

# **FISIOPATOLOGIA DE LA CÈL·LULA ENDOTELIAL EN LA CIRROSI HEPÀTICA**

Memòria presentada per

**SÒNIA TUGUES I SOLSONA**

per optar al títol de Doctora en Bioquímica

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Manuel Morales Ruiz**, en el Servei de  
Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona

Sònia Tugues Solsona

Dr. Manuel Morales Ruiz  
Director

Dr. Vicente Arroyo Pérez  
Tutor

Tesi inscrita en el programa de doctorat Biopatologia en Medicina  
Departament de Medicina, Facultat de Medicina



## ABREVIACIONS

ACTH	Hormona adrenocorticotròpica
ADH	Hormona antidiurètica
ALT	Alanina transaminasa
AM	Adrenomedulina
AMPK	Cinasa d'adenosina monofosfat
Ang	Angiopietina
Ang-II	Angiotensina-II
AVP	Vasopressina
$\alpha$ -SMA	Actina de múscul llis- $\alpha$
BDL	Lligadura del conducte biliar
Cav-1	Caveolina-1
CAM	Membrana corioalantoica
CaMKII	Cinasa II del complex Calci-Calmodulina
CCl <sub>4</sub>	Tetraclorur de carboni
CEs	Cèl·lules endotelials
CEsS	Cèl·lules endotelials sinusoidals
cGMP	guanosina 3',5' monofosfat cíclica
CHEs	Cèl·lules hepàtiques estel·lades
CKs	Cèl·lules de Kuppfer
CMLLs	Cèl·lules musculars llises
CO	Monòxid de carboni
DMNA	Dimetilnitrosamina
ECM	Matriu extracel·lular
EDRF	Factor relaxant derivat de l'endoteli
EGF	Factor de creixement epidèrmic
eNOS	Sintasa endotelial de l'òxid nítric
EPCs	Cèl·lules endotelials progenitores
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavina adenina dinucleòtid
FAK	Cinasa d'adhesions focals

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Factor de creixement de fibroblasts
FITC	Fluoresceïna isotiocianat
FMN	Flavina mononucleòtid
FN	Fibronectina
GFAP	Proteïna àcida glial fibrilar
GRK2	Proteïna cinasa-2 acoblada a receptor proteïna G
GSK3	Cinasa de la glicogen sintasa 3
GTP	Guanosina trifosfat
HIF-1 $\alpha$	Factor induïble per hipòxia-1 $\alpha$
HGF	Factor de creixement d'hepatòcits
HUVEC	Cèl·lules endotelials humanes de cordó umbilical
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular-1
IGF-1	Factor de creixement d'insulina-1
IL	Interleuquina
IFN- $\gamma$	Interferó- $\gamma$
JNK	Proteïna cinasa c-jun N-terminal
LDH	Lactat deshidrogenasa
LDL	Lipoproteïna acetilada de baixa densitat
LFA-1	Molècula associada a la funció dels leucòcits-1
LPS	Lipopolisacàrid
LSECTin	Lectina tipus C específica de fetge i endoteli de nòduls limfàtics
L-SIGN	Lectina específica de fetge i nòduls limfàtics d'unió a ICAM-3
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens
MCP-1	Factor quimioattractant de monòcits-1
MEK	Proteïna cinasa específica de meiosi
MMP	Metal·loproteïnasa
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
mTOR	Complex diana de rapamicina de mamífers
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
Np	Neuropilina
NO	Òxid nítric

NOS	Sintasa de l'òxid nítric
OVVs	Orgànuls vesículo-vacuolars
PAI	Inhibidor de l'activador del plasminògen
PAF	Factor activador de plaquetes
PAK	Proteïna cinasa activada per p21
PBE	Peritonitis bacteriana espontània
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PECAM-1	Molècula d'adhesió de cèl·lules endotelials i plaquetes-1
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PKA	Proteïna cinasa A
PKG	Proteïna cinasa G
PH	Plextrina
PLC- $\gamma$	Fosfolipasa C- $\gamma$
PHLPP	Proteïna fosfatasa amb dominis rics en leucina
PP	Pressió portal
PP2A	Proteïna fosfatasa 2A
PTEN	Proteïna fosfatasa supressora de tumors
PVL	Lligadura parcial de la vena porta
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa
PLGF	Factor de creixement de placenta
ROS	Radicals lliures d'oxigen
RT	Retrotranscripció
$\alpha$ -SMA	Actina de múscul llis- $\alpha$
S1-P	Esfingosina 1-fosfat
SHIP	Fosfatasa 5' inositol que conté dominis SH2
sGC	Guanilat ciclasa soluble
TAA	Tioacetamida
TGF	Factor de creixement transformant
TF	Factor tissular
TIMP	Inhibidor de les metal·loproteïnases
TIPS	Derivació transjugular intrahepàtica portosistèmica

TNF- $\alpha$	Factor de necrosi tumoral- $\alpha$
TSC-2	Complex d'esclerosi tuberós-2
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides
TXA <sub>2</sub>	Trombroxà A <sub>2</sub>
uPA	Activador del plasminògen
VCAM-1	Molècula d'adhesió a cèl·lules vasculars-1
VE-Caderina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de creixement endotelial vascular
VPF	Factor de permeabilitat vascular
vWf	Factor de von Willebrand

# Índex





# **INTRODUCCIÓ**

## **I. CIRROSIS HEPÀTICA.**

1.- Definició. Aspectes generals	1
2.- Alteracions intrahepàtiques: inflamació i fibrosi	2
2.1. Inflamació hepàtica i dany hepàtic	2
2.2. Reparació del dany tissular i fibrosi hepàtica	4
3.- Alteracions hemodinàmiques	8
3.1. Hipertensió portal	8
3.2. Hemodinàmica esplàcnica i sistèmica: circulació hiperdinàmica	10
4.- Formació d'ascitis en la cirrosi	12
5.- Models animals de cirrosi	15

## **II. LA CÈL·LULA ENDOTELIAL.**

1.- Característiques generals	16
1.1. Estructura de les cèl·lules endotelials	17
1.2. Heterogeneïtat funcional de les cèl·lules endotelials	18
2.- Paper de les CEs en la inflamació	20
3.- Regulació del to vascular	22
3.1. L'òxid nítric (NO)	22
3.1.1. Característiques funcionals i accions biològiques	22
3.1.2. Sintases de l'òxid nítric: Regulació	24
3.2. Akt (PKB)	27
3.3. Paper fisiopatològic del NO en la cirrosi	30
4.- Neovascularització i angiogènesi	33
4.1. Factors proangiogènics	35
4.1.1. La família de VEGF	35
4.1.1.1. Receptors de VEGF	36
4.1.1.2. Funcions de VEGF	39
4.1.1.3. PlGF	40
4.1.1.4. VEGF-C i VEGF-D	41

4.1.2. Les angiopoietines	41
4.1.2.1. Angiopoietina-1	42
4.1.2.2. Angiopoietina-2	43
4.1.2.3. Tie-2	44
4.1.3. PDGF	45
4.1.4. Hipòxia	46
4.1.5. Altres factors proangiogènics	47
4.2. Angiogènesi i inflamació	49
4.3. Inhibició de l'angiogènesi	51
4.3.1. Inhibidors endògens	53
4.3.2. Inhibició de VEGF	53
4.3.3. Altres inhibidors d'angiogènesi	55
4.3.4. Compostos sintètics inhibidors de RTKs	55
5.- La circulació hepàtica	58
5.1. Cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques	59
5.1.1. Característiques generals	59
5.1.2. Les CESs en condicions patològiques	62

## **OBJECTIUS** 64

## **RESULTATS**

- Article 1.** La transducció hepàtica d'un mutant constitutivament actiu d'Akt normalitza la pressió portal en rates cirròtiques. 66  
*Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats.*

<b>2. Article 2.</b> L'ascitis provinent de pacients cirròtics indueix angiogènesi a través de la via de senyalització de la fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt. <i>Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3- kinase/Akt signaling pathway.</i>	69
<b>3. Article 3.</b> Anàlisis de l'expressió gènica diferencial de l'endoteli hepàtic de rates cirròtiques mitjançant microarrays. <i>Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in livers of cirrhotic rats.</i>	72
<b>4. Article 4.</b> El tractament antiangiogènic amb Sunitinib millora l'infiltrat inflamatori, la fibrosi i la pressió portal en rates cirròtiques. <i>Antiangiogenic treatment with Sunitinib, ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats.</i>	77
<b>DISCUSSIÓ</b>	82
<b>CONCLUSIONS</b>	94
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	96
<b>AGRAÏMENTS</b>	



# **Introducció**



## **I. CIRROSI HEPÀTICA:**

### **1. DEFINICIÓ. ASPECTES GENERALS.**

La cirrosi hepàtica és una de les malalties del fetge amb més prevalència i incidència al nostre país. Als Estats Units, la cirrosi és la causa no neoplàstica més comuna de mort dins del grup de malalties digestives i hepatobiliars, ja que pot causar 30.000 morts a l'any, a les quals cal sumar 10.000 morts més per hepatocarcinoma derivat, en la majoria de casos, d'una cirrosi establerta (Friedman, 2003).

La cirrosi es pot definir com l'estadi final d'una hepatopatia crònica on té lloc un procés difós caracteritzat per fibrosi i la conversió de l'arquitectura normal del fetge en nòduls estructuralment anòmals (Anthony et al., 1978). Des de l'inici de la malaltia fins que la lesió progressa, apareix insuficiència hepàtica i hipertensió portal, que són els responsables de les principals complicacions de la cirrosi: acumulació de fluid a la cavitat abdominal (ascites), sangrat per varius, PBE, síndrome hepatorenal, desordres en la coagulació sanguínia, icterícia i encefalopatia hepàtica. Si la cirrosi no té cap d'aquestes complicacions s'anomena compensada, la qual en un 30-40% dels casos és asimptomàtica. La cirrosi amb una o més complicacions mencionades anteriorment rep el nom de cirrosi descompensada (Conn and Atterbury, 1987).

L'etiologia de la cirrosi és molt variada. Així doncs, en l'edat adulta la majoria de les cirrosi hepàtiques són causades pel consum excessiu d'alcohol (40%) i per infecció crònica dels virus de l'hepatitis C (40%) o de l'hepatitis B (10%). Causes menys freqüents són l'esteatohepatitis no alcohòlica, desordres metabòlics (hemocromatosis, malaltia de Wilson, deficiència d'alfa-1-antitripsina, glucogenòlisi tipus IV, galactosèmia), malalties biliars intra i extrahepàtiques, obstruccions del flux venós (malaltia veno-oclusiva i síndrome de Budd-Chiari) i la toxicitat produïda per toxines o altres fàrmacs terapèutics (Anthony et al., 1978).

Els tractaments actuals per la cirrosi es limiten a fer front als estímuls causants de la malaltia i a tractar les complicacions derivades. Així doncs, molts tractaments actuals per la cirrosi consisteixen en una restricció de sodi, tractament amb diürètics i completa abstinència de l'alcohol. Els pacients amb líquid ascític ric en leucòcits reben profilaxi contra la PBE amb antibiòtics i albúmina, mentre que els pacients amb hemorràgia gastrointestinal i varius establertes requereixen tractament amb agents beta-

bloquejants. Per altra banda, el TIPS ha estat un tractament efectiu per reduir la hipertensió portal i millorar el síndrome hepatorenal. En el cas concret de l'hepatitis viral, s'intenta eradicar el virus utilitzant interferó, ribavirina i lamivudina, mentre que per l'encefalopatia hepàtica s'utilitza lactulosa per tal de millorar l'estat mental. No obstant, tot i els nombrosos tractaments esmentats, durant l'estadi final de la cirrosi, l'opció més efectiva continua sent el trasplantament, amb un 75% de supervivència al cap de 5 anys. Tot i això, en pacients amb cirrosi induïda pel virus de l'hepatitis C, la infecció viral torna a aparèixer després del trasplantament donant lloc a una hepatitis crònica que pot progressar a cirrosi. A més, la poca disponibilitat d'òrgans, el gran nombre de llistes d'espera i els problemes de compatibilitat fan que urgeixi la necessitat d'explorar noves dianes terapèutiques que tendeixin a millorar el tractament d'aquesta patologia (Heidelbaugh and Sherbondy, 2006; Iredale, 2003).

## **2. ALTERACIONS INTRAHEPÀTIQUES: INFLAMACIÓ I FIBROSI.**

### **2.1. Inflamació hepàtica i dany hepàtic.**

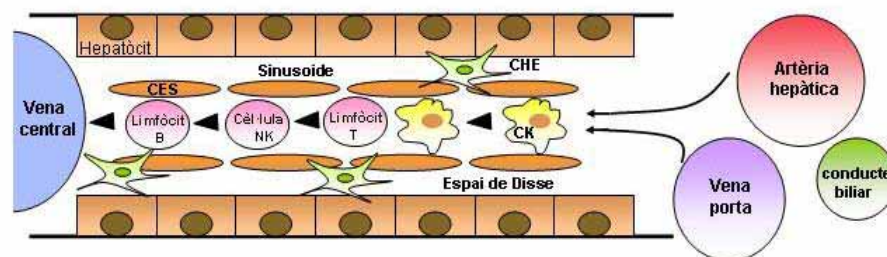
Com ja s'ha comentat anteriorment, en la cirrosi hepàtica es produeix una completa desestructuració de l'arquitectura normal del fetge que acaba donant lloc a insuficiència hepàtica i trastorns hemodinàmics greus. En resposta al dany hepatocel·lular, el fetge desencadena una resposta inflamatòria per tal de reparar el teixit. Aquest procés és dinàmic i, si no es resol adequadament i es perpetua en el temps, es desencadena un fenomen anomenat fibrosi. En aquest context, diversos estudis amb models animals i humans han demostrat una correlació entre l'activitat inflamatòria i la fibrosi (Iredale, 2007).

Les cèl·lules inflamatòries residents o reclutades al fetge inicien la resposta inflamatòria del fetge enfront el dany hepàtic. Aquest infiltrat inflamatori inclou limfòcits T, limfòcits B, histiòcits (granuloma), eosinòfils, neutròfils, macròfags, cèl·lules NK i mastòcits (figura 1). Els macròfags residents al fetge o CKs són considerats macròfags residents al fetge originaris de la mèdula òssea i representen d'un 15% a un 20% de les cèl·lules no parenquimals del fetge i un 50% de tots els macròfags tissulars de l'organisme. Alguns dels seus activadors més potents són el LPS i IFN $\gamma$  (Oda, 2004; Wisse et al., 1996). A causa de la seva localització, aquestes cèl·lules



poden aclarir endotoxines de la sang, fagocitar restes cel·lulars i microorganismes i estimular la síntesi i la deposició de ECM mitjançant l'activació de les cèl·lules mesenquimals per part d'algunes citocines com TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ , intermediaris actius d'oxigen i peròxids lipídics. Com a resultat de la seva activació, aquestes cèl·lules secreten radicals d'oxigen, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i eicosanoids (Song et al., 2000). A més, els macròfags expressen els lligands CD95L i TNF- $\alpha$ , fet que suggereix que l'apoptosi mediada pels receptors de la mort (CD95R i TNFR) contribuirien també a la inflamació hepàtica i a la fibrosi (Ramadori and Saile, 2004; Racanelli and Rehermann, 2006).

Els hepatòcits també poden contribuir al procés inflamatori, ja que poden respondre directament a LPS i a altres citocines proinflamatòries secretades per les CKs. En aquest context, LPS indueix l'activació de NF- $\kappa$ B que dona lloc a la inducció de diverses proteïnes de fase aguda i a la NOS induïble. A més, els hepatòcits expressen els receptors de TNF i IL-1 que participen en el dany hepàtic mitjançant l'activació de la via de les caspases involucrada en apoptosi i necrosi (Liu et al., 2002; Monshouwer and Hoebe, 2003).



**Figura 1.** Tipus cel·lulars residents al fetge (figura adaptada de Racanelli and Rehermann, 2006).

Les cèl·lules NK també són importants per la resposta inflamatòria a nivell hepàtic. La supervivència d'aquest tipus cel·lular depèn de les CKs, que secreten les interleuquines IL-12 i IL-18, capaces de regular la diferenciació i l'expansió d'aquestes cèl·lules. Un cop activades, les cèl·lules NK secreten grans quantitats de la molècula antiviral IFN- $\gamma$  i s'encarreguen de destruir els virus i cèl·lules malignes establint un balanç local en la producció de citocines proinflamatòries (Th1) i antiinflamatòries (Th2) (Ahmad and Alvarez, 2004).

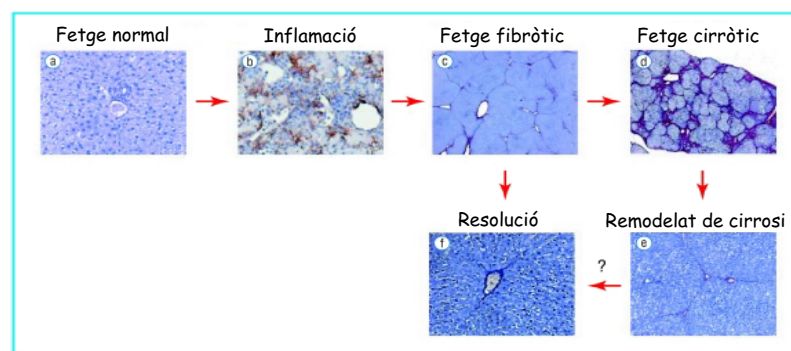
Els neutròfils són un tipus cel·lulars característic d'una inflamació aguda, tot i que també són presents en l'infiltrat inflamatori d'una malaltia hepàtica crònica, ja que l'extravasació i transmigració de neutròfils al teixit hepàtic és crítica pel dany i la citotoxicitat induïda per neutròfils. Les quimioquines expressades pels hepatòcits després d'un dany hepàtic induït per endotoxines estan involucrades en el reclutament extravascular d'aquest tipus cel·lular (Jaeschke and Hasegawa, 2006; Stramer et al., 2007).

Finalment, diversos estudis han demostrat que tant els limfòcits B com els T poden regular el procés fibròtic característic de la cirrosi. Tot i que el paper d'aquestes cèl·lules en les malalties hepàtiques encara no està ben descrit, hi ha evidències que suggereixen un rol dels limfòcits T en el dany hepàtic mitjançant l'activació de CKs a produir TNF- $\alpha$ . Altres estudis demostren que l'activació de les cèl·lules T per part dels antigens hepàtics induïx tolerància i no immunitat. Per altra banda, se sap que la resposta a la infecció hepàtica per paràsits, caracteritzada com una resposta de les cèl·lules Th2, acaba donant lloc a un procés de fibrosi progressiva (Iredale, 2007; Racanelli and Rehermann, 2006).

## **2.2. Reparació del dany tissular i fibrosi hepàtica.**

La fibrosi hepàtica és un procés dinàmic que constitueix una resposta de reparació molt ben regulada enfront el dany hepàtic crònic. Aquest procés de remodelat tissular dóna lloc a canvis en la formació, la composició i la degradació de la ECM del fetge. Com a conseqüència, es secreta un excés de ECM que s'acumula en la zona perisinusoidal que provoca l'aparició de barreres de difusió a l'oxigen i nutrients. Si el dany hepàtic perdura i el procés esdevé crònic, les diferents fases d'inflamació es repeteixen i el procés de regeneració hepàtica i la degradació de la ECM no poden contrarestar el procés de síntesi. Aquest fenomen es pot agreujar amb la necrosi hepatocel·lular que, a la vegada, actua d'estímul per la formació de més ECM, establint un cercle viciós que, en últim terme, dóna lloc a l'aparició de pseudolòbuls que alteren totalment l'estructura del parènquima hepàtic. En aquest moment, el fetge es veu incapaç de dur a terme les seves principals funcions que inclouen detoxificació, síntesi proteica i resposta immune. Aquesta fase final és la coneguda com a cirrosi (Gutierrez-Ruiz and Gomez-Quiroz, 2007; Iredale, 2003). Tot i que la cirrosi hepàtica s'ha

considerat històricament com un procés passiu i irreversible, alguns estudis apareguts el 1970 ja van suggerir que la fibrosi hepàtica constituïa un procés potencialment reversible. En aquest context, quan el dany hepàtic és agut o l'agent es retira en una etapa de fibrosi, té lloc un procés clàssic de cicatrització que permet un procés de regeneració normal del teixit retornant a una arquitectura hepàtica gairebé normal. Si es retira l'agent que provoca el dany hepàtic quan ja s'ha progressat a l'etapa de cirrosi, el fetge pot dur a terme un procés de remodelat de matriu fibrilar donant lloc a una cirrosi atenuada (Figura 2) (Iredale, 2003; Muddu et al., 2007).



**Figura 2.** Fisiopatologia de la fibrosi hepàtica (figura adaptada de Iredale, 2003).

El procés de fibrosi hepàtica està associat a alteracions importants en la ECM, tant de caràcter qualitatiu com quantitatiu. Aquesta matriu està formada per diferents macromolècules que inclouen fibril·les de col·làgens (I, III i IV), fibronectina, elastina, laminina, hialuronan, glicoproteïnes, glicosaminoglicans i proteoglicans, que tenen com a principal funció la de suport estructural del fetge. En un fetge normal, aquest espai conté una membrana basal de baixa densitat com a matriu, que és essencial per mantenir la funció de diferenciació de tots els tipus cel·lulars residents al fetge. A mesura que el fetge esdevé fibròtic, tenen lloc diferents canvis en la composició de la ECM. D'aquesta manera, el contingut total dels diferents components de la ECM augmenten de 3 a 5 vegades, no només a causa de un increment en la síntesi, sinó també a una disminució de la degradació (Friedman, 2000).

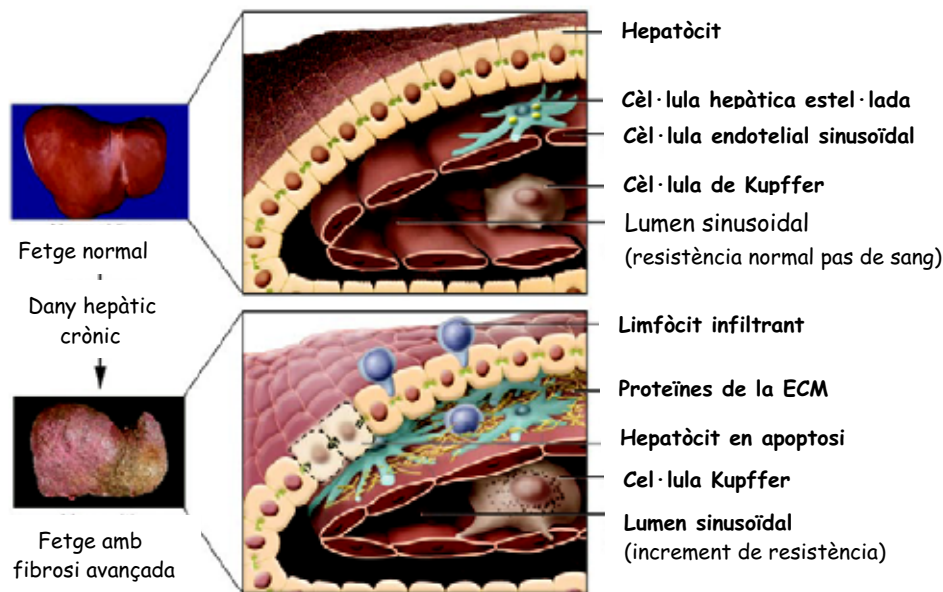
Nombroses evidències experimentals donen suport a la hipòtesi que el procés de fibrosi és mediat, en gran part, per les CHEs. Les CHEs van ser descrites per primera vegada per Ito i Nemoto al 1952 i, tal com ja s'ha comentat anteriorment, van ser anomenades cèl·lules de reserva de grassa, ja que contenen uns cossos lipídics que

constitueixen el major dipòsit de vitamina A. Més tard, al 1971, Wake va demostrar que aquestes cèl·lules eren les mateixes cèl·lules perisinusoidals localitzades a l'espai de Disse que havien estat identificades com a cèl·lules hepàtiques estel·lades el 1876 per Wilhelm Kupffer. En els últims anys, s'ha establert un acord generalitzat per anomenar-les CHEs (Enzan et al., 1997).

Després d'un dany hepàtic crònic, les CHEs duen a terme un procés d'activació, que implica una transició de la forma quiescent a la forma activada, on adquireixen característiques de miofibroblasts. Aquest procés de transdiferenciació fa que aquestes cèl·lules esdevinguin contràctils, proinflamatòries i fibrogèniques. Així doncs, les CHEs activades canvien el seu patró d'expressió gènica i s'acumulen als llocs de reparació tissular, secretant grans quantitats d'ECM i regulant la seva degradació. A més, la velocitat de proliferació de les CHEs s'incrementa després de la seva activació, amplificant així el número de cèl·lules fibrogèniques presents en el fetge (figura 3) (Pinzani et al., 2005).

Diversos estudis han mostrat que dos factors de creixement són els principals responsables del paper profibrogènic de les CHEs. En primer lloc, el factor de creixement PDGF, principalment produït per les CKs i les CEs, és el principal factor mitogènic i quimiotàctic per aquest tipus cel·lular. Per altra banda, la citoquina profibrogènica TGF- $\beta$ , que actua sobre les CHEs activades induint l'acumulació progressiva de la ECM, així com la inhibició de la seva degradació (Gong et al., 1998; Marra et al., 1994). Altres factors que medien la fibrosi hepàtica són reguladors de l'apoptosi o necrosi com Bcl-xL o Fas, reguladors de la resposta inflamatòria com les interleuquines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  o osteopontina, substàncies vasoactives com Ang-II, norepinefrina o ET-1, adipoquines com la leptina o l'adiponectina i enzims que generen ROS com la NADPH oxidasa (Bataller et al., 2003; Gutierrez-Ruiz and Gomez-Quiroz, 2007; Henderson and Iredale, 2007).

Les CHEs quiescents expressen marcadors característics d'adipòcits (PPAR $\gamma$ , SREBP-1c i leptina), mentre que, quan estan activades, expressen marcadors miogènics ( $\alpha$ -SMA, c-myb, miosina o desmina), alguns marcadors neuroendocrins (reelina, nestina, neurotrofines, sinaptofisina, i GFAP) i receptors de neurotransmissors (Alcolado et al., 1997; Bataller and Brenner, 2005).



**Figura 3.** Fenòmens sinusoidals durant la fibrosi hepàtica (figura adaptada de Bataller and Brenner, 2005).

Durant la fibrosi hepàtica, té lloc una interacció complexa entre els diferents tipus cel·lulars residents al fetge. En primer lloc, els hepatòcits són la primera diana dels agents hepatotòxics, incloent el virus de l'hepatitis, metabolits de l'alcohol i àcids biliars. Els hepatòcits danyats alliberen ROS i mediadors fibrogènics i indueixen el reclutament de cèl·lules de l'infiltrat inflamatori. Com ja s'ha comentat, aquestes cèl·lules, conjuntament amb altres tipus cel·lulars hepàtics, estimulen i activen les CHES, que secreten un excés de ECM, quimioquines inflamatòries i molècules d'adhesió cel·lular. Cal dir que els propis components de la ECM poden estimular la fibrogènesi directament. Així doncs, el col·lagen tipus IV o el fibrinògen indueixen les CHES activant citoquines latents com el TGF- $\beta$ . D'aquesta manera, s'estableix un cercle viciós on les cèl·lules inflamatòries i fibrogèniques s'estimulen entre elles perpetuant el procés de fibrosi hepàtica (Iredale, 2003).

Pel que fa al tractament de la fibrosi, cal dir que la intervenció més efectiva consisteix en la retirada de l'agent inductor del procés. Tot i la millora en el coneixement dels mecanismes que condueixen al procés de fibrosi, encara no hi ha cap substància que hagi estat aprovada com a agent antifibrogènic en humans. Donat que el procés inflamatori precedeix i promou la progressió de la fibrosi hepàtica, s'ha proposat l'ús de medicaments antiinflamatoris. Una altra estratègia consisteix en la inhibició de

l'acumulació de CHEs activades modulant tant la seva activació com l'apoptosi. En aquest context, els antioxidants com la vitamina E, la fosfatidilcolina o la S-adenosil-L-metionina, són capaços d'inhibir l'activació de les CHEs protegint els hepatòcits del procés d'apoptosi. Altres aproximacions consistirien en la inhibició de la síntesi de TGF- $\beta$  o la seva via de senyalització, l'administració d'alguns factors de creixement com IGF o HGF, la inhibició dels sistema renina-angiotensina, l'administració de lligands de PPAR $\alpha$  o PPAR $\gamma$ , el bloqueig d'ET-1 i dels seus receptors, l'administració de vasodilatadors, la infusió de cèl·lules mesenquimals progenitores o l'administració de MMPs, entre altres. Una limitació important dels agents antifibròtics és que no afecten les CHEs activades de manera eficient i provoquen efectes secundaris no desitjats. D'aquesta manera, l'administració d'aquestes substàncies de manera específica sobre les CHEs podria resoldre aquest problema (Bataller et al., 2003; Cho et al., 2000; Jonsson et al., 2001; Paizis et al., 2001; Ramalho et al., 2002; Wei et al., 2000).

Dins d'aquest context, cal destacar que les CKs han mostrat diferents funcions enfront la reparació tissular i la fibrosi hepàtica. En aquest context, la supressió de macròfags durant la progressió de la fibrosi hepàtica va mostrar efectes antifibròtics. En canvi, si els macròfags s'eliminaven durant la fase de resolució de la resposta inflamatòria tenia lloc un excés de ECM (Duffield et al., 2005).

### **3. ALTERACIONS HEMODINÀMIQUES.**

#### **3.1. Hipertensió portal.**

La hipertensió portal és la manifestació clínica més freqüent en la cirrosi hepàtica. Es caracteritza per l'augment patològic de la pressió hidrostàtica en el territori venós portal per sobre del seu interval de normalitat d'1-5mmHg, la qual cosa origina la formació d'una xarxa extensa de vasos col·laterals que deriven part del flux sanguini portal cap a la circulació sistèmica i impedeixen el seu pas a través del fetge. Com a conseqüència d'aquest síndrome, poden aparèixer algunes de les complicacions més importants de la cirrosi com són les varius gastroesofàgiques o l'ascites (Abraldes and Bosch, 2002).

Com en qualsevol sistema hidrodinàmic, la PP ve determinada per la relació entre el flux sanguini portal i la resistència que s'oposa a aquest flux. Aquesta relació es defineix per la llei d'Ohm en l'equació:

$$P1 - P2 = Q \times R$$

Si s'aplica al sistema portal, P1- P2 correspon al gradient de PP de perfusió hepàtica que fa referència a la diferència entre la pressió de la vena porta i la de la vena cava inferior; Q correspon al flux sanguini de tot el sistema venós portal i R es refereix a la resistència vascular exercida pel sistema venós portal, per les venes col·laterals i pel mateix fetge. Així doncs, l'increment de la PP es produeix com a resultat de dos fenòmens: l'augment de les resistències vasculars hepàtiques i l'increment de flux sanguini portal provinent del sistema esplàncnic. En la majoria dels casos, el desenvolupament i el manteniment de la hipertensió portal és a causa d'una combinació d'ambdós mecanismes. El component de l'increment del flux sanguini portal esdevé especialment important en estats de cirrosi més avançats. Quan aquest fenomen té lloc de manera crònica en el temps, es formen derivacions portosistèmiques que acaben donant lloc a varius gastroesofàgiques que situen el pacient en un alt risc de sofrir una hemorràgia gastrointestinal (Bosch and Garcia-Pagan, 2000).

L'augment de la resistència vascular intrahepàtica té un component fix que fa referència a la distorsió de l'arquitectura de la microcirculació hepàtica a causa d'un excés de producció de la ECM, aparició de nòduls regeneratius, canvis en l'anatomia vascular sinusoïdal i trombosi vascular. Per altra banda, existeix també un component dinàmic que es produeix com a conseqüència del desequilibri entre els la secreció de substàncies vasoconstrictores i els fenòmens de contracció per part de les CMLs i les CHEs i la secreció de substàncies vasoactives per part de les cèl·lules del sinusoide hepàtic (CHEs, CESs i CKs). Tot i que és difícil precisar quina és la contribució específica de cada un d'aquests dos components, s'ha vist que la pressió portal es pot reduir d'un 20% a un 30% amb agents farmacològics que redueixen la resistència vascular intrahepàtica (Rockey, 2003).

Així doncs, en un fetge normal, els agents vasoconstrictors (principalment ET-1, Ang-II, norepinefrina, AVP, etc.) i vasodilatadors (NO i algunes prostaglandines)

estan equilibrats. No obstant, després del dany hepàtic, aquest equilibri es desplaça i s'incrementa la producció d'agents vasoconstrictors (ET-1), al mateix temps que disminueix la síntesi de substàncies vasodilatadores (NO). Aquest fenomen, en un context de contractilitat exagerada de les CHEs, acaba provocant un augment de la resistència sinusoïdal intrahepàtica. Tot i que els principals factors responsables d'aquesta endotelopatia són l'ET-1 i el NO, hi ha altres factors vasoactius que hi juguen un paper important, entre els quals cal destacar l'angiotensina II, la trombina, la AVP, la  $\text{PGF2}\alpha$ , el  $\text{TXA}_2$ , la substància P, l'adenosina, les catecolamines i el PAF entre els agents que provoquen contracció i, el CO, la  $\text{PGE}_2$  i l'AM com a substàncies vasodilatadores (Rockey, 2001).

L'augment del flux sanguini portal és el resultat d'una marcada vasodilatació arterial en els òrgans esplàcnics que drenen el sistema venós portal. L'increment del flux portal representa un fenomen multifactorial que involucra mecanismes neurogènics, humorals i locals. Els primers estudis realitzats a determinar les causes responsables de l'augment del flux portal feien referència al paper dels vasodilatadors circulants, entre els quals cal destacar el glucagó, àcids biliars, NO, prostaciclina, neuropèptids, adenosina, endotoxina i altres hormones gastrointestinals (Benoit et al., 1985). En aquest context, molts tractaments per la hipertensió portal van dirigits a corregir l'increment de flux portal mitjançant vasoconstrictors esplàcnics, entre els quals cal destacar els agents beta-bloquejants no selectius (el propranolol, el nadolol i el timolol), la vasopressina (el seu ús clínic és controvertit a causa dels efectes adversos que té sobre la circulació sistèmica), la terlipressina (anàleg sintètic de la vasopressina que és bastant efectiva per controlar el sangrat i reduir la mortalitat), la somatostatina (redueix el flux portal i col·lateral a causa de la inhibició dels pèptids vasodilatadors esplàcnics com el glucagó) i l'octreotida i lanreotida (octapèptids cíclics anàlegs de la somatostatina però amb una vida mitjana més llarga (Thabut and Bernard-Chabert, 2007).

### **3.2. Hemodinàmica esplàcnica i sistèmica: circulació hiperdinàmica.**

Al 1953 Kowalski i Abelman van descriure per primera vegada el síndrome de circulació hiperdinàmica en pacients amb cirrosi hepàtica, caracteritzat per una marcada reducció de les resistències vasculars sistèmiques, hipotensió arterial, hipervolemia i



augment del batec i de la despesa cardíaca, donant com a resultat un increment del flux sanguini per unitat de temps. El síndrome de la circulació hiperdinàmica és conseqüència de la conjunció de dos fenòmens fisiopatològics: la vasodilatació de la circulació perifèrica i esplàcnica i l'expansió del volum plasmàtic. Així doncs, el to vascular anòmal en diferents territoris complica la cirrosi hepàtica donant lloc a conseqüències clíniques diferents i molt rellevants (Blendis and Wong, 2001).

La vasodilatació perifèrica té un paper molt important en l'activació dels sistemes neurohumorals endògens, ja que provoca una disminució del volum arterial sanguini efectiu que condueix a l'activació del sistema nerviós simpàtic i de l'eix renina-angiotensina-aldosterona, juntament amb l'alliberament de l'hormona ADH. Aquests mecanismes compensatoris regulen la retenció de sal i aigua amb la subseqüent expansió del volum plasmàtic. Malgrat aquestes mesures compensatòries, la vasodilatació progressa i es desenvolupa un estat circulatori hiperdinàmic caracteritzat per una despesa cardíaca elevada, una disminució de la pressió arterial sistèmica, edema perifèric i la formació d'ascites (figura 4). Aquestes complicacions són multifactorials i tenen lloc en diferents territoris vasculars. Així doncs, en la circulació renal, les etapes inicials de l'estat de circulació hiperdinàmica estan marcades per una vasodilatació arterial aferent que preserva la perfusió renal i la pressió del filtrat glomerular. No obstant, a mesura que la vasodilatació empitjora, la pressió de perfusió renal baixa i la vasoconstricció arteriolar pot conduir al desenvolupament de la disfunció renal (síndrome hepatorenal). En la circulació pulmonar, també s'observa vasodilatació arteriolar juntament amb un increment del flux sanguini i el desenvolupament de derivacions arteriovenoses, donant lloc a un intercanvi de gasos deficient. En una proporció petita dels casos, això acaba en un fenomen d'hipòxia severa resistent a la suplementació amb oxigen (síndrome hepatopulmonar). Així doncs, un to vascular anòmal és el responsable de la majoria de complicacions observades en la cirrosi (Arroyo and Jimenez, 2000; Hoefs, 1999; Iwakiri and Groszmann, 2006).

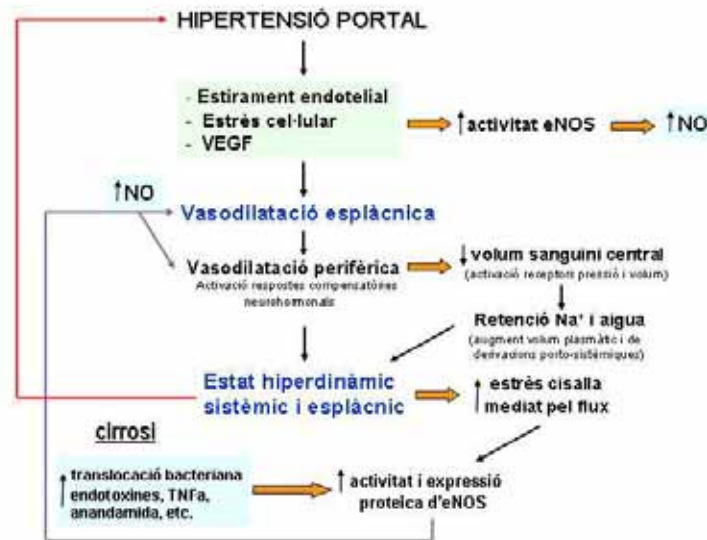


Figura 4. Mecanismes de la circulació hiperdinàmica (figura adaptada de Iwakiri and Groszmann, 2006).

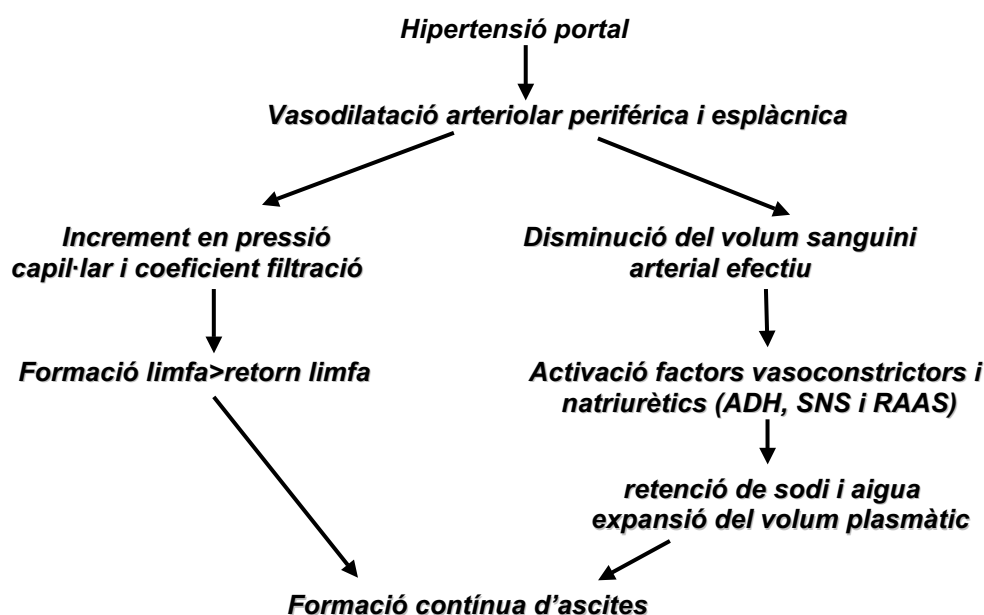
#### 4. FORMACIÓ D'ASCITES EN LA CIRROSI

L'ascites és una de les complicacions més freqüents de la cirrosi. En els pacients cirròtics compensats, l'ascites es desenvolupa al cap de 5 anys amb una freqüència del 30%. Un cop ha aparegut l'ascites, la taxa de supervivència a un any és del 50%, mentre que en els pacients amb cirrosi compensada és del 90% (Garcia-Tsao, 2001).

El líquid ascític es forma a partir d'un excés de fluïd proteic que es localitza a la cavitat peritoneal, sobrepasant el volum màxim que se situa en 25 ml. La concentració proteica total del líquid ascític oscil·la entre 0,5 i més de 6 g./dl. i està formada majoritàriament per albúmina i globulines, que representen del 45 al 55% de la concentració proteica total. Aquest fet indica que les proteïnes del líquid ascític en la cirrosi provenen de capil·lars amb porus grans com els dels sinusoides hepàtics. A més, un 99% de proteïnes del líquid ascític deriven del plasma per filtració. A part de les proteïnes esmentades, en el líquid ascític hi trobem un component cel·lular format per cèl·lules mesotelials descamades de la superfície peritoneal, eritròcits i leucòcits, dels quals aproximadament un 70% són leucòcits mononuclears (Arroyo, 1999a).

A causa de la seva composició relativament simple, clàssicament s'ha considerat que l'ascites té poca influència sobre les anomalies hemodinàmiques i renals que s'observen en els pacients cirròtics. No obstant, existeixen diferents estudis demostren que l'ascites dels pacients cirròtics conté quantitats significatives de citocines proinflamatòries, factors vasoactius i agents proliferatius, entre altres (Cejudo-Martin et al., 2001; Cejudo-Martin et al., 2002; Jimenez et al., 1999; Perez-Ruiz et al., 1999; Pruijboom et al., 1995).

La teoria més actual que explica la seva formació va ser proposada per Schrier al 1988. Aquesta teoria suggereix que la patologia de l'ascites es pot explicar a partir dels canvis en la circulació arterial induïts per la hipertensió portal. La hipòtesi considera que l'acumulació de fluïd a la cavitat abdominal és conseqüència de la vasodilatació arteriolar a l'àrea esplàcnica. En pacients amb cirrosi compensada, el grau d'hipertensió portal i de vasodilatació esplàcnica és moderat. En aquest cas, el fet de no poder emplenar la vasculatura arterial es pot compensar amb un increment del volum plasmàtic i de la despesa cardíaca. A més, el sistema limfàtic és capaç de retornar l'increment moderat de limfa produït a la circulació sistèmica, fet que evita el pas de fluïd cap a la cavitat abdominal. A mesura que la cirrosi progressa, la hipertensió portal i la resistència vascular esplàcnica s'intensifiquen, arribant a un punt crític quan el retorn de limfa, l'índex cardíac o el volum plasmàtic no poden compensar les conseqüències de la vasodilatació arteriolar esplàcnica. En aquest moment, el manteniment de la pressió arterial requereix l'activació persistent dels sistemes renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nerviós parasimpàtic i l'hormona ADH, que produeixen una retenció contínua d'aigua i sodi. El fluïd retingut, però, no és capaç d'emplenar l'arbre vascular dilatat, ja que s'escapa del compartiment intravascular a causa de un desequilibri entre l'excessiva producció de limfa i l'habilitat del sistema limfàtic de retornar-la a la circulació sistèmica. La conseqüència final d'ambdós desordres és el pas continu de fluïd a la cavitat abdominal i la formació d'ascites (figura 5) (Arroyo and Jimenez, 2000; Arroyo, 1999a; Arroyo, 1999b).



**Figura 5.** Fisiopatologia de la formació d'ascites.

El líquid ascític deriva del compartiment vacular hepatoesplàncic. Considerant l'anatomia del peritoneu i de la víscera abdominal, el líquid ascític provindria d'un excés de líquid intersticial extravasat del fetge i dels capil·lars esplàncics, que no pot ser drenat pels capil·lars limfàtics. En la cirrosi alcohòlica, s'ha demostrat que la màxima contribució a l'ascites prové del fetge (Levy, 1988).

Els pacients que presenten una quantitat moderada de líquid ascític són tractats amb diurètics, com l'espironolactona o l'amilorida i, en alguns casos, la furosemida. Quan el volum d'ascites està en excés, però, cal dur a terme una paracentesi i administrar els diurètics a dosis creixents. En un 5-10% dels pacients amb ascites, té lloc un fenomen d'ascites refractària, que consisteix en una falta de resposta a dosis elevades de diurètics, una recurrència de l'ascites després de la paracentesi i un risc elevat de síndrome hepatorenal. En aquests casos, l'estratègia terapèutica consisteix en repetides paracentesis de gran volum utilitzant expansors plasmàtics i, en alguns casos, l'ús de derivacions intrahepàtiques portosistèmiques (Gines et al., 2004).

## 5. MODELS ANIMALS DE CIRROSI

L'ús de models animals és molt important per l'estudi de les complicacions fisiopatològiques de la hipertensió portal i la cirrosi, ja que permeten un estudi raonable de diversos paràmetres que no es pot dur a terme en estudis amb humans.

Existeixen diferents models animals per l'estudi d'aquesta patologia que es poden classificar en models d'hipertensió portal prehepàtica i intrahepàtica. Dins del primer grup, cal destacar el model de PVL, que ha estat molt utilitzat en rates i ratolins per generar hipòtesis tant per caracteritzar la circulació sistèmica com esplàcnica. Tot i que en aquest model la hipertensió portal i la formació de vasos col·laterals es desenvolupa molt ràpidament, aquest fet no es correspon amb la majoria de situacions que tenen lloc en la pràctica clínica (Abralde et al., 2006).

Els models d'hipertensió portal intrahepàtica inclouen models d'hipertensió portal sinusoïdals com són el model de BDL i el model d'inducció a cirrosi per CCl<sub>4</sub>. El model de BDL, àmpliament utilitzat en rates, desenvolupa fibrosi-cirrosi al cap de 4-6 setmanes, però l'arquitectura hepàtica típica de la cirrosi és infreqüent. Aproximadament el 60% de les rates desenvolupen ascites. El principal desavantatge d'aquest model és, però, que no és adequat pels estudis farmacològics amb fàrmacs que s'eliminen a través de la ruta biliar.

El model de cirrosi induït per CCl<sub>4</sub>, àmpliament utilitzat en rates i també en ratolins, utilitza l'administració continuada de CCl<sub>4</sub> que indueix dany hepàtic crònic i cirrosi. Per aconseguir aquest model s'utilitzen diferents rutes d'administració oral, intraperitoneal i per inhalació. Segons el mètode utilitzat hi ha diferències entre el rendiment i el temps per arribar al procés de cirrosi. Generalment, de dotze a quinze setmanes després de l'administració de CCl<sub>4</sub>, les rates desenvolupen cirrosi micronodular, hipertensió portal, derivacions portosistèmiques (40-60%) i circulació hiperdinàmica. Si es manté de 12 a 20 setmanes, la majoria de rates desenvolupen ascites. El principal problema d'aquest model és la dificultat per obtenir un grup homogeni de rates cirròtiques a causa de la diferent sensibilitat de les rates al CCl<sub>4</sub> (Jimenez et al., 1992).

Altres models animals d'hipertensió portal sinusoïdal són la cirrosi induïda per TAA o per DMNA. La TAA és una toxina que s'administra amb l'aigua de beguda i intraperitoneal. Aquest model desenvolupa cirrosi macronodular amb hipertensió portal

en 12 setmanes. Aproximadament el 40% de les rates desenvolupen ascites. Contràriament al que passa amb el model de CCl<sub>4</sub>, la fibrosi es manté estable durant setmanes després de la retirada del TAA. Després de 18 setmanes d'administració de TAA, les rates desenvolupen colangiocarcinoma. La DMNA també és una hepatotoxina que indueix necrosi hepatocel·lular. Les rates desenvolupen fibrosi a les 5 setmanes, però la cirrosi amb ascites té lloc al cap de 13 setmanes. Aquest model s'utilitza molt poc, a causa de l'elevat potencial carcinogenètic de la DMNA (Laleman et al, 2006, Li et al, 2002).

Existeixen altres models animals que consisteixen en induir cirrosi a partir de la dieta, com l'administració de monocrotalina per via oral o l'esquistosomiasi (Abralde et al., 2006; Lee and Groszmann, 1999).

## **II. LA CÈL·LULA ENDOTELIAL.**

### **1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS**

Els vasos sanguinis són essencials per la distribució de nutrients i oxigen als teixits, així com per retirar-ne els productes residuals. Tots els vasos sanguinis comparteixen una sèrie de característiques comunes, tot i que el patró d'expressió gènica, la morfologia i la funció pot experimentar variacions en els diferents llits vasculars. La part interna dels vasos sanguinis està recoberta per una capa fina de CEs, que separen la sang dels teixits. Aquestes cèl·lules constitueixen un gran teixit metabòlic com és l'endoteli, que regula una gran varietat de respostes biològiques i funcions fisiològiques de l'organismes. A més, aquestes cèl·lules tenen una gran capacitat de síntesi i representen una gran part de la massa total del cos (720 g. en humans). D'aquesta manera, les CEs formen un òrgan secretori i regulador completament exposat a la sang (Bachetti and Morbidelli, 2000).

Durant el desenvolupament, la vasculatura és un dels primers sistemes que es formen i es necessita una correcta estructuració de l'endoteli per tal que el desenvolupament segueixi endavant. L'endoteli s'origina en el sac vitel·lí a partir de la diferenciació dels hemangioblasts en el mesoderm. En el sac vitel·lí, els hemangioblasts s'agrupen formant els anomenats illots sanguinis. Les cèl·lules situades a l'exterior

d'aquests illots es diferencien cap a cèl·lules endotelials (angioblasts) i les més internes constituïran els precursors hematopoïètics. Tot seguit, aquestes cèl·lules sofriran una sèrie de canvis morfològics i de remodelat vascular per donar lloc a una vasculatura funcional (Tallquist et al., 1999).

Les CEs es caracteritzen per una gran heterogeneïtat tant en aspectes estructurals i funcionals com en marcadors proteics, activació cel·lular i resposta a factors de creixement. Aquesta heterogeneïtat es detecta a diferents nivells i diferencia tant el comportament entre les CEs micro- i macrovasculars com entre cèl·lules aïllades de diferents òrgans i entre diferents zones d'un mateix òrgan.

Entre els marcadors moleculars específics d'aquestes cèl·lules destaquen la molècula d'adhesió PECAM-1 (CD31) o la (VE)-caderina, entre altres (Minami and Aird, 2005).

### **1.1. Estructura de les CEs.**

La forma d'aquestes cèl·lules varia segons el llit vascular, tot i que típicament són planes, amb una grossor que varia de 0,1 µm en capil·lars i venes a 1 µm en l'aorta. Les cèl·lules s'alineen segons la direcció del flux sanguini en segments rectes excepte en els llocs de ramificacions. Les CEs posseeixen elements estructurals molt importants per la via endocítica com invaginacions i vesícules recobertes de clatrina, cossos multivesiculars i lisosomes. A part de participar en el transport per endocitosis, les CEs també estan molt implicades en el transport per transcitosis, que consisteix en la transferència de macromolècules a través de l'endoteli. Per dur a terme aquest tipus de transport, utilitzen estructures especialitzades com les caveoles i els orgànuls OVV's (Muro et al., 2004; Gratton et al, 2004; Aird, 2007a).

Les CEs tenen 2 tipus principals d'unions intercel·lulars anomenades unions d'oclusió i unions adherents cèl·lula-cèl·lula. Aquestes estructures no només mantenen la integritat de l'endoteli a través de l'adhesió cel·lular, sinó que també funcionen com a estructures de senyalització que comuniquen la posició cel·lular, limiten el creixement, regulen l'apoptosi, l'expressió gènica i la formació de nous vasos sanguinis. Les unions d'oclusió formen una barrera de transport entre les CEs anomenat transport paracel·lular i ajuden a mantenir la polaritat cel·lular entre els costats luminal i abluminal de les CEs.

En la microvasculatura, les unions són més estretes en arterioles que capil·lars, mentre que en venes encara són més laxes. Aquesta unió més desorganitzada en les vènules reflexa el rol d'aquest tipus de vasos en l'extravasació de leucòcits durant la inflamació. En canvi, la barrera sanguínea del cervell, que protegeix el teixit neural de les fluctuacions de la composició sanguínea, és molt rica en aquest tipus d'unions (Bazzoni and Dejana, 2004; Dejana, 2004).

L'endoteli pot ser continu o discontinu. L'endoteli continu pot ser, a la vegada, fenestrat o no fenestrat. Les fenestracions són porus transcel·lulars d'uns 70 nm de diàmetre que s'estenen a través de tota la cèl·lula. La densitat de les fenestracions varia segons el llit vascular i inclús moltes CEs es polaritzen respecte a la distribució fenestral. L'endoteli continu no fenestrat es localitza en artèries, venes i capil·lars del cervell, pell, cor i pulmó. En canvi, l'endoteli continu fenestrat es pot trobar en zones que es caracteritzen per un increment de filtració o de transport transendotelial com són els capil·lars de les glàndules endocrines, de la mucosa gàstrica i intestinal, el plexus coroide, el glomèrul i una subpoblació de túbuls renals. L'endoteli discontinu es troba en alguns llits vascular, principalment en el fetge. Les CESs del fetge posseeixen grans fenestracions (100 a 200 nm de diàmetre) amb porus circulars, més freqüents en la zona centrilobular que en la periportal (Reichen, 1999).

## **1.2. Heterogeneïtat funcional de les cèl·lules endotelials.**

Cada cèl·lula endotelial funciona com un petit dispositiu que s'adapta a diferents senyals d'entrada i/o sortida. Les senyals d'entrada, que provenen de l'àmbit extracel·lular, consten de forces biomecàniques (estrés cel·lular) i bioquímiques (factors de creixement, citoquines, quimioquines, hormones, complement, NO, oxigen i ROS). Les senyals de sortida fan referència al fenotip cel·lular, que es mesura com la forma de la cèl·lula, el flux de calci, l'expressió proteica, l'expressió de mRNA, la migració, la proliferació, la supervivència/apoptosi, el to vasomotor, el balanç homeostàtic, l'alliberament de mediadors inflamatoris i l'adherència i transmigració de leucòcits. Les senyals d'entrada estan acoblades a les de sortida per vies de senyalització que comencen a la superfície cel·lular i s'acaben a nivell de modificació transcripcional i posttranscripcional.



Les CEs duen a terme moltes funcions, moltes de les quals estan mediades per un tipus específic de vas sanguini o llit vascular (Aird, 2007b). Entre les principals funcions que desenvolupen les CEs, cal destacar les següents:

- Regulació de la permeabilitat i del transport de macromolècules.
- Manteniment de l'homeòstasi tissular i regulació dels mecanismes de coagulació.
- Regulació de la immunitat innata i adquirida.
- Control del tràfic leucocitari.
- Control de les CMLLs i pericits.
- Síntesi de substàncies del teixit conjuntiu.
- Participació en el metabolisme lipídic.
- Regulació del to vascular i de la perfusió.
- Inducció i prevenció del creixement vascular.
- Secreció de factors de creixement i de citoquines quimiotàctiques per a la neovascularització.

Pel que fa a la permeabilitat, cal dir que l'endoteli vascular és semipermeable, de manera que els fluïds i els soluts petits es mouen de manera passiva a través de la ruta paracel·lular, mentre que les macromolècules utilitzen la via transcel·lular utilitzant els OOVs, les caveoles i canals transendotelials derivats de vesícules (Mehta and Malik, 2006; Michel and Curry, 1999).

Una altra funció de l'endoteli és mantenir la sang en un estat fluïd i promoure la formació limitada de coàguls quan es produeix algun dany a la paret vascular. Així doncs, les CEs expressen els diferents factors anticoagulants i procoagulants. Totes aquestes molècules anti- i procoagulants estan distribuïdes per tota la vasculatura de manera irregular, fet que permet un balanç correcte de l'homeòstasi local (Rosenberg and Aird, 1999).

A part d'aquestes funcions, les CEs també sintetitzen múltiples components del teixit conjuntiu (FN, trombospondina, elastina, microfibretes i enzims com l'elastasa i la col·lagenasa), presenten receptors de les lipoproteïnes circulants i participen en processos de distribució de lípids per tot l'organisme.

## 2. PAPER DE LES CEs EN LA INFLAMACIÓ.

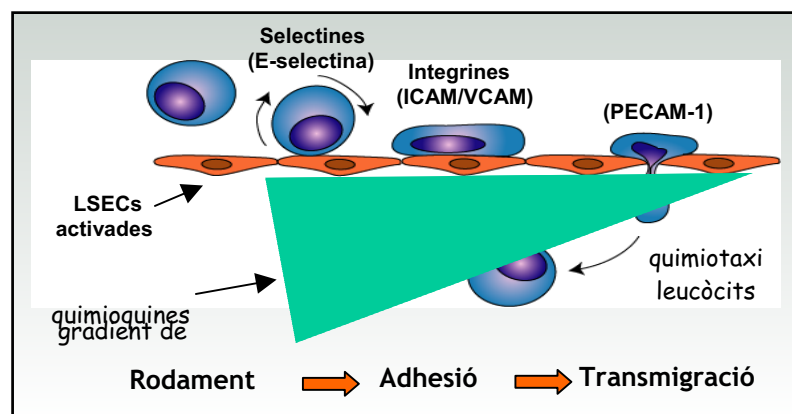
Durant un procés d'inflamació aguda, es produeix un reclutament de neutròfils ràpid (en un període d'hores), que es produeix com a conseqüència del que s'anomena "activació de les CEs", que es defineix com l'adquisició de noves capacitats per part de les CEs en estat quiescent. Aquest fenomen d'activació es pot dividir en dos tipus de respostes: una resposta ràpida que és independent de l'expressió gènica *de novo* (activació tipus I) i una resposta més lenta que depèn de l'expressió gènica (activació tipus II) (Pober and Cotran, 1990).

El tràfic de leucòcits de la sang als teixits inclou diferents etapes que consisteixen en una adhesió inicial, el rodament, l'arrest i la transmigració (figura 6). Les dues primeres etapes, que inclouen una adhesió inicial i el rodament, són dependents de la família de glicoproteïnes transmembrana anomenades selectines. L'endoteli expressa les selectines P i E, mentre que els leucòcits expressen la selectina L. La P-selectina s'expressa de manera constitutiva i s'emmagatzema formant grànuls en els cossos de Weibel-Palade. En aquest context, quan l'endoteli s'estimula mitjançant l'activació de tipus I, la P-selectina és alliberada en pocs minuts. En canvi, la E-selectina se sintetiza de nou després de l'activació endotelial per part d'IL-1, LPS o TNF- $\alpha$ . La seva expressió es pot induir ràpidament a les 2 hores després de l'estimulació (Cook-Mills and Deem, 2005; Ala et al., 2003).

L'adhesió leucocitària és deguda a interaccions entre integrines dels leucòcits i les molècules d'adhesió expressades en l'endoteli activat com ICAM-1 i VCAM-1. Aquestes molècules d'adhesió són membres de la superfamília de les immunoglobulines i serveixen de lligands per les integrines dels leucòcits. VCAM-1 s'uneix a les integrines  $\alpha_4\beta_1$  i  $\alpha_4\beta_7$ , expressades en la majoria de leucòcits mononuclears i la seva expressió està regulada a nivell transcripcional, ja que és un dels primers marcadors de lesions aterogèniques en models animals. D'aquesta manera, VCAM-1 no s'expressa de manera constitutiva i se sintetiza de nou després de l'estimulació amb TNF- $\alpha$  o IL-1, entre altres (Collins et al., 1995; Cybulsky et al., 1991). Per altra banda, ICAM-1 i ICAM-2 s'uneixen a les integrines CD11/CD18, Mac-1 i la molècula LFA-1, expressades en gairebé totes les cèl·lules del sistema immune o en cèl·lules d'origen mieloide. L'expressió de ICAM-1 i ICAM-2 és constitutiva, tot i que pot incrementar després de

l'estimulació amb diferents citoquines, concretament en lesions ateroscleròtiques madures, tot i que s'ha comprovat que el principal factor que contribueix en la iniciació i la formació de la lesió és VCAM-1 (Collins et al., 2000; Cybulsky et al., 2001; Kelly et al., 2007).

Els mecanismes moleculars de la transmigració són menys coneguts, però es creu que involucren CD99, PECAM-1(CD31) i membres de la família de la molècula d'adhesió JAM. En aquest sentit, PECAM-1 té un paper important en la transmigració de leucòcits, ja que, a part de les seves propietats d'adhesió, també indueix la mobilització d'algunes integrines cap a la superfície dels leucòcits, fet que possibilita la migració d'aquests tipus cel·lulars per la membrana basal. A més, PECAM-1 també indueix l'expressió de la MMP-9 i incrementa la direccionalitat i motilitat dels leucòcits (Muller, 1993; Nourshargh and Marelli-Berg, 2005). Cal dir que aquesta cascada d'esdeveniments no té lloc de la mateixa manera en tots els llits vasculars. Pel que fa al fetge, els leucòcits s'adhereixen a l'endoteli capil·lar independentment del rodament. A més, el reclutament de neutròfils en aquest territori no requereix E-selectina i és parcialment dependent de ICAM-1. Aquesta interacció entre les CE i els leucòcits polimorfonuclears és fonamental en la reacció inflamatòria, ja que en la superfície de les CE s'han identificat antígens HLA que poden estimular la producció d'interleuquines per part dels limfòcits T (Cook-Mills and Deem, 2005, Rao et al., 2007).



**Figura 6.** Transmigració de leucòcits a través de l'endoteli vascular.

Quan la reacció inflamatòria no pot erradicar l'estímul que la provoca, s'activa una resposta immune adaptativa que fa que el procés inflamatori evolucioni a un estat crònic on intervenen altres cèl·lules efectores especialitzades. En aquest procés, les CE

hi participen presentant antigens a les cèl·lules T de memòria i efectores (Choi et al., 2004).

### **3. LA REGULACIÓ DEL TO VASCULAR.**

Les cèl·lules endotelials són sensibles a canvis induïts per forces hemodinàmiques i per mediadors circulants sintetitzats de manera local. Per tal de respondre a aquests canvis, les CEs sintetitzen una sèrie de substàncies vasoactives dirigides a mantenir el to vascular i la perfusió. Entre aquestes substàncies, destaquen factors vasoconstrictors com l'angiotensina II, l'ET-1, el TXA<sub>2</sub>, els isoprostans, l'anió superòxid, o l'uridina, i vasodilatadors com la bradiquinina, la PGI<sub>2</sub>, el NO, el factor hiperpolaritzant derivat de l'endoteli, l'adenosina, la prostaciclina, els àcids epoxieicosatrienoics, l'acetilcolina o el pèptid natriurètic C, entre altres. Aquestes substàncies vasoactives actuen de manera coordinada per mantenir les funcions normals de l'endoteli i operar com un mecanisme de suport quan una de les vies té un funcionament deficient (Michiels, 2003).

#### **3.1. L'òxid nítric (NO).**

##### **3.1.1. Característiques funcionals i accions biològiques.**

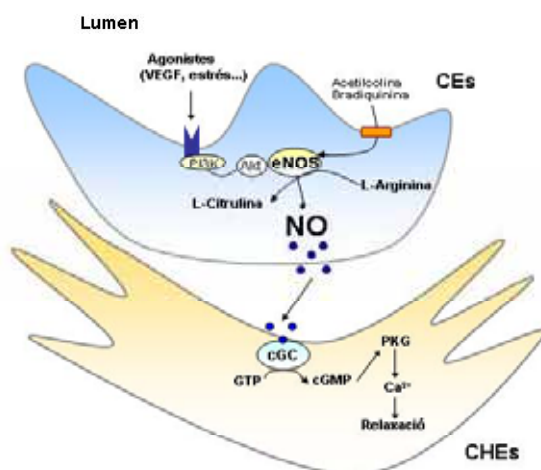
Al 1980, Furchgott i Zawadzki van demostrar l'existència del que van anomenar factor relaxant derivat de l'endoteli o EDRF. Aquests autors van demostrar que, després de la retirada de l'endoteli en preparacions de vasos sanguinis, l'acetilcolina era incapaç de relaxar el múscul llis vascular. En aquest context, van proposar que l'acetilcolina estimulava la producció de EDRF per part de l'endoteli que difonia al teixit muscular adjacent on induïa relaxació (Furchgott and Zawadzki, 1980). Més endavant, al 1986, Louis Ignarro i Robert Furchgott van proposar que el factor EDRF corresponia a l'òxid nítric i, l'any següent, dos grups d'investigació van demostrar el mateix fet de manera independent (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). De fet, Furchgott, Zawadzki i Ignarro van rebre el Premi Nobel de Medicina/Fisiologia el 1998 pel seu treball pioner en la biologia de EDRF i NO.

El NO és una molècula gasosa hidrofòbica essencial per nombrosos processos biològics com són la relaxació dels vasos sanguinis, la neurotransmissió, la citotoxicitat,

la defensa enfront agents patògens, l'apoptosi o la inhibició de la coagulació i de l'agregació plaquetària. És un radical lliure (té un electró desaparellat) amb un temps de vida curt (entre 3 i 5 s.) que és capaç de difondre a les cèl·lules adjacents actuant com a missatger intra o intercel·lular. Les accions del NO són mediades a través de diferents vies de senyalització que inclouen interaccions amb hemoproteïnes com la sGC, interaccions amb l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) que acaben produint peroxinitrit ( $ONOO^-$ ), la S-nitrosilació dels grups tiols i reaccions amb l'oxigen per acabar generant nitrïts i nitrats. La diana preferencial del NO dependrà de la quantitat de NO produïda, el tipus cel·lular o l'estat d'oxidació de la cèl·lula (Moncada et al., 1991).

D'entre les principals funcions del NO, la més ben caracteritzada és la que indueix vasodilatació a través de la producció de cGMP. En la figura 7 es mostren els mecanismes mitjançant els quals el NO exerceix el seu efecte vasodilatador sobre els vasos sanguinis. L'activació de l'endoteli vascular per l'estrès de cisalla o per les activacions de receptors per part de bradicinina, acetilcolina o altres agonistes indueix un augment intracel·lular de  $Ca^{2+}$ . Aquest increment de calci estimula eNOS, que produeix NO a partir de L-arginina. El NO produït difon des de la cèl·lula d'origen fins a les cèl·lules musculars adjacents i s'uneix al grup hemo de la guanilat ciclasa soluble. Aquesta unió activa la guanilat ciclasa que converteix la guanosina trifosfat en cGMP. L'acumulació de cGMP inicia diferents etapes de fosforilació de substrats mediades per la cinasa PKG. Entre els principals substrats fosforilats cal destacar Hsp20 i la cinasa de la cadena lleugera de miosina. En cèl·lules musculars llises, la fosforilació de PKG dóna lloc a una disminució dels nivells de calci intracel·lular, fet que permet modular diferents funcions fisiològiques com la relaxació cel·lular. Altres dianes del cGMP són els canals de nucleòtids i les fosfodiesterases depenents de nucleòtid (figura 7) (Murad, 2006).

En el fetge, el NO generat per les cèl·lules endotelials sinusoidals actua sobre les CHEs adjacents activant la cGMP, fet que comporta una relaxació d'aquestes cèl·lules. Aquesta regulació paracrina contribueix de manera molt important a la modulació de la resistència intrahepàtica (Langer and Shah, 2006; Rockey and Shah, 2004, Morales-Ruiz and Jimenez, 2005a).



**Figura 7.** Generació de NO i efecte sobre les CHEs.  
(figura adaptada de Langer and Shah, 2006).

### 3.1.2. Sintases de l'òxid nítric: Regulació.

L'òxid nítric és produït de manera endògena en diferents tipus cel·lulars a través de les hemoproteïnes tipus P-450 anomenades NOS. Aquests enzims consten d'un domini reductasa a l'extrem COOH-terminal i un domini oxidasa a l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal, separats per un lloc d'unió a calci-calmodulina i només són funcionals en forma d'homodímers. El domini oxidasa conté un lloc actiu hemo tipus citocrom P-450 i un lloc d'unió per tetrahydrobiopterina, mentre que el domini reductasa conté un domini de transferència d'electrons que uneix FMN i FAD. En presència de calmodulina, el NADPH s'uneix a l'extrem C-terminal i actua com a donador d'electrons que són transferits a través de FMN i FAD cap al grup hemo del domini oxigenasa. D'aquesta manera, es produeix l'oxidació del substrat (L-arginina) que s'acaba convertint en L-citrulina generant NO en una reacció modulada per la tetrahydrobiopterina (Lamas et al., 1992, Knowles and Moncada, 1994).

Existeixen 3 isoformes de NOS que comparteixen aproximadament un 55% d'homologia: la isoforma neuronal (nNOS o NOS1), la induïble (iNOS o NOS2) i l'endotelial (eNOS o NOS3). nNOS s'expressa principalment en el teixit neural, en múscul esquelètic i en la màcula densa. Aquest enzim és dependent de la via de calci-calmodulina i produeix NO a concentracions baixes (nM). En condicions fisiològiques, nNOS està involucrada en la relaxació d'esfínters (estómac, bufeta, uretra), en l'erecció

penil, la neurotransmissió i la formació de memòria (Liu and Huang, 2007). La isoforma iNOS, en canvi, se sintetitza de nou en macròfags, CMLs, CHes, hepatòcits i altres tipus cel·lulars després de la inducció per LPS i citocines proinflamatòries. Un cop expressada, iNOS sintetitza grans quantitats de NO durant períodes de temps llargs, independentment d'estímuls mecànics o hemodinàmics. Cal destacar que, tant nNOS com iNOS han estat implicades en alguns aspectes de la patofisiologia de la hipertensió portal (Kone et al., 2003).

eNOS és la isoforma que s'expressa constitutivament de forma majoritària en CEs, tot i que es pot induir en resposta a diferents estímuls com són l'exercici, estímuls mecànics com un augment de l'estrès de cisalla, VEGF, estrògens o agonistes dels receptors acoblats a proteïna G com acetilcolina, bradiquinina, catecolamines o S1-P. De manera basal, existeix una producció de NO generat per l'estrès cel·lular provocat per les forces hemodinàmiques de la sang i per l'estirament pulsàtil de la paret vascular deguda al cicle cardíac. Aquesta producció contínua de NO és important per mantenir el el to vascular així com l'estat antiaterogènic de l'endoteli. Aquesta última acció la duu a terme evitant l'activació de factors de transcripció que determinen l'expressió de factors proaterogènics com les molècules d'adhesió necessàries pel reclutament de leucòcits (Fleming and Busse, 2003; Papapetropoulos et al., 1999).

La isoforma eNOS és la més sensible a les concentracions intracel·lulars de calci i la seva regulació molecular és complexa. Així doncs, a part de la seva regulació a nivell transcripcional, eNOS està altament regulada a través de mecanismes postranscripcionals i posttraduccional. Pel que fa a les interaccions proteïna-proteïna, eNOS pot interaccionar amb diverses proteïnes, entre les quals cal destacar Cav-1 i Hsp90. En CEs quiescents, la majoria d'eNOS funcional resideix a les caveoles on interacciona amb la proteïna de recobriment caveolar Cav-1. La unió d'eNOS a les caveoles té lloc via palmitoilació, i aquesta localització optimitza la capacitat d'eNOS per produir NO. La interacció de l'enzim amb Cav-1 evita la unió de l'enzim a la calmodulina i el manté en estat inactiu. La unió d'agonistes com la bradiquinina augmenta la concentració intracel·lular de calci, provocant la dissociació d'eNOS de caveolina-1 i la formació del complex actiu eNOS-calmodulina. El cicle es reverteix quan els nivells intracel·lulars de calci retornen als valors basals (Feron et al., 1998).

Per altra banda, Hsp90 s'ha descrit com un activador al·lostèric d'eNOS que també actua com a proteïna estructural de suport participant en el reclutament d'altres molècules reguladores. Hsp90 s'associa amb eNOS en cèl·lules endotelials quiescents. L'estimulació per part de VEGF, histamina, estrès cel·lular o estrògens augmenta la interacció entre Hsp90 i eNOS al mateix temps que augmenta la producció de NO (Sessa, 2004; Garcia-Cardena et al., 1998).

Altres proteïnes que interaccionen amb eNOS són la proteïna d'interacció amb la sintasa de l'òxid nítric NOSIP i l'inductor del tràfic de la sintasa de l'òxid nítric NOSTRIN. Aquestes dues proteïnes participen en la translocació d'eNOS des de la caveola cap a dianes intracel·lulars, fet que té com a resultat una menor activitat d'eNOS.

eNOS pot sofrir diferents modificacions post-traduccionals que regulen la seva activitat i proporcionen mecanismes per l'estimulació i la inhibició dinàmica de l'enzim en resposta a estímuls fisiològics i fisiopatològics. Entre aquestes modificacions, cal destacar la miristoil·lació i la palmitoil·lació de la proteïna, que li permeten unir-se a la bicapa lipídica de les caveoles i la S-nitrosilació, que dona lloc a la inhibició de l'enzim. Tot i això, la regulació post-traduccionals més important que afecta eNOS és la fosforilació. D'aquesta manera, eNOS es pot fosforilar en els residus serina (Ser), treonina (Thr) i tirosina (Tyr) (Dudzinski and Michel, 2007). En aquest context, una de les fosforilacions més importants d'aquest enzim és la que té lloc sobre el residu Ser 1177 (humà)/ 1179 (boví) per part de la proteïna cinasa Akt (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). Tot i això, aquest mateix residu també es pot fosforilar per les cinases PKA, CaMKII i AMPK. A més, eNOS es pot fosforilar en altres residus com Ser633 (humà)/ Ser635 (boví), Ser615(humà)/ Ser617(boví), que indueixen l'activació d'eNOS; Ser114 (humà)/ Ser116(boví) o Thr495 (humà)/ Thr497 (boví), que exerceix una regulació negativa sobre eNOS (figura 8) (Boo et al., 2002; Boo and Jo, 2003; Butt et al., 2000; Sessa, 2004; Fleming and Busse, 2003).



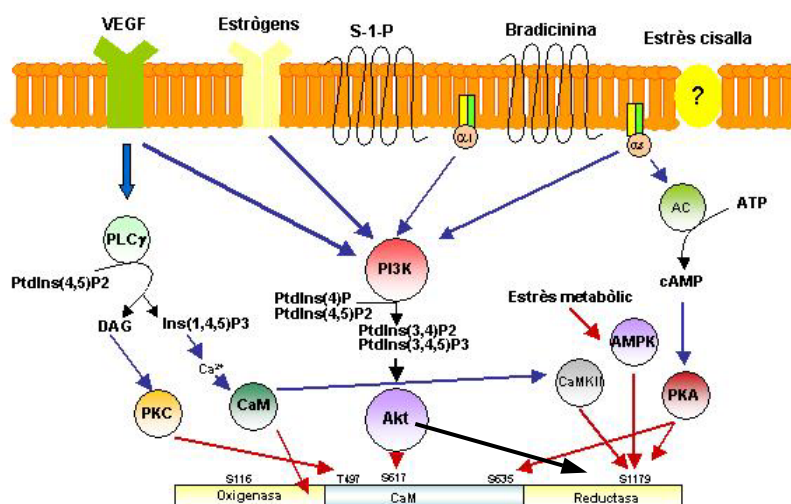


Figura 8. Activació d'eNOS (figura adaptada de Sessa, 2004).

### 3.2. Akt (PKB).

La proteïna Akt (PKB) és una serina/treonina cinasa pertanyent a la superfamília de cinases “AGC” i és un important mediador de la senyalització entre receptors amb domini extracel·lular i la modulació de l'expressió gènica, el metabolisme i la supervivència cel·lular. Akt és un enzim altament regulat ja que la seva desregulació donaria lloc a la pèrdua de control del creixement cel·lular i a oncogènesis. La subfamília de PKB comprèn 3 isoformes, PKB $\alpha$  (Akt1), PKB $\beta$  (Akt2) i PKB $\gamma$  (Akt3), que provenen de tres gens diferents i conserven una estructura comuna que inclou tres dominis funcionals: un domini N-terminal d'homologia a plecstrina (PH), un domini central cinasa i un domini C-terminal regulador que conté un motiu hidrofòbic amb llocs de fosforilació [FxxF(S/T)Y]. Aquesta arquitectura es conserva al llarg de diferents espècies des de la mosca, el cuc i els murins a l'home (Somanath et al., 2006).

Després de la unió dels receptors tirosina cinases als seus lligands (o la unió d'agonistes a receptors acoblats a proteïna G), té lloc l'autofosforilació i activació d'aquests receptors. La PI3K és reclutada a la membrana i s'uneix als residus fosfotirosina dels receptors. Allà fosforila els lípids de membrana anomenats fosfatidilinositol 4-5-bifosfats per formar fosfatidilinositols 3-4-5 trifosfats. Aquests lípids recluten proteïnes que contenen el domini PH cap a la membrana plasmàtica entre les quals cal destacar Akt i PDK1. PDK1 fosforila Akt en el seu domini catalític,

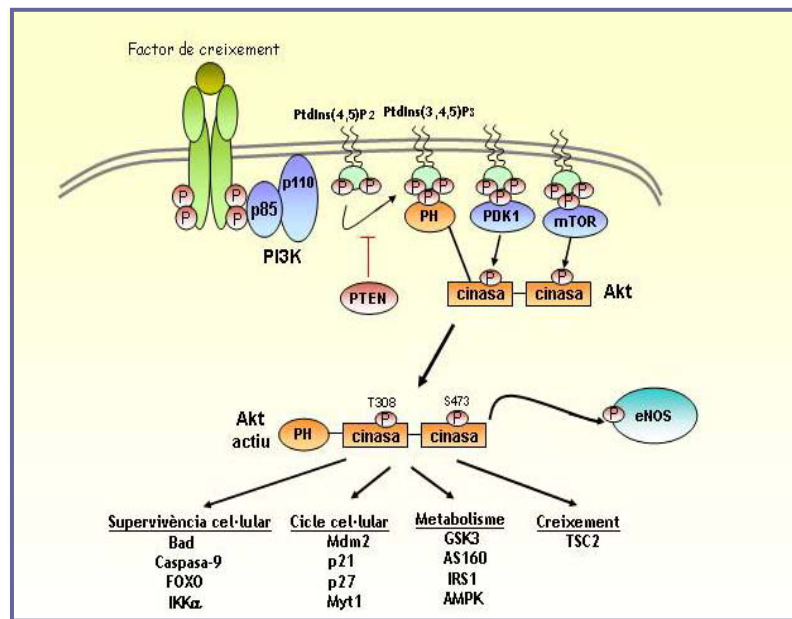
concretament en el residu Thr308. El segon lloc de fosforilació d'Akt se situa en un domini hidrofòbic pròxim al C-terminal (Ser473). Aquest residu pot ser fosforilat per diferents cinases, entre les quals cal destacar el complex (mTOR)-Rictor. Quan aquests dos llocs es fosforilen, té lloc l'activació completa d'Akt, fet que li permet la translocació a altres llocs de la cèl·lula i exercir les seves funcions biològiques mitjançant la fosforilació d'altres substrats, molts dels quals contenen la seqüència *consensus* RxRxx(S/T) (figura 9) (Brazil and Hemmings, 2001; Morales-Ruiz, 2004; Cantley, 2002).

Akt pot ser desfosforilat i inactivat per fosfatases com la PP2A, que desfosforila Thr308, o PHLPP, que desfosforila majoritàriament Ser473. A més, la fosfatasa PTEN i SHIP, poden inhibir l'activitat d'Akt indirectament actuant sobre la PI3K (Fayard et al., 2005; Shiojima and Walsh, 2006).

Entre les proteïnes que són fosforilades per Akt, cal destacar nombrosos substrats que participen en diferents processos cel·lulars regulats per aquesta cinasa i que contenen la seqüència RxRxx(S/T), on x és un aminoàcid i S/T el lloc de fosforilació. Alguns dels principals substrats d'Akt s'agrupen dins els següents processos cel·lulars:

- Regulació del cicle cel·lular: Akt controla la progressió del cicle cel·lular a través de la regulació de membres de la família de factors de transcripció FOXO, la degradació de p53 mitjançant la fosforilació de Mdm2 i el bloqueig dels inhibidors del cicle cel·lular p21<sup>cip1</sup> i p27<sup>kip1</sup> i la proteïna cinasa Myt1.
- Apoptosi: l'activitat d'Akt protegeix contra l'apoptosi a través de la fosforilació i inhibició de mediadors proapoptòtics com Bad, IκB kinasa-β (IKK-β) o caspasa-9.
- Metabolisme i creixement cel·lular: Després de la seva activació, Akt inactiva GSK3, induint així la síntesi de glicogen. A més, Akt també fosforila el complex TSC-2, que facilita l'activació de la cinasa p70S6K, induint la síntesi proteica i el creixement cel·lular.
- Migració cel·lular: Algunes de les dianes d'Akt involucrades en la migració cel·lular són PAK, girdina o la integrina β3.

Un altre dels principals substrats d'Akt és eNOS que, com ja s'ha comentat, regula la biosíntesi de NO per part de les cèl·lules endotelials (Hanada et al., 2004; Fayard et al., 2005; Stambolic and Woodgett, 2006).



**Figura 9.** Regulació d'Akt (figura adaptada de Shiojima and Walsh, 2006).

La manipulació genètica dels gens d'Akt en ratolins, ja sigui per l'ús d'animals transgènics o *knockouts*, ha aportat noves evidències a la senyalització induïda per Akt. En aquest context, a deleció d'Akt1 en ratolins dóna lloc a un fenotip de retard del creixement, mentre que la deficiència d'Akt2 mostra un fenotip de resistència a insulina i, depenent dels antecedents genètics, un retard del creixement lleu. En canvi, els ratolins deficients per Akt3 no presenten un retard del creixement, però sí una reducció en la mida del cervell a causa de una disminució del tamany i del nombre de cèl·lules. La redundància funcional que s'observa en els tres gens que codifiquen per Akt es demostra mitjançant ratolins mutants amb delecions combinades d'aquests gens. Així doncs, els ratolins deficients per Akt1/Akt2 moren després del naixement a causa de defectes en múltiples teixits incloent múscul esquelètic, os, i pell, mentre que els deficients per Akt1/Akt3 moren dins l'úter. Per tant, el fenotip d'aquest mutants és més sever que la suma dels fenotips per separat, suggerint un grau de compensació funcional entre els 3 gens d'Akt en mamífers (Fayard et al., 2005; Somanath et al., 2006).

Pel que fa a estudis amb transgènics, s'han utilitzat formes constitutivament actives d'Akt com per exemple un mutant d'Akt1 miristoïlat que provoca la localització d'Akt a la membrana plasmàtica (Akt1 miristoïlat o myr-Akt) o un mutant d'Akt1 que mimetitzava la seva fosforilació i conseqüent activació (Akt1 T308D/ Ser473D). L'activitat d'aquests mutants és insensible a la inhibició de PI3K.

En CEs, la sobreexpressió d'Akt1 és letal durant l'embriogènesis, ja que s'associa a un patró de remodelat vascular anòmal. Si Akt1 es sobreexpressa en CEs en adults, s'indueix la formació patològica de vasos sanguinis similars a la neovascularització tumoral. No obstant, durant la formació neoíntima induïda per la cessació del flux sanguini, l'activació transitòria d'Akt en cèl·lules endotelials atenua la formació de la lesió, ja que la capa endotelial es manté funcionalment intacta i s'atenuen els estímuls que promouen el creixement de les CMLs (O'Neill and Abel, 2005; Shiojima and Walsh, 2006).

Finalment, cal dir que els animals deficients per Akt també mostren anomalies en l'angiogènesi induïda per VEGF o isquèmia i en la mobilització de cèl·lules endotelials progenitores, donant com a resultat uns nous vasos formats immadurs i permeables (Chen et al., 2005).

En conjunt, totes aquestes observacions suggereixen que la senyalització d'Akt desenvolupa un paper molt important en l'homeostasi vascular i es requereix un control precís d'aquesta via per obtenir un patró de remodelat vascular normal (Brazil et al., 2004; Brazil and Hemmings, 2001).

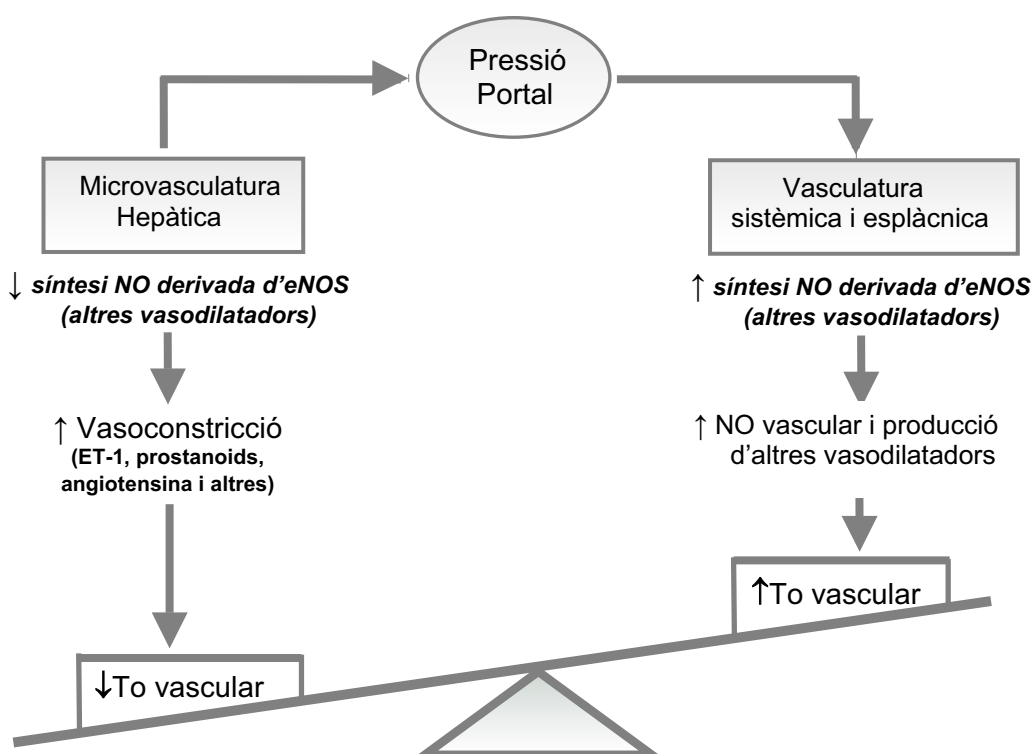
### **3.3. Paper fisiopatològic del NO en la cirrosi.**

En els fetges cirròtics, la producció de NO està disminuïda, fet que dona lloc a una constricció sinusoidal i a un augment de la pressió de perfusió en resposta a l'increment progressiu del flux i l'estrès cel·lular. En aquest context, hi ha estudis que mostren que la producció de NO i l'activitat d'eNOS estan disminuïts en els fetges de rates tractades amb CCl<sub>4</sub> i en les CESs aïllades de rates tractades amb CCl<sub>4</sub> o de rates amb BDL, respectivament. A més a més, les CESs d'aquests animals cirròtics tenen igual quantitat de mRNA i proteïna eNOS en comparació amb els animals control, suggerint un control postraducciona l'activitat de l'enzim (Gupta et al., 1998; Rockey and Chung, 1998).

Així doncs, s'ha postulat que, anomalies en alguna de les modificacions bioquímiques o en les interaccions proteïna-proteïna, podrien ser determinants per explicar el comportament de les CESs després del dany hepàtic. En aquest sentit, les CESs dels fetges cirròtics mostren un augment de l'expressió i de la interacció de Cav-1

amb eNOS que impedeix la unió de l'enzim a calmodulina. Aquest fenomen podria contribuir a la producció deficient de NO que té lloc en els fetges cirròtics (Hendrickson et al., 2003; Shah et al., 1999). Un altre estudi va demostrar que els pacients cirròtics presenten una sobreexpressió de Cav-1. Tot i això, la interacció *in vivo* d'aquestes dues proteïnes en la cirrosi humana encara no ha estat demostrada (Yokomori et al., 2002).

Cal dir que les alteracions en la síntesi de NO derivada d'eNOS en la microcirculació hepàtica i en la circulació esplàcnica o sistèmica són completament oposades. Així doncs, contràriament al que s'observa en la microvasculatura hepàtica, en la vasculatura esplàcnica i sistèmica es produeix un excés de NO derivat d'eNOS que media la vasodilatació arterial i el desenvolupament del síndrome de circulació hiperdinàmica que, en últim terme, acabarà provocant les greus complicacions associades a la cirrosi i altres malalties hepàtiques cròniques (figura 10) (Iwakiri and Groszmann, 2007; Langer and Shah, 2006).



**Figura 10.** Regulació del to vascular en la cirrosi (figura adaptada de Wiest and Groszmann, 2002).

Diferents estudis han demostrat que l'increment de NO a la zona esplàcnica és dependent de l'endoteli i de l'activació d'eNOS en aquest territori que pot tenir lloc per diferents mecanismes (Iwakiri and Groszmann, 2007).

Tot i que l'increment de la producció de NO s'origina principalment en el territori esplàcnic i, per tant, és en la circulació esplàcnica on té lloc una disminució de la resistència vascular, la vasodilatació arterial central i perifèrica també pot contribuir a aquest fenomen. Una manifestació clàssica d'aquesta vasodilatació arterial és la hiporeactivitat arterial als vasoconstrictors (Claria et al., 1994; Sieber and Groszmann, 1992; Sieber et al., 1993). En aquest context, eNOS també juga un paper important en aquestes anomalies hemodinàmiques, ja que la inhibició de la síntesi de NO corregeix, en gran part, la hemodinàmica esplàcnica i sistèmica en diferents models experimentals de cirrosi (Claria et al., 1992; Morales-Ruiz and Jiménez, 2005a; Niederberger et al., 1995; Pizcueta et al., 1992).

Tot i que tots els estudis comentats anteriorment demostren un paper clau del NO en la circulació hiperdinàmica, la relació temporal entre l'aparició de la circulació hiperdinàmica i l'activació de la producció de NO encara continua sent una qüestió pendent de resposta. En aquest context, un estudi va mostrar que els ratolins deficientes per eNOS o iNOS amb hipertensió portal induïda per PVL mantenen l'estat de circulació hiperdinàmica (Iwakiri et al., 2002). En canvi, un estudi posterior va mostrar que la deleció del gen eNOS en ratolins els protegeix de les anomalies hemodinàmiques típiques de la hipertensió portal. Aquestes observacions no es van reproduir en animals deficientes per iNOS (Theodorakis et al., 2003).

Així doncs, tot i els avenços que s'han fet en aquests últims anys per elucidar els mecanismes responsables de la disfunció endotelial en la cirrosi, encara fan falta més estudis dirigits a delinear els mecanismes responsables de la deficiència de NO hepàtica així com les causes inicials de la sobreexpressió d'eNOS en la circulació esplàcnica i sistèmica.

#### 4. NEOVASCULARITZACIÓ I ANGIOGÈNESI.

Els vasos sanguinis van aparèixer durant l'evolució per transportar l'oxigen als òrgans distants. D'aquesta manera, aquests vasos són crucials pel creixement dels òrgans durant l'embriogènesis i per reparar el teixit danyat en l'edat adulta.

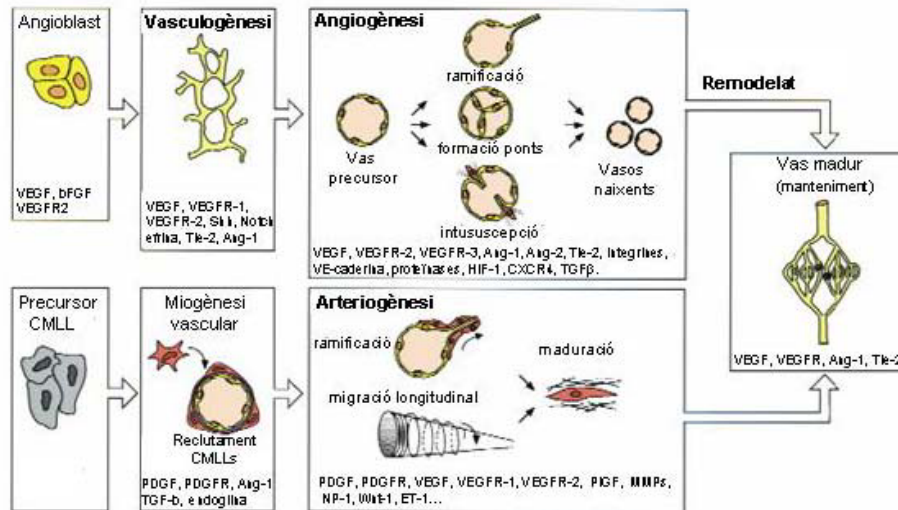
En l'embrió, els vasos sanguinis proveeixen els òrgans creixents amb l'oxigen necessari per desenvolupar-se. A part de la seva funció nutricional, aquests vasos també aporten senyals tròfics que promouen la morfogènesis dels òrgans.

El procés de formació de nous vasos sanguinis es coneix popularment com angiogènesi. No obstant, aquest terme no cobreix l'ampli espectre de processos que tenen lloc pel correcte desenvolupament dels vasos sanguinis i, de manera general, la definició que fa referència a la formació de nous vasos és la neovascularització. La neovascularització és el resultat de diferents processos que inclouen l'angiogènesi, l'arteriogènesi i la vasculogènesi. El terme angiogènesi descriu la formació de nous capil·lars a partir de vasos preexistents, sense la participació dels precursors de les CEs. Tot i que els vasos formats per angiogènesi són principalment capil·lars, també s'ha observat que en alguns models animals es poden arribar a formar vasos de més tamany (Carmeliet, 2005, Morales-Ruiz and Jiménez, 2005b).

Per altra banda, l'arteriogènesi es refereix al procés de maduració i potser de nou creixement de conductes col·laterals. Quan una artèria s'obstrueix, el sistema arterial respon engrandint els vasos col·laterals preexistents que connecten el sistema arterial. Normalment, aquest procés té lloc fora d'una àrea d'isquèmia en resposta a la pressió de perfusió que provoca un increment de l'estrès de cisalla que activa les CEs induint l'acumulació de cèl·lules mononuclears derivades de la sang als llocs d'estenosi arterial. Aquestes cèl·lules de l'infiltrat cel·lular produeixen diversos factors de creixement i proteïnases que estimulen les CMLLs perquè migrin i es divideixin. Una qüestió que encara està per resoldre relativa al procés d'arteriogènesis és si els vasos col·laterals són de nova formació o provenen de la remodelació de canals vasculars preexistents (Carmeliet, 2000; Heil et al., 2006).

Finalment, la vasculogènesi és el procés de formació de vasos sanguinis a partir de EPCs i cèl·lules progenitores vasculars. Tot i que la vasculogènesi té lloc principalment durant l'embriogènesi, s'ha demostrat que les EPCs procedents de la medul·la òssia també poden contribuir a aquest fenomen en adults mitjançant la seva

incorporació en processos de neovascularització activa com isquèmia de miocardi, vascularització tumoral o cicatrització (figura 11) (Carmeliet, 2003; Carmeliet, 2005; Simons, 2005).



**Figura 11.** Formació de la xarxa vascular (figura adaptada de Carmeliet, 2000).

Després del naixement, l'angiogènesi encara contribueix al creixement dels òrgans però, en adults, la majoria de vasos sanguinis es mantenen en estat quiescent i aquest procés només té lloc durant la reproducció o la cicatrització. No obstant, les CEs retenen la capacitat de dividir-se ràpidament en resposta a estímuls fisiològics com ara la deficiència d'oxigen (hipòxia) o la inflamació. D'aquesta manera, quan el balanç entre factors angiogènics i antiangiogènics es veu alterat, l'angiogènesi esdevé un important fenomen fisiopatològic en un gran nombre de malalties. Així doncs, alguns dels desordres que es caracteritzen per un excés d'angiogènesi són l'artritis reumatoide, el creixement tumoral, la psoriasi, la obesitat, l'asma, la diabetes, l'esclerosi múltiple, l'endometriosi, la SIDA, algunes infeccions bacterianes o les malalties autoimmunes, entre altres. Per altra banda, en altres malalties com la isquèmia coronària o la preclàmpsia, l'angiogènesi és insuficient (Carmeliet, 2003).



## 4.1. Factors proangiogènics.

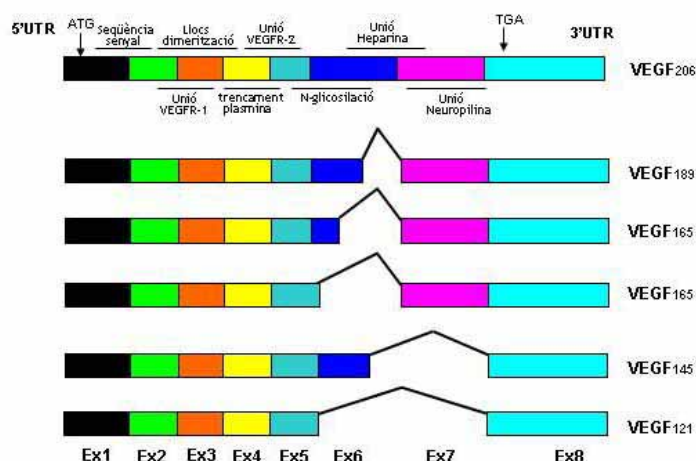
### 4.1.1. La família del factor de creixement endotelial vascular.

VEGF va ser purificat l'any 1989 per Napoleone Ferrara, que el va descriure com un potent mitògen provinent del del medi de cèl·lules fol·liculars de la pituïtària bovina (Ferrara and Henzel, 1989). Aquest mateix polipèptid, però, ja havia estat aïllat prèviament per Harold Dvorak al 1983, que el va anomenar VPF (Senger et al., 1983).

La família de VEGF és essencial per les respostes de diferenciació, proliferació i quimiotaxi en els processos de vasculogènesi, angiogènesi fisiològica i patològica i la formació de vasos limfàtics o limfoangiogènesi. La importància d'aquest sistema radica en el fet que la simple pèrdua d'un al·lel de VEGF causa defectes vasculars embrionaris letals, mentre que la disminució dels nivells de VEGF en un 25% causa una deficiència en la perfusió de l'esпина dorsal que dona lloc a la degeneració neuronal motora característica de l'esclerosi lateral amiotròfica. Així doncs, VEGF juga un paper insubstituïble en el desenvolupament del sistema vascular (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Oosthuyse et al., 2001).

La família de VEGF està formada per 7 gens que donen lloc a glicoproteïnes dimèriques estructuralment relacionades: VEGF-A (conegut popularment com VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (del virus orfe parapox), VEGF-F (del verí de serp) i PlGF. A més, el gen de VEGF-A genera 5 isoformes diferents a partir d'empalmament alternatiu que consten de 121, 145, 165, 189 o 206 residus d'aminoàcids (les isoformes murines tenen un aminoàcid menys); d'aquestes tres, la 189, 165 i 121 són les isoformes considerades més importants ja que s'expressen de manera més freqüent (figura 12) (Tischer et al., 2001). Les diferents isoformes de VEGF-A exerceixen moltes de les mateixes funcions que inclouen permeabilitat vascular, proliferació i migració de les CEs i supervivència cel·lular. No obstant, tot i exercir les mateixes activitats *in vitro*, les isoformes de VEGF-A tenen propietats físiques i químiques diferents que afecten les seves funcions *in vivo* (Houck et al., 1991). Així doncs, VEGF<sub>165</sub>, la isoforma més abundant i estudiada, és una molècula de càrrega positiva que uneix heparina i la podem trobar tant en forma soluble com unida a la ECM. Per altra banda, les isoformes de pes molecular més elevat (189 i 206) contenen residus bàsics d'unió a heparina que medien la seva unió a la ECM d'on són alliberats mitjançant l'activació per proteases. Finalment, VEGF<sub>121</sub> és un polipèptid àcid que no

uneix heparina i pot difondre pels teixits amb molta facilitat. Cal dir que la pèrdua del domini d'unió a heparina dóna lloc a una disminució de l'activitat mitogènica de VEGF-A, suggerint que VEGF<sub>165</sub> té les característiques òptimes pel que fa a biodisponibilitat i potència biològica (Dvorak, 2002; Ferrara, 2004; Zachary and Gliki, 2001).



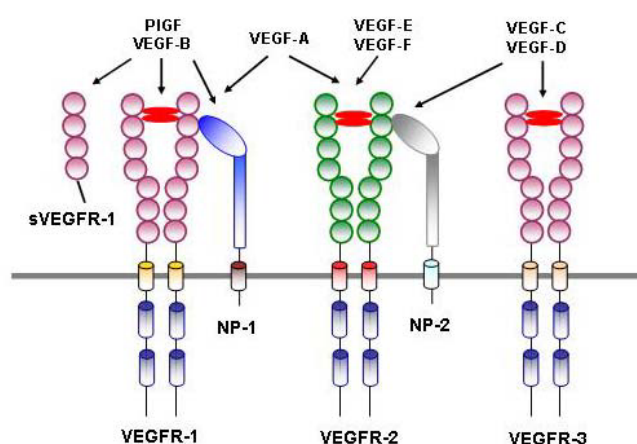
**Figura 12.** Estructura exònica del mRNA de VEGF (figura adaptada de Bates et al, 2002).

L'expressió de VEGF està altament regulada, principalment pel que fa a nivell transcripcional. En aquest context, la hipòxia és un dels estimuladors més importants de la producció de VEGF, tant a través de la transcripció gènica com per estabilització del mRNA. Altres mecanismes que regulen la transcripció de VEGF inclouen diversos factors de creixement com EGF, PDGF, IGF-1, FGF, TNF- $\alpha$ , HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i interleuquines proinflamàtores com IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 i IL-13. Les hormones també són importants reguladors de l'expressió gènica de VEGF-A. Concretament, la TSH, l'ACTH, les gonadotropines, l'estradiol i les progestines poden induir l'expressió de VEGF-A en diferents contextos fisiopatològics (Yla-Herttuala et al., 2007).

#### 4.1.1.2 Receptors de VEGF.

La família de VEGF s'uneix i activa tres receptors tirosina cinasa transmembrana: VEGFR-1 o Flt-1, VEGFR-2, KDR o Flk-1 i VEGFR-3 o Flt-4. Aquests tres receptors difereixen en l'especificitat d'unió als seus lligands. En aquest context, VEGFR-1 uneix VEGF-A, VEGF-B i PlGF-1 i -2; VEGFR-2 uneix VEGF-A,

VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E (figura 13). Aquests dos receptors s'expressen de manera predominant a l'endoteli vascular, tot i que VEGFR-1 també s'expressa en CMLLs i monòcits, entre altres. En canvi, VEGFR-3, que es localitza principalment en CEs limfàtiques, uneix VEGF-C i VEGF-D amb gran afinitat. A més, existeixen tres receptors més que no tenen el domini tirosina cinasa: una forma soluble de VEGFR-1 (sVEGFR-1), Np-1 i Np-2. sVEGFR-1 podria funcionar com un inhibidor natural de VEGF-A, ja que només conté el domini extracel·lular de VEGFR-1. Np-1 uneix PlGF, VEGF-B i VEGF-A<sub>165</sub>, però no VEGFA<sub>121</sub>. En canvi, Np-2 uneix VEGF-A<sub>165</sub>, VEGFA<sub>145</sub>, PlGF i VEGF-C. Np-1 actua com a co-receptor augmentant la interacció entre VEGF i VEGFR-2, forma complexes amb VEGFR-1 i augmenta l'angiogènesi tumoral *in vivo*. Np-1 és essencial pel desenvolupament del sistema vascular, mentre que Np-2 està més relacionat amb la formació de vasos limfàtics (Guttman-Raviv et al., 2006; Olsson et al., 2006).

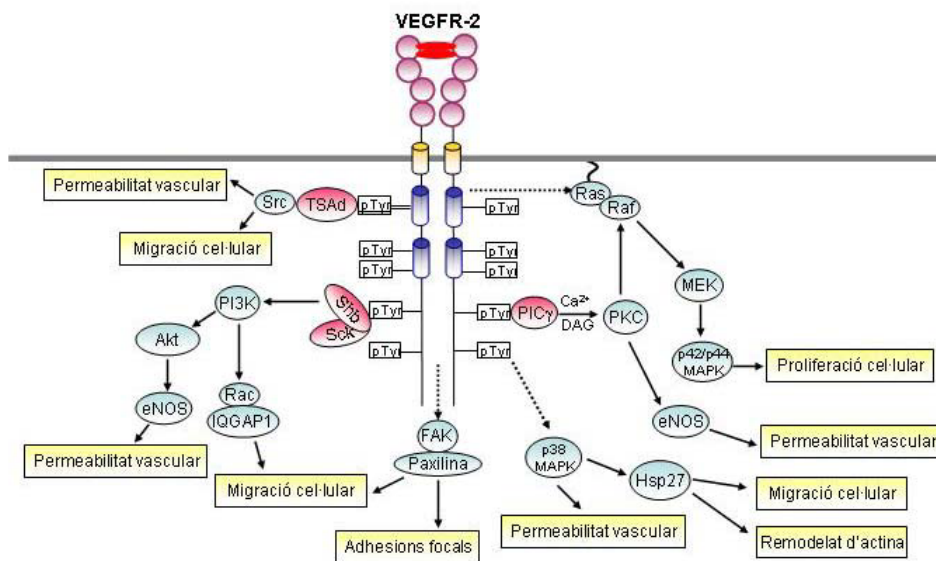


**Figura 13.** Representació esquemàtica de la família de VEGF i els seus receptors. (figura adaptada de Yla-Herttuala, 2007).

L'activitat d'aquests receptors tirosina cinasa ve regulada per la disponibilitat de lligands. Tot i que VEGF té més afinitat per VEGFR-1 que per VEGFR-2, és aquest últim receptor el que està considerat com el mediador de la majoria de senyals angiogèniques induïdes per VEGF-A. D'aquesta manera, VEGFR-2 és crucial pels efectes mitogènics, quimiotàctics, de supervivència i vasodilatació induïts per VEGF en CEs (Gille et al., 2001). Aquest receptor està format per una regió extracel·lular amb set dominis tipus immunoglobulina, un domini transmembrana i un domini tirosina cinasa

amb un insert de 70 aminoàcids. A més d'expressar-se en les CEs, VEGFR-2 també s'expressa en cèl·lules neuronals, osteoblasts, megacariòcits i cèl·lules progenitores hematopoietiques. L'expressió d'aquest receptor està autoregulada pels seus mateixos lligands. Els ratolins deficientes per aquest receptor moren a E8.5-E9.5 a causa de deficiències en el desenvolupament, concretament en la vasculogènesi i en la formació de cèl·lules hematopoietiques (Shalaby et al., 1995). En els adults, l'expressió de VEGFR-2 en les CEs disminueix, tornant a augmentar en l'endoteli dels vasos que es troben en un procés d'angiogènesi (Cebe-Suarez et al., 2006; Olsson et al., 2006).

Després de la unió a VEGFR-2, VEGF-A activa diferents cascades de senyalització entre les quals cal destacar la via clàssica de proliferació cel·lular Ras-Raf-1-MEK-MAPK, la inducció de permeabilitat vascular a través de PI3K/Akt/eNOS o Src, diferents efectors de la migració cel·lular com les GTPases Cdc42 i Rac, FAK, la MAPK p38 o Src (figura 14) (Gerber et al., 1998; Guo et al., 2005; Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).



**Figura 14.** Transducció de senyal a través de VEGFR-2 (Figura adaptada de Olsson et al, 2006).

VEGFR-1 també està format per un domini extracel·lular amb set dominis tipus immunoglobulina, una regió transmembrana i un domini intracel·lular tirosina cinasa. Durant el desenvolupament, VEGFR-1 s'expressa en angioblasts i en l'endoteli, tot i que en menor grau si es compara amb VEGFR-2. En adults, VEGFR-1 s'expressa en CEs,

osteoblasts, monòcits/macròfags, trofoblasts de la placenta, cèl·lules mesangials renals i també en algunes cèl·lules progenitores hematopoètiques. Tal com passava amb VEGF-A, l'expressió de VEGFR-1 també es regula directament per hipòxia. VEGFR-1 té una activitat cinasa molt baixa, i la deleció del seu domini cinasa no afecta el desenvolupament vascular, suggerint que el seu paper abans del naixement és mínim (Hiratsuka et al., 1999). No obstant, alguns estudis suggereixen que VEGFR-1 és crític pel procés d'angiogènesi en adults, majoritàriament en condicions patològiques (Carmeliet et al., 2001; Rakic et al., 2003). A més, VEGFR-1 participa en la migració de monòcits, en el reclutament de les CEs progenitores i en l'increment de les propietats adhesives de les cèl·lules NK. A més, l'activació de VEGFR-1 per part de PlGF promou la formació de vasos col·laterals i l'activitat arteriogènica en processos d'isquèmia a través del reclutament de cèl·lules de la medul·la òssia. Le Couter et al. van proposar una nova funció per VEGFR-1 en les CEs hepàtiques. En aquest estudi, l'activació de VEGFR-1 donava lloc a l'alliberament de HGF, que actua de manera paracrina sobre els hepatòcits estimulant-ne la proliferació (LeCouter et al., 2003). D'aquesta manera, la senyalització a través de VEGFR-1 en les CEs no només té un paper en la regulació de l'angiogènesi, sinó també en l'alliberament paracrí de factors de creixement específics de teixit (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

Els ratolins deficientes per VEGFR-1 moren a E8.5-E9.0 a causa de una desorganització vascular causada pel creixement exagerat de les CEs. Per tant, sembla que VEGFR-1 podria funcionar segregant VEGF-A durant l'embriogènesi regulant la seva accessibilitat per VEGFR-2 en els vasos sanguinis en desenvolupament (Olsson et al., 2006).

#### 4.1.1.3. Funcions de VEGF.

VEGF-A és crític durant el desenvolupament embrionari, ja que controla un gran número de processos que van des de l'expansió de les primeres cèl·lules progenitores de la vasculatura al control de la proliferació i migració de les CEs, el remodelat vascular i l'especificació arterio-venosa. Així doncs, VEGF-A és l'estimulador d'angiogènesi més potent que s'ha descrit fins al moment. En models *in vitro*, VEGF-A estimula el creixement de CEs vasculars derivades d'artèries, venes i vasos limfàtics i indueix la migració i la formació tubular de les CEs en diferents condicions experimentals. A més,

VEGF-A també estimula una potent resposta angiogènica en una gran varietat de models *in vivo*, ja que és un important factor per la supervivència per a les CEs (Byrne et al., 2005; Otrrock et al., 2007).

VEGF-A també és un important inductor de permeabilitat vascular. En aquest context, molts estudis han proposat el NO com un factor crític per aquest procés. Tot i això, els animals deficients per eNOS es desenvolupen amb normalitat, fet que fa pensar que aquesta via és dispensable per l'angiogènesi durant el desenvolupament (Iwakiri et al., 2002; Mehta and Malik, 2006; Theodorakis et al., 2003).

#### 4.1.1.4 Factor de creixement derivat de placenta.

PlGF va ser descobert en la placenta humana l'any 1991, dos anys després de la identificació del VEGF (Maglione et al. 1991) El transcrit humà de PlGF genera tres isoformes que difereixen en el tamany i en les seves propietats d'unió: PlGF-1 (PlGF<sub>131</sub>), PlGF-2 (PlGF<sub>152</sub>) i PlGF-3 (PlGF<sub>203</sub>). PlGF-2 és capaç d'unir-se a substàncies polianióniques (heparina) i als co-receptors Np-1 i Np-2 a causa de la inserció d'un domini bàsic de 21 aminoàcids. A més, aquesta isoforma és la única present en ratolins. Tot i que s'han fet molts estudis per determinar la regulació de l'expressió de PlGF, encara no està clar si la hipòxia afecta l'expressió d'aquest factor de creixement i si hi ha altres molècules involucrades en aquesta regulació (De Falco et al., 2002; Green et al., 2001; Persico et al., 1999).

Els ratolins deficients per PlGF no mostren un fenotip aparent. No obstant, aquests ratolins mostren una recuperació lenta després de ser sotmesos a un infart de miocardi i defectes en la formació de vasos col·laterals en resposta a una isquèmia induïda en les extremitats (Carmeliet et al., 2001). En canvi, la sobreexpressió de PlGF s'ha associat a diferents situacions d'angiogènesi patològica (Autiero et al., 2003; Luttun et al., 2002a; Luttun et al., 2002b). Els estudis *in vitro* han mostrat que el paper de PlGF en l'angiogènesi és controvertit. En alguns d'aquests estudis, PlGF ha mostrat tenir molt poc efecte sobre la proliferació, migració i permeabilitat de les CEs, mentre que altres treballs mostren que l'eix PlGF/VEGFR-1 estimula el creixement, la viabilitat i la migració d'aquestes cèl·lules (Tjwa et al., 2003).

#### 4.1.1.5 Factors limfoangiogènics VEGF-C i VEGF-D.

VEGF-C i VEGF-D són principalment factors limfoangiogènics que indueixen el creixement de vasos limfàtics tant durant el desenvolupament com en l'adult. VEGF-C es produeix com una proteïna precursora que és proteolitzada a l'espai extracel·lular per generar una proteïna homodimèrica de 21-kDa amb gran afinitat pels receptors 2 i 3 de VEGF. La forma madura de VEGF-C indueix mitogènesi, migració i supervivència de les CEs, així com quimiotaxi de macròfags i monòcits. Durant el desenvolupament, VEGF-C s'expressa principalment en zones de formació de vasos limfàtics. En aquest context, els ratolins deficients per VEGF-C moren a E15.5-E17.5 a causa de malformacions en els vasos limfàtics i la consegüent formació d'edema tissular. No obstant, tot i ser crític per la formació de la vasculatura limfàtica, VEGF-C no és essencial pel desenvolupament de vasos sanguinis. La transcripció del mRNA de VEGF-C en CEs s'incrementa en resposta a citoquines proinflamàtiques, indicant que VEGF-C pot regular la funció dels vasos limfàtics durant la inflamació (Adams and Alitalo, 2007; Karkkainen et al., 2004; Tammela et al., 2005).

La forma humana de VEGF-D és processada en els seus extrems C- i N-terminals per donar lloc a una forma madura que s'uneix als receptors 2 i 3 de VEGF i és mitogènica i angiogènica per CEs, així com inductora d'angiogènesi i limfoangiogènesi *in vivo*. En ratolins, en canvi, VEGF-D només s'uneix al receptor 3 de VEGF, indicant que VEGF-D té un paper diferent en aquesta espècie. En alguns tipus de tumors, VEGF-D té un paper crucial per als fenòmens de limfoangiogènesi i metastasi (Byzova et al., 2002; Otrrock et al., 2007; Rissanen et al., 2003; Tammela et al., 2005).

#### **4.1.2. Les angiopoietines.**

Un altre sistema de senyalització involucrat en el manteniment, el creixement i l'estabilització dels vasos sanguinis és el format per les angiopoietines i els seus receptors. Aquest sistema consta de dos receptors tirosina cinasa (Tie-1 i Tie-2) i quatre lligands: Ang-1, Ang-2, Ang-3 i Ang-4. Els receptors s'expressen de manera gairebé exclusiva en CEs i en cèl·lules progenitores hematopoietiques, tot i que l'expressió de Tie-2 també s'ha trobat en alguns monòcits i eosinòfils associats a tumors. Tie-1 i Tie-2 tenen una estructura similar que consisteix en un domini extracel·lular amb un 33% de similitud i un domini tirosina cinasa intracel·lular que mostra una similitud del 67%. Les

angiopoietines es van identificar com a lligands de Tie-2. Entre elles, les més conegudes i més ben caracteritzades són Ang-1 i Ang-2. Sorprenentment, de moment no s'ha identificat cap lligand per Tie-1. Tot i això, a concentracions molt elevades, Ang-1 és capaç d'unir-se a Tie-1 a través d'integrines (Bach et al., 2007; Eklund and Olsen, 2006; Jones, 2003).

#### 4.1.2.1 Angiopoietina-1.

Ang-1 s'expressa de manera constitutiva en diferents tipus cel·lulars: pericits, CMLLs, fibroblasts i algunes cèl·lules tumorals. En canvi, l'expressió d'Ang-2 és gairebé exclusiva de les CEs, tot i que també se n'ha detectat expressió en algun altre tipus cel·lular. L'expressió constitutiva d'Ang-1 i els baixos nivells de la fosforilació de Tie-2 en la vasculatura adulta suggereixen que la senyalització de Tie-2 mediada per Ang-1 s'encarrega de controlar la quiescència vascular. A més, Ang-1 indueix migració, formació tubular, ramificació vascular i supervivència, però no proliferació de les CEs (Hayes et al., 1999; Kwak et al., 1999; Papapetropoulos et al., 1999). Ang-1 també exerceix efectes protectors sobre l'endoteli mitjançant la seva acció antipermeabilitzant i antiinflamatòria (Stoeltzing et al., 2003; Thurston et al., 2000). En aquest context, Ang-1 indueix la sobreexpressió de PECAM-1 i disminueix la fosforilació de PECAM-1 i de VE-caderina a les unions cèl·lula-cèl·lula, fet que provoca que es formin de manera més ràpida. A més, Ang-1 disminueix els nivells de les molècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-Selectina induïts per VEGF a les CEs, donant lloc a una disminució de l'adhesió de leucòcits. Per altra banda, Ang-1 estabilitza els vasos mitjançant el reclutament de pericits, i, tot i que no es coneixen molt bé els mecanismes d'aquest efecte, es creu que involucra l'alliberament de factors de creixement com PDGF per part de les CEs (Uemura et al., 2002). Cal dir que la majoria d'aquestes accions induïdes per Ang-1 vénen mediades per l'activació de la via de PI3-K i la conseqüent activació d'Akt (Brindle et al., 2006; Ward and Dumont, 2002).

#### 4.1.2.2. Angiopoietina-2.

Ang-2 s'uneix a Tie-2 però no indueix l'autofosforilació del receptor, suggerint que Ang-2 funciona com a lligand antagonista de Tie-2 (Maisonpierre et al., 1997). Aquest concepte es recolza en el fet que els ratolins transgènics per Ang-2 no són viables i mostren un fenotip similar als ratolins deficientes per Ang-1 o Tie-2. En canvi,



els ratolins deficientes per Ang-2 es desenvolupen amb normalitat, tot i que alguns d'aquests ratolins moren al cap de 14 dies a causa d'ascites quilosa i edema subcutani característics d'una malformació dels vasos limfàtics (Gale et al., 2002; Gerhardt and Betsholt, 2003).

L'expressió d'Ang-2 està molt controlada. D'aquesta manera, el mRNA d'Ang-2 és gairebé indetectable en la vasculatura quiescent, mentre que en la vasculatura tumoral la seva expressió es troba exageradament augmentada. L'expressió d'Ang-2 es regula per diferents citoquines com FGF-2, VEGF i TNF- $\alpha$ , així com per factors ambientals com la hipòxia, nivells elevats de glucosa i superòxid (Mandriota and Pepper, 1998). L'alliberament d'Ang-2 dóna lloc a una desestabilització ràpida de l'endoteli, suggerint que Ang-2 funciona com un regulador negatiu de l'endoteli en estat quiescent. A més, Ang-2 desencadena una resposta inflamatòria mitjançant l'activació de l'endoteli i la inducció de permeabilitat vascular (Ward and Dumont, 2002).

Contràriament a l'expressió relativament estable d'Ang-1, Ang-2 s'expressa principalment en zones de remodelat vascular, incloent l'aparell reproductor femení i els tumors (Zhang et al., 2003). En aquests teixits, Ang-2 es troba sobreexpressat conjuntament amb VEGF-A als llocs d'angiogènesi activa, mentre que en zones de regressió vascular l'expressió de VEGF-A en relació a Ang-2 està disminuïda. Aquestes observacions suggereixen un model on la unió d'Ang-2 a Tie-2 no indueix cap funció específica, sinó que interfereix amb l'efecte estabilitzador d'Ang-1 augmentant la sensibilitat dels vasos a l'acció d'altres factors pro-angiogènics. En consistència amb aquest model, es va veure que Ang-2 promou la capacitat de resposta a VEGF en diferents territoris vasculars (Oshima et al., 2005).

Altres estudis, però, han mostrat que Ang-1 i Ang-2 tenen funcions similars. Per exemple, l'estimulació sostinguda de CEs amb Ang-2 és capaç d'induir la fosforilació de Tie-2, així com la senyalització d'Akt, que promou supervivència i migració cel·lular. A més, Ang-2 pot estimular la quimiotaxi i la formació tubular de CEs en gels de col·lagen o en esferoides. En aquest context, estudis *in vivo* han demostrat que Ang-2 pot actuar com a factor proangiogènic en models experimentals de la membrana de la pupila en ratolins o l'assaig *corneal pocket* en conills (Jones, 2003; Eklund and Olsen, 2006).

Finalment, un estudi recent va mostrar que Ang-2 és capaç de sensibilitzar les CEs als estímuls proinflamatoris. D'aquesta manera, en presència d'Ang-2, les CEs sobreexpressen ICAM-1 i VCAM-1 en resposta a TNF- $\alpha$ . A més, Ang-2 també sensibilitza les CEs a l'acció de VEGF, un factor clau pel procés d'angiogènesi. Aquest fenomen es reverteix amb l'administració d'Ang-1, ja que l'activació de Tie-2 per aquest factor disminueix la inflamació mitjançant la inhibició de NF- $\kappa$ B. Així doncs, aquests resultats suggereixen que Ang-2 no només té un paper en el remodelat dels vasos sanguinis, sinó que també promou la inducció de la resposta inflamatòria (Fiedler et al., 2006).

#### 4.1.2.3 El receptor Tie-2.

Tant Ang-1 com Ang-2 s'uneixen al mateix lloc del domini extracel·lular de Tie-2 amb afinitats similars. La unió d' Ang-1 a Tie-2 provoca una autofosforilació del receptor que promou migració i supervivència endotelial. Aquest concepte es recolza en el fet que els ratolins deficients per Ang-1 i Tie-2 mostren fenotips similars, ja que moren entre E9.5 i E12.5 a causa de defectes en el remodelat vascular del plexe capil·lar primari i en el desenvolupament del cor. Aquesta similitud de fenotips suggereix que l'activació de Tie-2 per part d'Ang-1 media el remodelat i l'estabilització de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-ECM i juga un paper important en el reclutament de cèl·lules periendotelials als vasos sanguinis. Els ratolins deficients per Ang-1 presenten un fenotip menys sever que els deficients per Tie-2, suggerint que hi ha altres angiopoietines que poden participar en la senyalització per Tie-2 durant el desenvolupament vascular (Fiedler and Augustin, 2006).

El fet que les CMLLs no expressin Tie-2 ha portat a la hipòtesis que les CEs regulen el recobriment de cèl·lules musculars de manera paracrina mitjançant l'activació de Tie-2. D'aquesta manera, l'Ang-1 derivada de cèl·lules mesenquimals activa Tie-2 en CEs en vasos que estan en desenvolupament. Aquestes CEs, per la seva banda, produeixen i secreten substàncies quimiotàctiques com serotonina, PDGF-B, TGF- $\beta$  o EGF, que s'encarreguen de reclutar les cèl·lules murals per estabilitzar els nous vasos sanguinis formats (Lindblom et al., 2003).

La fosforilació de Tie-2 per part d'Ang-1 activa diferents cascades de senyalització cel·lular que activen diferents proteïnes efectores entre les quals cal destacar la via PI3K/Akt, que sembla essencial per la supervivència, migració i formació tubular induïda per Ang-1; la via Dok-R-PAK i les GTPases RhoA i Rac1, involucrades en l'efecte migratori induït per Ang-1 o la via Ras-Raf-1-MEK-MAPK, entre altres (Cascone et al., 2003; Marron et al., 2000; Master et al., 2001). La unió de PI3-K a Tie2 activa Akt, que media els efectes antiapoptòtics d'Ang-1 i media l'activació d'eNOS (Papapetropoulos et al., 2000; Babaei et al., 2003). A més, Akt fosforila i inactiva el factor de transcripció forkhead que, a la vegada, és un potent inductor de l'expressió i de la secreció d'Ang-2. L'activació de Tie-2 també dona lloc al reclutament de l'inhibidor del factor nuclear NF- $\kappa$ B ABIN-2, que inhibeix la via de NF- $\kappa$ B protegint les CEs de l'apoptosi mitjançant la inhibició de respostes inflamatòries (Hughes et al., 2003; Brindle et al., 2006).

#### **4.1.3. El factor de creixement derivat de plaquetes.**

El factor de creixement PDGF va ser purificat a finals dels anys 70 com un factor provinent de les plaquetes que promou la proliferació de cèl·lules mesenquimals. Existeixen 4 gens per PDGF (A, B, C i D), i cinc formes biològicament actives de la proteïna: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC i PDGF-DD. Aquests factors de creixement s'uneixen, amb diferent selectivitat, als receptors tirosina cinasa PDGFR- $\alpha$  i PDGFR- $\beta$ , que s'expressen en CEs i CMLLs. PDGF-BB i el seu receptor PDGFR- $\beta$  tenen un paper essencial en l'estabilització dels nous vasos sanguinis formats a través del revestiment per part de les CMLLs (Lindahl et al., 1997). Mitjançant l'alliberament de PDGF-BB, les CEs estimulen el creixement, la migració, supervivència i diferenciació de les cèl·lules mesenquimals que expressen PDGFR- $\beta$  i les recluten al voltant dels vasos naixents, fet que comporta un model paracrí d'interacció entre els dos tipus cel·lulars (Abramsson et al., 2003). D'aquesta manera, l'absència de pericits en embrions deficientes per PDGF-B o PDGFR- $\beta$  incrementa el creixement de CEs, la permeabilitat i la deformitat i el tamany i fragilitat dels vasos, donant lloc a sangrat, defectes en la perfusió vascular i hipòxia (Hellstrom et al., 1999; von Tell et al., 2006). L'administració dual de VEGF i PDGF-BB dona lloc a la formació d'una xarxa vascular

més madura que la que es forma administrant qualsevol dels dos factors per separat, la qual cosa suposa un fet rellevant pel desenvolupament d'estratègies terapèutiques dirigides a incrementar l'angiogènesi. Pel que fa als tumors, tot i que les CEs tumorals expressen PDGF-BB, només algunes de les cèl·lules murals associades a tumors expressen PDGFR- $\beta$ . Tot i això, la inhibició de la senyalització a través de PDGFR- $\beta$  és capaç de bloquejar l'angiogènesi en alguns tipus de tumors (Erber et al., 2004; Tallquist and Kazlauskas, 2004).

PDGF-C i PDGF-D també promouen angiogènesi, però la seva funció en aquest procés encara no està ben caracteritzada.

#### **4.1.4. Hipòxia.**

La hipòxia és un fenomen de desequilibri entre el subministrament i la demanda d'oxigen tissular que té lloc en algunes patologies vasculars i neoplàstiques, i que dona com a resultat un abastiment limitat d'oxigen en el microambient d'alguns teixits. Pel que fa a la regulació de l'angiogènesi, la hipòxia constitueix un estímul important per la formació de nous capil·lars, així com pel reclutament de CEs progenitores. La resposta cel·lular a la hipòxia ve mediada per l'activació de HIF-1, que induïx l'expressió de gens que afecten el creixement de les CEs, el reclutament de CMLLs, la vasoregulació o l'atracció de leucòcits, entre altres funcions (Liao and Johnson, 2007).

HIF-1 és un factor de transcripció heterodimèric format per dues subunitats: HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ . Mentre que l'expressió de HIF-1 $\beta$  és constitutiva, l'expressió de HIF-1 $\alpha$  augmenta exponencialment a mesura que la concentració d'oxigen disminueix. En condicions de no hipòxia (normòxia), HIF-1 $\alpha$  s'hidroxila en dos residus prolina, interacciona amb el proteasoma i es degrada. En canvi, durant la hipòxia, la degradació de HIF-1 $\alpha$  s'inhibeix, donant lloc a l'acumulació de la proteïna, que dimeritza amb HIF-1 $\beta$  per unir-se als elements de resposta a HIF-1 que formen part del promotor de molts gens pro-angiogènics. Entre els factors proangiogènics regulats per hipòxia cal destacar VEGF, Ang-2, HGF, PlGF, Tie-2, VEGFR-1, PDGF-B, NOS, ET-1, MCP-1, IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-13, PAI-1, TF, fibronectina,  $\alpha$ -integrina o catepsina-D, entre altres (Hirota and Semenza, 2006; Wang and Semenza, 1995).

#### 4.1.5. Altres factor proangiogènics.

Altres factors de creixement amb capacitat angiogènica són HGF, que, mitjançant la unió al seu receptor c-met, és un activador potent d'angiogènesi. Aquest efecte pot indirecte, mitjançant l'estimulació de les CEs perquè produeixin VEGF o directe mitjançant l'activació de les CEs per part de HGF (Sengupta et al., 2003; Zhang and Vande Woude, 2003). Per altra banda, el factor FGF-2 també ha mostrat la seva capacitat proangiogènica mitjançant la unió al receptor FGFR-1 i FGFR-2, fet que permet el reclutament de vies de senyalització depenents d'altres factors de creixement proangiogènics (Kanda et al., 2004).

El factor de creixement TGF- $\beta$  és una citoquina multifuncional involucrada en la regulació de la proliferació, diferenciació, migració i supervivència de diferents tipus cel·lulars. En mamífers, existeixen tres isoformes de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3, se secreta de forma latent i necessita ser activat per proteases abans d'unir-se als seus receptors tirosina cinasa de tipus I i II. Després de la unió del lligand als receptors tipus I i la seva conseqüent activació, les senyals es transdueixen al nucli a través dels factors intracel·lulars anomenats Smads.

La pèrdua o l'excés de funció d'aquest factor en ratolins ha revelat que les vies de senyalització de TGF- $\beta$  tenen un paper important durant l'embriogènesi i el manteniment de l'homeostasi en adults, ja que són crucials pels diferents passos del procés angiogènic, incloent el manteniment de la integritat de la paret vascular, el reclutament de CMLLs, la desposició de ECM i la diferenciació de CEs a un endoteli més especialitzat. De totes maneres, TGF- $\beta$  pot comportar-se com un inhibidor o un estimulador de l'angiogènesi *in vitro* i *in vivo*, depenent del context cel·lular i de les condicions experimentals (Bertolino et al., 2005; Lebrin et al., 2005).

Els components de la ECM també tenen una funció important en el creixement dels vasos sanguinis, no només com a suport estructural, sinó també mitjançant la pròpia senyalització i actuant com a reservori de factors de creixement. Les principals molècules que formen la ECM es poden dividir en dos tipus: les proteïnes fibroses (col·lagen, laminina, fibronectina i elastina) i els glicosaminoglicans (GAGs). Les proteïnes fibroses participen en la formació de l'esquelet i en l'adhesió de les estructures de la matriu i estan envoltades de GAGs, que les mantenen hidratades i els confereixen

propietats gelatinoses. Els components de la ECM i la membrana basal transdueixen senyals pro- o antiangiogènics a través de la unió a integrines. Les integrines són receptors de superfície de components específics de la ECM, que transmeten informació de manera bidireccional entre l'exterior i l'interior de les cèl·lules vasculares i les ajuden a formar nous vasos en coordinació amb els seus voltants (Heino, 2007; Rhodes and Simons, 2007; Serini et al., 2006).

La fibronectina és una glicoproteïna dimèrica que se secreta i s'adhereix als components estructurals i als receptors de la superfície cel·lular contribuint no només a l'organització de la ECM, sinó també a l'adhesió, la migració, el creixement i la diferenciació cel·lular. Els ratolins deficientes per FN mostren un fenotip homozigot que és letal durant el desenvolupament embrionari a causa de anomalies en la formació dels vasos sanguinis (Watt and Hodivala, 1994). La FN té múltiples isoformes, una de les quals és una forma soluble que es troba en sang i altres fluïds corporals i està involucrada en la coagulació sanguínia i la cicatrització. Les altres formes de la FN se situen adjacents a la superfície de les cèl·lules formant part de la ECM en forma de fibril·les insolubles. Per tal que la fibronectina s'agrupi per formar fibril·les, cal un procés d'activació que està regulat per integrines i pels filaments d'actina intracel·lulars. Per altra banda, l'estructura primària dels dominis de fibronectina està formada per tres tipus de mòduls que es repeteixen: tipus I, II i III. D'entre aquests mòduls, el més abundant és la repetició tipus III, que conté una seqüència formada pel tripèptid arginina, glicina i àcid aspàrtic, que és l'encarregada d'unir-se a integrines i mediar la senyalització intracel·lular (Pankov and Yamada, 2002).

Un dels primers passos per la formació dels vasos sanguinis consisteix en la degradació de la membrana basal subendotelial i la ECM adjacent. Així doncs, la degradació proteolítica constitueix una part molt important del procés de neovascularització. Diverses famílies de proteïnases han estat implicades en aquest procés, entre les quals cal els uPAs, el PAI-1, les MMPs, els TIMPs, les heparanases, les quimases, les triptases, les catepsines o les calicreïnes, entre altres. Les proteïnases s'encarreguen de fragmentar les proteïnes de la ECM per facilitar la migració de les CEs, d'alliberar factors proangiogènics units a la matriu i d'activar algunes quimioquines angiogèniques per la proteòlisi. El procés de degradació de la ECM, però, ha de tenir lloc de manera controlada, ja que una degradació excessiva podria limitar el

suport estructural necessari per la migració de les CEs i inhibir l'angiogènesi. D'aquesta manera, les proteïnases també poden aturar l'estímul angiogènic mitjançant l'alliberació d'inhibidors units a la matriu que actuen com a inhibidors endògens de l'angiogènesi (Roy et al., 2006; Rundhaug, 2005).

Com ja s'ha comentat, els leucòcits reclutats als teixits durant un procés d'inflamació secreten diferents quimioquines que poden afectar l'angiogènesi patològica. Entre les quimioquines proangiogèniques cal destacar GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , ENA-78, GCP-2, IL-8, SDF-1, 9E3, eotaxina, MCP-1 o fractalquina, mentre PF-4, MIG, IP-10, ITAC, BCA-1 es comporten com a factors angiostàtics (Mehrad et al., 2007).

## **4.2. Angiogènesi i inflamació.**

Nombroses evidències han demostrat que la neovascularització és un element clau en la fisiopatologia de la inflamació, ja que és essencial per la persistència i la cronicitat de diferents situacions patològiques associades a inflamació com la psoriasi, l'artritis reumatoide, la malaltia de Crohn, la diabetes, desordres oculars o el càncer, entre altres. En aquest context, molts tipus cel·lulars importants durant els processos inflamatoris alliberen diferents factors de creixement com TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8 o IL-18, que estimulen l'angiogènesi de manera directa sobre les CEs o indirectament estimulant l'expressió de VEGF o altres factors proangiogènics per part de diferents tipus cel·lulars. Per altra banda, l'angiogènesi perpetua el procés inflamatori distribuint oxigen i nutrients per satisfer les necessitats metabòliques de les cèl·lules presents als llocs d'inflamació. Així doncs, en models animals d'inflamació, s'ha vist que l'angiogènesi té lloc durant les primeres etapes de la resposta inflamatòria. Aquesta activació inicial dona com a resultat un increment de l'expressió de les molècules d'adhesió i quimioquines per part de les CEs, que són capaces de promoure el reclutament de més infiltrat cel·lular, amplificant així el procés de resposta inflamatòria (Ezaki et al., 2001). En aquest context, l'endoteli té un paper important en el procés de migració i extravasació de cèl·lules del sistema immune a través de la vasculatura. De fet, la migració de cèl·lules del sistema immune cap als teixits inflamats va gairebé sempre acompanyada d'un increment de neovascularització (Lai and Adams, 2005).

Molts dels processos inflamatoris es poden resoldre després de l'eliminació del factor iniciador, fent que les CEs retornin a un estat no activat. No obstant, en la inflamació crònica, l'infiltrat es manté donant lloc a una inflamació persistent que es perpetua tot i l'absència del factor que ha provocat l'estimulació original. Aquesta fase crònica de la inflamació està associada al creixement de nous vasos sanguinis, que ve acompanyada d'un fenomen d'organogènesi limfoide terciària. En els teixits que adquireixen característiques d'òrgans limfoides, s'observa un reclutament de limfòcits que no és el que s'associa normalment a l'infiltrat inflamatori i les CEs venulars adquireixen una morfologia similar a les grans vècules d'entrada de limfòcits als nòduls limfàtics. Cal destacar que aquests nous vasos constitueixen una via d'entrada pel continu reclutament de cèl·lules inflamatòries, així com de nutrients i oxigen a les àrees d'inflamació crònica que estan en un estat d'hipòxia (Pober and Sessa, 2007).

Tot i que la inflamació és crucial per defensar el nostre organisme contra els patògens, quan la resposta inflamatòria perdura i esdevé crònica, tenen lloc efectes adversos que s'intensifiquen amb l'activació de l'angiogènesi. En aquest context, nombroses evidències demostren que la inflamació crònica i l'angiogènesi poden ser induïdes per estímuls comuns i a més, els dos processos semblen dependents l'un de l'altre, ja que s'han trobat mecanismes moleculars comuns en ambdós processos. Totes aquestes observacions han donat lloc al desenvolupament d'estratègies terapèutiques dirigides contra l'angiogènesi i la inflamació crònica (Costa et al., 2007).

Moltes malalties hepàtiques cròniques es caracteritzen per processos d'inflamació i fibrosi. En aquest context, el teixit fibròtic ofereix resistència al flux sanguini i a la distribució d'oxigen, fet que provoca que el teixit esdevingui hipòxic. D'aquesta manera, l'estimulació dels factors induïbles per hipòxia dona lloc a la sobreexpressió de factors proangiogènics i a la formació de nous vasos sanguinis. De manera similar, en moltes malalties hepàtiques té lloc una reacció inflamatòria local. En aquest context, els mediadors proinflamatoris, així com altres estímuls independents de la hipòxia, poden estimular la resposta angiogènica a través de la inducció del factor induïble per hipòxia HIF-1 (Medina et al., 2004).

Diverses malalties hepàtiques cròniques, com l'hepatitis B o C, la cirrosi biliar primària, l'hepatitis autoimmune, la malaltia alcohòlica hepàtica o fins i tot la cirrosi hepàtica s'han associat a processos d'angiogènesi en un context de diferents condicions



inflamatòries, fibròtiques i d'isquèmia (Battista et al., 2001; Corpechot et al., 2002; El Assal et al., 1998; Garcia-Monzon et al., 1995; Lara-Pezzi et al., 2001; Majano et al., 2001; Mazzanti et al., 1997; Medina et al., 2003; Rosmorduc et al., 1999; Shimoda et al., 1999; Sanz-Cameno et al., 2006; Sato et al., 1983).

Tot i que els estudis anteriors fan referència al teixit hepàtic, altres estudis han mostrat un increment d'angiogènesi en la microvasculatura de diferents òrgans de la cavitat abdominal en models experimentals de cirrosi. (Geerts et al., 2006; Sieber et al., 2001; Sumanovski et al., 1999).

### **4.3. Inhibició de l'angiogènesi.**

La regressió dels vasos sanguinis té lloc de manera natural quan els vasos que formen la vasculatura naixent estan en excés. A més, aquest fenomen constitueix la base de la majoria d'estratègies terapèutiques antiangiogèniques. Durant els últims anys, s'han dedicat molts esforços a desenvolupar estratègies terapèutiques per promoure la revascularització dels teixits isquèmics o per inhibir l'angiogènesi en el càncer o malalties oculars, de les articulacions o de la pell.

Els esforços per inhibir el procés d'angiogènesi estan majoritàriament dirigits a la investigació del càncer. En aquest cas, l'angiogènesi no inicia la malaltia, però promou la progressió tumoral i la metastasi. Així doncs, el creixement neoplàstic requereix la nova formació de vasos sanguinis, per la qual cosa es va proposar que inhibir l'angiogènesi podria ser un tractament antitumoral efectiu. En contra del que passa amb les cèl·lules tumorals, les CEs són genòmicament estables i per això es consideren ideals com a dianes terapèutiques no resistents a la teràpia antiangiogènica (Ferrara and Alitalo, 1999).

Generalment, els inhibidors del procés d'angiogènesi poden actuar a les diferents etapes del cicle de creixement de les CEs. D'aquesta manera, es pot inhibir l'activació dels vasos quiescents mitjançant la neutralització de factors proangiogènics amb anticossos o altres compostos que inhibeixin la seva senyalització. A més, també es pot inhibir la degradació de la ECM per tal d'evitar la invasió dels nous vasos formats, així com la proliferació de les CEs mitjançant l'arrest del cicle cel·lular o la inhibició de la maduració d'aquestes cèl·lules. Finalment, es pot forçar les CEs a entrar en un procés de

mort cel·lular. Alguns dels principals agents antiangiogènics es troben resumits a la taula 1 d'aquest treball (Kerbel and Folkman, 2002).

Inhibidor	Classe	Diana	Mecanisme d'acció
<b>TNP-470</b> (TAP Pharmaceuticals)	<i>anàleg de la fumagilina</i>	<i>No es coneix bé (ciclina D1 i ciclina A)</i>	<i>Inhibició de la proliferació cel·lular</i>
<b>Trombospondina-1</b>	<i>Inhibidor endògen</i>	<i>No es coneix bé</i>	<i>Inhibició de la proliferació cel·lular</i>
<b>Angiostatina</b>	<i>fragment intern del plasminògen</i>	<i>No es coneix bé</i>	<i>Inhibició de la proliferació cel·lular</i>
<b>Endostatina</b>	<i>Inhibidor endògen/ fragment del col·lagen XVIII</i>	<i>No es coneix bé</i>	<i>Inhibició de la proliferació cel·lular</i>
<b>Bevacizumab/Avastina</b> (Genentech Inc.)	<i>Anticòs monoclonal</i>	<i>VEGF</i>	<i>Interferència amb factors angiogènics</i>
<b>VEGF trap</b> (Regeneron Inc.)	<i>Proteïna fusió (Fc Ig/2IgVEGFR1/3IgVEGFR2)</i>	<i>VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub> i PlGF</i>	<i>Interferència amb factors angiogènics</i>
<b>Trastuzumab/Herceptina</b> (Genentech Inc.)	<i>Anticòs monoclonal</i>	<i>HER2</i>	<i>Interferència amb factors angiogènics</i>
<b>Pegaptanib/Macugen</b> (Eyeteck Pharmaceuticals)	<i>Oligonucleòtid</i>	<i>VEGF<sub>165</sub></i>	<i>Interferència amb factors angiogènics</i>
<b>SU11248/Sunitinib</b> (Pfizer Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>VEGFR, PDGFR, Kit i Flt3</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>SU5416/Semaxinib</b> (Pfizer Inf.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>VEGFR</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>SU6668</b> (Pfizer Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>Flk-1, FGFR i PDGFR</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>Bay43-9006/Sorafenib</b> (Bayer Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>Rafcinasa, VEGFR i PDGFR</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>AZD2171</b> (AstraZeneca Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>VEGFR2</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>PTK787/Vatalanib</b> (Novartis Pharmaceuticals)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>VEGFR1,2,3 PDGFR i ckit</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>Erlotinib/Tarceva</b> (Genentech Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>EGFR</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>ZD1839/Gefinitib</b> (AstraZeneca Inc.)	<i>Inhibidor tirosina cinasa</i>	<i>EGFR</i>	<i>Inhibidors de cinases</i>
<b>Marimastat</b> (British Biotech Inc.)	<i>àcid hidroxàmic</i>	<i>MMP2, MMP9</i>	<i>Inhibició de la degradació de la ECM</i>
<b>Batimastat</b> (British Biotech Inc.)	<i>àcid hidroxàmic</i>	<i>MMP16, MMP8, MMP12</i>	<i>Inhibició de la degradació de la ECM</i>
<b>BAY12-9566</b> (Bayer Inc.)	<i>anàleg de l'àcid butanoic</i>	<i>MMP2, MMP9</i>	<i>Inhibició de la degradació de la ECM</i>
<b>AG3340/Prinomastat</b> (Pfizer Inc.)	<i>derivat de l'àcid hidroxàmic</i>	<i>MMP2, MMP3, MMP9 i 14</i>	<i>Inhibició de la degradació de la ECM</i>
<b>Talidomida</b> (Celgene Corporation)	<i>No es coneix bé</i>	<i>TNF<math>\alpha</math>, inhibició de VEGF, NFkB, COX2</i>	<i>No es coneix bé</i>

Taula 1. Inhibidors d'angiogènesi.

#### 4.4.1. Inhibidors endògens.

La senyalització intracel·lular associada a la cascada angiogènica es basa en una retroalimentació positiva que fa possible continuar l'activació de l'angiogènesi a través de la producció prolongada dels factors de creixement i dels seus receptors. En aquest context, la producció d'inhibidors endògens és important per aturar aquest cicle positiu de senyals proangiogèniques. Dins del grup d'inhibidors endògens de l'angiogènesi, cal destacar la trombospondina, l'angiostatina, la tusmatina, l'endostatina, la canstatina o la vasohibina, entre altres (Gasparini et al., 2005; Folkman, 2004; Ruhrberg, 2001).

Cal dir que els esforços per utilitzar inhibidors endògens per bloquejar el creixement tumoral han resultat poc eficaços. Per exemple, l'angiostatina recombinant humana i l'endostatina s'han utilitzat en assajos clínics de fase I sense obtenir un benefici clínic significatiu.

#### 4.4.2. Inhibició de VEGF

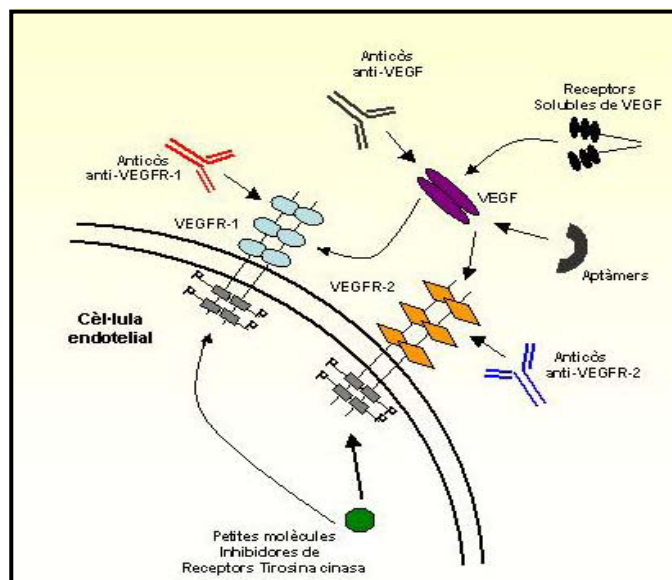
Tot i que la inhibició de FGF o del sistema angiopoietina/Tie2 podria ser eficaç per inhibir el creixement tumoral, VEGF i els seus receptors constitueixen el sistema més investigat en el procés d'angiogènesi tumoral i són la principal diana de les teràpies antiangiogèniques. En aquest context, les estratègies per inhibir VEGF inclouen diferents aproximacions com ara els receptors solubles, els anticossos, petites molècules sintètiques i els aptàmers (Ho and Kuo, 2007).

L'experiència clínica amb els inhibidors de VEGF ve donada per diferents assajos clínics que han generat una gran controvèrsia. En primer lloc, l'anticòs monoclonal humanitzat anti-VEGF-A anomenat Bevacizumab, que s'uneix de manera específica a VEGF, ha demostrat tenir un benefici clínic en pacients amb càncers colorectal, de mama, de pulmó, d'ovari, peritoneal, pancreàtic, de pròstata i de ronyó, combinat amb la quimioteràpia convencional. Aquest anticòs va ser aprovat l'any 2004 pel seu ús clínic per la FDA per càncer colorectal i de pulmó (Ferrara et al., 2004). Altres anticossos dirigits contra els receptors de VEGF també han mostrat efectes antiangiogènics. Entre ells, cal destacar MF-1 i 6.12, que actuen sobre VEGFR-1 i DC101, anticòs específic per VEGFR-2. Cal dir, però, que la combinació dels anticossos en contra dels dos receptors de VEGF dona una resposta inhibidora major a l'obtinguda

quan s'administren els inhibidors per separat, suggerint un paper dels dos receptors en la vascularització tumoral.

Una altra aproximació consisteix en administrar VEGFR-1 o VEGFR-2 solubles per tal d'inhibir la senyalització d'aquests receptors. En aquest sentit, un receptor soluble quimèric anomenat sVEGFR1/2 o VEGF-Trap ha mostrat una gran capacitat d'inhibició de la vasculatura tumoral en diferents models experimentals. Pel que fa a la pràctica clínica, VEGF-Trap es troba en fase III en càncer d'ovari (Holash et al., 2002). Altres inhibidors/reguladors de la via de VEGF són l'aptàmer VEGF165, anticossos contra PlGF i petites molècules sintètiques que actuen sobre receptors de VEGF i altres receptors tirosina cinasa anomenats RTKs (Milkiewicz et al., 2006; Ruckman et al., 1998).

Per altra banda, l'activitat dels receptors de VEGF es pot neutralitzar mitjançant la immunització amb pèptids derivats dels receptors. A llarg termini, una estratègia més atractiva seria inhibir de manera específica les vies de senyalització que regulen la proliferació o la migració, ja que, d'aquesta manera, l'increment de les dosis o la duració del tractament no afectaria les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis normals (figura 15) (Carmeliet, 2003; Ferrara and Kerbel, 2005).



**Figura 15.** Estratègies per inhibir la senyalització de VEGF (figura adaptada de Ferrara and Kerbel, 2005).

#### 4.4.3. Altres inhibidors d'angiogènesi.

Entre els diferents inhibidors del procés d'angiogènesi, cal destacar TNP-470, un anàleg de la fumagilina que bloqueja l'activitat de la cinasa dependent de la ciclina CDK2 i inhibeix l'activació de la proteïna del retinoblastoma. Aquest compost ha obtingut bons resultats en alguns pacients amb carcinoma renal, de pròstata i alguns sarcomes (Ingber et al., 1990).

Una manera d'incrementar l'efecte antiangiogènic consisteix en actuar no només sobre la via de VEGF, sinó també inhibint el reclutament de les cèl·lules murals mitjançant la inhibició dels receptors de PDGF (Erber et al., 2004). Altres estratègies consisteixen en inhibir el reclutament de cèl·lules hematopoiètiques, actuant, per exemple, sobre algun dels seus receptors com c-kit. L'angiogènesi també es pot inhibir actuant sobre les pròpies cèl·lules tumorals mitjançant inhibidors del receptor de EGF com erlotinib o cetuximab. Aquesta inhibició de l'angiogènesi es deu al fet que les cèl·lules tumorals alliberen diversos factors proangiogènics i indueixen l'expressió de receptors angiogènics als vasos tumorals. A més, al destruir les cèl·lules tumorals, els vasos disminueixen la seva compressió i s'incrementa la perfusió i la distribució dels diferents compostos antiangiogènics i antitumorals (Kerbel and Folkman, 2002).

Una altra estratègia consisteix en inhibir els receptors d'algunes integrines crítiques per l'adhesió i la supervivència cel·lular. Per exemple, s'han desenvolupat anticossos en contra de la integrina  $\alpha v$  (Vitaxin) tot i que només ha obtingut uns resultats modestos en assajos clínics en fase I. El pèptid cíclic EMD 121974, que inhibeix les integrines  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  es troba també en fase I. Altres inhibidors d'angiogènesi són els inhibidors de la ciclooxigenasa-2 com Celecoxib, els inhibidors de les MMPs (Marimastat, Batimastat o Bay12-9566) i inhibidors dirigits a factors de transcripció rellevants per l'angiogènesi com HIF-1 $\alpha$  (Gasparini et al., 2005; Milkiewicz et al., 2006).

#### 4.4.4. Compostos sintètics inhibidors de receptors tirosina cinasa.

Els receptors tirosina cinasa que estan involucrats directament en l'angiogènesi són els receptors de VEGF, els receptors de PDGF, els receptors de FGF, de HGF i de les angiopoietines 1 i 2, entre altres. En els últims anys s'ha treballat sobre la hipòtesi

que la inhibició de diferents vies i de diferents receptors obtindria resultats superiors als observats a l'inhibir una sola diana proangiogènica. En aquest context, s'han desenvolupat una gran quantitat de petites molècules sintètiques amb capacitat antiangiogènica dirigides a inhibir aquests receptors tirosina cinasa conegudes com RTKs. La majoria d'aquestes molècules s'administren de manera oral i s'utilitzen actualment en la pràctica clínica (Epstein, 2007).

En primer lloc, el Vatalanib (PTK787) és un inhibidor de l'activitat tirosina cinasa dels receptors de VEGF i, a concentracions elevades, de PDGFR i c-kit. S'administra de manera oral i ha demostrat ser eficaç en alguns tipus de tumors sòlids com càncer colorectal (es troba ja en fase III), càncer de mama, de pròstata, de pàncreas, gastrointestinal i algunes leucèmies (fase II). SU5416 o Semaxanib, un inhibidor específic per l'activitat tirosina cinasa de VEGFR-2, també ha demostrat ser eficaç en molts tipus de tumors en models experimentals murins. Tot i això, els resultats obtinguts en diversos estudis de fase II amb aquest inhibidor van ser bastant decepcionants, fet pel qual es va interrompre el seu ús clínic. SU6668 té un espectre d'activitat molt ampli i va ser dissenyat per inhibir l'activitat tirosina cinasa de PDGFR, FGFR-1 i VEGFR-2. Tot i això, diversos assajos clínics van mostrar que aquest inhibidor té més afinitat per altres tirosina cinases, per la qual cosa la utilització d'aquest inhibidor s'ha hagut de reorientar en base a nous estudis preclínics. ZD6474 és un inhibidor oral de VEGFR-2, VEGFR-3 i, en menor grau, de EGFR. Aquest inhibidor també ha mostrat una certa activitat contra PDGFR, VEGFR-1, Tie-2, FGFR-1 i s'ha mostrat eficaç en càncer de mama, de tiroïdes (fase II) i també en càncer de pulmó (fase III). AG-013736 és un agent antiangiogènic oral amb activitat contra VEGFR, PDGFR i c-kit. En la pràctica clínica, es troba en fase II en càncer de tiroïdes, de mama, de pàncreas, renal, de pulmó i en melanoma. AZD2171 és un potent inhibidor oral dels receptors de VEGF i PDGF. En càncer de pulmó, aquest inhibidor ja es troba en fase III i també ha mostrat ser eficaç en altres tumors sòlids, càncer d'ovari, de coll, colorectal de mama, de ronyó o de fetge, entre altres (Besse et al., 2006; Homsí and Daud, 2007). Entre aquests inhibidors, destaquen tres molècules sintètiques que han estat aprovades pel seu ús clínic per la FDA. En primer lloc, l'imatinib (STI157) és un inhibidor oral de tirosina cinases que bloqueja l'activitat de l'oncoproteïna bcl-abl i també de c-kit i PDGFR. L'ús clínic d'aquest inhibidor va ser aprovat per la FDA l'any 2001 pel tractament de la leucèmia mieloide

crònica i de tumors estromals gastrointestinals. Per altra banda, el sorafenib (BAY 43-9006) és un inhibidor potent de Raf-1, un enzim clau en la via de senyalització Ras/Raf/MEK/ERK, tot i que també bloqueja l'autofosforilació dels diferents receptors tirosina cinasa com VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR $\beta$ , cKit i RET. Aquest inhibidor va ser aprovat l'any 2005 per la FDA pel seu ús clínic en càncer renal i també ha demostrat la seva eficàcia en melanoma, càncer hepatocel·lular, glioma, càncer de pròstata, d'endometri, colorectal, pancreàtic, de mama, gàstric i molts altres (Chow and Eckhardt, 2007).

Finalment, cal destacar l'inhibidor SU11248 o Sunitinib. Aquest inhibidor és un derivat estructural de les indolin-2-ones que va ser identificat gràcies a la seva potent activitat contra VEGFR-2 i PDGFR- $\beta$  i a una gran estabilitat i solubilitat en sèrum. En aquest context, Sunitinib és capaç d'inhibir el domini *split* cinasa dels receptors de VEGF, PDGF i bFGF, c-kit, la tirosina cinasa relacionada amb fms (Flt3), CSF-1 i RET. En assajos *in vitro*, aquest inhibidor va ser capaç d'inhibir VEGFR-2 i els receptors de PDGF a un rang de concentracions nanomolar. Aquest resultat va ser recolzat per assajos funcionals d'inhibició d'aquests RTKs, on el tractament de cèl·lules endotelials humanes del cordó umbilical (HUVEC) amb l'inhibidor va donar lloc a una disminució de la migració i una inducció d'apoptosi en aquestes cèl·lules (Mendel et al., 2003; Osusky et al., 2004).

Pel que fa a estudis *in vivo*, sunitinib va resultar eficaç a l'hora d'inhibir el creixement tumoral de diferents línies cel·lulars i models de xenografts en ratolins en diversos estudis preclínics. En aquest context, Sunitinib va mostrar activitat antiangiogènica i prevenció del creixement tumoral en diferents tipus de models tumorals en ratolins. Mitjançant l'ús d'aquests models animals, es va poder determinar les concentracions mínimes requerides de RTKs per inhibir el creixement tumoral, tenint en compte que la unió del sunitinib amb les proteïnes plasmàtiques és molt elevada i arriba aproximadament al 95%. Segons això, per tal d'inhibir la fosforilació de VEGFR-2 i PDGFR es necessiten dosis de 20 a 40 mg/kg/dia per tal d'arribar a concentracions en plasma de 50 a 100 ng/ml. El fet d'administrar dosis més grans de manera més intermitent no va resultar efectiu per mantenir les concentracions terapèutiques en sèrum, ja que el bloqueig de la fosforilació del receptor es mantenia més de 12 hores però menys de 24 hores. A més, per poder inhibir el receptor de FGF es requerien unes

dosis molt més elevades d'inhibidor, fet que fa pensar que aquest receptor juga un paper menys important en l'activitat preclínica de sunitinib (Mendel et al., 2003).

A part dels receptors de VEGF i PDGF, Sunitinib també pot inhibir el receptor Flt-3, que s'expressa en cèl·lules progenitores hematopoiètiques immadures i en algunes cèl·lules mieloides i limfoides. Aquest receptor regula la supervivència i la proliferació d'aquests tipus cel·lulars. En aquest cas, es va observar que dosis de 20mg/kg/dia eren suficients per mantenir una concentració plasmàtica de 50 ng/ml, que era capaç d'inhibir Flt3 de manera sostinguda i eradicar cèl·lules leucèmiques en un model murí de leucèmia mieloide aguda (O'Farrell et al., 2003).

Sunitinib també és capaç d'inhibir c-kit, un receptor que s'expressa en cèl·lules hematopoiètiques progenitores, mastòcits, cèl·lules germinals i cèl·lules intersticials de Cajal. Aquest receptor ha estat implicat en leucèmies, càncers de pulmó o gastrointestinal, neuroblastoma, melanoma i càncers d'ovari i de mama. Tot i que *in vitro* es requereixen dosis de l'ordre nanomolar per inhibir la fosforilació de c-Kit, per inhibir aquest receptor *in vivo* en models murins de càncer de pulmó o gastrointestinal cal utilitzar dosis de 40 a 80 mg/Kg/dia (Heinrich et al., 2002).

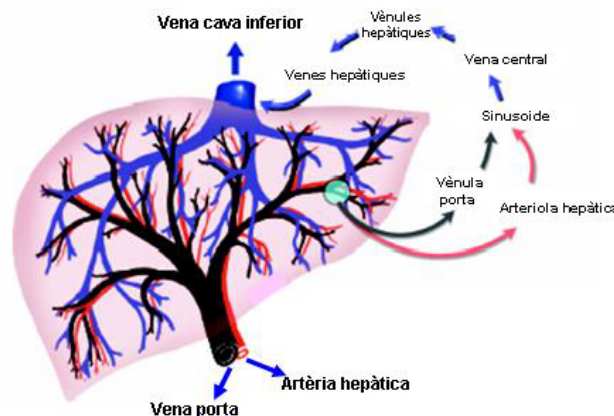
Pel que fa a la pràctica clínica, Sunitinib va ser aprovat per la FDA l'any 2006 pel tractament de càncer metastàtic renal i per tumors gastrointestinals estromals resistents a imatinib (Adams and Leggas, 2007). Aquest inhibidor també s'ha mostrat eficaç en altres tipus de tumors com melanoma, càncer colorectal, de pròstata, de mama, gàstric o neuroendocrí, on es troba en estudis de fase II (Folkman, 2007; Honsi and Daud, 2007).

## **5. LA CIRCULACIÓ HEPÀTICA.**

El fetge té quatre tipus de vasculatura diferents: la vena porta, l'artèria hepàtica, el sinusoides hepàtic i la vena hepàtica. Aquest òrgan rep d'un 15 a un 20% de la despesa cardíaca mitjançant una aportació sanguínia dual: l'artèria hepàtica, que subministra aproximadament un terç del volum sanguini hepàtic distribuint sang ben oxigenada cap al territori hepàtic; i la vena porta, que reparteix els dos terços del volum sanguini restant, distribueix sang poc oxigenada i plena de nutrients provinent de les estructures abdominals. Contràriament a l'estructura habitual de venes a l'organisme, la vena porta



es ramifica en vènules que acaben formant les vènules porta terminals característiques dels tractes portals. L'artèria hepàtica i la vena porta drenen el seu contingut als sinusoides hepàtics, que constitueixen la xarxa capil·lar del fetge. Després de circular pels sinusoides, la sang es buida en les vènules hepàtiques terminals, la vena hepàtica i, en últim lloc, a la vena cava inferior i l'aurícula dreta (figura 17).



**Figura 16.** Circulació hepàtica (figura adaptada de Aird, 2007b).

Els sinusoides hepàtics se situen entre els hepatòcits i constitueixen el llit de capil·lars de la microcirculació hepàtica, formant una barrera efectiva al pas de bacteries, virus i productes tòxics del tracte intestinal a la circulació sistèmica a través del sistema venós portal. Així doncs, el sinusoides hepàtic juga un paper molt important a l'hora de mantenir la funció hepàtica.

## 5.1. Cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques.

### 5.1.1. Característiques generals.

Les CESs, que constitueixen el 50% de les cèl·lules no parenquimals del fetge, formen un endoteli discontinu que funciona com un tamís selectiu. D'aquesta manera, les CEs que revesteixen el sinusoides hepàtic són diferents de les que formen altres tipus de capil·lars i es caracteritzen per la presència d'un gran nombre de fenestracions de 90-100 nm. de diàmetre. Aquestes fenestracions ocupen d'un 6% a un 8% de la superfície del fetge i actuen com a filtres dinàmics per fluïds, soluts i partícules petites des de la sang als hepatòcits a través de l'espai de Disse. A més, les fenestracions també permeten

la transferència de lipoproteïnes i petits quilomicrons remanents des de la sang cap l'espai de Disse, on són recollides pels hepatòcits mitjançant endocitosi mediada per receptor. Hi ha diversos factors que poden fer variar el diàmetre de les fenestracions, entre els quals cal destacar la pressió, el CCl<sub>4</sub>, l'alcohol, la nicotina o la serotonina. Una altra de les característiques morfològiques més importants de les CESs és que, en condicions normals, aquestes cèl·lules produeixen molt poca membrana basal formada per col·lagen tipus IV (Aird, 2007b; Wisse, 1970).

Aquestes cèl·lules expressen una sèrie de marcadors comuns a totes les CEs que són útils a l'hora d'identificar una cèl·lula de llinatge endotelial. Entre aquests marcadors, cal destacar PECAM-1, el factor vWf, CD34, la endoglina (CD105), la E-Selectina (expressió baixa), la VE-caderina, la unió de lectines, la captació de LDLs acetilades o l'expressió d'eNOS. L'expressió de tots aquests marcadors pot variar en CESs en cultiu, a causa de la tendència de les cèl·lules a perdre els marcadors específics de teixit quan es cultiven *in vitro* (taula 2). En aquest context, en LSEC en cultiu, CD31 mostra una localització intracel·lular, mentre que, en estadis posteriors, després d'un procés de defenestració, CD31 s'expressa a la superfície d'aquestes cèl·lules (DeLeve et al., 2004). De moment, no es coneix cap marcador específic de CESs hepàtiques que no s'expressi en els altre tipus de CEs (Lalor et al., 2006). Tot i això, recentment s'han identificat dos noves lectines que s'expressen en les LSECs anomenades L-SIGN i LSEctin (Lai et al., 2006; Liu et al., 2004).

Marcador	Expressió endotelial extra-hepàtica	Expressió en CESs <i>in vivo</i>	Expressió en CESs <i>in vitro</i>	Utilització per fenotipatge
CD31	cèl.lules endotelials vasculars i limfàtiques	Sí, nivells baixos	Sí	Àmpliament expressat en CEs
vWf	cèl.lules endotelials vasculars	Sí, controvertida	Sí	Àmpliament expressat en CEs
Unió a lectina	cèl.lules endotelials	Sí	Sí	Àmpliament expressat en CEs
Captació AcLDLs	cèl.lules endotelials	Sí	Sí	També les capten macròfags i altres CEs.
CD34	cèl.lules endotelials vasculars i limfàtiques	No	Baix o absent	Es pot sobreexpressar durant capillarització o cultiu <i>in vitro</i>
E-Selectina	cèl.lules endotelials vasculars	Baix o absent	Baix, augmenta amb citoquines	Expressat en CEs activades
Antígen Pal-E	cèl.lules endotelials vasculars	No	No?	Es pot sobreexpressar durant capillarització
CD105/Endoglina	sobreexpressat en capillarització	Sí	Sí	Expressat en CEs i també en CHES i fibroblasts del fetge

Taula 2. Marcadors cel·lulars característics de les CEs.

Cal destacar que, en comparació amb les CEs provinents d'altres teixits, les CESs hepàtiques no s'adapten bé al cultiu *in vitro*. D'aquesta manera, quan aquestes cèl·lules es cultiven *in vitro*, els índex de supervivència són baixos i el seu fenotip és làbil, fet que dificulta la majoria d'estudis funcionals amb aquest tipus cel·lular (Braet et al., 1994; DeLeve et al., 2006; Tokairin et al., 2002). Els processos de supervivència i la funció d'aquestes cèl·lules *in vivo* i *in vitro* estan regulats per diferents factors associats a processos d'angiogènesi o homeòstasi de les CEs com VEGF, HGF, PDGF o EGF, entre altres. Molts d'aquests factors poden actuar de manera paracrina i poden ser secretats per altres tipus cel·lulars hepàtics pròxims a les CESs com hepatòcits, HSCs o KCs (Krause P et al., 2000; Ross et al., 2001; Semino et al., 2006).

Les CESs són capaces d'eliminar les macromolècules sobrants de la sang venosa portal mitjançant endocitosis mediada per receptor. Entre les molècules que es depuren de la sang destaquen components de la ECM com l'hialuronan, les LDLs, l'albumina desnaturalitzada, l'ovoalbumina i altres macromolècules modificades o desnaturalitzades (Enomoto et al., 2004; Smedsrod et al., 1990).

Una altra de les funcions importants de les CESs fa referència a la immunitat. Així doncs, aquestes cèl·lules tenen la capacitat de presentar antigens als limfòcits T mitjançant molècules dels complexos majors d'histocompatibilitat de classe I i II. A

més, les CESs també expressen les molècules coestimuladores CD40, CD54, CD80 i CD86. Sembla que aquesta funció de les CESs té com a resultat un fenomen de tolerància immunològica enlloc d'un augment de resposta immunitària enfront antígens específics (Knolle and Gerken, 2000). En aquest context immunitari, cal tenir en compte que els sinusoides hepàtics medien la majoria del tràfic leucocitari que té lloc en el fetge. Tal com passa en els capil·lars del pulmó, l'acumulació i l'adhesió de leucòcits als sinusoides hepàtics no ve precedida pel rodament. Així doncs, el reclutament de leucòcits en aquest territori no requereix E-Selectina i és parcialment depenent de l'expressió d'ICAM-1 i VCAM-1 a la superfície cel·lular (Granger and Kubes, 1994; Granger, 1997).

Finalment, les CESs participen en l'organogènesi i la regeneració hepàtica. D'aquesta manera, les CESs produeixen el factor de creixement HGF, que actua de manera paracrina per induir proliferació d'hepatòcits. Al mateix temps, els hepatòcits expressen VEGF, que s'uneix al VEGFR-2 donant lloc a proliferació vascular. S'ha demostrat també que VEGF indueix la proliferació d'hepatòcits a través del VEGFR-1 mitjançant l'expressió de HGF i IL-6 per part de les CESs (LeCouter et al., 2003).

### **5.1.2. Les CESs en condicions patològiques.**

Durant la fibrosi hepàtica, els sinusoides experimenten un procés anomenat capil·larització, que es caracteritza per una pèrdua progressiva de les fenestracions i la formació d'una membrana basal contínua de col·lagen tipus IV i laminina, fet que ve acompanyat per un increment de l'expressió de CD31 i VCAM-1. Aquests canvis impedeixen una correcta difusió de l'oxigen i del transport de soluts i fluids a través del sinusoides (Bhunchet and Fujieda, 1993; Martinez-Hernandez and Martinez, 1991; Mori et al., 1993). A més, el fenomen de capil·larització s'ha associat a una captació incorrecta d'acid hialurònic, un dels principals components de la ECM que s'ha associat amb processos d'inflamació, reparació tissular i morfogènesi regenerativa (Tamaki et al., 1996; Ueno et al., 1993).

Altres canvis microvasculars observats en els fetsges dels animals cirròtics inclouen l'aparició d'espais lliures de sinusoides d'alta velocitat, la dilatació de les vènules hepàtiques terminals i un increment del lumen vascular causat per la formació

de vasos derivats que sobrepassen els sinusoides (Sherman et al., 1990; Vollmar et al., 1998).

Finalment, i tal com ja s'ha comentat anteriorment, les CESs aïllades d'animals cirròtics generen una quantitat deficient de NO que contribueix a l'increment de la resistència intrahepàtica característic dels fetges d'aquests animals.



**Objectius**





La cirrosi hepàtica constitueix un estadi de fibrosi hepàtica irreversible que es produeix com a resposta a un dany hepàtic prolongat i que té com a conseqüència l'acumulació de teixit connectiu al fetge degut a un desequilibri important entre la producció i la degradació de la ECM. Quan la cirrosi és severa, es produeix una desestructuració completa del parènquima hepàtic donant lloc a l'aparició d'insuficiència hepàtica i trastorns hemodinàmics greus. Aquestes alteracions apareixen associades a un síndrome de circulació hiperdinàmica que es caracteritza per hipotensió arterial, hipertensió portal, augment de la despesa cardíaca i disminució de les resistències perifèriques totals. En estadis més avançats, els pacients cirròtics desenvolupen importants alteracions en l'homeòstasi dels líquids corporals que donen lloc a la formació d'ascites.

Els coneixements actuals sobre els mecanismes fisiopatològics que intervenen en el desenvolupament i el manteniment de la cirrosi hepàtica han estat associats a una millora paral·lela en el tractament del malalt cirròtic. No obstant, la cirrosi hepàtica encara segueix estant vinculada de manera inevitable a un deteriorament progressiu de la qualitat de vida d'aquests pacients i a una disminució significativa de la seva esperança de vida. En aquest context, i gràcies a estudis realitzats durant les dos últimes dècades, s'ha pogut apreciar la importància de l'endoteli vascular com a regulador multifuncional de la fisiologia i la fisiopatologia dels processos homeostàtics i inflamatoris. Les funcions de l'endoteli depenen bàsicament de la seva capacitat per respondre a estímuls hemodinàmics, mediadors locals i d'alliberar factors que poden influenciar els mecanismes d'adhesió i agregació cel·lular. A més, aquest tipus cel·lular també està involucrat en els processos de vasculogènesi i angiogènesi, ja sigui en condicions fisiològiques o patològiques.

Una sèrie d'evidències acumulades durant els últims anys recolzen la hipòtesi de que una marcada disfunció endotelial podria ser la causa de l'inici i el manteniment d'algunes de les complicacions associades a la cirrosi hepàtica. En aquest context, existeixen diversos estudis que han destacat la importància de el NO en la fisiopatologia de la cirrosi, així com d'altres substàncies vasoactives produïdes per l'endoteli com són les prostaciclins, les endotelines o el factor de von Willebrand, entre altres. A més a més, durant el desenvolupament de la cirrosi tenen lloc una sèrie de canvis morfològics i funcionals en la microvasculatura del territori hepàtic, entre els quals cal destacar la

“capil·larització” sinusoïdal, caracteritzada per la presència d’una membrana basal capil·lar que envolta el sinusoides hepàtic que dificulta l’intercanvi de substrats entre els hepatòcits i la sang que perfon el fetge; la disminució de les fenestracions, tant en el diàmetre com en nombre, la formació de derivacions entre els vasos pre- i postsinusoïdals que causa un increment del lumen vascular, la dilatació de les vènules hepàtiques terminals o l’aparició de sinusoides amb velocitats elevades de flux, entre altres.

Així doncs, tenint en compte els antecedents descrits, l’objectiu global d’aquesta tesi doctoral consistia en investigar nous mecanismes responsables de les alteracions en la cèl·lula endotelial que tenen lloc durant la progressió de la cirrosi hepàtica amb la finalitat d’explorar noves dianes terapèutiques específiques l’endoteli per al tractament d’aquesta malaltia.

De manera específica, aquesta tesi doctoral està dividida en quatre estudis principals dirigits a:

- I. Avaluar el paper fisiopatològic de la via de senyalització Akt/eNOS en l’increment de la resistència intrahepàtica que té lloc en la cirrosi.
- II. Determinar l’adaptació fisiopatològica de l’endoteli a la presència de líquid ascític mitjançant l’anàlisi de l’activitat morfogènica del líquid ascític humà en CEs.
- III. Avaluar les diferències en el perfil d’expressió gènica entre l’endoteli hepàtic de rates controls i rates cirròtiques per tal d’identificar nous gens diana específics d’endoteli.
- IV. Analitzar la funció fisiopatològica de l’angiogènesi inflamatòria en la cirrosi avaluant la utilitat terapèutica d’un inhibidor d’angiogènesi multidiana conegut com Sunitinib.

# **Resultats**



---

**Article 1: La transducció hepàtica d'un mutant constitutivament actiu d'Akt normalitza la pressió portal en rates cirròtiques.**

Diversos estudis han mostrat que els fetges cirròtics presenten un dèficit important de la producció de NO, així com una disminució de l'activitat de la proteïna eNOS en CEs aïllades d'aquest mateix teixit. Com ja s'ha comentat, un dels principals mecanismes de regulació d'eNOS consisteix en la fosforilació de la proteïna en el residu Ser1176 per part de la cinasa Akt, donant com a resultat l'activació d'eNOS i l'augment de la producció de NO. En el moment de començar aquest estudi, s'havien seguit diferents aproximacions farmacològiques per tal de distribuir NO al fetge de manera específica. No obstant, es si la via de senyalització Akt/eNOS podia participar en l'increment de la resistència intrahepàtica característica del fetge cirròtic.

Aquest primer treball es va realitzar en el model de cirrosi experimental en rates induït mitjançant la inhalació de CCl<sub>4</sub> de 17 a 19 setmanes (Claria and Jiménez, 1999; Jiménez et al., 1992). Després de l'extracció del teixit hepàtic, es va analitzar la quantitat de proteïna i l'estat de fosforilació d'Akt i eNOS per Western Blot. Finalment, es va investigar el paper d'Akt en els fetges de rates cirròtiques a través de la transducció amb adenovirus que codificaven per una forma constitutivament activa d'Akt (myr-Akt) o per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa. Els resultats d'aquest estudi es resumeixen a continuació:

1. Els fetges cirròtics presenten una activació deficient dels enzims Akt i eNOS.

En primer lloc, es va analitzar la quantitat de proteïna i l'estat de fosforilació d'Akt i eNOS en els homogenats de fetge provinents de rates cirròtiques mitjançant Western Blot. Aquests experiments van mostrar que els nivells de fosforilació hepàtics d'Akt i d'eNOS (Ser1176) estaven disminuïts en comparació amb els dels animals del grup control. Per altra banda, no es van observar canvis en els nivells proteics d'Akt o eNOS entre els dos grups experimentals (figura 1, article 1).

2. La transducció de CEs amb els adenovirus que codifiquen per  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), el mutant constitutivament actiu d'Akt (myr-Akt) o un mutant inactiu d'Akt (AA-Akt) promou la fosforilació d'eNOS i la producció de NO per part d'aquestes cèl·lules.

Per tal de determinar si els adenovirus  $\beta$ -gal, myr-Akt i AA-Akt podien transduir CEs *in vitro*, es van infectar CEs d'aorta bovines (BAEC) amb 100 multiplicitats d'infecció (m.o.i.) dels adenovirus esmentats, que va tenir com a resultat nivells similars d'expressió de myr-Akt i AA-Akt. A més, l'expressió de myr-Akt en BAEC va augmentar els nivells de fosforilació d'eNOS i la producció de NO per part d'aquestes cèl·lules (figura 2, article 1).

### 3. L'administració de l'adenovirus $\beta$ -Gal en rates cirròtiques té el fetge com a diana preferencial.

Per tal d'evaluar la distribució tissular dels transgens, es van infectar rates control amb l'adenovirus  $\beta$ -gal mitjançant administració intravenosa per la vena de la cua i es va analitzar l'expressió i l'activitat de l'enzim  $\beta$ -gal en diferents teixits com el fetge, l'artèria aorta, l'artèria mesentèrica, el cor, el ronyó o els pulmons, tres dies després de la infecció. Aquests experiments demostren que el fetge és l'òrgan que presenta una major activitat de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa, mentre que en els altres teixits l'activitat de l'enzim és gairebé inexistent. Després de 15 dies, l'activitat  $\beta$ -gal en el fetge és menor però encara es pot detectar, mentre que als 30 dies aquesta activitat ja esdevé indetectable (figura 3, article 1).

### 4. L'expressió de myr-Akt en fetges de rates cirròtiques activa eNOS i millora els paràmetres hemodinàmics d'aquests animals.

Per dur a terme aquests experiments *in vivo*, es van infectar rates cirròtiques amb els adenovirus de myr-Akt o  $\beta$ -gal ( $5 \times 10^5$  pfu) i es van dur a terme diferents anàlisis 3 dies després de la infecció. En primer lloc, es va demostrar la presència de myr-Akt en hepatòcits i en CESS aïllades dels animals cirròtics. Tot seguit, es van analitzar els nivells de fosforilació d'Akt i eNOS per Western Blot, donant com a resultat un increment dels nivells de fosforilació d'aquestes proteïnes en els fetges cirròtics transduïts amb myr-Akt, en comparació amb els fetges transduïts amb  $\beta$ -gal (vehicles) (figura 4A i 4B, article 1). En concordància amb aquest resultat, els nivells de cGMP intrahepàtics (mesura indirecta dels nivells de NO) eren significativament superiors en

els fetges transduïts amb myr-Akt (figura 4C, article 1). Finalment, es van mesurar els paràmetres hemodinàmics de pressió portal (PP), pressió arterial mitja (PAM), despesa cardíaca i flux mesentèric superior en aquests dos grups experimentals. Cal destacar que la transducció dels fetges cirròtics amb myr-Akt va provocar una millora dels paràmetres hemodinàmics amb una disminució de la PP en un 40%, un augment significatiu de la PAM i una disminució del flux mesenteric superior (figura 5, article 1).

### 5. L'administració adenovírica de myr-Akt o $\beta$ -gal no provoca efectes citopàtics ni altera la funció hepàtica dels animals cirròtics.

L'anàlisi d'alguns paràmetres bioquímics de funció hepàtica (bilirrubina, alanina transaminasa, lactat deshidrogenasa i albúmina) i l'examinació de la histologia hepàtica van determinar que no existien diferències en cap d'aquests paràmetres entre les rates infectades amb myr-Akt o  $\beta$ -gal (figura 6, article 1).





## BASIC-LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT

### Transduction of the Liver With Activated Akt Normalizes Portal Pressure in Cirrhotic Rats

MANUEL MORALES-RUIZ,\* PILAR CEJUDO-MARTÍN,\* GUILLERMO FERNÁNDEZ-VARO,\* SÒNIA TUGUES,\* JOSEFA ROS,\* PAOLO ANGELI,† FRANCISCA RIVERA,\* VICENTE ARROYO,§ JUAN RODÉS,§ WILLIAM C. SESSA,¶ and WLADIMIRO JIMÉNEZ\*

\*Hormonal Laboratory and §Liver Unit-Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic Universitari and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN), University of Barcelona, Barcelona, Spain;

†Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Padova, Padova, Italy; ¶Pharmacology Department, Molecular Cardiology Program, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

**Background & Aims:** Portal hypertension in cirrhosis is secondary to an increase in hepatic resistance that occurs mainly through collagen deposition. However, recent evidence points to a major contribution by other factors, such as an intrahepatic reduction in nitric oxide production. Akt is a major activator of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme, but its potential role in intrahepatic resistance in cirrhosis is unknown. For this reason the aims of the present study were to determine whether there is an impaired Akt activation in cirrhotic livers and how this phenomenon relates to the decrease in NO production associated with portal hypertension. **Methods:** Cirrhosis was induced in rats by carbon tetrachloride inhalation. Protein abundance and phosphorylation status of Akt and eNOS were examined by Western blotting. The role of Akt in the liver of cirrhotic rats was investigated through infection with adenoviruses encoding either  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) or constitutively active Akt (myr-Akt). **Results:** The liver of cirrhotic animals showed a significant reduction in Akt and eNOS phosphorylation. Adenoviral delivery of myr-Akt restored eNOS phosphorylation and increased the intrahepatic concentration of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. These events were associated with normalization in portal pressure and a significant increase in mean arterial pressure after 3 days of adenoviral infection. In contrast, transduction of livers with  $\beta$ -gal did not produce any change in these hemodynamic parameters. **Conclusions:** myr-Akt gene therapy restored Akt activation and NO production in the cirrhotic liver, suggesting that this therapy may be useful for the treatment of portal hypertension.

Increased resistance to portal blood flow is the primary factor in the pathophysiology of portal hypertension and is the main cause of morbidity and mortality of patients with cirrhosis.<sup>1</sup> This increased intrahepatic vas-

cular resistance is the consequence of anatomic abnormalities caused by fibrosis and the formation of regenerating nodules. It is well established that this is not a purely mechanical phenomenon and different vasoactive agents such as nitric oxide play an important role in the development of the intrahepatic resistance associated with cirrhosis. In this regard, there are studies showing that NO production and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein activity are decreased in perfused cirrhotic livers and isolated endothelial cells from cirrhotic liver, respectively.<sup>2,3</sup> The eNOS enzyme is highly regulated by posttranslational modifications and interaction with other proteins.<sup>4,5</sup> In this context, it has been shown recently that enhanced expression and interaction of caveolin with eNOS may contribute to impaired NO production and reduced NOS activity in livers from cirrhotic and bile duct-ligated rats.<sup>6,7</sup> However, further studies are required to completely define the mechanisms responsible for the reduced hepatic NO production, considering recent evidences of eNOS regulation by protein phosphorylation.

Recently, there has been increasing evidence that supports the role of the phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)/Akt pathway activating eNOS. The PI3-kinase enzyme catalyses the phosphorylation of phosphatidylinositol lipids producing phosphatidylinositol 3,4-

*Abbreviations used in this paper:* AA-Akt, inactive phosphorylation mutant Akt;  $\beta$ -gal,  $\beta$ -galactosidase; BAEC, bovine aortic endothelial cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HA, hemagglutinin; MAP, mean arterial pressure; myr-Akt, constitutively active Akt; NO, nitric oxide; P-Akt, polyclonal anti-phospho-Akt-Ser-473; P-eNOS, anti-phospho-eNOS-Ser-1177; pfu, plaque-forming unit; PI3-kinase, phosphoinositide 3-kinase; PP, portal pressure.

© 2003 by the American Gastroenterological Association  
0016-5085/03/\$30.00

doi:10.1016/S0016-5085(03)00909-0

bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. One downstream effector of PI3-kinase is the serine/threonine kinase Akt (or protein kinase B),<sup>8</sup> which is recruited to the plasma membrane and binds to phosphatidylinositol lipids via its pleckstrin homology domain on PI3-kinase activation. Akt is then phosphorylated by phosphoinositide-dependent kinases, and this phosphorylation enhances its catalytic activity toward a variety of diverse substrates.<sup>9</sup> Recently, it has been shown that Akt can phosphorylate eNOS on serine 1179 (bovine sequence) or serine 1177 (human sequence), resulting in eNOS activation and NO production.<sup>10,11</sup>

Because of the impaired NO production and eNOS activity found in cirrhotic livers, several pharmacologic and gene therapy approaches have been followed to specifically deliver NO to this organ. This new therapy includes the use of liver-targeted NO donors, such as the NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid NCX-1000,<sup>12</sup> and the hepatic gene transfer of neuronal NOS and eNOS.<sup>13,14</sup> Although these approaches reduced portal pressure in experimental animals, none of them showed how Akt activation and eNOS phosphorylation participated in the increased intrahepatic resistance occurring in the cirrhotic liver. For these reasons, the aim of this study was to assess the pathophysiological role of this signaling pathway by using a new gene therapy approach for the treatment of portal hypertension based on the activation of the intrahepatic eNOS by gene transfer of a constitutively active mutant of Akt.

## Materials and Methods

### Cell Purification and Culture

Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were isolated and cultured as previously described.<sup>16</sup> A total of 293 cells (American Type Culture Collection) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum, penicillin/streptomycin (50 U/mL and  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and L-glutamine (2 mmol/L). Endothelial cells from cirrhotic rats infected 3 days prior with myr-Akt adenovirus ( $5 \times 10^{10}$  plaque-forming units [pfu]) were purified after collagenase retrograde perfusion and posterior centrifugal elutriation as previously described.<sup>17</sup> The inferior vena cava was catheterized and perfused at a rate of 8 mL/min with Hanks' buffer (pH = 7.4) supplemented with 15 mmol/L HEPES and 1 mmol/L ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid at 37°C. Next, the portal vein was cut and the vena cava was ligated, and then the perfusion rate was increased to 14 mL/min. After an initial 10 minutes, perfusion was continued for 15 minutes with Hanks' buffer containing 15 mmol/L HEPES, 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , and 0.05% wt/vol of collagenase A (Roche Diagnostics, S.L. Mannheim, Germany). Then, the liver was excised and resuspended in Hanks' buffer (15 mmol/L HEPES, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase,

0.01% collagenase) and incubated for 10 minutes at 37°C. Cell suspension was filtered through a 100- $\mu\text{m}$  mesh and then parenchymal cells were removed by centrifugation at 70g. The remaining nonparenchymal cells were diluted in Hanks' buffer to a final concentration of  $30 \times 10^6$  cell/mL and a volume of 40 mL was loaded into a JE-6 Beckman elutriation rotor at 2500 rpm. For sinusoidal endothelial cell purification, 150 mL of cell suspension was collected (20 mL/min flow) and a peroxidase staining reaction was performed in this cell fraction to discard contamination by Kupffer cells. More than 95% of the cells were peroxidase negative.

### Adenoviral Constructs

Three replication-defective recombinant adenoviral constructs, under the control of the cytomegalovirus promoter, expressing  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), hemagglutinin (HA)-tagged inactive phosphorylation mutant Akt (AA-Akt), or a carboxyl-terminal HA-tagged constitutively active Akt (myr-Akt), were generated as described previously.<sup>10,18</sup> All vectors were propagated in the 293 cell line, and titers were determined by standard plaque assay.<sup>19</sup>

### In Vitro and In Vivo Viral Transduction

BAECs were infected with 100 multiplicity of infection of adenovirus containing  $\beta$ -gal, AA-Akt, or myr-Akt for 3 hours. The virus was removed and the cells were left to recover for 24 hours in complete medium. These conditions resulted in uniform expression of the transgenes in close to 100% of the cells.

The in vivo studies were performed in 30 adult male Wistar rats undergoing a cirrhosis induction protocol for 17–19 weeks,<sup>20</sup> and in 13 control Wistar rats, according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari. At the time of the study, only 5 cirrhotic rats had ascites. The animals were fed ad libitum with standard chow and distilled water containing phenobarbital (0.3 g/L) as drinking fluid. Cirrhotic rats were assigned randomly to one of the following groups: group A, cirrhotic animals not infected with adenoviruses; and groups B and C, which were infected with  $5 \times 10^{10}$  pfu of adenoviruses containing the transgene for  $\beta$ -gal or myr-Akt, respectively. For this purpose, the viruses were diluted in 500  $\mu\text{L}$  of saline solution and injected via the tail vein. After virus inoculation, the animals were returned to their cages with free access to food and water.

### Measurement of Hemodynamic Parameters

Animals were anesthetized with inactin (100 mg/kg), and portal pressure (PP), mean arterial pressure (MAP), and cardiac output were measured as previously described.<sup>21</sup>

### Splanchnic Hemodynamic Effect of Akt Activation in Cirrhotic Animals

Ten cirrhotic rats undergoing a cirrhosis induction protocol for 17–19 weeks were used in this experiment. Half of the animals were infected with adenoviruses containing the

transgene for  $\beta$ -gal ( $5 \times 10^{10}$  pfu) and the other half were infected with adenoviruses containing the transgene for myr-Akt gene ( $5 \times 10^{10}$  pfu) in a random manner. After 3 days of infection, an abdominal midline incision was performed in the animals and the superior mesenteric artery was dissected free from connective tissue and a nonconstrictive perivascular ultrasonic flow probe was placed around this vessel close to its aortic origin. The flow probe was then connected to a small animal flowmeter to measure blood flow in the superior mesenteric artery. Each value represents the average of 3 measurements. Measurements were made after a 30-minute period of stabilization after surgery.

### Western Blotting

Cell lysates and liver homogenates were prepared in lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mmol/L ethylene glycol-bis[ $\beta$ -aminoethyl ether]-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 1% [vol/vol] Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% deoxycholic acid, 20 mmol/L sodium fluoride [NaF], 1 mmol/L sodium pyrophosphate [ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ], 1 mmol/L sodium vanadate, 1 mmol/L Pefabloc, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin). The samples were run on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane that was blocked in Tris-buffered saline (10 mmol/L Tris, pH 7.6, 100 mmol/L NaCl) containing 0.1% (vol/vol) Tween 20 and 5% (wt/vol) nonfat dry milk for 2 hours, and probed with rabbit polyclonal anti-phospho-Akt-Ser-473 (P-Akt), anti-phospho-eNOS-Ser-1177 (P-eNOS), anti-Akt (New England Biolabs, Beverly, MA), mouse monoclonal anti-eNOS (BD Biosciences, Palo Alto, CA), or anti-HA-12CA5 (Roche Diagnostics), followed by an incubation with goat anti-mouse or donkey anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. A total of 100  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded for P-eNOS analysis and 30  $\mu\text{g}$  of proteins for eNOS, P-Akt, Akt, and HA analysis.

### Histology

Rats were killed and the right lateral hepatic lobe from each animal was removed immediately. For H&E staining, liver tissue was fixed in formalin and embedded in paraffin. Next, 4- $\mu\text{m}$  sections were made and stained. Histopathology was interpreted by one independent pathologist who was blinded to the study.

### Other Measurements

Serum osmolality was determined from osmometric depression of the freezing point (Osmometer 3MO; Advanced Instruments, Needham Heights, MA) and sodium and potassium concentration by flame photometry (IL 943; Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Total bilirubin, lactate dehydrogenase, albumin, and alanine transaminase levels were measured by the Advia 1650 automatic analyzer (Bayer, Tarrytown, NY). *LacZ* gene expression was detected by 2 methods: cytochemical staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) as previously described<sup>22</sup> (Sigma

Chemical Co, St. Louis, MO), and by a chemiluminescent  $\beta$ -gal reporter gene assay (Roche Diagnostics). For measurement of NO, the release of  $\text{NO}_2^-$ , the stable breakdown product of NO in aqueous medium, was determined by a chemiluminescence detector in a NO analyzer (Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO) as previously described.<sup>16</sup> The concentration of 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) was determined by radioimmunoassay (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA).

### Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SE. Statistical differences were measured by the unpaired Student *t* test, one-way analysis of variance with Bonferroni post hoc test, the Mann-Whitney *U* test, and the Kruskal-Wallis test with the Dunns post hoc test when appropriate. Differences were considered to be significant at a *P* value  $<0.05$ .

## Results

### Impaired Akt and Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation in Cirrhotic Animals

The liver histology of all animals treated with  $\text{CCl}_4$  included in the study had a finely granulated surface, and histologic examination showed the characteristic features of cirrhosis. Body weight, electrolytes, and osmolality in control and cirrhotic rats included in the study are depicted in Table 1.

Recently, it has been shown that Akt can phosphorylate bovine eNOS on serine 1179, resulting in eNOS activation and NO production.<sup>10,11</sup> To correlate the involvement of this signaling pathway with the impaired eNOS activity that has been described previously in the liver of cirrhotic animals, we documented the intrahepatic protein abundance of Akt and eNOS and their phosphorylation status by immunoblot analysis (Figure 1A). Akt phosphorylation is reduced in the liver homogenate of cirrhotic rats in comparison with control animals. Moreover, the phosphorylation of eNOS in serine 1176 (the Akt-phosphorylation site in the rat eNOS sequence) also is diminished significantly in the liver of cirrhotic animals with similar kinetics, as shown in the serine/threonine kinase Akt enzyme. No changes were observed in the amount of Akt or eNOS protein levels between either control or cirrhotic animals. Collectively, these data suggest that the reduction in the Akt activity found in cirrhotic livers may be responsible, at least in part, for the impaired function of eNOS observed in sinusoidal endothelial cells from injured liver.<sup>2,3,6,7</sup>

### In Vitro Characterization of the Adenoviral Constructs

Because of the impairment in Akt and eNOS activation observed in our experimental cirrhotic model,

**Table 1.** Standard Liver Function Test Results in Control and Cirrhotic Rats

	Control rats	Cirrhotic rats	Cirrhotic rats	
			$\beta$ -galactosidase	myr-Akt
Body wt (g)	555 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	481 $\pm$ 15	427 $\pm$ 12	429 $\pm$ 11
Alanine transaminase (U/L)	33.7 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	87.5 $\pm$ 9.3	81.9 $\pm$ 9	71.7 $\pm$ 6.5
Lactate dehydrogenase (U/L)	682.3 $\pm$ 87.3	615.8 $\pm$ 84.1	1131.9 $\pm$ 192.2	1042.5 $\pm$ 285.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.2 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.45	0.7 $\pm$ 0.45	0.6 $\pm$ 0.25
Albumin (g/L)	40 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 1.6	28 $\pm$ 1.8	28 $\pm$ 1.2
Serum sodium (mEq/L)	146 $\pm$ 3.7	142 $\pm$ 1.9	141 $\pm$ 1.2	142 $\pm$ 1.8
Serum potassium (mEq/L)	6.8 $\pm$ 1	6.5 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.5
Serum osmolality (mOsm/kg)	298 $\pm$ 6	299 $\pm$ 14	299 $\pm$ 5	297 $\pm$ 3

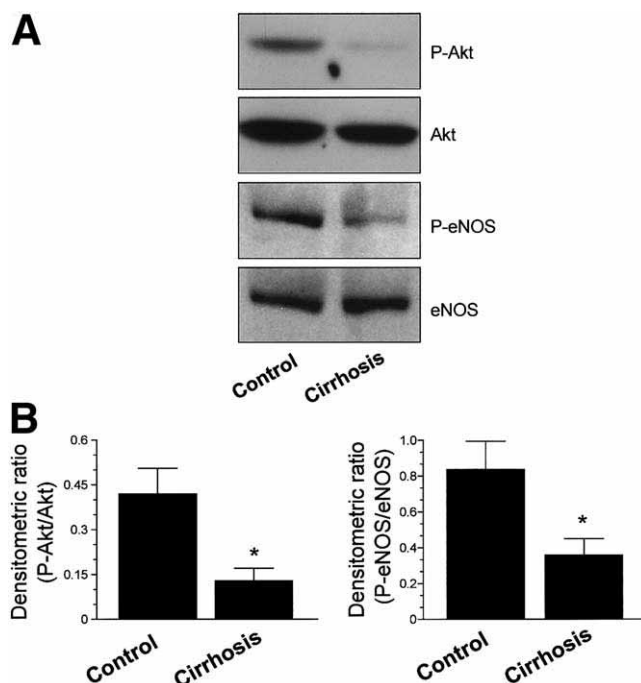
<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs. cirrhotic rats, cirrhotic rats transduced with  $\beta$ -galactosidase, and cirrhotic rats transduced with myr-Akt.

we investigated whether myr-Akt could be used as a candidate for gene therapy treatment of portal hypertension. For this purpose, we first assessed whether this adenoviral replication-defective construct could transduce endothelial cells in vitro and induce eNOS activation and NO production. BAECs were infected with 100 multiplicity of infection of adenovirus expressing  $\beta$ -gal, AA-Akt, or myr-Akt. Adenoviral transduction of BAECs

resulted in equal levels of expression of AA-Akt and myr-Akt (Figure 2B). Likewise, the expression of myr-Akt in BAECs was linked to an increase in eNOS phosphorylation, as expected considering the well-defined PI3-K/Akt/eNOS pathway. Next, we compared the basal accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> quantified by NO-specific chemiluminescence in these experimental conditions. There were no statistical differences in NO measurement between endothelial cells infected with  $\beta$ -gal or AA-Akt adenovirus. However, BAECs infected with myr-Akt adenovirus produced a significant increase of NO compared with cells infected with  $\beta$ -gal or AA-Akt viruses. These results showed that the  $\beta$ -gal, myr-Akt, and AA-Akt adenoviruses can transduce endothelial cells in vitro and that myr-Akt expression promotes PI3-kinase-independent eNOS phosphorylation and, as a result, NO production.

### Intravenous Administration of $\beta$ -Galactosidase Adenovirus Targets the Liver and Results in Intrahepatic Transgene Expression

To quantitatively examine the tissue distribution of the transgene in normal rats, adenoviruses carrying the  $\beta$ -gal gene ( $5 \times 10^{10}$  pfu/500  $\mu$ L) were infused into the tail vein. The liver, aorta, mesentery, lung, kidney, and heart were removed from animals 3 days after adenoviral infusion and then  $\beta$ -gal expression and activity were analyzed by X-gal staining and by a chemiluminescent reporter gene assay system, respectively. In agreement with several articles showing that intravenous administration of adenoviral vectors preferentially target the liver,<sup>15,23,24</sup> the highest level of  $\beta$ -gal activity and X-gal staining were seen in this organ (Figure 3). Moreover, although some activity was detected in the heart, there was almost no expression in the other tissues studied (Figure 3A). After 15 days,  $\beta$ -gal expression was reduced but still detected in the liver. However, no  $\beta$ -gal activity



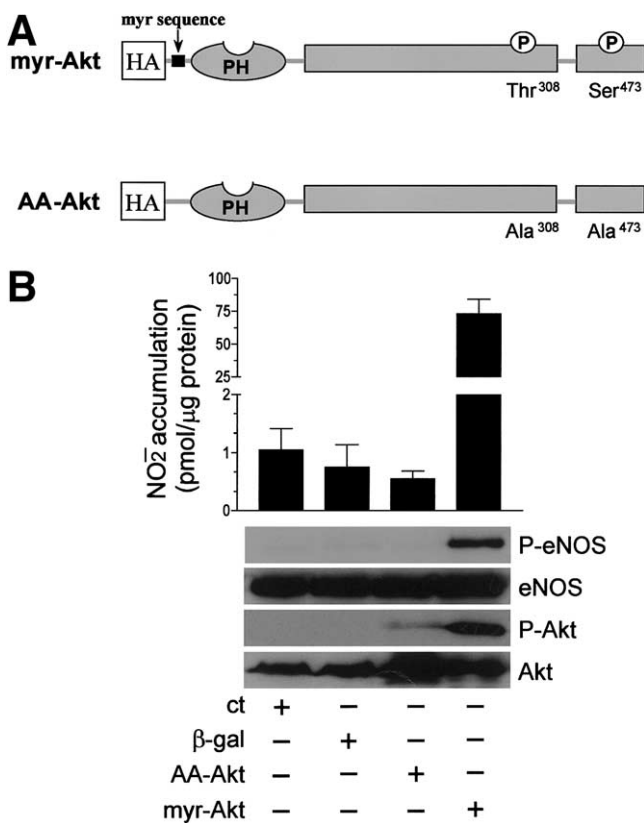
**Figure 1.** Impaired Akt and eNOS activation in the liver of cirrhotic animals. (A) Liver tissue from control rats and cirrhotic rats were homogenated in lysis buffer and subjected to electrophoresis in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis with antibodies for P-Akt, Akt, P-eNOS, and total eNOS, as described in the Materials and Methods section. Representative Western blot analyses are shown. (B) Histograms reflect the densitometric ratios of P-Akt to Akt (left) and P-eNOS to eNOS (right) measured in 10 control and 10 cirrhotic livers. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \* $P \leq 0.01$  compared with control rats.



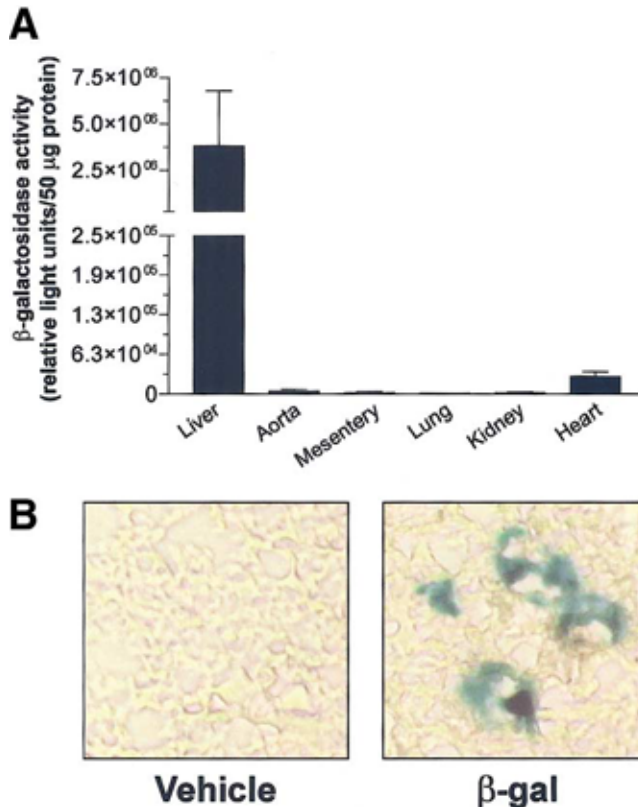
was detected in the other tissues (data not shown). Liver tissue collected 30 days after adenovirus infection showed almost undetectable levels of  $\beta$ -gal activity.

**Effect of Activated Akt Expression on Portal Hypertension and Systemic Hemodynamics in the Liver of Cirrhotic Rats**

Previous studies, together with our data (Figure 2B), showed overexpression of myr-Akt phosphorylated bovine eNOS at serine 1179 and significantly increased NO production.<sup>10,11</sup> For this reason, we hypothesized that adenoviral transduction of myr-Akt may restore NO production in liver from cirrhotic animals. To test this hypothesis we first showed that myr-Akt is expressed in

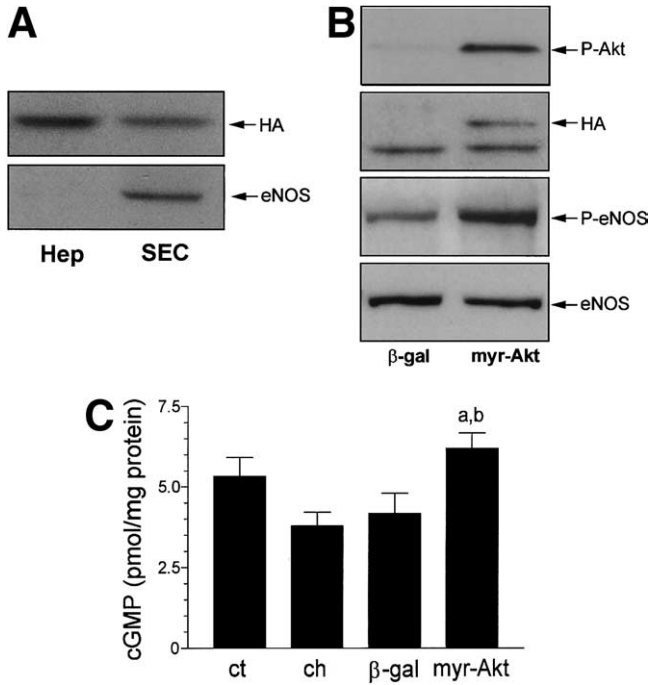


**Figure 2.** myr-Akt transduction of BAEC-induced eNOS phosphorylation and NO production. (A) The myr-Akt mutant is based on the wild-type sequence of Akt with the exception that it is HA tagged and it incorporates an amino terminus containing a src myristoylation (myr) signal generated by PCR. This mutation allows the permanent phosphorylation of the Akt mutant in its amino acids threonine (Thr) 308 and serine (Ser) 473. These 2 amino acids have been substituted by alanine in the wild-type sequence to synthesize the HA-tagged inactive phosphorylation mutant Akt (AA-Akt). (B) BAECs were NO treated or infected with  $\beta$ -gal, AA-Akt, or myr-Akt adenoviruses as described in the Materials and Methods section. Cells were serum starved and NO production was quantified in the media by chemiluminescence. Finally, cells were harvested and cell lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies specific for P-eNOS, total eNOS, P-Akt, and total Akt (n = 3).



**Figure 3.** Adenovirus-mediated  $\beta$ -galactosidase gene expression in the liver. (A) Control rats were killed after 3 days of infection with  $5 \times 10^{10}$  pfu of  $\beta$ -gal adenovirus. The liver, aorta, mesentery, lung, kidney, and heart tissues were collected and homogenized in lysis buffer to measure  $\beta$ -gal activity by using a chemiluminescent assay. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 3). (B) Representative sections of livers from control rats treated with vehicle (left panel) or control rats infected with  $5 \times 10^{10}$  pfu of adenovirus expressing  $\beta$ -gal (right panel) are shown. The paraformaldehyde-fixed sections were embedded in OCT and stained histochemically by using X-gal as described in the Materials and Methods section. Original magnification  $\times 200$ .

sinusoidal endothelial cells of cirrhotic rats after adenoviral infection. Studies were performed in cirrhotic rats 3 days after intravenous injection of myr-Akt adenoviruses ( $5 \times 10^{10}$  pfu). As shown in Figure 4A, although HA abundance was most prominent in hepatocytes, endothelial cells also were targeted by the adenovirus, indicating that the expression of myr-Akt in these cells may induce the activation of eNOS. As seen in Figure 4A (bottom panel), eNOS was recognized mainly in the endothelial cell fraction, indicating the specificity of the cell purification by the centrifugal elutriation method. To determine whether the infection of cirrhotic rats with adenovirus for myr-Akt was associated with an increase in the activity of eNOS, immunoblot analysis of cirrhotic livers transduced with constitutively active Akt (myrAkt) was performed, showing an increase in the levels of phosphorylated Akt and in the incorporation of phosphate into eNOS, as compared with adenoviral transduction of

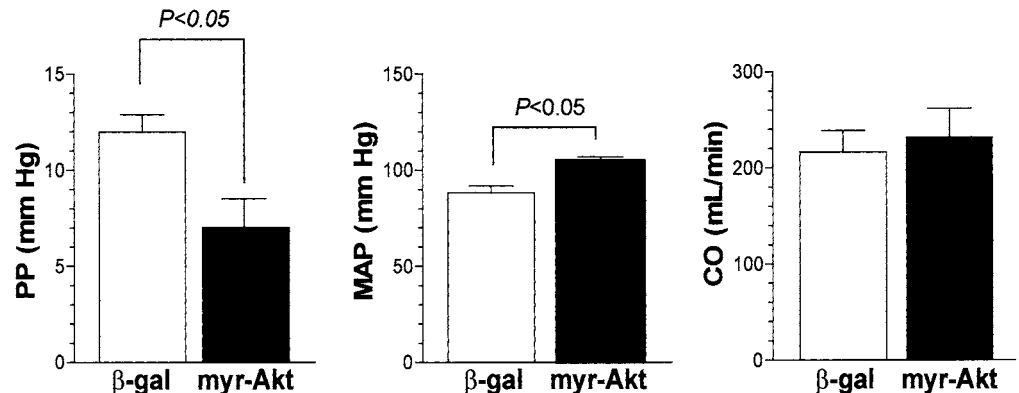


**Figure 4.** myr-Akt transduction in cirrhotic livers activates eNOS. (A) Hepatocytes (Hep) and sinusoidal endothelial cells (SEC) were purified, as described in the Materials and Methods section, from liver of cirrhotic rats that were intravenously injected with myr-Akt adenoviruses ( $5 \times 10^{10}$  pfu) 3 days earlier. Cells were lysated in lysis buffer and 30  $\mu$ g of protein was subjected to electrophoresis and immunoblot analysis with specific antibodies for HA and eNOS ( $n = 2$ ). (B) After cirrhotic rats were infected with adenovirus expressing  $\beta$ -gal or myr-Akt at a dose of  $5 \times 10^{10}$  pfu, immunoblot analyses were performed with P-eNOS, total eNOS, P-Akt, or HA antibodies, as described earlier. Representative Western blot analyses are shown. (C) The intrahepatic concentration of cGMP from 10 control rats (ct), 10 cirrhotic rats (ch), 10 cirrhotic rats infected with  $\beta$ -gal ( $\beta$ -gal), and 10 cirrhotic rats infected with myr-Akt (myr-Akt) adenoviruses were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P \leq 0.01$  compared with ch and <sup>b</sup> $P \leq 0.05$  compared with  $\beta$ -gal.

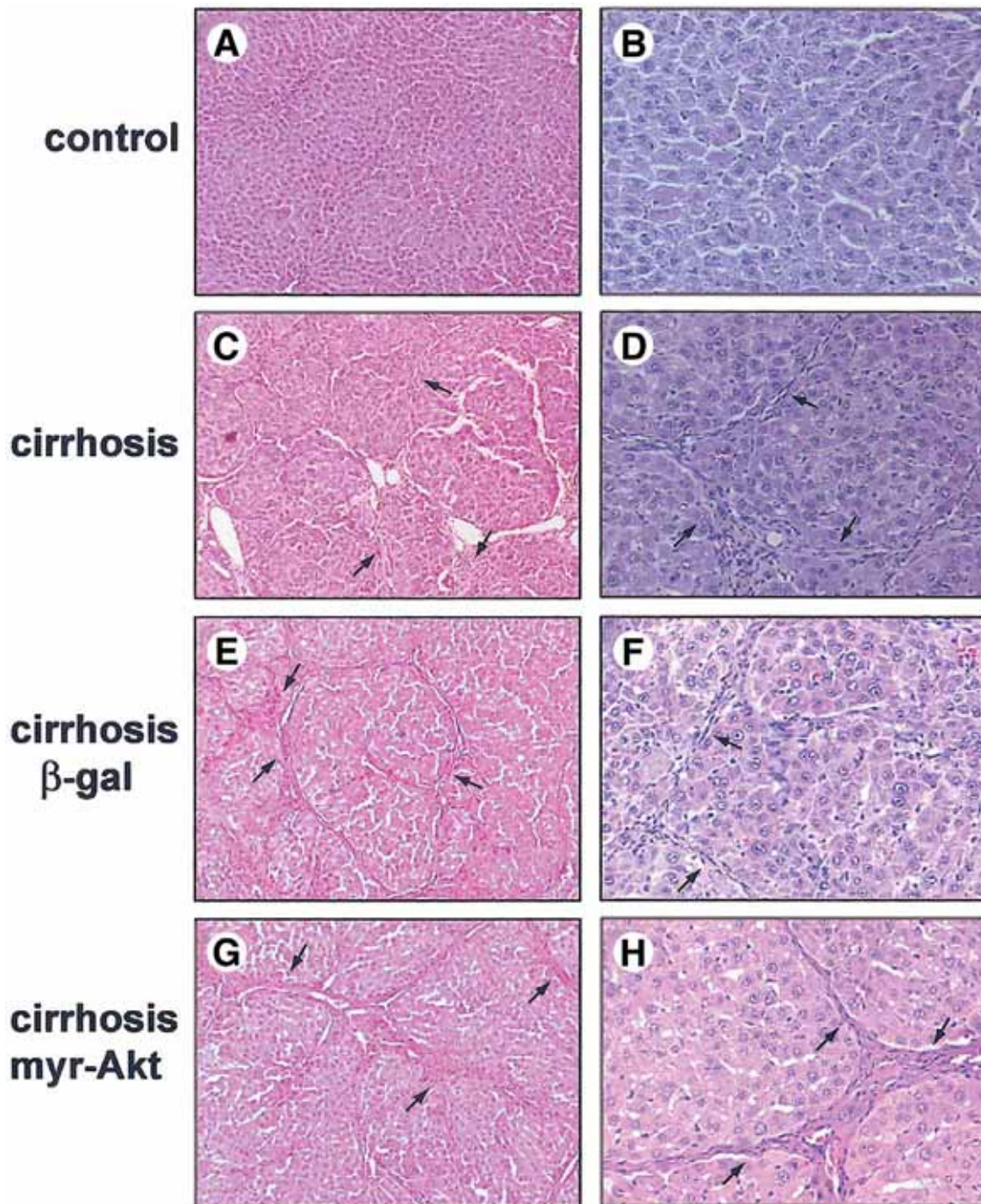
$\beta$ -gal (Figure 4B). Consistent with the increase in eNOS phosphorylation, intrahepatic cGMP levels, used as a marker for NO bioactivity, were increased significantly in cirrhotic livers transduced with myr-Akt compared

with cirrhotic livers and cirrhotic livers transduced with  $\beta$ -gal (Figure 4C). In concordance with the already described impaired NO production in cirrhotic livers, the amount of intrahepatic cGMP detected in control rats was quantitatively higher than in noninfected cirrhotic animals, although the differences did not reach statistical significance. Next, we evaluated the therapeutic use of the myr-Akt adenovirus through the measurement of PP, MAP, and cardiac output after 3 days of myr-Akt or  $\beta$ -gal adenoviral infection (Figure 5). Transduction of myr-Akt into the liver of cirrhotic animals produced a 40% decrease in PP and a significant increase in MAP in comparison with  $\beta$ -gal-transduced cirrhotic rats. In addition, animals infected with  $\beta$ -gal adenovirus did not experience any change in these parameters, as compared with noninfected cirrhotic rats (data not shown). Furthermore, no changes in cardiac output were detected in either group of adenovirus-infected animals. These results suggest that the reestablishment of eNOS activity in cirrhotic livers may be associated with a decrease in intrahepatic resistance. For this reason it is conceivable to postulate that there is a reduction in portal blood flow in cirrhotic rats transduced with myr-Akt. Therefore, we performed an experiment with 5 cirrhotic rats infected with  $\beta$ -gal adenoviruses and 5 cirrhotic animals infected with myr-Akt adenoviruses. Superior mesenteric blood flow was measured with an ultrasonic flow probe. As predicted, cirrhotic rats transduced with myr-Akt showed a significant decrease in the superior mesenteric blood flow in comparison with cirrhotic rats infected with  $\beta$ -gal adenovirus ( $26.29 \pm 0.79$  mL/min vs.  $21.33 \pm 0.74$  mL/min, respectively;  $P \leq 0.01$ ). These results taken together indicate that myr-Akt expression in the liver of cirrhotic animals activates eNOS and that this phenomenon promotes amelioration in the hemodynamic parameters.

**Figure 5.** myr-Akt transduction reduces PP and increases MAP in cirrhotic rats. After 3 days of adenoviral infection ( $5 \times 10^{10}$  pfu), PP, MAP, and cardiac output were measured in cirrhotic rats. Data are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ).







**Figure 6.** Histopathologic analysis after adenoviral treatment. Representative sections of livers from (A, B) control rats, (C, D) cirrhotic rats, (E, F) cirrhotic rats infected with adenovirus expressing  $\beta$ -gal, and (G, H) cirrhotic rats infected with adenovirus expressing myr-Akt are shown. Animals were killed 3 days after the infection and liver samples were collected for paraffin sections followed by H&E staining. Arrows denote fibrotic bands. Original magnification (A, C, E, G) 40 $\times$ , and (B, D, F, H) 200 $\times$ .

### Cytopathic Effects of Adenoviral Administration

To determine whether adenoviral infection could induce cytopathic effects we examined liver function by measuring related serum biochemical parameters (Table 1), and we performed liver histology after 3 days of

infection (Figure 6). Table 1 shows that cirrhotic rats had developed marked abnormalities in liver function. As anticipated, cirrhotic rats showed decreased albumin protein levels and increased activity of alanine transaminase. In addition, CCl<sub>4</sub>-treated rats had a tendency for enhanced serum concentration of total bilirubin, although

statistical differences were not achieved. No significant differences were found in any of these parameters between cirrhotic rats infected with adenovirus expressing  $\beta$ -gal or myr-Akt transgenes. These data indicate that no additional liver damage was induced by transduction with adenoviruses. Moreover, histopathologic examination of cirrhotic livers noninfected (Figure 6C and D) or infected (Figure 6E–H) with adenoviruses revealed few foci of inflammatory infiltrate with no significant differences attributed to the adenoviral treatment. Furthermore, no important necrotic foci were noted in the liver of any group of cirrhotic animals throughout the course of the study.

## Discussion

The major finding of this report is the impaired Akt activation in cirrhotic livers and the subsequent decrease in the incorporation of phosphate groups into serine 1176 in the eNOS sequence. On the basis of these results, we used a gene transfer approach to restore the intrahepatic eNOS activity in cirrhosis using a recombinant replication-deficient adenovirus vector carrying the constitutively active mutant of Akt. The *in vivo* studies showed that the intravenous administration of myr-Akt adenovirus to cirrhotic rats at a dose of  $5 \times 10^{10}$  pfu resulted in transgene expression, increased eNOS phosphorylation, and enhanced intrahepatic release of NO, as estimated by the hepatic content of cGMP. Furthermore, restoring eNOS activity by myr-Akt gene delivery normalizes portal pressure, decreases superior mesenteric blood flow, and ameliorates arterial hypotension in cirrhotic rats. Related to these findings, detailed histologic examination of the animals used in this study, which underwent a cirrhosis induction protocol for 17–19 weeks, revealed that cirrhotic livers have predominantly thin and often incomplete fibrous septa. Therefore, our results strongly suggest that in this cirrhotic stage the vascular liver tone still is highly modulated by the vasculogenic component, and probably this therapy would not have been as effective in a late scenario, in which abundant collagen deposition and concomitant mechanical obstruction would have been the most important contributor to the intrahepatic resistance.

Previous studies have shown the importance of the serine threonine protein kinase Akt as a critical mediator in cell viability acting through several targets.<sup>25–29</sup> eNOS is another recently described Akt substrate, linking activation of PI3-kinase to the release of NO in endothelial cells.<sup>10,11</sup> Consistent with these reports, we found that bovine eNOS phosphorylation by an activated form of Akt results in a sustained production of NO by endo-

thelial cells (Figure 2B). It can be predicted, therefore, that Akt-dependent eNOS phosphorylation may be an important mechanism in the control of vascular function. However, few studies have addressed the physiologic and pathophysiologic role of Akt in the control of vascular tone.<sup>30,31</sup> Thus far, to our knowledge only one report has assessed the role of the Akt/eNOS signaling pathway in portal hypertension.<sup>32</sup> The results of this work suggest that the activation of eNOS by Akt may be the first step leading to an initial increase in NO production in mesenteric arterial beds, leading to splanchnic vasodilation. Because splanchnic arterial vasodilation contributes to the increase in portal pressure, we can conclude that our results, in conjunction with these observations obtained in the experimental model of portal hypertension, point to Akt activity as a major modulator of portal blood flow in cirrhosis. Although we have shown that myr-Akt liver transduction correlates with an increase in phosphorylated eNOS, we cannot discount the possibility that other up-stream regulators such as AMP-activated kinase,<sup>33</sup> protein kinase A, and protein kinase G,<sup>34</sup> which *in vitro* phosphorylate eNOS on serine 1177/1179, may affect intrahepatic NO production in cirrhosis. An important question that remains unanswered is the underlying mechanism that promotes a differential activation of Akt in the setting of portal hypertension and whether impaired Akt activation is a major factor for the increase in hepatocyte apoptosis observed in liver disease.

Evidence supporting a role for the increase in NO production in the pathogenesis of arterial vasodilation in cirrhosis was obtained early in our laboratory.<sup>35</sup> In agreement with these results, several investigations also showed an increase in NOS activity in the systemic and splanchnic arterial beds of both cirrhotic patients and rats with experimental cirrhosis.<sup>36–39</sup> This situation differs substantially from the defective eNOS activation previously described in the cirrhotic liver. Therefore, the attempts to restore the intrahepatic eNOS activity in this pathophysiologic condition must be examined carefully, taking into account that a systemic vasodilatory action may have detrimental effects, as observed with the use of conventional NO donors.<sup>40</sup> Consistent with previous studies in rodents,<sup>15,23,24</sup> we have shown that after intravenous injection of adenovirus, the liver is the main target of the expressed transgene. These results show that we can target eNOS phosphorylation selectively in the liver without promoting a systemic hypotensive effect. Furthermore, the normalization in PP was accompanied by a correction of systemic hypotension. The inflammatory response induced by adenovirus-based gene therapies has been the object of much concern. In our studies,



we failed to detect minimal inflammation or significant increase in alanine transaminase or lactate dehydrogenase levels with either,  $\beta$ -gal or myr-Akt adenovirus. This problem could be significantly more complicated in humans. The balance between adenovirus toxicity and transgene expression, together with the specificity in liver targeting, are important issues to be resolved in the future, probably by the use of new viral vectors or pharmacologic strategies. Although similar approaches have been used to selectively target NO delivery to the liver and reduce PP, <sup>12,14,41</sup> this study shows that restoration of the intrahepatic NOS activity improves portal hemodynamics and systemic arterial pressure in cirrhotic animals.

In conclusion, the results of this study reveal a previously unknown signaling pathway involved in the accentuation of portal hypertension in cirrhosis and strongly suggest that the down-regulation of Akt activity is responsible, in part, for the diminished NO production observed in cirrhotic livers.

These results raise the possibility that the use of a constitutively active form of Akt could be explored as a treatment for portal hypertension in cirrhotic patients as well as in other clinical situations such as atherosclerosis, in which a pathologic decrease in eNOS activity is a common feature.

## References

- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis: I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):141–156.
- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926–931.
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344–351.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:818–824.
- Cao S, Yao J, McCabe TJ, Yao Q, Katusic ZS, Sessa WC, Shah V. Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function. *J Biol Chem* 2001;276:14249–14256.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222–1228.
- Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol* 2001;280:G1209–G1216.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997;88:435–437.
- Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:262–267.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597–601.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601–605.
- Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8897–8902.
- Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741–748.
- Van De CM, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;51:440–445.
- Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, Yao J, Katusic ZS. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 2000;279:G1023–G1030.
- Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1995;270:17641–17644.
- Brouwer A, Barelds RJ, Knook DL. Centrifugal separation of mammalian cells. In: Rickwood D, ed. *Centrifugation: a practical approach*. 2nd ed. Oxford: IRL Press, 1987:183–218.
- Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 1999;274:16349–16354.
- Ehrengruber MU, Lanzrein M, Xu Y, Jasek MC, Kantor DB, Schuman EM, Lester HA, Davidson N. Recombinant adenovirus-mediated expression in nervous system of genes coding for ion channels and other molecules involved in synaptic function. *Methods Enzymol* 1998;293:483–503.
- Clària J, Jiménez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V, Ginès P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis, and treatment*. 24th ed. London: Blackwell Science, Inc., 1999:379–396.
- Poo JL, Jimenez W, Muñoz RM, Bosch-Marce M, Bordas N, Morales-Ruiz M, Perez M, Deulofeu R, Sole M, Arroyo V, Rodes J. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology* 1999;116:161–167.
- Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Yoshiji H, Nagao S, Fukui H. Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000;47:563–570.
- Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, Gant TW, Thorgeirsson SS, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992;1:372–378.
- Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai K. Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:S471–S484.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857–868.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318–1321.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg

- ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–241.
28. Gratton JP, Morales-Ruiz M, Kureishi Y, Fulton D, Walsh K, Sessa WC. Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:30359–30365.
  29. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82–85.
  30. Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, Sessa WC, Walsh K. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest* 2000;106:493–499.
  31. Scotland RS, Morales-Ruiz M, Chen Y, Yu J, Rudic RD, Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion. *Circ Res* 2002;90:904–910.
  32. Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, Sessa WC. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol* 2002;282:H2084–H2090.
  33. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 1999;443:285–289.
  34. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2000;275:5179–5187.
  35. Claria J, Jimenez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 1992;15:343–349.
  36. Campillo B, Chabrier PE, Pelle G, Sediame S, Atlan G, Fouet P, Adnot S. Inhibition of nitric oxide synthesis in the forearm arterial bed of patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:1423–1429.
  37. Ros J, Jimenez W, Lamas S, Claria J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995;21:554–560.
  38. Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993;104:1750–1754.
  39. Albillos A, Rossi I, Cacho G, Martinez MV, Millan I, Abreu L, Barrios C, Escartin P. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am J Physiol* 2002;268:G459–G464.
  40. Groszmann RJ. Beta-adrenergic blockers and nitrovasodilators for the treatment of portal hypertension: the good, the bad, the ugly. *Gastroenterology* 1997;113:1794–1797.
  41. Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741–748.

---

Received January 20, 2003. Accepted May 1, 2003.

Address requests for reprints to: Manuel Morales-Ruiz, Ph.D., Hormonal Laboratory, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. e-mail: mmorales@medicina.ub.es; fax: (34) 93-227-5454.

Supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Programa Ramón y Cajal to M.M.-R.), grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF2001-2585 to M.M.-R. and SAF99-0016 to W.J.), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/1514 to W.J.), Fundació La Marató de TV3 (000610 to W.J.), FIS (FIS 01/1514 to P.C.-M.), DGICYT (SAF99-0016 to G.F.-V.), and from DGICYT (SAF2001-2585 to S.T.). W.C.S. is an Established Investigator of the American Heart Association.

The authors thank Dr. Kenneth Walsh for kindly providing the myr-Akt and AA-Akt adenoviruses. The authors recognize the skillful technical assistance of E. Calvo for technical help with cGMP measurements, Dr. V. D. Libera and A. Sticca in superior mesenteric blood flow studies, as well as Dr. C. Mezquita in sinusoidal endothelial cell purification.

---

**Article 2: L'ascites provinent de pacients cirròtics indueix angiogènesi a través de la via de senyalització de la PI3K/Akt.**

Quan la cirrosi hepàtica es troba en un estat avançat, les complicacions hemodinàmiques s'agregen per donar lloc a la fase descompensada de la malaltia, on té lloc un desajust de l'homeòstasi dels fluids corporals que provoca l'acumulació d'ascites a la cavitat peritoneal. A partir de la formació d'ascites, les complicacions hemodinàmiques, i els diferents processos fisiopatològics associats a la cirrosi s'agregen de tal manera que acaben resultant en la descompensació de la malaltia. Segons aquestes observacions, la hipòtesi d'aquest estudi proposava que el líquid ascític podria ser capaç d'induir modificacions a l'arbre vascular peritoneal i provocar canvis morfològics, moleculars o fisiològics en aquest territori. En aquest context, estudis anteriors havien mostrat que el líquid ascític conté quantitats significatives de citoquines proinflamatòries, factors de creixement i agents vasoactius o proliferatius. Per tant, aquest segon treball pretenia determinar l'adaptació fisiopatològica de l'endoteli vascular peritoneal en resposta als diferents factors bioactius que conté el líquid ascític, així com també els principals factors responsables d'aquestes alteracions associades a l'endoteli en presència d'aquest líquid. D'aquest segon estudi es van derivar els següents resultats:

**1. L'ascites activa les vies de senyalització de Erk-1/2, JNK i Akt en CEs.**

Per tal de determinar si el líquid ascític es bioactiu, es va analitzar l'activació de diferents vies de senyalització en CEs mitjançant l'estimulació de cèl·lules BAEC amb líquid ascític provinent de pacients cirròtics i fluid provinent de diàlisi peritoneal de pacients no-cirròtics, que es va utilitzar com a control. Tot seguit, es va analitzar l'estat de fosforilació i la quantitat de la MAPK Erk-1/2, la proteïna cinasa JNK i Akt. Es va observar que l'estimulació de BAEC amb líquid ascític condueix a la fosforilació i activació de Erk-1/2, JNK, i Akt amb un màxim d'activació que té lloc als 10 minuts d'incubació (figura 1, article 2). Aquests mateixos resultats es van reproduir utilitzant cèl·lules HUVECs.

2. L'ascites indueix la formació d'estructures tubulars i quimiotaxi en CEs a través de la via de senyalització PI3K/Akt.

La incubació de HUVECs amb líquid ascític de pacients cirròtics va provocar un increment de la migració i la reorganització d'aquestes cèl·lules per arribar a formar estructures tubulars (figura 2A i 2B, article 2). En aquests experiments, l'ascites va induir la fosforilació de la serina/treonina cinasa Akt (figura 2C, article 2). Per altra banda, el fluïd peritoneal no va influenciar ni la quimiotaxi ni la formació tubular en aquestes cèl·lules. La preincubació d'aquestes cèl·lules amb l'inhibidor de la PI3-K, LY294002, va evitar la formació tubular i l'activació d'Akt induïda per l'ascites i va disminuir la migració cel·lular en aproximadament un 20% (figura 3, article 2). Per acabar d'establir la relació entre la via de senyalització PI3K/Akt i els processos de formació tubular i migració cel·lular estimulats pel líquid ascític, es van transduir cèl·lules HUVEC amb els adenovirus  $\beta$ -gal o el mutant inactiu en la fosforilació d'Akt (AA-Akt). Els resultats van mostrar que l'adenovirus AA-Akt era capaç d'inhibir la formació tubular induïda pel líquid ascític en cèl·lules HUVECs (figura 4, article 2).

3. Un anticòs que neutralitza la fibronectina inhibeix la formació tubular i la quimiotaxi de les CEs induïda per l'ascites *in vitro*.

Per tal de determinar alguns dels possibles factors capaços de conferir propietats angiogèniques al líquid ascític, es van dur a terme experiments de neutralització preincubant cèl·lules HUVEC amb anticossos contra VEGF-A, HGF, bFGF, IL-8 i FN. Aquests experiments van mostrar que l'anticòs que neutralitza la FN va disminuir a la meitat la migració cel·lular, l'activació d'Akt i la formació tubular en les CEs induïda per l'ascites (figura 5, article 2). A més, la concentració de FN en el líquid ascític estava incrementada en comparació amb l'obtinguda en el fluïd peritoneal.

4. L'ascites indueix angiogènesi *in vivo* i aquest procés es pot inhibir mitjançant el bloqueig de la senyalització de la FN i de PI3K.

Per tal de determinar si l'ascites era capaç d'induir angiogènesi *in vivo*, es va utilitzar l'assaig d'angiogènesi de la CAM d'embrió de pollastre. El líquid ascític va ser capaç d'induir una important resposta angiogènica en el 100% de les CAM de pollet

analitzades, mentre que la preincubació de l'ascites amb l'anticòs anti-FN o amb l'inhibidor LY294002 van disminuir de manera significativa l'angiogènesi *in vivo* induïda pel líquid ascític. Per altra banda, el tractament amb el fluid PD no va induir cap tipus de resposta angiogènica en aquest model (figura 6, article 2).



## Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway

Manuel Morales-Ruiz<sup>1,\*</sup>, Sònia Tugues<sup>1</sup>, Pilar Cejudo-Martín<sup>1</sup>, Josefa Ros<sup>1</sup>,  
Pedro Melgar-Lesmes<sup>1</sup>, Patricia Fernández-Llama<sup>3</sup>, Vicente Arroyo<sup>2</sup>,  
Juan Rodés<sup>2</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hormonal Laboratory, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN), University of Barcelona, Villarroel 170 Barcelona 08036, Spain

<sup>2</sup>Liver Unit-Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas (IRSIN), University of Barcelona, Villarroel 170 Barcelona 08036, Spain

<sup>3</sup>Fundació Puigvert, Renal Unit and Hypertension, Barcelona, Spain

**Background/Aims:** Ascites in patients with cirrhosis is associated with worsening of systemic hemodynamics. Thus, the aim of this study was to investigate the biological activity of ascites on endothelial cells.

**Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used to investigate the angiogenic activity of ascites obtained from cirrhotic patients.

**Results:** Ascites-induced Akt activation, cell migration and tube formation in HUVECs. The pretreatment of HUVECs with the phosphatidylinositide 3-kinase (PI3-kinase) inhibitor LY294002, resulted in a decrease in chemotaxis and cell tube formation induced by ascites. Moreover, the inhibition of Akt activity in HUVECs by transduction of an inactive phosphorylation Akt mutant (AA-Akt), blocked tube formation. These angiogenic effects of ascites were also operative *in vivo* showing a PI3-kinase activation dependence in the angiogenesis induced by ascites. In addition, the preincubation of ascites with anti-fibronectin antibody led to a significant decrease in HUVECs migration, cell tube formation and *in vivo* angiogenesis.

**Conclusions:** These results confirm the novel concept that ascites is a bioactive fluid which can modify vascular properties through the activation of the PI3-kinase/Akt pathway in endothelial cells. Furthermore, our results demonstrated that this ascites-induced mechanism is mediated, at least in part, by fibronectin.

© 2005 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cirrhosis; Akt; Ascites; Angiogenesis

### 1. Introduction

Patients with cirrhosis exhibit a characteristic hyperdynamic circulatory syndrome with increased cardiac output and excessive vasodilation, mainly occurring in the splanchnic circulation. Aggravation of these complications

marks the progression of compensated cirrhosis into the decompensated phase of the disease characterized by derangement of body fluid homeostasis which results in accumulation of ascites into the peritoneal cavity [1]. Because of its relatively simple composition [2], ascites has generally been considered to have little influence on the hemodynamic, and host defense abnormalities occurring in cirrhotic patients. This concept, however, has recently been challenged by several investigations describing significant amounts of proinflammatory cytokines, growth factors, vasoactive agents or extracellular matrix-forming proteins in ascites of cirrhotic patients [3–6]. In addition, several

Received 23 August 2004; received in revised form 23 December 2004; accepted 26 January 2005; available online 12 April 2005

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 2275400x2667; fax: +34 93 2275697.

E-mail address: mmoralesruiz@ub.edu (M. Morales-Ruiz).

studies have demonstrated that the cellular component of ascites might influence the concentration of these substances [7–9]. It is of interest that many of the substances found in ascites are able to activate the PI3-kinase/Akt signaling pathway. Akt signaling regulates endothelial NO production, cell migration, and survival in physiological conditions which are all cellular responses that contribute to angiogenesis and maturation of the vascular network. The correct adaptation of the vascular system to the activation of this signaling pathway is essential to maintain normal tissue function and homeostasis in response to physiological and pathophysiological stimuli, such as an increase in growth factors and cytokine concentration [10–14].

In this context, little is known about the pathophysiological adaptation of the endothelium to the presence of ascitic fluid and how these modifications produce long-term structural changes in the splanchnic vasculature. Here, we considered the hypothesis that, under proper stimulus, the production of these substances in the peritoneal cavity could, theoretically, regulate angiogenesis in the splanchnic vascular bed. Therefore, we undertook the present study to investigate the changes in molecular and cellular events caused by the exposure of human endothelial cells to ascites from cirrhotic patients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

The investigation was performed in ascites of 13 cirrhotic patients (9 women and 4 men). The etiology of cirrhosis was alcoholic in six subjects, HBsAg or hepatitis C antibody-associated in five, both alcoholic and viral in one and cryptogenic in one case. All patients had advanced liver cirrhosis: six belonged to Child-Pugh class B and seven to Child-Pugh class C. Patients developing spontaneous bacterial peritonitis and/or hepatocellular carcinoma were excluded from the study. Ascites from these patients was collected by therapeutic paracentesis and centrifuged at  $200\times g$  for 10 min to discard cells. Additionally, peritoneal dialysate (PD) fluid from three non-cirrhotic patients with end-stage renal failure on peritoneal dialysis was used in our experiments as a control of human peritoneal fluid not-related to cirrhosis. This study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic.

### 2.2. Cell cultures

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from umbilical cords as described previously [15] and characterized by immunofluorescence with specific anti-rat CD31 antibodies (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from bovine aortas as previously described [16].

### 2.3. Endothelial cell tube formation assay

Two hundred and fifty microlitres of growth factor reduced Matrigel basement membrane matrix (BD Biosciences, Palo Alto, CA), was plated in 24-well tissue culture plates. One millilitre of HUVECs cell suspension (40,000 cells/ml) was added to each well and incubated for 90 min to allow cell adhesion. Culture medium was then removed and 1 ml of ascites or PD fluid was added to each well. After 15 h, capillary tubes were viewed using a Olympus inverted phase-contrast microscope (Olympus Optical Co.) and tube formation was quantified by measuring total tube length in three

random fields/well using Scion Image Beta 4.02 software (Scion Corporation, Frederick, MD)

### 2.4. Migration assay

Migration assays were performed using a modified Boyden chamber (Neuroprobe, Cabin John, MD) as previously described [13,14].

### 2.5. Western blot

Serum-starved BAECs and HUVECs were incubated with or without LY294002 (10  $\mu$ M), ascites or PD fluid and lysated in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 20 mM NaF, 1 mM Pefabloc, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10  $\mu$ g/ml leupeptin). Then, Western blots with anti-Akt, anti-phospho-Akt-Ser<sup>473</sup>, anti-Erk-1/2 MAPK, anti-phospho-Erk-1/2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, anti-JNK MAPK, anti-phospho-JNK-Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup> (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) or anti-HA antibodies (Roche Diagnostics) were performed as previously described [16].

### 2.6. Adenoviral constructs and in vitro adenoviral transduction

Adenoviral constructs expressing the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) or hemagglutinin (HA)-tagged inactive phosphorylation mutant Akt (AA-Akt), were generated as described previously [10,17]. HUVECs were infected with adenovirus containing the transgene for  $\beta$ -gal or AA-Akt (100 m.o.i.) for 3 h.

### 2.7. Antibody neutralization experiments

When indicated, ascites of cirrhotic patients was incubated with anti-VEGF-A (20  $\mu$ g/ml; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), anti-HGF (20  $\mu$ g/ml; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), anti-basic FGF (1  $\mu$ g/ml; Oncogene, Boston, MA), anti-IL8 (20  $\mu$ g/ml; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) or anti-fibronectin (FN) (40  $\mu$ g/ml; NeoMarkers, Fremont, CA), sodium azide free-antibodies for 2 h at room temperature.

### 2.8. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay

On day 4 of development, fertilized eggs (male breeders strain T44, Sasso, Inc., Sabres, France) were incubated at 37 °C in a humidified environment until day 10. Then, 0.3 ml of saline or sample was pipetted onto the upper surface of the CAM, and the eggs were again incubated in the same conditions for 18–20 h. To analyze differences in vessel number, pictures were taken with a Stereomicroscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) and analyzed by three independent investigators who were blinded to the study. Assays for each test sample were carried out in duplicate.

### 2.9. Other measurements and statistical analysis

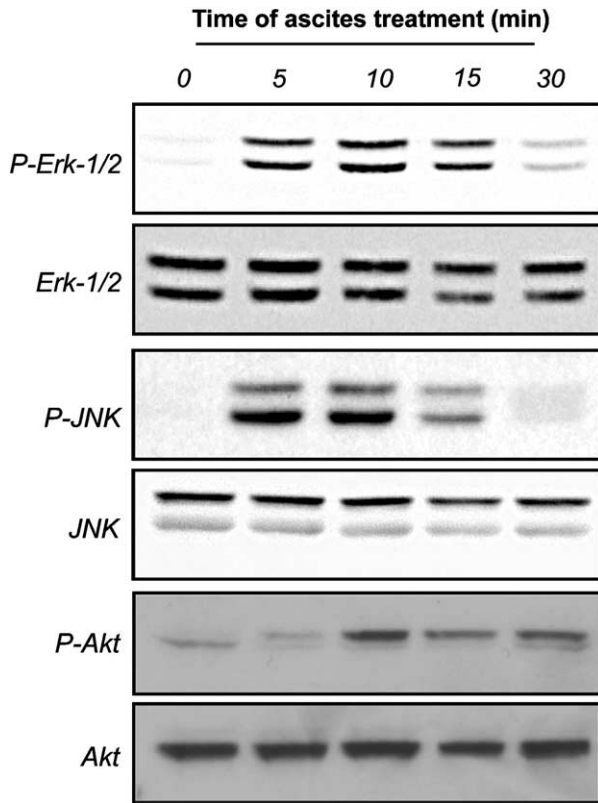
Total fibronectin (FN) was measured by ELISA (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA). Data is expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences were analyzed by using the unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance with Bonferroni post hoc-test when appropriate. Differences were considered to be significant at a *P* value <0.05.

## 3. Results

### 3.1. Ascites activates Erk-1/2, JNK and Akt in endothelial cells

We propose as a working hypothesis that ascites from cirrhotic patients contains bioactive factors that may



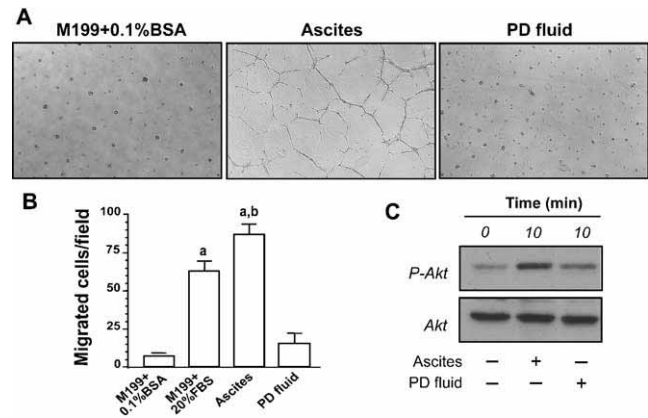


**Fig. 1.** Effect of ascites on Erk-1/2 MAPK, JNK MAPK and Akt activation in endothelial cells. BAECs were treated with ascites for the indicated periods of time. Activation of Erk-1/2, JNK MAP kinases and Akt was analyzed by immunoblotting of cell lysates (30  $\mu$ g) with phosphospecific antibodies as described in Section 2. Representative results from three and five similar experiments (MAP kinases and Akt immunoblots, respectively) are shown.

stimulate distinct intracellular signaling pathway in endothelial cells. To test this hypothesis, we examined phosphorylated and total Erk-1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) MAPK, and Akt upon stimulation of endothelial cells with ascites. Stimulation of BAECs with ascites-induced time-dependent activation of Erk-1/2 MAPK and JNK MAPK which peaked at 10 min and returned to close to baseline by 30 min (Fig. 1). Analogous to activation of MAP kinases, Fig. 1 shows that ascites from cirrhotic patients can stimulate Akt phosphorylation in a time-dependent fashion, with a maximal activation occurring within 10 min, not having returned to basal levels 30 min after the beginning of the incubation. Similar results of Erk-1/2 MAPK, JNK MAPK and Akt activation were obtained when HUVECs were treated with ascites (data not shown).

### 3.2. Ascites-induces endothelial cell tube formation and chemotaxis

Fig. 2A shows that the incubation of serum-starved HUVECs with ascitic fluid from cirrhotic patients promoted



**Fig. 2.** Ascites from cirrhotic patients stimulated endothelial tube formation, and chemotaxis. (A) HUVECs were seeded on growth factor-reduced Matrigel in the presence of either M199+0.1% BSA (left panel), ascites (middle panel) or PD fluid (right panel) for 15 h at 37 °C and photographed (original magnification  $\times 100$ ). (B) HUVECs were subjected to a migration assay as described in Section 2 in the presence of ascites or PD fluid for 4 h. The data shown are mean  $\pm$  SEM of migrated cells from three separate experiments. (a)  $P < 0.01$  compared with M199+0.1% BSA or PD fluid; (b)  $P < 0.01$  compared with M199+10% FBS. (C) BAECs were treated with ascites or PD fluid. Lysates were analyzed by Western blotting (30  $\mu$ g) with anti-phospho-Akt-Ser<sup>473</sup> (upper panel) or anti-Akt (lower panel) antibodies. Representative results from four similar experiments are shown.

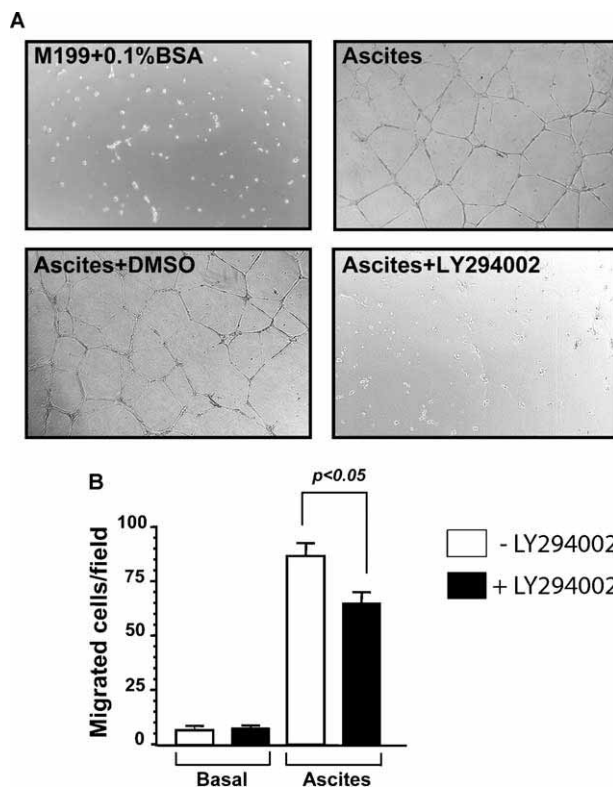
the elongation and reorganization of cells into tube-like structures (central panel), an effect not seen when cells were incubated with M199+0.1% BSA (left panel). During the process of angiogenesis, endothelial cells proliferate and migrate to form new blood vessels. Therefore, we assessed the effect of ascites on endothelial cell migration by employing a modified Boyden chamber. As shown in Fig. 2B, few control cells migrated in basal conditions, whereas a 13-fold increment of the migrated cells could be detected when 20% FBS was added to the chemotaxis medium as a positive control of cell migration. Interestingly, ascites from cirrhotic patients induced a migration activity that was about 1.3 times that of the positive control. To explore whether the proangiogenic activity of ascites is a common property of peritoneal fluids regardless of the underlying etiology, we assessed the angiogenic properties of PD fluid. In spite of histopathological studies that have revealed that prolonged peritoneal dialysis is associated with enhanced angiogenesis [18,19], PD fluid did not influence either endothelial cell tube formation or chemotaxis (Fig. 2A, right panel and Fig. 2B fourth line, respectively).

### 3.3. Ascites stimulates endothelial cell tube formation and chemotaxis in a PI3-kinase/Akt dependent manner

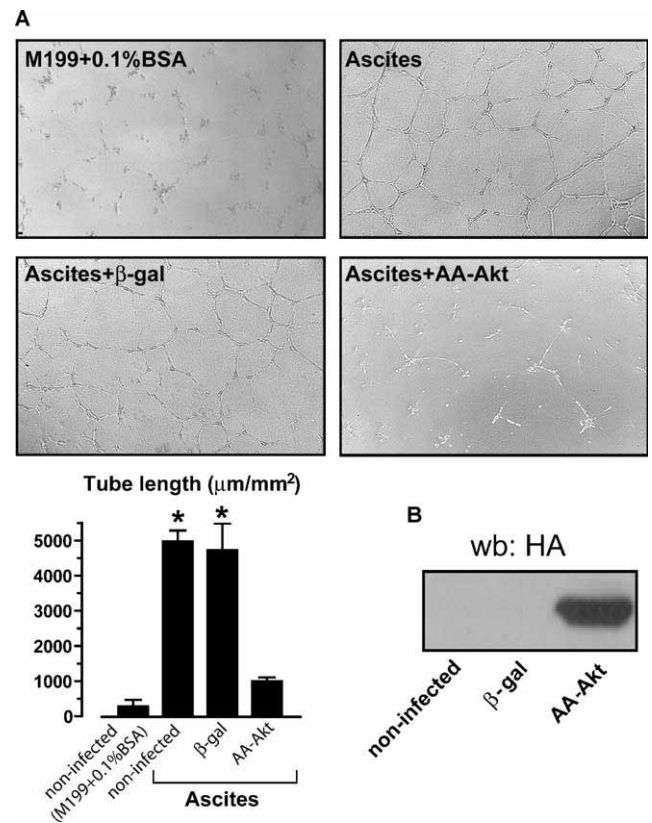
It has been reported that the PI3-kinase/Akt signaling pathway regulates angiogenesis by inhibiting apoptosis and by modulating cell migration and morphogenesis [12–14,20]. Figs. 1, 2C and 5C show that ascites from

cirrhotic patients can stimulate Akt phosphorylation, effect that was antagonized by preincubation of HUVECs with the PI3-kinase inhibitor LY294002 (Fig. 5C). By contrast, incubation of endothelial cells with vehicle or with PD fluid during 10 min had little effect on Akt phosphorylation (Fig. 2C). In addition, the incubation of HUVECs with ascites and LY294002 totally prevented cell tube formation compared with HUVECs treated with ascites or HUVECs treated with ascites and 0.1% DMSO, which was used as a control for the vehicle of LY294002 (Fig. 3). Furthermore, ascites-stimulated cell migration was blocked by ~20% with LY294002 (Fig. 3B).

To more firmly establish a link between the PI3-kinase/Akt signaling pathway and the induction of tube formation and cell migration promoted by ascites, we transduced HUVECs with adenovirus expressing an inactive phosphorylation mutant of Akt (AA-Akt) or the  $\beta$ -galactosidase gene. Fig. 4A shows that, in comparison to basal conditions, the incubation of non-transduced or  $\beta$ -galactosidase transduced HUVECs with ascites results



**Fig. 3.** Ascites stimulates endothelial cell tube formation and chemotaxis in a PI3-kinase dependent manner. (A) HUVECs were passed into Matrigel-coated wells. Cells were cultivated with either medium without serum, or ascites not-supplemented or supplemented with 0.1% DMSO or LY294002 (10  $\mu$ M) for 15 h at 37 °C. (B) 20,000 HUVECs non-treated or pretreated with 10  $\mu$ M of LY294002 for 1 h were subjected to a migration assay in the presence of vehicle or ascites and supplemented with or without LY294002 (10  $\mu$ M). Results are expressed as mean number of migrating cells/field  $\pm$  calculated in three different wells. Similar results were obtained in three additional experiments.

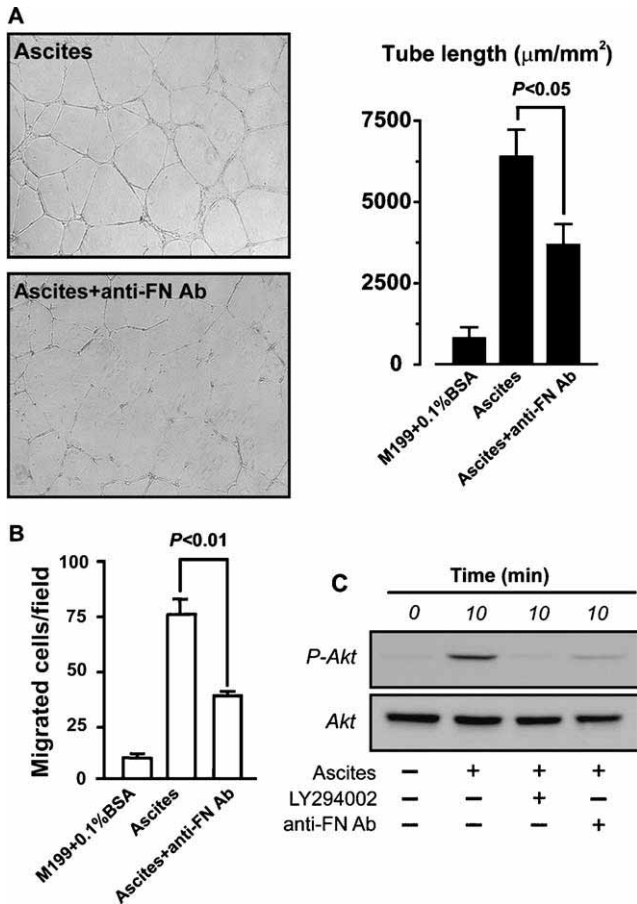


**Fig. 4.** AA-Akt prevents ascites-induced morphogenesis in endothelial cells. (A) HUVECs non-infected or infected with adenoviruses (100 m.o.i.) for  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) or HA-tagged AA-Akt (AA-Akt) were seeded on growth factor-reduced Matrigel in the presence of either medium without serum or ascites for 14 h at 37 °C and then photographed (original magnification  $\times$ 100). Each column represents the mean values  $\pm$  SEM for three replicate experiments. \**P* < 0.01 compared to M199+0.1% BSA and AA-Akt transduced cells treated with ascites. (B) HUVECs non-infected or infected with adenoviruses for  $\beta$ -galactosidase or AA-Akt (100 m.o.i.) were subjected to immunoblot analysis with anti-HA-antibody.

in cell tube formation. Interestingly, this proangiogenic property of ascites was not seen when cells were infected with AA-Akt adenovirus. Correct infection of HUVECs by adenovirus was checked by Western blot for hemagglutinin, the tag of AA-Akt adenovirus (Fig. 4B), or by  $\beta$ -galactosidase assay (data not shown).

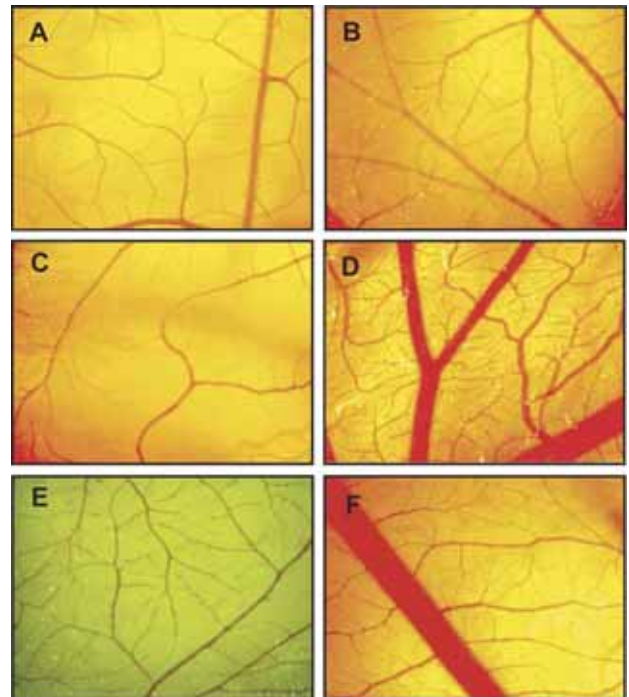
#### 3.4. In vitro inhibition of endothelial cell tube formation and migration by anti-FN-neutralizing antibody

In order to establish which factor/s confers angiogenic properties to ascites we performed neutralization experiments with specific antibodies for VEGF-A, HGF, bFGF, IL8 and/or FN. As shown in Fig. 5A, ascites-induced tube formation was significantly impaired (*P* < 0.05) by neutralizing FN activity, whereas the incubation of ascites with anti VEGF-A, HGF, bFGF, IL8 showed no effect (data not shown). Since FN has been shown to modulate chemotaxis in endothelium through the PI3-kinase/Akt signaling pathway, we also analyzed the effect of a neutralizing anti-FN



**Fig. 5.** Effects of neutralizing anti-fibronectin antibody on the ascites-induced tube formation, chemotaxis and Akt activation in endothelial cells. (A) HUVECs were seeded onto the surface of growth factor-reduced Matrigel, in the presence or absence of ascites (upper panel) or ascites treated with neutralizing anti-fibronectin antibody (lower panel). The quantitative measurement is shown on the right (mean values  $\pm$  SEM for six replicate experiments). (B) 20,000 HUVECs were subjected to a migration assay in the presence of chemotaxis medium, ascites or ascites treated with neutralizing anti-FN antibody. Results from three separate experiments are shown. (C) HUVECs were treated with LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), ascites or ascites treated with neutralizing anti-FN antibody. Lysates were analyzed by Western blotting (30  $\mu\text{g}$ ) with antibodies to phospho-Akt-Ser<sup>473</sup> or Akt. Representative results from three similar experiments are shown.

antibody on Akt activation and chemotaxis in HUVECs. As shown previously, ascites stimulated HUVECs chemotaxis (Fig. 5B, lane 2). By contrast, the treatment of ascites with anti-FN antibodies reduced HUVECs cell migration by 50% (Fig. 5B, lane 3) compared to non-treated ascites. In addition, fibronectin depletion of ascites attenuated Akt activation in endothelial cells (Fig. 5C, lane 4). Additionally, we quantified the concentration of FN in ascites and PD fluids. As predicted, the concentration of fibronectin in ascites from cirrhotic patients was significantly higher than that observed in PD fluid ( $19.99 \pm 4.23$  vs  $1.10 \pm 0.16$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively;  $P < 0.01$ ).



**Fig. 6.** Inhibition of ascites dependent in vivo angiogenesis by neutralizing anti-fibronectin antibody and PI3-kinase blockade. Vehicle (A), 1  $\mu\text{g}$  VEGF-A<sub>165</sub> + 1  $\mu\text{g}$  bFGF (B), PD fluid (C), ascites (D), ascites + 10  $\mu\text{M}$  LY294002 (E) or ascites preincubated with 40  $\mu\text{g}$  of neutralizing anti-fibronectin antibody (F) in a total volume of 300  $\mu\text{L}$  was applied on 10-day-old chick embryo CAMs. After 24 h of incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$ , CAMs were photographed (magnification  $\times 25$ ). Similar results were obtained in three similar experiments.

### 3.5. Ascites-induced angiogenesis in vivo is inhibited by fibronectin signaling and PI3-kinase blockade

To determine whether the effect of ascites on in vitro angiogenesis was also operative in vivo, we used a chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis assay. For this purpose, we performed this assay with ascites non-treated or previously treated with anti-FN antibodies (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Fig. 6). In these experiments 100% of chick CAM treated with either the positive control (1  $\mu\text{g}$  bFGF + 1  $\mu\text{g}$  VEGF-A<sub>165</sub>) or ascites presented a pronounced angiogenic response (Fig. 6B and D, respectively) compared to saline treatment (Fig. 6A). By contrast, PD fluid treatment exerted little effect on angiogenesis in this model (Fig. 5C). As in the case of cell migration and Matrigel assays, ascites-induction of in vivo angiogenesis was significantly inhibited by the treatment of the chick embryos with LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ) in 100% of cases (Fig. 6E). Furthermore, as also observed in the in vitro experiments, the treatment of ascites with a neutralizing anti-FN antibody displayed a significant inhibition on ascites-induced angiogenesis (Fig. 6F).



#### 4. Discussion

Here we demonstrated that ascites from cirrhotic patients is a bioactive fluid that induces time-dependent activation of Erk-1/2 MAPK, JNK MAPK and Akt signaling pathways in endothelial cells. In addition, we showed that ascites presents *in vitro* and *in vivo* angiogenic properties. By contrast, PD fluid lacked angiogenic properties although after long-term peritoneal dialysis the peritoneum of patients with end-stage renal failure undergoes histological changes that include increased vascularization [18,19]. The data obtained support the hypothesis that the angiogenic properties of ascites seem to be a characteristic feature of cirrhosis.

The pretreatment of HUVEC cells or the chick embryo with LY294002 (10  $\mu$ M) resulted in a decrease of chemotaxis, a reduction in tube formation and, in the *in vivo* model, a decrease in the number of vessels and ramifications promoted by ascites. These results indicate that the angiogenic response on endothelial cells elicited by ascites is mediated, at least in part, by the PI3-k/Akt signaling pathway. Although Akt is known to be critical for cell survival, proliferation, and gene expression, the results of these studies are in agreement with recent investigations that showed the importance of this enzyme in angiogenic processes related with endothelial cell survival, migration, differentiation of endothelial cells and induction of blood vessel growth [12–14,20,21]. However, we cannot wholly rule out the possibility that the activation of other signaling pathways in endothelial cells, such as the Raf-MEK1/2-Erk-1/2 MAPK cascade, may also contribute to the proangiogenic properties of ascites.

Many of the angiogenic substances found in ascites of cirrhotic patients are able to activate the PI3-kinase/Akt signaling pathway [13,22,23]. Neutralizing antibodies to VEGF-A, HGF, bFGF, IL-8 and/or FN were used to determine the factor/s involved in ascites-induced angiogenesis and endothelial PI3-kinase/Akt activation. Among them, only FN was able to abrogate the angiogenic properties of ascites. Furthermore, the concentration of fibronectin in ascites was significantly higher than that observed in PD fluid which did not present angiogenic activity. However, and taking into account the differences in the total protein concentration between ascites and PD fluid ( $21.28 \pm 5.6$  and  $1.09 \pm 0.41$   $\mu$ g/ml, respectively), we cannot discard the possibility that the calculated FN concentration is also reflecting the overall dilution of these fluids. In addition, it must be emphasized that we were unable to completely block either Akt activation or the angiogenic properties of ascites by neutralization of FN content. Therefore, this information suggests that there are probably other growth factors or extracellular matrix not studied in this work that may participate in the angiogenesis induced by ascites.

Evidence supporting the idea that cirrhosis is associated with increased splanchnic angiogenesis had been obtained by using the experimental model of portal hypertension by partial portal vein ligation [24,25]. In conjunction

with this observation, our results point to the hypothesis that splanchnic angiogenesis may be part of a complex multifactorial process involved in the pathophysiology of the circulatory dysfunction occurring in cirrhosis. In this pathophysiological scenario, the vascular system rearranges its architecture to supply an adequate blood flow to tissues by two different mechanisms. The former is the passive modulation of vascular tone by the action of vasoactive substances such as increased levels of nitric oxide and endogenous cannabinoids [26,27] or the hyporesponsiveness to endogenous vasoconstrictors [28]. The second mechanism contemplates the induction of long-term structural changes in the architecture of the vascular system. For example, portal hypertension results in the development of portosystemic collateral veins and angiogenesis that constitute a rescue system against increased intrahepatic resistance. In addition, cirrhosis is associated with remodeling of systemic blood vessels, which occurs as an adaptive process in response to systemic vasodilation [29]. However, the inability of these vascular modifications to efficiently couple with the hemodynamic events associated with cirrhosis, contributes to the accumulation of ascites, which is an important component for the regulation of angiogenic processes in endothelial cells, as we have demonstrated, and might amplify long-term vascular structural changes in this disease.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr Kenneth Walsh for kindly providing the AA-Akt adenoviruses as well as Dr A Arañó (from the Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado, S.A.L.) for his assistance with the CAM assay. We also thank the staff of Granja Bellavista S.C.P. for providing fertilized 4-day-old eggs and Dr T Doñate for her assistance with peritoneal dialysis patients.

This work was supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF2001-2585 to M.M-R; and SAF2003-02597 to WJ), Fondo de Investigación Sanitaria (Fis: 02/0588 to JR), Instituto de Salud Carlos III (C02/03) and Fundació La Marató de TV3 (000610 to W.J.). S.T. has a grant from DGICYT (SAF2001-2585). MM-R is an investigator of the Programa Ramón y Cajal (Ministerio de Ciencia y Tecnología). PF-LL had a grant from FIS (PI021547) and from Sociedad Española de Nefrología (SEN-2002).

#### References

- [1] Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258–266.

- [2] Hoefs JC. Characteristics of Ascites. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier RW, editors. Ascites and renal dysfunction in liver disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA: Blackwell Science, Inc.; 1999. p. 14–35.
- [3] Jin-no K, Tanimizu M, Hyodo I, Kurimoto F, Yamashita T. Plasma level of basic fibroblast growth factor increases with progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol* 1997;32:119–121.
- [4] Mesquita RC, Leite-Mor MM, Parise ER. Fibronectin in the ascitic fluid of cirrhotic patients: correlation with biochemical risk factors for the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:843–847.
- [5] Navasa M, Follo A, Filella X, Jimenez W, Francitorra A, Planas R, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 1998;27:1227–1232.
- [6] Shimizu I, Ichihara A, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in ascites from patients with cirrhosis. *J Biochem (Tokyo)* 1991;109:14–18.
- [7] Cejudo-Martin P, Ros J, Navasa M, Fernandez J, Fernandez-Varo G, Ruiz-del-Arbol L, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor in peritoneal macrophages of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2001;34:487–493.
- [8] Cejudo-Martin P, Morales-Ruiz M, Ros J, Navasa M, Fernandez-Varo G, Fuster J, et al. Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 2002;36:1172–1179.
- [9] Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, et al. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999;29:1057–1063.
- [10] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597–601.
- [11] Gratton JP, Morales-Ruiz M, Kureishi Y, Fulton D, Walsh K, Sessa WC. Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:30359–30365.
- [12] Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, et al. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 2001;8:693–704.
- [13] Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, et al. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 2000;86:892–896.
- [14] Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S, Gratton JP, Scotland R, Shiojima I, et al. Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:19672–19677.
- [15] Ros J, Leivas A, Jimenez W, Morales M, Bosch-Marce M, Arroyo V, et al. Effect of bacterial lipopolysaccharide on endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *J Hepatol* 1997;26:81–87.
- [16] Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522–531.
- [17] Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 1999;274:16349–16354.
- [18] Margetts PJ, Kolb M, Yu L, Hoff CM, Holmes CJ, Anthony DC, et al. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am J Pathol* 2002;160:2285–2294.
- [19] Miyata T, Devuyt O, Kurokawa K, van Ypersele dS. Toward better dialysis compatibility: advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002;61:375–386.
- [20] Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest* 2000;106:493–499.
- [21] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 2002;90:1243–1250.
- [22] Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2002;277:19922–19928.
- [23] Zeng Q, Chen S, You Z, Yang F, Carey TE, Saims D, et al. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *J Biol Chem* 2002;277:25203–25208.
- [24] Sumanovski LT, Battegay E, Stumm M, van der KM, Sieber CC. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 1999;29:1044–1049.
- [25] Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004;126:886–894.
- [26] Ros J, Claria J, To-Figuera J, Planaguma A, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, et al. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:85–93.
- [27] Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478–491.
- [28] Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, et al. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993;18:367–372.
- [29] Fernandez-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Arroyo V, Sole M, et al. Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol* 2003;162:1985–1993.



---

**Article 3: Anàlisi de l'expressió gènica diferencial de la cèl·lula endotelial hepàtica de rates cirròtiques mitjançant microarrays.**

La cèl·lula endotelial és capaç de regular la resistència intrahepàtica a través de la síntesi de substàncies vasoactives i de components morfològics característics de l'endoteli sinusoïdal. En aquest context, diferents estudis han mostrat la importància de la cèl·lula endotelial vascular en l'inici i el manteniment d'algunes de les complicacions associades a la cirrosi hepàtica. Així doncs, les CESs hepàtiques participen en la disfunció endotelial característica dels fetges cirròtics ja que, com ja s'ha comentat, presenten deficiències en l'activació d'eNOS, així com alteracions morfològiques o estructurals com la disminució de les fenestracions i la formació de membrana basal. En el moment de començar aquest estudi, encara no existia cap estudi descriptiu de l'expressió gènica diferencial o de la regulació de les vies de senyalització específiques de l'endoteli hepàtic en la cirrosi. De la mateixa manera, existia un gran interès per identificar gens específics d'endoteli que podrien ser utilitzats com a alternatives terapèutiques per al tractament d'aquesta malaltia. Per tant, en aquest estudi es van aïllar CESs de rates cirròtiques i rates control i es va estudiar el patró d'expressió gènica diferencial d'aquestes cèl·lules mitjançant la tècnica de microarrays. Els resultats obtinguts en aquest estudi s'enumeren a continuació:

1. L'aïllament de CESs de fetges d'animals controls i cirròtics permet obtenir una població endotelial amb una puresa del 90%.

Les CESs es van aïllar de fetges de rates controls i cirròtiques mitjançant una perfusió retrògrada amb col·lagenasa seguit d'un gradient discontinu de Percoll i un pas posterior de purificació mitjançant boles magnètiques que permeten separar les CKs de la població endotelial. Les cèl·lules que es van obtenir a partir d'aquests aïllaments mostraven un 90% de reactivitat positiva pels marcadors específics d'endoteli eNOS, RECA-1 i CD31 (figura 1, article 3). Del 10% de la població contaminant restant, només se'n va identificar un 6%, que estava format per limfòcits i CHes. Tot i això, l'RNA provinent de la població contaminant no va interferir en els resultats finals, ja

que no es van detectar marcadors d'aquests dos tipus cel·lulars en les dades obtingudes a partir dels microarrays.

2. L'anàlisi de l'expressió gènica de les CESs va revelar que la majoria dels mRNAs expressats de manera diferencial en la cirrosi s'associen a processos de remodelat de la ECM, inflamació, resposta a l'estrès i senyalització cel·lular.

L'anàlisi del patró d'expressió gènica mitjançant la tècnica de microarrays es va dur a terme a partir de RNA obtingut de CESs provinents de 6 rates controls i 6 rates cirròtiques. El dendograma obtingut a partir del clúster jeràrquic no supervitzat de les dades va mostrar que totes les mostres provinents de rates cirròtiques s'agrupaven per formar un grup estadísticament diferent al de les mostres d'animals controls (figura 2A, article 3). A més, l'anàlisi estadístic va permetre obtenir una llista final de gens formada per 489 transcrits que s'expressaven de manera diferencial en les CESs dels animals cirròtics ( $P < 0.005$ ). Es van considerar només aquells transcrits amb un quocient d'expressió diferencial igual o superior a 1,8. Es va observar que, d'aquests 489 gens, 260 presentaven una intensitat de senyal incrementada en la condició de cirrosi en comparació amb la control, mentre que els 230 restants mostraven una intensitat de senyal reduïda (figura 2B, article 3; taules 2 i 3, article 3). Cal destacar que, dels 260 transcrits sobreexpressats i dels 230 d'expressió reduïda, només 133 i 92, respectivament, presentaven anotacions funcionals en les bases de dades públiques.

Els gens sobreexpressats en les CESs dels animals cirròtics es van agrupar en els següents grups funcionals:

a) Citoesquelet i remodelat de la ECM (13,5%):

- Lisil oxidasa (lox): enzim que catalitza la reacció de *cross-linking* de les fibres de col·lagen amb les fibres d'elastina de la ECM.
- Col·lagens: Col1a1, Col18a1 i Col1a2.
- Metal·loproteïnases: MMP-2 i MMP-23.
- Altres: decorina, elastina, trombospondina 4 o tropomiosina 1- $\alpha$ .



b) Activació endotelial i interacció cèl·lula-cèl·lula (10%):

- Receptor 1 de lipoproteïnes de baixa densitat oxidades (Olr1): s'indueix en vasos ateroscleròtics en resposta a IL-6 i TNF- $\alpha$ .
- Interleuquina-6 (Il6).
- Receptor de la interleuquina-1 (Il1r1).
- Selectines E i P (Sele i Selp): molècules de superfície que medien l'adhesió laxa de leucòcits a l'endoteli durant la progressió del procés inflamatori.
- Caderines 1 i 2 (Cdh1 i Cdh2) i claudines 3 i 5 (Cldn3 i Cldn5): factors involucrats en el manteniment de les unions intercel·lulars de l'endoteli.

c) Transducció de senyal i proliferació (27%):

- VEGF-D: factor de creixement que pertany a la família de VEGF implicat en fenòmens de formació de vasos limfàtics.
- Gen tipus wingless 4 (Wnt4): com tots els gens de la família tipus wingless, té un paper clau en el desenvolupament i també ha estat involucrat en fenòmens de fibrosi intersticial induïda per dany renal.
- Via de senyalització del factor IGF: dins d'aquest grup, van resultar sobreexpressades les proteïnes d'unió a IGF 1 i 5 (Igfbp1 i Igfbp5) i el receptor 2 de IGF (Igf2).
- Via de senyalització de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 3 i la proteïna latent d'unió a TGF- $\beta$  2 (Ltbp2).
- Altres: reguladors de la senyalització per receptors acoblats a proteïna G (Gpr, Rgs5 o Gpr37), la tirosina cinasa pp60-c-src (Src), annexina 1 (Anxa1), integrina  $\beta$ 5 (itgb5), la proteïna activadora 3 de RAS p21 (Rasa 3), la fosfolipasa A2 (Pla2), la carboxipeptidasa Z, el receptor 3 de la taquinina (Tacr3) o la proteïna específica d'arrest del creixement 7 (Gas7), entre altres.

d) Estrès oxidatiu (4,5%):

Dins d'aquest grup, destaquen la peroxidasa 2 del glutatió (Gpx2), la glutaredoxina 1 (Glx1), la S-transferasa del glutatió mu 5 (Gstm5), i els citocroms P450 15- $\beta$  i 4A3. (Cyp2c12 i Cyp4a3).

e) Factors de transcripció, metabolisme lipídic i modificació proteica (16,2%):

Dins aquest grup, cal destacar el factor de transcripció 21 (Tcf21), el factor de transcripció 7 específic de fetge (Lisch7), la proteïna d'unió a GATA 3 (Gata 3) o la lamina B1, entre altres.

f) Transportadors, apoptosi, tirosina fosfatases i altres grups minoritaris (28,8%):

En aquest grup s'hi poden incloure les proteïnes que modifiquen l'activitat del receptor de la calcitonina 1 i 3 (Ramp1 i Ramp3), la lipocalina 2 (Lcn2), el canal de sodi acoblat a voltatge tipus  $6\alpha$  (Scn6a), la caspasa 7 (Casp7) o el regulador de l'apoptosi WT1 (Pawr), entre altres.

Pel que fa als gens d'expressió reduïda, cal destacar els següents grups funcionals:

a) Transducció de la senyal i proliferació (38,8%):

Dins d'aquest grup, cal destacar diferents gens que regulen l'activació de la eNOS com són calmodulina 1 (Calm1), el receptor d'adrenomedulina (Admr), el receptor del pèptid natriurètic atrial (Npr1) o VEGFR-2 (Kdr). Concretament, Admr, Npr1 i Kdr poden induir vasodilatació a través de la producció de NO en CE.

Altres gens dins d'aquest grup són les proteïnes morfogèniques de l'os 2 i 6 (Bmp2 i Bmp6), la semaforina 6B, VEGFR-1, el receptor 2 de cannabinoides (Cnr2), el receptor de c-kit (Kit), el receptor 1 d'adiponectina (LOC289036) o les fosfolipases A2 i B2 (Pla2 i Pld2), entre altres.

b) Transportadors i canals (14%).

c) Metabolisme / catabolisme (8,5%).

d) Estrès oxidatiu (8,5%).

e) Grups minoritaris entre els quals trobem trànsit cel·lular, factors de transcripció o coagulació, entre altres (29,7%).

3. La validació de les dades obtingudes per PCR o Western Blot van recolzar els resultats obtinguts mitjançant els experiments de microarrays.

En primer lloc, per tal de validar els resultats obtinguts es va analitzar l'expressió gènica de *bmp2*, *Cnr2*, *mmp2* i *selp* en CEs provinents de rates controls i cirròtiques utilitzant la tècnica de PCR a temps real (figura 3A, article 3). Els resultats obtinguts van concordar amb les dades obtingudes mitjançant l'anàlisi dels microarrays. Tot seguit, es va analitzar l'expressió gènica del factor inductor de limfoangiogènesi VEGF-D per PCR convencional a partir de RNA procedent de CEs i de fetges d'animals controls i cirròtics. Aquest experiment va mostrar que les CEs cirròtiques sobreexpressaven VEGF-D en comparació amb les controls (figura 3B, article 3). A més, l'expressió hepàtica de VEGF-D augmentava de manera progressiva durant el tractament amb  $CCl_4$  (figura 4B, article 3). Finalment, per tal d'obtenir una validació funcional d'aquests resultats, es va dur a terme una tinció immunohistoquímica utilitzant un marcador específic de vasos limfàtics conegut com a podoplanina. Aquesta tinció va revelar que el número de vasos limfàtics està incrementat de manera significativa en els fetges cirròtics en comparació amb els fetges controls (figura 4A, article 3). Cal destacar que aquests nous vasos formats se situaven principalment en els tractes portals i en el teixit fibròtic dels fetges cirròtics.



# MICROARRAYS AND OTHER NEW TECHNOLOGIES

## Microarray Analysis of Endothelial Differentially Expressed Genes in Liver of Cirrhotic Rats

SÒNIA TUGUES,\* MANUEL MORALES-RUIZ,\* GUILLERMO FERNANDEZ-VARO,\* JOSEFA ROS,\* DAVID ARTETA,† JAVIER MUÑOZ-LUQUE,\* VICENTE ARROYO,§ JUAN RODÉS,§ and WLADIMIRO JIMÉNEZ\*

\*Hormonal Laboratory, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona; †Progenika-Biopharma S.A., Derio; and §Liver Unit-Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Background & Aims:** There is a long-standing interest in the identification of endothelial-specific pathways for therapeutic targeting in cirrhosis. Therefore, the aim of this study was to evaluate differences in gene expression patterns between liver endothelial cells (LECs) from control and cirrhotic rats by using microarrays. **Methods:** LECs were obtained by isopycnic centrifugation. LECs gene expression was then analyzed on high-density oligonucleotide microarrays. **Results:** Analysis of gene expression revealed that most of the differentially expressed mRNA in cirrhosis are associated with extracellular matrix remodeling, inflammation, antioxidant/stress response, and cell signaling. **Conclusions:** The collective expression changes observed within some functional groups of genes indicate that LECs in cirrhotic livers may contribute to lymphangiogenesis, enhancement of fibrogenesis and inflammatory processes, changes in cell-cell interaction with up-regulation of adherens junction proteins, and alterations in the intrahepatic vascular tone because of the down-regulation of genes involved in vasodilatation.

In physiologic conditions, hepatic resistance is regulated by vascular endothelium through the synthesis of vasoactive molecules and through morphologic components characteristic of the sinusoidal endothelium, such as the absence of basal membrane and the presence of fenestration. By contrast, several studies have described in cirrhosis that hepatic vascular compliance decreases and liver endothelial cells (LECs) seem to play an important role in this process by different pathophysiologic mechanisms such as an impaired endothelial nitric oxide (eNOS) activation<sup>1,2</sup> and the decrease in the number of fenestrations together with the formation of lamina basal in the sinusoidal endothelium.<sup>3</sup>

In this context, there is a long-standing interest in the identification of endothelial-specific pathways for thera-

peutic targeting in cirrhosis. However, analysis of endothelial gene expression in the liver is difficult because endothelial cells are enmeshed in a complex organ constituted by hepatocytes, Kupffer cells, stellate cells, extracellular matrix, and infiltrated cells. This heterogeneous cellular composition contributes to the complexity of the intrahepatic transcriptome<sup>4</sup> and prevents delineation of an accurate picture of the pathophysiological role of LECs when the results obtained are from whole tissue. In this study, we overcome this limitation by isolating endothelial cells from liver of control and cirrhotic rats and analyzed their gene expression profile by using oligonucleotide microarrays.

### Materials and Methods

#### Rat Liver Endothelial Cell Isolation

The study was performed in LECs isolated from 6 adult male Wistar rats and 6 adult male Wistar rats that were exposed to inhalation of CCl<sub>4</sub> to induce cirrhosis as previously described<sup>5–7</sup> and according to the criteria of the investigation and ethics committee of the Hospital Clínic Universitari. LECs were purified after collagenase retrograde perfusion and Percoll gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden).<sup>8</sup> We optimized the purification of LECs by the inclusion of a negative affinity purification step using magnetic beads (Dyna; Biotech, Oslo, Norway) precoupled with 1 µg anti-rat CD163 antibody (Serotec, Oxford, United Kingdom).

#### Antibodies

Antibodies used for immunofluorescence were mouse anti-RECA-1 (eBioscience, San Diego, CA), mouse anti-eNOS

*Abbreviations used in this paper:* eNOS, endothelial nitric oxide synthase; LECs, liver endothelial cells; VEGF, vascular endothelial growth factor.

© 2005 by the American Gastroenterological Association  
0016-5085/05/\$30.00

doi:10.1053/j.gastro.2005.09.006

**Table 1.** RT-PCR Primer Sequences

Primer	Sequence	Annealing temperature	Length
<i>BMP2</i>	(S) 5'-ATGGACGTGCCCCCTAGTGCTCT-3' (AS) 5'-TCCTGGCTGGCCCCGAGTGC-3'	63°C	322 bp
<i>MMP2</i>	(S) 5'-TGCACCATCGCCCATCATCAAAGTT-3' (AS) 5'-AAGGCCCGAGCAAAAGCATCATCC-3'	60°C	357 bp
<i>PSELEC</i>	(S) 5'-TGCGGGGCTTCAGGACAATG-3' (AS) 5'-CCAAGGCGCCACCCAAGTAAG-3'	60°C	283 bp
<i>Cnr2</i>	(S) 5'-TTCCCCCTGATCCCCAACGACTAC-3' (AS) 5'-CTCTCCACTCCGACGGGCATAAAT-3'	60°C	369 bp
<i>HPRT</i>	(S) 5'-GGGGGTATAAGTTCTTTGCTGAC-3' (AS) 5'-CATTTTGGGGCTGTACTGCTTGAC-3'	54°C	264 bp
$\beta$ -actin	(S) 5'-TAAGGCCAACCGTAAAAAGATGAC-3' (AS) 5'-ATTGCCGATAGTGATGACCTG-3'	58°C	421 bp
<i>VEGF-D</i>	(S) 5'-ATGGAGAGTGGGCCGACGTGAATA-3' (AS) 5'-AGGGGGCTTGAAAAATGTGTTGGT-3'	59°C	416 bp

S, sense; AS, antisense.

(Transduction Laboratories, Lexington, KY), and mouse anti-desmin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). In addition, we used mouse anti-PECAM-1 (Serotec), mouse anti-CD68 (Serotec), and R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-CD45 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) antibodies for FACScan analysis, mouse monoclonal anti-eNOS antibody,<sup>8</sup> Western blotting, and antipodoplanin antibody (Sigma Chemical Co.) for immunohistochemistry.

### RNA Isolation, Microarray Hybridization, and Data Analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD), and the derived cRNA samples were hybridized to Rat Expression 230A oligonucleotide microarrays (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA). A gene was considered to be expressed in a particular experimental condition when it was detected in 100% of GeneChips analyzed.

Unsupervised hierarchical clustering of samples was performed by calculating the Spearman correlation coefficient within the filtered set of transcripts. Differences were considered to be significant at a *P* value < .005 according to ANOVA test. Results have been deposited in the Gene Expression Omnibus MIAME-compliant database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Accession number: GSE1843).

To validate the expression levels obtained in microarray experiments, we used quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and conventional RT-PCR. Primer descriptions and their corresponding annealing temperatures are specified in Table 1. Detailed materials and methods are described in supplemental material on-line at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org).

## Results

### Isolation of LECs From Control and Cirrhotic Rats

Figure 1A shows that nearly 90% of isolated LECs demonstrated strong immunoreactivity for eNOS and

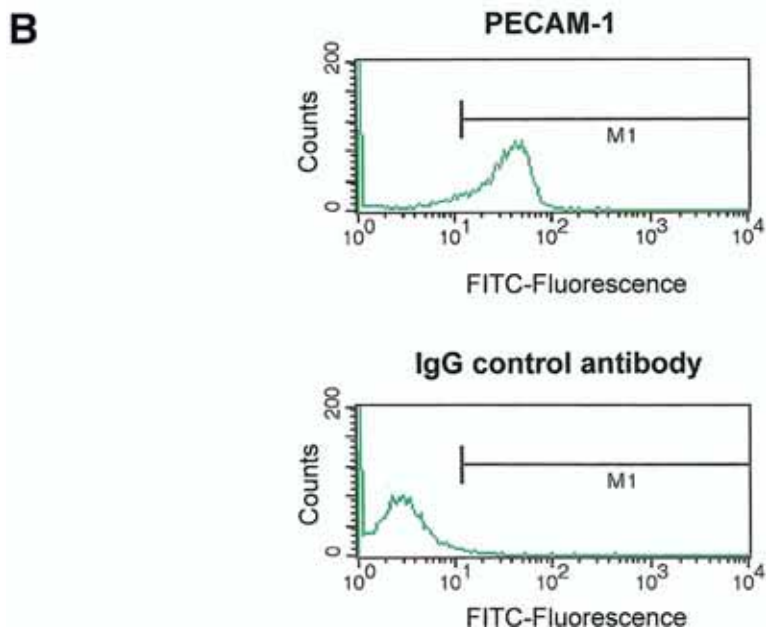
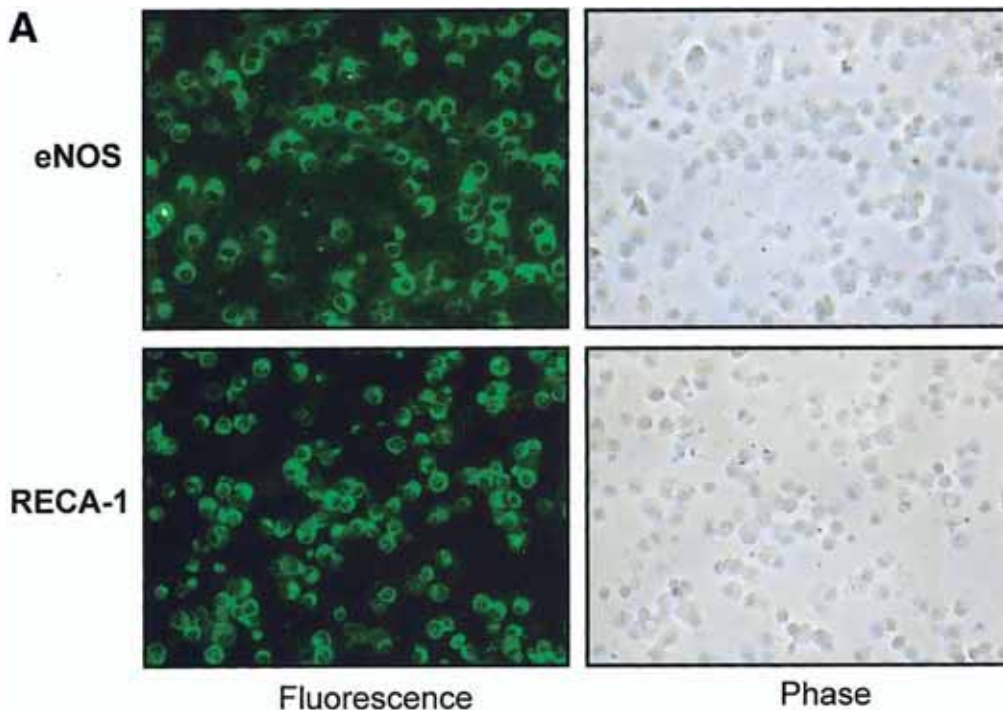
RECA-1 proteins (91%  $\pm$  1.6% for eNOS and 89%  $\pm$  1.2% for RECA-1 immunoreactivity) and for PECAM-1 protein as detected by FACScan analysis (Figure 1B). We were only able to identify ~6% of the remaining 10% contaminating population that was mainly composed of lymphocytes (2.98%  $\pm$  1.4% for CD45 FACScan analysis) and stellate cells (3.14%  $\pm$  0.1% for desmin FACScan analysis). Nevertheless, their mRNA did not contribute to our final results as inferred by observing the absence of cell markers such as desmin or CD45 in our microarray data. Additionally, Kupffer cells were not detected by CD68 FACScan analysis (Supplemental Figure 1S, see supplementary material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org))

After LECs isolation, we proceeded immediately with the purification of their mRNA without previous in vitro cell culture. This last step in our protocol was designed to avoid any exposure of endothelial cells to culture conditions that may induce changes in gene expression. Nevertheless, it should be noted that, although we try to minimize external interferences over the endothelial cell transcriptional machinery, there may be subtle transcriptional responses to osmotic stress or even loss of mRNA with short half-lives that may interfere with the analysis.

### Microarray Global Analysis of LECs Gene Expression Profiles

Total RNA from LECs that were obtained from 6 control rats and 6 cirrhotic rats were hybridized in parallel to 6 identical oligonucleotide arrays. In each array, cRNA poles of 2 cirrhotic rats or 2 control rats were used.

The dendrogram of Figure 2A clearly showed that all LECs samples from cirrhotic rats clustered together and formed a statistically different group from control sam-



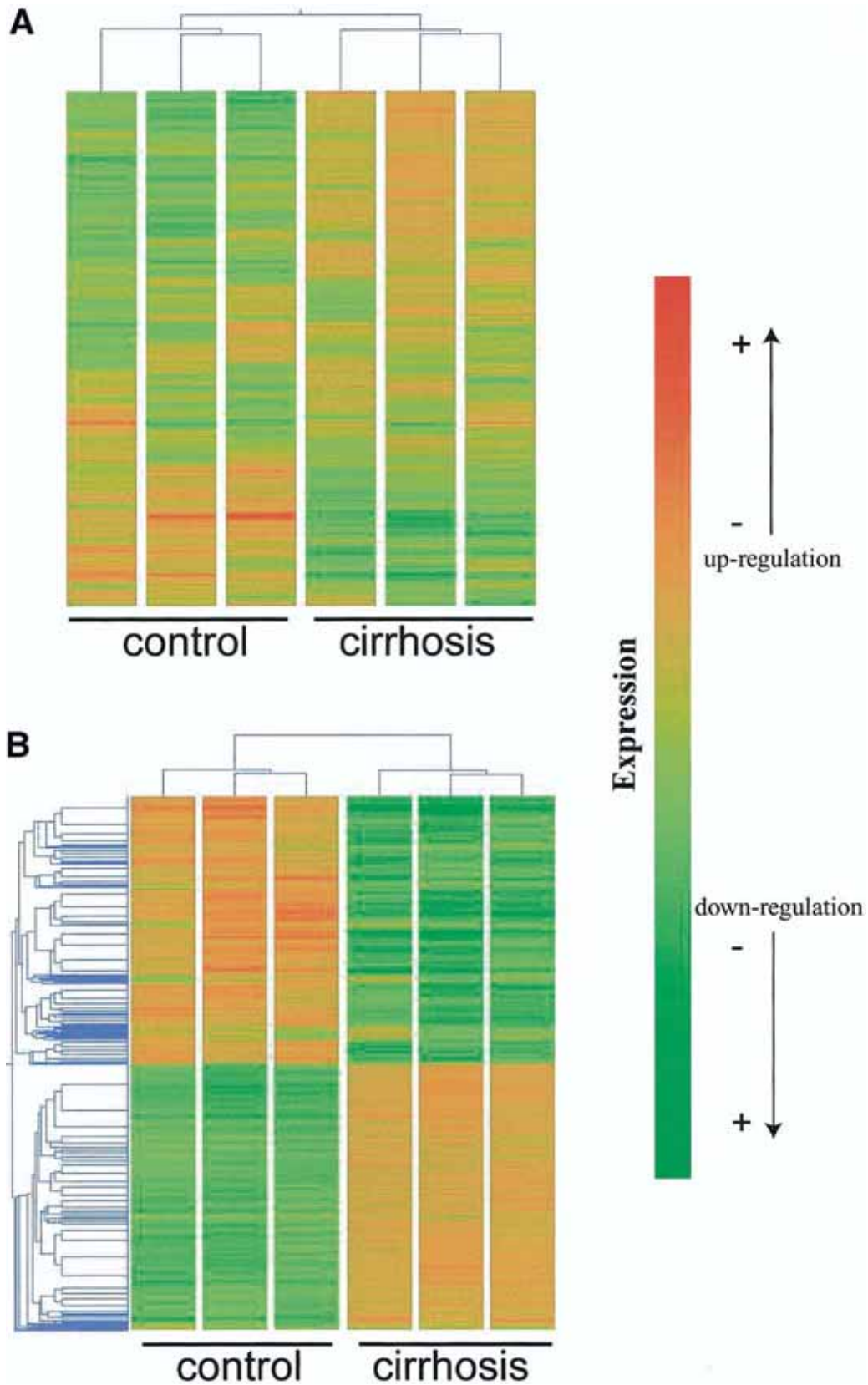
**Figure 1.** eNOS, RECA-1, and PECAM-1 expression in LECs. (A) Representative immunofluorescent images of eNOS and RECA-1 in LECs are shown with their corresponding phase-contrast images (n = 4, original magnification  $\times 200$ ). (B) LECs were analyzed by FACSscan for PECAM-1 or incubated with IgG isotype control antibody. The percentage of cells expressing PECAM-1 was calculated as the percentage of cells that was located under the M1 window (n = 4).

ples. The statistical analysis identified 489 transcripts that were differentially expressed at a significance of  $P < .005$ . Two hundred sixty transcripts had significantly increased signal intensity in LECs from cirrhotic rats compared with LECs from control rats, and 230 transcripts had reduced signal intensity (Figure 2B). Of the 260 up-regulated and the 230 down-regulated genes differentially expressed in cirrhosis, only 133 and 92, respectively, have functional annotations in public databases. Tables 2 and 3 show the numerical and descriptive

analyses for some of these differentially expressed genes without considering genes that presented a fold change lower than 1.8 (for up-regulated genes) or genes that presented a fold change higher than 0.55 (for down-regulated genes).

**Validation of Microarray Data**

In general, analyses obtained by quantitative real-time RT-PCR and conventional RT-PCR (Figure 3A and 3B) showed results consistent with the data obtained in



**Figure 2.** Hierarchical clustering analysis of differentially regulated transcripts in cirrhosis. Gene regulation results are explained in the *red-green code bar* shown on the right. (A) Unsupervised hierarchical clustering of control and cirrhotic LECs samples. (B) Supervised 2-way hierarchical clustering was performed by using the 489 most significantly differentially expressed genes found in LECs from controls and LECs from cirrhotic rats.



**Table 2.** Genes Up-regulated by Cirrhosis in LECs

Gene description	Fold change $\pm$ SD over controls	P value	Accession no.
<b>Inflammation/Immunoresponse</b>			
Olr1: oxidized low-density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	10.38 $\pm$ 4.50	$P < .005$	NM_133306
Sele: selectin, endothelial cell	2.10 $\pm$ 0.31	$P < .005$	L25527
Selp: selectin, platelet	4.42 $\pm$ 1.31	$P < .005$	BI296054
Tnfrsf4: tumor necrosis factor superfamily, member 4	8.45 $\pm$ 2.04	$P < .005$	NM_013049
Il1r1: interleukin 1 receptor-like 1	17.59 $\pm$ 5.31	$P < .005$	U04317
Il6: interleukin 6	4.80 $\pm$ 0.28	$P < .001$	NM_012589
Alcam: activated leukocyte cell adhesion molecule	3.51 $\pm$ 0.88	$P < .005$	NM_031753
<b>Signaling transduction</b>			
Ltbp2: latent transforming growth factor $\beta$ binding protein 2	18.80 $\pm$ 7.13	$P < .005$	NM_021586
Wnt4: wingless-type MMTV integration site family, member 4	11.90 $\pm$ 1.87	$P < .001$	NM_053402
Tc10: ras-like protein	2.20 $\pm$ 0.42	$P < .005$	NM_053522
Gpr: putative G-protein-coupled receptor	2.15 $\pm$ 0.43	$P < .005$	BG663422
Rgs5: regulator of G-protein signaling 5	8.86 $\pm$ 1.53	$P < .001$	NM_019341
Gpr37: G-protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	2.66 $\pm$ 0.44	$P < 0.0001$	NM_057201
Fhl2: four and a half LIM domains 2	6.32 $\pm$ 1.13	$P < .005$	NM_031677
Itgb5: integrin, $\beta$ 5	1.83 $\pm$ 0.43	$P < .005$	AW520594
Tacr3: tachikin receptor 3	5.68 $\pm$ 1.16	$P < .005$	NM_017053
Ptger4: prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	2.72 $\pm$ 0.39	$P < .005$	NM_032076
Ptgrn: prostaglandin F2 receptor negative regulator	4.52 $\pm$ 1.11	$P < .001$	NM_019243
Prkar2b: protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II $\beta$	2.02 $\pm$ 0.48	$P < .005$	M12492
Rasa3: RAS p21 protein activator 3	2.28 $\pm$ 0.40	$P < .005$	A170661
Pla2g4a: phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	3.13 $\pm$ 0.73	$P < .005$	NM_133551
Src: tyrosine protein kinase pp60-c-src	2.55 $\pm$ 0.43	$P < .005$	BI282912
Igf2r: insulin-like growth factor 2 receptor	2.39 $\pm$ 0.49	$P < .005$	NM_012756
Igfbp1: insulin-like growth factor binding protein 1	9.69 $\pm$ 1.90	$P < .0005$	NM_013144
Igfbp5: insulin-like growth factor binding protein 5	7.29 $\pm$ 0.89	$P < .0001$	BE104060
Anxa1: annexin 1	3.64 $\pm$ 0.76	$P < .005$	NM_012904
Cpz: carboxypeptidase Z	3.50 $\pm$ 0.68	$P < .005$	NM_031766
<b>Cytoskeleton and ECM</b>			
Col1a1: collagen, type 1, $\alpha$ 1	24.26 $\pm$ 5.88	$P < .005$	BI285575
Spp1: secreted phosphoprotein 1	11.14 $\pm$ 1.77	$P < .0005$	AB001382
Lox: lysyl oxidase	18.92 $\pm$ 5.68	$P < .0005$	NM_017061
Thbs4: thrombospondin 4	3.30 $\pm$ 0.70	$P < .005$	X89963
Tpm1: tropomyosin 1, $\alpha$	4.29 $\pm$ 0.42	$P < .005$	M23764
Dcn: decorin	3.55 $\pm$ 0.88	$P < .005$	BM390253
Col18a1: collagen, type XVIII, $\alpha$ 1	7.65 $\pm$ 2.87	$P < .005$	A1101782
Pcolce: procollagen C-proteinase enhancer protein	5.27 $\pm$ 1.38	$P < .005$	NM_019237
Col1a2: procollagen, type 1, $\alpha$ 2	9.42 $\pm$ 3.20	$P < .005$	BM388837
Mgp: matrix Gla protein	3.01 $\pm$ 0.54	$P < .005$	NM_012862
Mmp2: matrix metalloproteinase 2 (72 kilodalton type IV collagenase)	5.64 $\pm$ 1.46	$P < .005$	U65656
Mmp23: Matrix metalloproteinase 23	3.84 $\pm$ 0.76	$P < .001$	NM_053606
Krt8: keratin 8	6.83 $\pm$ 2.53	$P < .005$	BF281337
Fbn1: fibrillin-1	2.78 $\pm$ 0.42	$P < .005$	BM389019
Eln: elastin	3.49 $\pm$ 0.92	$P < .005$	J04035
<b>Cell-cell adhesion molecules</b>			
Cdh1: cadherin 1	12.15 $\pm$ 1.57	$P < .001$	NM_031334
Cdh2: cadherin 2	3.85 $\pm$ 0.65	$P < .005$	AF097593
Cldn3: claudin 3	12.33 $\pm$ 4.90	$P < .005$	NM_031700
Cldn5: claudin 5	8.42 $\pm$ 1.91	$P < .0005$	BI281680
<b>Coagulation</b>			
F3: coagulation factor 3	5.38 $\pm$ 0.66	$P < .001$	NM_013057
C4a: complement component 4a	4.59 $\pm$ 0.77	$P < .005$	BI285347
<b>Redox reaction and oxidative stress</b>			
Glrx1: glutaredoxin 1 (thioltransferase)	3.50 $\pm$ 0.66	$P < .005$	AF319950
Gpx2: glutathione peroxidase 2	3.47 $\pm$ 0.43	$P < .005$	AA800587

(continued on following page)

**Table 2 (continued).** Genes Up-regulated by Cirrhosis in LECs

Gene description	Fold change $\pm$ SD over controls	<i>P</i> value	Accession no.
Gstm5: glutathione S-transferase, $\mu$ 5	1.85 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	U86635
Cyp2c12: cytochrome P450 15- $\beta$ gene	18.58 $\pm$ 5.58	<i>P</i> < .005	NM_031572
Cyp4a3: cytochrome P450 4A3	2.70 $\pm$ 0.49	<i>P</i> < .005	M33936
Transcription factor			
Mycn: v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	11.85 $\pm$ 4.94	<i>P</i> < .005	BI275570
Litaf: LPS-induced TNF- $\alpha$ factor	1.88 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	BI284739
Tcf21: transcription factor 21	3.05 $\pm$ 0.72	<i>P</i> < .005	BE113336
Lisch7: liver-specific bHLHZip transcription factor 7	3.96 $\pm$ 0.95	<i>P</i> < .005	NM_032616
Lmnb1: lamin B1	2.58 $\pm$ 0.41	<i>P</i> < .005	NM_053905
Gata3: GATA-binding protein 3	3.85 $\pm$ 0.89	<i>P</i> < .005	NM_133293
Transporters/channels			
Ramp1: receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	3.07 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	NM_031645
Ramp3: receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	8.82 $\pm$ 3.99	<i>P</i> < .005	NM_020100
Lcn2: lipocalin 2	9.26 $\pm$ 1.09	<i>P</i> < .005	NM_130741
Ank: progressive ankylosis	2.25 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_053714
Scn6a: sodium channel, voltage-gated, type 6, $\alpha$ polypeptide	2.98 $\pm$ 0.49	<i>P</i> < .005	BF285019
Slc34a2: solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	12.00 $\pm$ 2.58	<i>P</i> < .005	NM_053380
Proliferation/development			
Gpc3: glypican 3	3.71 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_012774
Krt1-18: keratin complex 1, acidic, gene 18	5.40 $\pm$ 1.29	<i>P</i> < .005	BI286012
Egln3: EGL 9 homolog 3 ( <i>C. elegans</i> )	3.82 $\pm$ 0.98	<i>P</i> < .005	NM_019371
S100a4: S100 calcium-binding protein A4	4.75 $\pm$ 1.28	<i>P</i> < .001	NM_012618
Phb: prohibitin	2.20 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	BI282863
Tgfb3: transforming growth factor, $\beta$ 3	3.51 $\pm$ 0.60	<i>P</i> < .001	NM_013174
Gas7: growth arrest specific 7	3.55 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	AJ131902
H19: H19 fetal liver mRNA	5.88 $\pm$ 0.32	<i>P</i> < .005	BF284168
Hdgf: hepatoma-derived growth factor	2.14 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_053707
VEGF-D: c-fos induced growth factor	4.37 $\pm$ 1.75	<i>P</i> < .005	AY032728
Apoptosis			
Casp7: caspase 7	1.98 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	NM_022260
Pawr: PRKC, apoptosis, WT1, regulator	2.31 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	U05989

NOTE. Gene expression profiles of LECs from control and cirrhotic rats from 3 independent microarray experiments. Genes significantly up-regulated by cirrhosis (*P*  $\leq$  .005; and fold changes  $\geq$  1.8). For each of these genes, the fold change results are given (mean  $\pm$  SD).

microarray experiments. In addition, the data from both microarrays (0.88-  $\pm$  0.12- vs 1.01-  $\pm$  0.10-fold change, respectively, over controls) and Western blot analyses (Figure 3C) showed that the expression of eNOS is unresponsive to the experimental condition of cirrhosis as previously described.<sup>2,8,9</sup>

Several studies have clearly demonstrated that vascular endothelial growth factor (VEGF)-D is an inducer of lymphangiogenesis through the activation of the VEGF receptor-3 (VEGFR-3).<sup>10</sup> Thus, to obtain a functional validation of our microarray data, we performed immunohistochemical studies to analyze the possible increase of lymphatic vessels in the liver of cirrhotic animals. Staining for the lymphatic endothelial cell marker podoplanin revealed numerous lymphatic vessels in cirrhotic livers, specifically in septa and scattered tissue (Figure 4A). With the aim to clarify whether this finding has pathophysiologic relevance, we performed a time course of the VEGF-D expression in cirrhotic rats compared with control rats. The results showed that VEGF-D

expression increased progressively from week 10 to 15 of CCl<sub>4</sub> treatment compared with control animals. Moreover, this increase in VEGF-D expression is maintained until week 28 (Figure 4B). This information suggests that the expression of VEGF-D is part of the natural history of this pathophysiologic process and it is not due to adverse effects of CCl<sub>4</sub> treatment.

## Discussion

The following discussion focuses on the significance of some of the up-regulated and down-regulated transcripts expressed in LECs, in an attempt to define better the pathophysiologic role of the endothelium in cirrhotic livers.

### Extracellular Matrix Remodeling

One of the most clearly affected genes within this biologic group is Lox. Several studies have demonstrated that the inhibition of Lox expression may be useful for

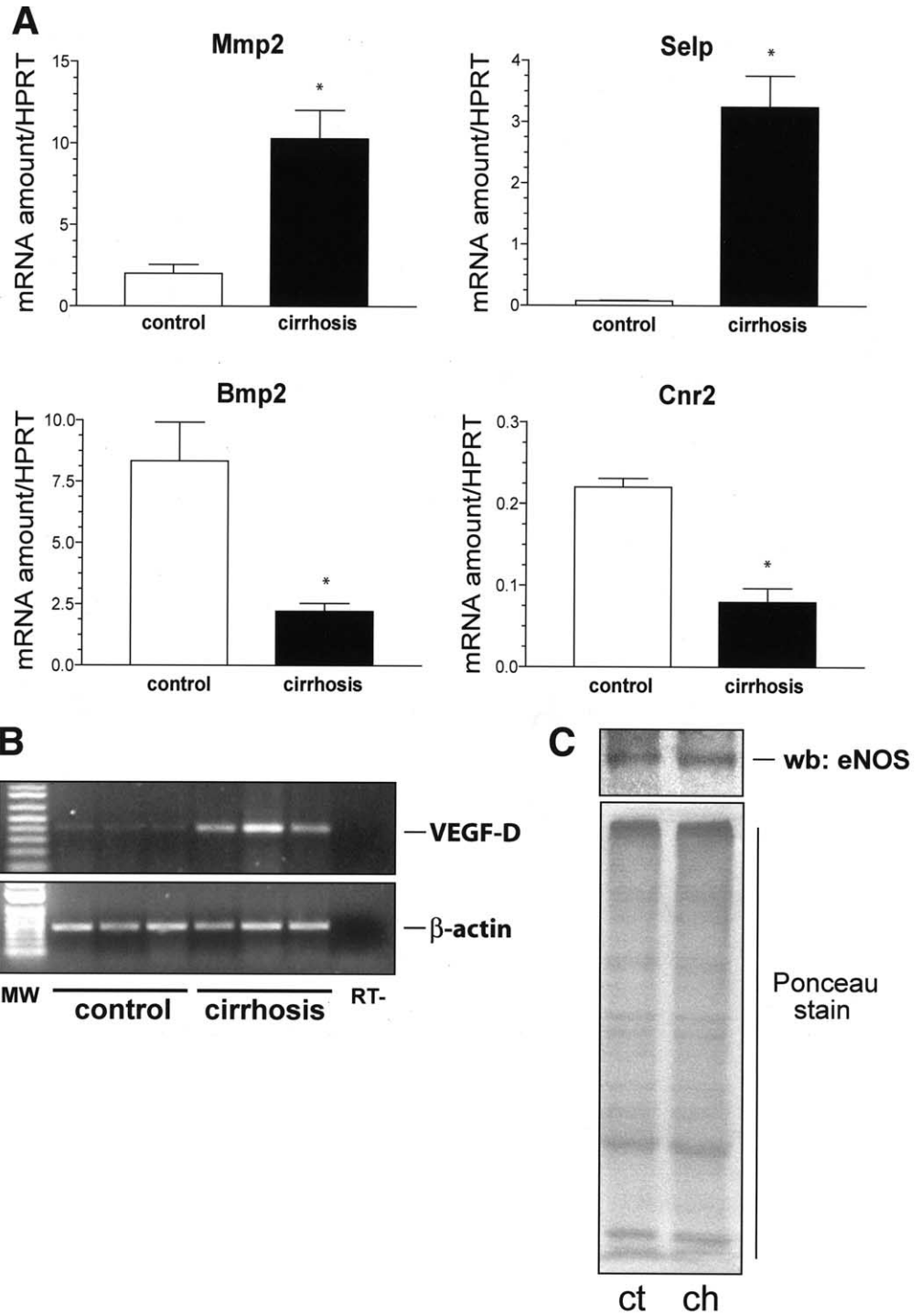
**Table 3.** Genes Down-regulated by Cirrhosis in LECs

Gene description	Fold change $\pm$ SD over controls	<i>P</i> value	Accession no.
<b>Inflammation/Immunoresponse</b>			
Ly68:lymphocyte antigen 68	0.41 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0001	NM_053383
<b>Signaling transduction</b>			
Camk2g: calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II $\gamma$	0.54 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	NM_133605
Calml1: calmodulin 1	0.55 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_031969
Tao2: serine/threonine protein kinase TAO	0.41 $\pm$ 0.41	<i>P</i> < .005	NM_022702
Btg2: $\beta$ -cell translocation gene 2, anti proliferative	0.43 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	BI288701
Ig-Hepta: G protein-coupled hepta-helical receptor Ig-Hepta	0.41 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	BI290677
Gnaq: heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein $\alpha$ q subunit	0.43 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AW143805
Rgs3: regulator of G-protein signaling 3	0.49 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_019340
Admr: adrenomedullin receptor	0.31 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_053302
Npr1: natriuretic peptide receptor 1	0.26 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	NM_012613
Gabbr2: $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor, $\rho$ 2	0.49 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	NM_017292
Sh3d4: SH3 domain protein 4	0.44 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	AW143437
Rab11a: RAB11a, member RAS oncogene family	0.51 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	BE118560
Pla2g1b: phospholipase A2, group IB	0.29 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	AI234860
Pld2: phospholipase D2	0.37 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	D88672
Prkch: protein kinase C-eta	0.42 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AA799981
Fit1: FMS-like tyrosine kinase 1	0.28 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AF157595
Kdr: kinase insert domain protein receptor	0.54 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	U93307
LOC245963: Estrogen-regulated protein CBL20, 20.4 kilodaltons	0.38 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	AF223678
Pde2a: cyclic GMP stimulated phosphodiesterase	0.47 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_031079
Kit: c-kit receptor tyrosine kinase	0.33 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_022264
Cnr2: cannabinoid receptor 2 gene	0.32 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_020543
LOC289036: adiponectin receptor 1	0.39 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	BI289063
Acvr1: activin A receptor type II-like 1	0.33 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_022441
<b>Cytoskeleton and ECM</b>			
Klct: kinesin light chain KLCT	0.37 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AF166267
Tnxa: tenascin XA	0.28 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	BM390128
Adamts1: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)	0.38 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0001	NM_024400
<b>Coagulation</b>			
Cd59: CD59 antigen	0.46 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	NM_012925
Tfpi2: tissue factor pathway inhibitor 2	0.39 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AI179507
Thbd: thrombomodulin	0.51 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_031771
<b>Redox reaction and oxidative stress</b>			
Mt1a: Metallothionein	0.53 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AF411318
Ggt1a1: $\gamma$ -glutamyltransferase-like activity 1	0.27 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	NM_019235
Vdup1: up-regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3	0.53 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	U30789
Gstp2: glutathione S-transferase, pi 2	0.43 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	X02904
Cyp26: cytochrome P450, 26, retinoic acid	0.12 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_130408
Cyp4b1: cytochrome P450, subfamily 4B, polypeptide 1	0.21 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	M29853
<b>Transcription factor</b>			
Gata2: GATA binding protein 2	0.34 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	NM_033442
Maf: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog (c-maf)	0.25 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .001	NM_019318
Hoxa4: homeo box A4	0.36 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AA900970
Pet1: ETS domain transcription factor Pet-1	0.23 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	U91679
<b>Proliferation/development</b>			
Sema6b: semaphorin 6B	0.24 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	NM_053471
Nog: noggin	0.31 $\pm$ 0.43	<i>P</i> < .005	AA859752
Dri42: ER transmembrane protein Dri 42	0.43 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AI177031
Bmp2: bone morphogenetic protein 2	0.37 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .005	AA944827
Bmp6: bone morphogenetic protein 6	0.31 $\pm$ 0.42	<i>P</i> < .0005	AI230985

NOTE. Gene expression profiles of LECs from control and cirrhotic rats from 3 independent microarray experiments. Genes significantly down-regulated by cirrhosis (*P*  $\leq$  .005; and fold changes  $\leq$  0.55). For each of these genes, the fold change results are given (mean  $\pm$  SD).

the control of liver fibrosis.<sup>11</sup> However, the present study is the first to prove gene expression of Lox in LECs. This agrees with several studies demonstrating the expression of Lox in endothelium during the course of fibrotic

processes.<sup>12</sup> In addition, LECs exhibit significant increases in Col1a1, Col18a1, and Col1a2, with the greatest mRNA expression found in Col1a1. This phenomenon is not surprising, considering earlier observations



**Figure 3.** Validation of differentially expressed genes. (A) Real-time RT-PCR for Mmp2, Selp, Bmp2, or Cnr2 were performed in LECs from control or cirrhotic rats. Each column represents mean values  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < .05 compared with LECs from control rats. (B) Total RNA extracted from LECs was amplified by RT-PCR using VEGF-D primers. MW, molecular weight; RT, samples without retrotranscriptase enzyme. (C) LECs lysates (30  $\mu$ g) from control (ct) and cirrhotic (ch) rats were analyzed by Western blotting with anti-eNOS antibody. Ponceau S Red staining is shown in the lower panel.

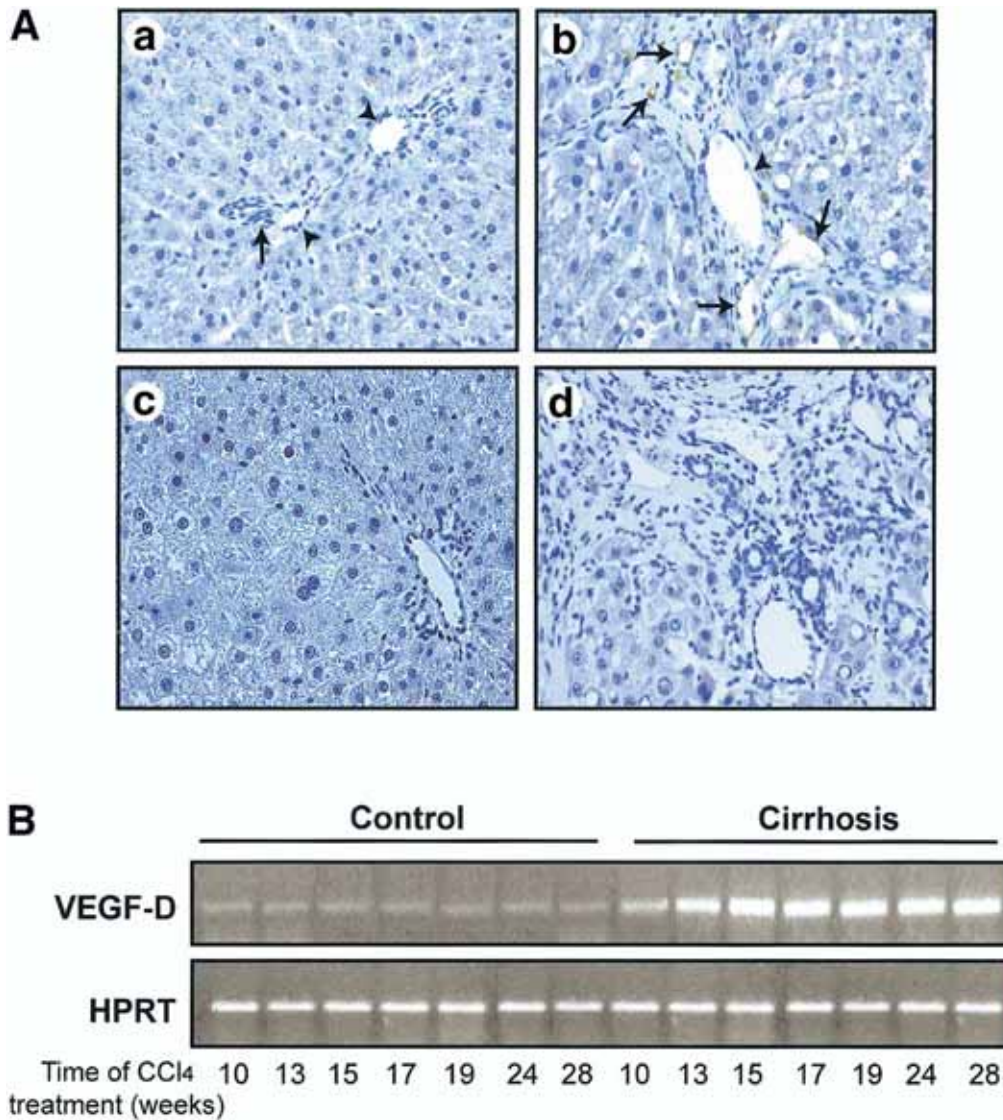
demonstrating endothelial expression of these genes in fibrotic livers.<sup>13-15</sup> Our results also showed that cirrhosis up-regulates Mmp2, which has already been shown to be elevated in fibrotic livers,<sup>16</sup> and Mmp23 genes in LECs.<sup>17</sup>

### Endothelial Cell Activation and Cell-Cell Interaction

Our findings of the up-regulation of a number of inflammatory genes, including Olr1, Sele, Selp, Tnfrsf4,

Il1r1l, and Il6, suggest that these alterations may play a pivotal role in the development and progression of the inflammatory process of cirrhosis. The up-regulation of the Olr1 gene is of special interest in cirrhosis because several reports have demonstrated the ability of this receptor to inhibit eNOS activity in atherosclerotic vessels.<sup>18,19</sup> Cirrhosis also leads to induction of IL-6, Sele, and Selp. These findings are in agreement with investigations showing the capability of endothelium to pro-





**Figure 4.** Functional validation of microarrays. (A) Extensive positive immunohistochemical staining for podoplanin was present in the vasculature of cirrhotic livers (arrows in *b*) as compared with control animals (*a*). Some vessels did not stain for podoplanin (arrowheads in *a* and *b*). Negative control staining is also shown (panels *c* and *d* for control and cirrhotic rats, respectively) ( $n = 3$ ; original magnification,  $\times 200$ ). (B) Time-course analysis of VEGF-D and HPRT mRNA expression in livers from control and cirrhotic rats ( $n = 3$ ).

duce cytokines and cell adhesion molecules upon exposure to environmental signals.<sup>20,21</sup> In this study, we have also identified 4 factors with known roles in intercellular junctions that were up-regulated in LECs from cirrhotic rats: Cdh1, Cdh2, Cldn3, and Cldn5. Hypothetically, these changes in LECs gene expression may interfere with the bidirectional transport of molecules between endothelial cells and hepatocytes affecting normal liver physiology and contributing actively to the onset of morphologic changes described in the hepatic sinusoid during cirrhosis.<sup>3,22</sup>

### Signaling Transduction and Proliferation

In LECs from cirrhotic rats, the greatest number of up-regulated transcripts was in functional groups related to signaling transduction and cell growth. Our analysis identified several genes not previously known to

be over expressed during liver disease. One example is VEGF-D gene, whose up-regulation suggests a prolymphangiogenic role of this growth factor in cirrhosis. This is in agreement with the immunohistochemical analysis of Figure 4, which shows a higher number of lymphatic vessels in cirrhotic compared with control livers. Another surprising finding of our study was the identification of a substantial number of genes related to the activation of eNOS that were significantly down-regulated in cirrhosis (Calm 1, Admr, Npr1, and Kdr). Particularly, the Admr, Npr1, and Kdr genes are specific receptors for adrenomedullin, atrial natriuretic peptide, and VEGF, respectively, which have the common characteristic of acting as inducers of vasodilatation through the production of NO in endothelial cells.<sup>23–25</sup> These results point to the hypothesis that the impaired activation of eNOS found in cirrhotic livers may be explained as a multiple acti-

vation defect in several interconnected signaling cascades that regulate intrahepatic eNOS activity.

In summary, the present study revealed a differential regulation of important functional groups of genes in LECs that should yield important insights into pathogenic mechanisms and suggest therapeutic approaches to treat cirrhosis.

## Appendix

### Supplemental data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [10.1053/j.gastro.2005.09.006](http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.006)

## References

- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926–931.
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344–351.
- Martinez-Hernandez A, Martinez J. The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991;14:864–874.
- Shackel NA, Gorrell MD, McCaughan GW. Gene array analysis and the liver. *Hepatology* 2002;36:1313–1325.
- Claria J, Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V, Ginès P, Rodés J, Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in the liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA: Blackwell Science, 1999:379–396.
- McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol* 1969;50:502–506.
- Lopez-Novoa JM, Rengel MA, Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1980;238:F353–F357.
- Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522–531.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222–1228.
- Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001;7:199–205.
- Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:367–375.
- Herrera VM, Didishvili T, Lopez LV, Ruiz-Opazo N. Differential regulation of functional gene clusters in overt coronary artery disease in a transgenic atherosclerosis-hypertensive rat model. *Mol Med* 2002;8:367–375.
- Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990;86:1641–1648.
- Musso O, Rehn M, Saarela J, Theret N, Lietard J, Hintikka E, Lotrian D, Campion JP, Pihlajaniemi T, Clement B. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology* 1998;28:98–107.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Surrenti C, Riecken EO, Stein H. Cellular localization of type I III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1990;137:59–70.
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245–G249.
- Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997;26:1521–1529.
- Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T, Sawamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1274–1279.
- Mehta JL, Li DY, Chen HJ, Joseph J, Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to up-regulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:857–861.
- Adams DH, Hubscher SG, Fisher NC, Williams A, Robinson M. Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation. *Hepatology* 1996;24:533–538.
- Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992;6:2591–2599.
- Mori T, Okanoue T, Sawa Y, Hori N, Ohta M, Kagawa K. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:891–897.
- Brunner F, Wolkart G. Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc Res* 2001;61:102–110.
- De Matteo R, May CN. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2003;140:1414–1420.
- Li B, Ogasawara AK, Yang R, Wei W, He GW, Zioncheck TF, Bunting S, de Vos AM, Jin H. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 2002;39:1095–1100.

---

Received January 16, 2005. Accepted July 6, 2005.

Address requests for reprints to: Manuel Morales-Ruiz, PhD, Hormonal Laboratory, Hospital Clinic Universitari, Villarroel 170, Barcelona, Spain 08036. e-mail: [morales@clinic.ub.es](mailto:morales@clinic.ub.es); fax: (34) 93 2275697.

Supported by grants from DGICYT (SAF2001-2585 to M.M.R. and SAF2003-02597 to W.J.), FIS (PI 041198 to M.M.R., 01/1514 to W.J., and 02/0588 to J.R.), and Instituto de Salud Carlos III (C02/03).

S.T. and M.M.R. contributed equally to this work.

The authors thank Dr Pedro Jares, from the Genomic Unit of IDIBAPS, for his expert technical assistance in microarray experiments.

## **Material and Methods**

***Induction of Cirrhosis in Rats:*** The study was performed in 6 cirrhotic male adult Wistar rats and 6 control Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France), according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari. Both groups were fed *ad libitum* with standard feed and water containing Phenobarbital (0.3 g/L) as drinking fluid. Cirrhosis was induced by CCl<sub>4</sub> which was administered by inhalation twice weekly (Mondays and Fridays) following the method of McLean and McLean (1) modified by Lopez Novoa et al. (2-3).

### ***Rat liver endothelial cell isolation:***

LECs were purified after collagenase retrograde perfusion of liver as previously described (4). The digested liver was layered over a discontinuous 25–50 per cent Percoll gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After centrifugation, the middle region between layers was removed and washed once with Hanks' solution. This step resulted in a substantial enrichment of LECs but also in a contamination of the cell preparation with Kupffer cells as previously described (5). We, therefore, optimized the purification of LECs by the inclusion of a negative affinity purification step using magnetic beads (Dyna, Biotech, Oslo, Norway) pre-coupled with 1 µg of anti-rat CD163 antibody (Serotec Oxford, UK) for  $1 \times 10^7$  beads. This step removed the contaminating cell population of Kupffer cells from the endothelial fraction. Finally, LECs were collected and subsequently processed for RNA isolation.

***Immunofluorescence and immunohistochemistry:*** Cells were fixed in acetone, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and labeled with mouse monoclonal anti-rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1) (eBioscience, San Diego, CA) at 1/100 dilution (5µg/ml), mouse monoclonal anti-eNOS (Transduction Laboratories, Lexington, KY) at 1/300 dilution (0.83 µg/ml) or mouse monoclonal anti-desmin (Sigma Chemical Co., St

Louis, MO) at a 1/20 dilution. Next, cells were incubated with appropriate FITC-conjugated secondary antibody at 1/200 dilution. The percentage of positive cells was determined by counting four different fields per slide with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (at the original magnification x200).

For immunohistochemistry, livers from control and cirrhotic rats were fixed with 10% neutral-buffered formalin (pH 7.2) and embedded in paraffin. Tissue sections were incubated 1 hour at room temperature with anti-podoplanin antibody (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) at a dilution of 1:300 with PBS+0.5% BSA and revealed with Dako LSAB2 System, HRP (Dako, Glostrup, Denmark) following the manufacturers' instruction. Immunoreactivity was visualized by light microscope (Olympus Bx51, Tokyo, Japan).

***Flow cytometric analysis:*** LECs from control and cirrhotic rats ( $1 \times 10^6$  cells) were washed twice with PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS), fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and incubated with mouse anti-rat platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) antibody at 1/100 dilution, mouse anti-rat CD68 antibody (Serotec Oxford, UK) at 1/100 dilution or R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human CD45 (Becton Dickinson, Mountain View, C.A) at 1/50 dilution in PBS+2% FBS for 30 min at 4°C. In all cases, parallel isotype control experiments were performed. Following incubation, cells were washed three times with PBS+2%FBS, then incubated with appropriate FITC-conjugated secondary antibodies for 15 min at 4°C (1/200). Fluorescence was analyzed using a FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). At least 4,000 cells for each experiment were analyzed.

***Real-time RT-PCR and conventional RT-PCR assays:*** One microgram of total RNA from each sample was reverse transcribed using First Strand cDNA Synthesis Kit



according to the manufacturer's manual (Roche, Mannheim, Germany). Two  $\mu\text{l}$  of the obtained cDNA were amplified by real-time PCR with the DNA Master SYBR Green 1 kit (Roche, Mannheim, Germany) with a final concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 2.5 mM of  $\text{Mg}^{2+}$ . The primers used are specified in Table 1. PCR was performed on an Opticon real-time PCR machine (MJ Research, Waltham, MA), in a 96-well plate. For each sample, the amount of the target gene was determined from the appropriate standard curve. Fold changes were calculated by dividing target values from cirrhotic samples by those from the averaged control samples. The level of the housekeeping gene HPRT was used as an internal control for normalization of RNA quantity. Conventional reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as previously described (6).

**Western blot:** LECs were lysated in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 20 mM NaF, 1 mM Pefabloc, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin). Then, Western blotting with anti-eNOS antibody was performed as previously described (4).

**RNA isolation, microarray hybridization and data acquisition:** Total RNA was extracted from LECs with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD) after the cell-isolation step described above. cRNA samples were hybridized to the Rat Expression 230A oligonucleotide microarray (Affymetrix). Microarray sample preparation and processing procedures were performed as described in the Affymetrix GeneChip Expression Analysis Manual (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA).

**Microarray data analysis:** The expression profile data were analyzed by using Affymetrix Microarray Suite (MAS 5), Affymetrix Data Mining Tool (v.3.0), and GeneSpring v6.1 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) software according to standards

of the Bioinformatics Unit of Progenika-Biopharma S.A. GeneSpring analysis: Gene expression data was normalized by chip normalization (all expression data on a chip is normalized to the 50 th percentile of all values on that chip) and by gene normalization (the data for a given gene is normalized to the median expression level of that gene across all samples). Unsupervised hierarchical clustering of liver samples was performed by calculating the Spearman correlation coefficient within the filtered set of transcripts. In addition, the ANOVA test was conducted to assign statistical significance of gene expression. A conservative adjustment of this method (Bonferroni's multiple test correction) did not result in significant *P*-values. Therefore, we used a  $P < 0.005$  to assign statistical significance. MAS-5 and Data Mining Tool analysis: The hybridization signal of the expressed genes was filtered based on the criteria of being called "Present" (according to the Detection Algorithm used by Affymetrix) in the three analyzed Genechips for each experimental group. In addition, we used MAS-5 Affymetrix algorithms for evaluation of alterations in levels of gene expression between control and cirrhotic samples. With these results we performed an analysis of consistency of the change calls values using nine pair-wise comparisons between individual chips from the cirrhotic group vs. individual chips from the control group. Results have been deposited in the Gene Expression Omnibus MIAME-compliant database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). The GEO accession number is GSE1843.

Functional classification of the up-regulated or down-regulated genes was performed using public databases such as the Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) and Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

## References for Material and Methods

1. McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol* 1969;50:502-506.
2. Lopez-Novoa JM, Rengel MA, Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1980;238:F353-F357.
3. Claria J, Jimenez 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 the liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment.* Malden MA: Blackwell Science, 1999:379-396.
4. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522-531.
5. Daneker GW, Lund SA, Caughman SW, Swerlick RA, Fischer AH, Staley CA, Ades EW. Culture and characterization of sinusoidal endothelial cells isolated from human liver. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34:370-377.
6. Morales-Ruiz M, Jimenez W, Perez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, Arroyo V. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1996;24:1481-1486.



---

**Article 4: El tractament antiangiogènic amb Sunitinib millora l'infiltrat inflamatori, la fibrosi i la pressió portal en rates cirròtiques.**

Com ja s'ha comentat anteriorment, la neovascularització és un element clau en la fisiopatologia dels mecanismes inflamatoris i està implicat en la cronificació de moltes lesions inflamatòries. En aquest context, la inflamació promou l'angiogènesi i, de la mateixa manera, la neovascularització és pro-inflamatòria a través de l'expressió de les molècules d'adhesió. Així doncs, els nous vasos formats constitueixen una via d'entrada pel continu reclutament de cèl·lules inflamatòries, així com de nutrients i oxigen a les àrees d'inflamació crònica que estan en un estat d'hipòxia. En aquest context, sembla raonable que la inhibició de l'angiogènesi durant la cirrosi podria modular la inflamació crònica associada a aquesta malaltia. Així doncs, abans de començar aquest estudi, el vincle entre angiogènesi i inflamació en la cirrosi hepàtica encara no havia estat explotat com a estratègia terapèutica. A més, la hipòtesi principal d'aquest treball es basava en que el tractament de la cirrosi amb agents farmacològics amb múltiples mecanismes d'acció contra l'angiogènesi, la inflamació i la fibrosi produïrien resultats superiors als que s'havien aconseguit fins al moment actuant sobre una sola diana individual. En aquest context, es pretenia determinar si la progressió de la cirrosi va acompanyada d'un augment d'angiogènesi, així com els possibles factors responsables d'aquest fenomen. A continuació, es va tractar un grup de rates cirròtiques amb Sunitinib, un inhibidor multidiària de receptors tirosina cinasa que ha demostrat eficàcia com a potent agent antiangiogènic en diversos assajos clínics. Els resultats d'aquest últim estudi van ser els següents:

**1. La progressió de la cirrosi s'associa a un augment de la neovascularització hepàtica.**

La proliferació vascular en els animals cirròtics es va analitzar mitjançant una tinció immunohistoquímica pel marcador específic de vasos sanguinis vWf i també utilitzant la tècnica de l'angiografia amb FITC-dextrà. Es va observar que els fetges cirròtics mostren un augment significatiu del nombre de vasos sanguinis, principalment situats en els tractes portals i els septes fibròtics. Cal dir que aquest fenomen no era exclusiu del teixit hepàtic, ja que els animals cirròtics també presentaven un augment del

número de vasos sanguinis en la zona esplàcnica. Les angiografies van demostrar que els nous vasos sanguinis formats eren funcionals (figura 1, article 4).

## 2. Els fetges cirròtics sobreexpressen els factors proangiogènics VEGF-A, Ang-1, Ang-2 i PlGF.

Amb l'objectiu de determinar alguns dels possibles factors responsables de l'augment d'angiogènesi en la cirrosi, es va analitzar l'expressió de VEGF-A, Ang-1, Ang-2 i PlGF per immunohistoquímica i/o RT-PCR. En els fetges control, la tinció per VEGF-A i Ang-2 va mostrar una tinció tènue localitzada en els hepatòcits perivenulars. No obstant, a mesura que la cirrosi progressa, l'expressió d'aquests dos factors es va ampliar als hepatòcits que rodegen el teixit fibrós, arribant a un 90% del parènquima en els fetges cirròtics amb ascites. Degut a que l'expressió d'aquests dos factors es regula per hipòxia, es va analitzar la presència de zones d'hipòxia mitjançant una tinció pel marcador d'hipòxia pimonidazol. Aquests experiments van mostrar que la localització de les zones d'hipòxia va correlacionar amb l'expressió de VEGF-A i Ang-2 (figura 2A, article 4).

Per altra banda, la distribució d'Ang-1 va seguir un patró molt diferent al descrit per VEGF-A i Ang-2, caracteritzat per una expressió tènue en fetges controls i un augment d'expressió en la cirrosi independent de la progressió de la malaltia (figura 2A, article 4).

Finalment, es va analitzar l'expressió gènica hepàtica de PlGF per RT-PCR convencional. El resultat va mostrar que els fetges cirròtics sobreexpressen PlGF i aquest augment s'accentua a mesura que la malaltia progressa (figura 2B, article 4).

## 3. La neovasculatura hepàtica expressa les molècules d'adhesió VCAM-1 i ICAM-1.

Amb la finalitat de determinar les característiques proinflamatòries de la neovasculatura hepàtica, es va analitzar l'expressió de les molècules d'adhesió VCAM-1 i ICAM-1 i la seva colocalització amb els vasos sanguinis mitjançant una doble immunofluorescència utilitzant vWf com a marcador de vasos sanguinis. Aquests experiments van mostrar que l'expressió de VCAM-1 als fetges controls era tènue i es localitzava de manera irregular en el sinusoides hepàtic. En aquest cas, no hi havia

colocalització entre vasos sanguinis i l'expressió de VCAM-1. En canvi, en els fetges cirròtics es va observar un increment significatiu de l'expressió de VCAM-1 que, a més, colocalitzava amb els nous vasos sanguinis formats. Aquest mateix disseny experimental també es va utilitzar per ICAM-1, observant-se de nou que, en els fetges cirròtics, la majoria dels nous vasos formats expressaven aquesta molècula d'adhesió (figura 4, article 4).

#### 4. La neovascularura hepàtica és capaç de reclutar cèl·lules de l'infiltrat inflamatori en el territori adjacent.

Tenint en compte els resultats anteriors, es va analitzar la presència d'infiltrat inflamatori i la seva localització relativa amb la neovascularura hepàtica d'aquests animals mitjançant tincions d'immunofluorescència per marcadors de macròfags (CD11b), limfòcits (CD3) i vWf per vasos sanguinis. Tal com s'esperava, en els fetges dels animals controls no es va observar presència d'infiltrat inflamatori. En canvi, en els fetges cirròtics es va detectar un augment significatiu de macròfags i limfòcits localitzats al voltant de la neovascularura hepàtica en els septes fibròtics (figura 3, article 4).

#### 5. Sunitinib inhibeix l'activació de Erk-1/2 induïda per VEGF-A i Ang-1 *in vitro* en cèl·lules HUVEC.

Per tal de comprovar la capacitat inhibidora de SU11248 sobre l'activitat dels receptors tirosina cinasa es van dur a terme experiments *in vitro* on es van estimular cèl·lules HUVEC amb VEGF-A o Ang-1 i es va analitzar l'estat de fosforilació d'Erk-1/2 en presència o absència de l'inhibidor. Es va observar que el tractament de HUVEC amb VEGF-A o Ang-1 va estimular la fosforilació d'Erk-1/2 als diferents temps analitzats. Tal i com s'esperava, el tractament amb SU11248 va inhibir completament l'activació d'aquesta cinasa (figura 5A, article 4).

#### 6. Sunitinib inhibeix l'angiogènesi associada a la progressió de la cirrosi.

Un cop comprovats els efectes inhibitoris de SU11248 *in vitro*, es va analitzar la capacitat antiangiogènica d'aquest inhibidor *in vivo* en rates cirròtiques. Així doncs, per analitzar l'efectivitat del tractament amb SU11248, es va quantificar el número de vasos

sanguinis en diferents territoris vasculars mitjançant una tinció immunohistoquímica per vWf i angiografies. El tractament amb l'inhibidor va disminuir de manera significativa la densitat vascular hepàtica, així com la dels altres territoris vasculars analitzats com la zona esplàcnica o l'intestí prim (figura 5B, article 4).

### 6. El tractament de rates cirròtiques amb Sunitinib disminueix l'infiltrat inflamatori associat a la neovasculatura hepàtica.

Per tal d'analitzar l'efecte de Sunitinib sobre l'infiltrat cel·lular associat a la neovasculatura hepàtica, es van dur a terme experiments de dobles immunofluorescències per macròfags (CD11b), limfòcits (CD3) i vasos sanguinis (vWf). El resultat va mostrar que els fetges de rates cirròtiques tractades amb l'inhibidor presentaven una disminució significativa tant del número de macròfags com de limfòcits associats a la neovasculatura hepàtica (figura 6, article 4).

### 7. El tractament amb Sunitinib disminueix la fibrosi hepàtica i la pressió portal en rates cirròtiques.

Donat que Sunitinib és un inhibidor del receptor de PDGF, es va analitzar l'efecte de l'inhibidor sobre els següents paràmetres: activació de les CHEs mitjançant una tinció per  $\alpha$ -SMA, el contingut de col·lagen hepàtic per una tinció de tricròmic de Mason i els paràmetres hemodinàmics de PP i PAM. Es va observar que Sunitinib va disminuir el número de cèl·lules positives per  $\alpha$ -SMA, que es un paràmetre associat a l'activació de les CHEs (figura 7A i 7B, article 4). En concordància amb aquestes dades, el tractament amb Sunitinib va disminuir significativament la formació de ECM de col·lagen (figura 7C, article 4). Aquests resultats van ser confirmats per experiments de microarrays, on es va observar que el tractament amb Sunitinib s'associava a una disminució significativa de l'expressió de gens implicats en l'activació de les CHEs i en la formació de ECM com  $\alpha$ -SMA i diferents tipus de col·lagens, entre altres (taula suplementària 1, article 4). Tenint en compte aquest efecte antifibrogènic de Sunitinib, a continuació es va analitzar el seu possible efecte sobre els paràmetres hemodinàmics hepàtics mesurant la PP en rates cirròtiques tractades amb vehicle i rates cirròtiques



tractades amb Sunitinib. Cal destacar que el tractament amb Sunitinib va disminuir significativament la pressió portal en rates cirròtiques (figura 7D, article 4).

8. Sunitinib inhibeix l'activació de Erk-1/2, Akt i la viabilitat cel·lular induïda per PDGF en CHes humanes activades:

Per tal de profunditzar en els mecanismes antifibrogènics de Sunitinib, es va analitzar l'efecte d'aquest inhibidor sobre la senyalització intracel·lular i la viabilitat de CHes humanes activades utilitzant la línia cel·lular LX2. El resultat va mostrar que el tractament de les cèl·lules amb PDGF està associat a l'activació d'ERK i d'Akt als diferents temps analitzats. El tractament amb Sunitinib va inhibir l'activació d'aquestes dues cascades de senyalització dependents del receptor de PDGF (figura 7E, article 4). Per altra banda, es va analitzar l'efecte de l'inhibidor sobre la viabilitat cel·lular de les LX2 mitjançant un assaig de MTT en resposta a l'estimulació amb PDGF. Els experiments van mostrar que el tractament amb l'inhibidor va disminuir de manera significativa l'increment de viabilitat cel·lular induït per PDGF (figura 7F, article 4).



# Antiangiogenic Treatment with Sunitinib Ameliorates Inflammatory Infiltrate, Fibrosis, and Portal Pressure in Cirrhotic Rats

Sònia Tugues,<sup>1</sup> Guillermo Fernandez-Varo,<sup>1</sup> Javier Muñoz-Luque,<sup>1</sup> Josefa Ros,<sup>1</sup> Vicente Arroyo,<sup>2</sup> Juan Rodés,<sup>2</sup> Scott L. Friedman,<sup>3</sup> Peter Carmeliet,<sup>4,5</sup> Wladimiro Jiménez,<sup>1</sup> and Manuel Morales-Ruiz<sup>1</sup>

Liver cirrhosis is a very complex disease in which several pathological processes such as inflammation, fibrosis, and pathological angiogenesis are closely integrated. We hypothesized that treatment with pharmacological agents with multiple mechanisms of action will produce superior results to those achieved by only targeting individual mechanisms. This study thus evaluates the therapeutic use of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor Sunitinib (SU11248). The *in vitro* effects of SU11248 were evaluated in the human hepatic stellate cell line LX-2 by measuring cell viability. The *in vivo* effects of SU11248 treatment were monitored in the livers of cirrhotic rats by measuring angiogenesis, inflammatory infiltrate, fibrosis,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) accumulation, differential gene expression by microarrays, and portal pressure. Cirrhosis progression was associated with a significant enhancement of vascular density and expression of vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and placental growth factor in cirrhotic livers. The newly formed hepatic vasculature expressed vascular cellular adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. Interestingly, the expression of these adhesion molecules was adjacent to areas of local inflammatory infiltration. SU11248 treatment resulted in a significant decrease in hepatic vascular density, inflammatory infiltrate,  $\alpha$ -SMA abundance, LX-2 viability, collagen expression, and portal pressure. **Conclusion:** These results suggest that multitargeted therapies against angiogenesis, inflammation, and fibrosis merit consideration in the treatment of cirrhosis. (HEPATOLOGY 2007;46:1919-1926.)

Abbreviations: ang-1, angiopoietin-1; ang-2, angiopoietin-2; FITC, fluorescein isothiocyanate; HSC, hepatic stellate cell; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; SU11248, Sunitinib; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

From the <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Liver Unit-Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Ciberehd, Spain; the <sup>3</sup>Division of Liver Diseases, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY; and the <sup>4</sup>Department for Transgene Technology and Gene Therapy and <sup>5</sup>The Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Leuven, Belgium.

Received March 8, 2007; accepted July 9, 2007.

Supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia Plan Nacional de I+D+I (SAF2007-63069 to M.M.-R., SAF2006-07053 to W. J.), the National Institutes of Health (DK56621 to S. L. F.), and Ministerio de Sanidad y Consumo (PI041198 to M.M.-R.; and CC02/03 and PI041198 to M.M.-R.).

Address reprint requests to: Manuel Morales-Ruiz, Ph.D., Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Villarreal 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: morales@clinic.ub.es; fax: (34) 93-2275697.

Copyright © 2007 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21921

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Supplementary material for this article can be found on the HEPATOLOGY website (<http://interscience.wiley.com/jpages/0270-9139/suppmat/index.html>).

According to reports of the World Health Organization, cirrhosis is one of the leading causes of mortality worldwide and a shortened life expectancy despite recent therapeutic advances. Cirrhosis is characterized by the presence of a hepatic inflammatory infiltrate that occurs early in the history of the disease, prior to the onset of significant clinical manifestations; it becomes chronic during the evolution of the illness, particularly in chronic viral hepatitis.<sup>1</sup> This dynamic inflammatory state is believed to contribute to the progression of liver fibrogenesis and cirrhosis.<sup>2</sup>

Angiogenesis is of major importance during adult tissue repair<sup>3</sup> and is also a hallmark of inflammatory processes where both phenomena are closely integrated. For instance, many inflammatory mediators have direct angiogenic activities, and may also indirectly stimulate other cells to produce angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF)-A.<sup>4</sup> Angiogenesis, in turn, contributes to the perpetuation and the amplification of the inflammatory state due to the expression of adhesion molecules and chemokines in the neovasculature, which promote the recruitment of inflammatory cells. The in-

flammatory response can also be accentuated by new vessels acting as transporters of nutrients to the site of inflammation and tissue remodeling.<sup>5</sup> In this context, there is considerable evidence suggesting that during early inflammatory states, angiogenesis may contribute to the transition from acute to chronic inflammation.

The existence of important angiogenic processes in cirrhotic liver is widely accepted. For instance, in cirrhotic livers, scar tissue is surrounded by a dense vasculature.<sup>6</sup> Additionally, neovascularization is significantly increased during the development of liver fibrosis in both human and animal studies.<sup>7</sup> In light of these observations, and considering that chronic inflammation and angiogenesis are associated in many disorders, this link could also be exploited therapeutically in cirrhosis to modulate chronic inflammation.

An interesting therapeutic candidate to be used as an inhibitor of angiogenesis in cirrhosis is Sunitinib (SU11248). This indolinone molecule was designed to have a broad selectivity for the split kinase family of receptor tyrosine kinases, including KIT and FLT3,<sup>8</sup> and has efficacy as a potent antitumor and antiangiogenic agent in clinical trials for treatment of cancer.<sup>9,10</sup> Its antiangiogenic efficacy is attributable to inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), both of which are essential for angiogenesis development.<sup>11</sup> Apart from angiogenesis, the inhibition of PDGFR has an additional therapeutic capability, because PDGF is among the most potent mitogenic and chemotactic agents for hepatic stellate cells (HSCs).<sup>12</sup> These cells, which rapidly induce the receptor  $\beta$  subunit (PDGFR- $\beta$ ) when they are activated,<sup>13</sup> play a key role in the development and progression of hepatic fibrosis.

We hypothesized that SU11248 treatment may have multiple mechanisms of action against cirrhosis progression. Therefore, we tested its efficacy in culture and in an animal model of cirrhosis.

## Materials and Methods

**Animals and Treatment.** The study was performed in male adult Wistar rats according to the criteria of the Investigation and Ethics Committees of the Hospital Clínic. Cirrhosis was induced by inhalation of CCl<sub>4</sub> as described previously.<sup>14</sup> For the *in vivo* study, 10 cirrhotic rats were treated daily with 40 mg/kg of SU11248 (Pfizer, Inc., NY) via oral administration for 1 week. In parallel, another group of 10 cirrhotic rats received a daily intragastric administration of citrate-buffered solution (pH 3.5) as a control.

**Fluorescein Isothiocyanate–Dextran Angiography, Histology, Immunohistochemistry, and Immunofluorescence.** See online expanded Experimental Procedures.

**Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction and GeneChip Hybridization.** Total RNA was extracted from the frozen liver with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, MD). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). Then, complementary DNA samples were amplified for 30–35 cycles (94°C for 30 seconds, 55–60°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute). Specific primers used for complementary DNA amplification were: placental growth factor, 5'-GTCGCTGTAGTGGCTGCTGTGGTG-3' (forward primer) and 5'-TGTGGGGTTTTGCTTTGCTTCCTC-3' (reverse primer); and HPRT, 5'-GGG-GCTATAAGTTCTTTGCTGAC-3' (forward primer) and 5'-CATTTTGGGGCTGTACTGCTTGAC-3' (reverse primer).

RNA from livers of 4 nontreated cirrhotic rats and 4 SU11248-treated cirrhotic rats was hybridized to 8 high-density oligonucleotide microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) as described previously.<sup>14</sup> Microarray results have been deposited in the Gene Expression Omnibus MIAME-compliant database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession number: GSE6929).

**Cell Culture and Western Blotting.** Human umbilical vein endothelial cells were isolated and cultured as described previously.<sup>15</sup> The LX-2 cell line, which is derived from normal primary human HSCs that have been immortalized by selection in low serum, were maintained as described previously. These cells expressed markers of activated HSCs and presented a similar phenotype to that of activated HSCs *in vivo*.<sup>16</sup>

Serum-starved cells were incubated with or without 1  $\mu$ M SU11248, 100 ng/mL human VEGF-A, 200 ng/mL human angiopoietin-1, and 20 ng/mL PDGF-BB (R&D Systems, Minneapolis, MN). Then, cell lysates were prepared in lysis buffer and Western blotting was performed using anti-Erk-1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK), anti-phospho-Erk-1/2 (Thr202/Tyr204) MAPK, anti-Akt, and anti-phospho-Akt (Ser473)-specific antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) as described previously.<sup>17</sup>

**Cell Viability Assay.** For the quantification of cell viability, we performed the MTT assay using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide reagent (Sigma Chemical, St. Louis, MO). (See also online expanded Experimental Procedures available at <http://interscience.wiley.com/jpages/0270-9139/suppmat/index.html>.)

**Hemodynamic Measurements.** Animals were anesthetized with inactine (0.5 mL/kg) and prepared for mea-

surement of hemodynamic parameters as described previously.<sup>17</sup> Mean arterial pressure and portal pressure were continuously recorded in a multichannel system (MX4P and MT4; Lectromed, Ltd., Jersey, Channel Islands, UK).

**Statistical Analysis.** Statistical differences were analyzed via Student *t* test. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. Gene expression analysis was performed using libraries from the Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org>) rooted in the computing environment R (see also online expanded Experimental Procedures).

## Results

**Vascular Proliferation During Cirrhosis Progression.** Vascular proliferation was investigated via immunolabeling using the anti-vWF antibody and by fluorescein angiography. In cirrhotic livers, vWF-labeled vessels were nearly 10 times more prevalent than in control rats (Fig. 1A, panels b and a, respectively; Fig. 1C). Similarly, fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran angiography revealed significant growth of a disorganized vascular network in cirrhotic livers that was associated

with the absence of normal lobular drainage through the central vein (Fig. 1A, panels d and c, respectively). Vascular growth was much more pronounced as cirrhosis progressed (data not shown). Next, vascular changes were also analyzed in other splanchnic beds, including the mesenteric region (Fig. 1B, panels e and f) and the tissue adjacent to the hepatic hilum (Fig. 1B, panels g and h). vWF immunolabeling showed an increase in the number of mesenteric vessels in cirrhotic rats (Fig. 1B, panels e and f; Fig. 1D). These results were corroborated by FITC-dextran angiographies (Fig. 1B, panels g and h).

**Induction of Angiogenic Factors in Cirrhotic Livers.** Liver tissue was processed from control and cirrhotic rats at 8-12 weeks (early cirrhosis) and 17-20 weeks (advanced cirrhosis), respectively, after the beginning of CCl<sub>4</sub> treatment. All cirrhotic animals included in the second group had well-developed cirrhosis and ascites. There was a marked increase in the abundance of VEGF-A, angiopoietin-1 (ang-1), angiopoietin-2 (ang-2), and placental growth factor in cirrhotic livers compared with controls. The expression of these growth factors was higher in cirrhotic rats with ascites than in those without ascites (Fig. 2A).

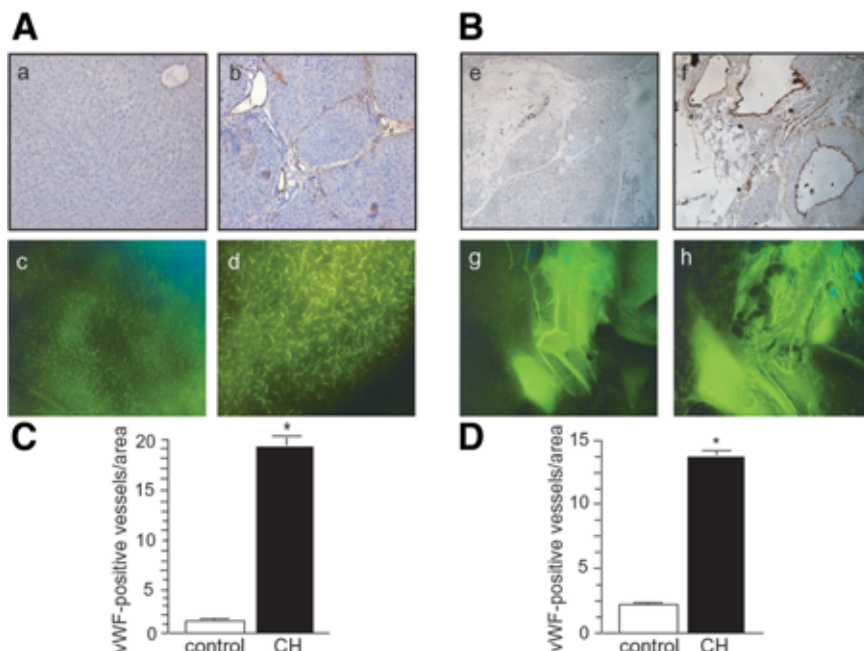


Fig. 1. Increased hepatic and splanchnic neovascularization in cirrhotic rats. (A) Hepatic vasculature was analyzed by immunostaining of paraffin liver sections with anti-vWF antibodies (panels A and B; original magnification  $\times 100$ ) and by FITC-dextran angiography (panels C and D). Cirrhotic livers (panels B and D) exhibited an increased number of microvessels compared with control livers (panels A and C). The histogram in (C) shows the number of vWF-stained vessels quantified in control and cirrhotic livers ( $n = 10$  for each group). Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean.  $*P < 0.001$  compared with control rats. (B) Splanchnic vasculature was visualized with anti-vWF antibodies (panels e and f; original magnification  $\times 100$ ) and by performing FITC-dextran angiographies (panels g and h). Cirrhotic rats (CH), (panels F and H) had a significant vascular proliferation in both the mesenteric area (panel F) and in the proximity of the hepatic hilum area (panel h) compared with control rats (CT), (panels E and G). (D) Histogram shows the number of vWF-stained vessels quantified in the mesenteric tissue of control and cirrhotic rats ( $n = 10$  for each group). Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean.  $*P < 0.001$  compared with control rats.



Because the expression of VEGF-A and ang-2 is activated by hypoxia, we next investigated whether the distribution of these proteins may be attributable to hypoxic conditions. Immunohistochemistry for pimonidazole protein adducts has been used as a tissue marker of hypoxia.<sup>18</sup> As shown in Figure 2A, pimonidazole staining was not detected in control livers. In contrast, the distribution of pimonidazole adducts displayed a similar pattern to that of VEGF-A and ang-2 expression in cirrhotic livers.

**Cellular Infiltration and Correlation with the Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the Vasculature of Cirrhotic Livers.** As shown in Fig. 3, CD11b-positive and CD3-positive cells were barely detected in livers of control rats. In contrast, a significant increase in CD11b and CD3 immunoreactivity was detected in cirrhotic livers. This increase in inflammatory infiltrate density was mainly localized in portal tracts and fibrous septa close to the newly formed vasculature. Next, the expression of

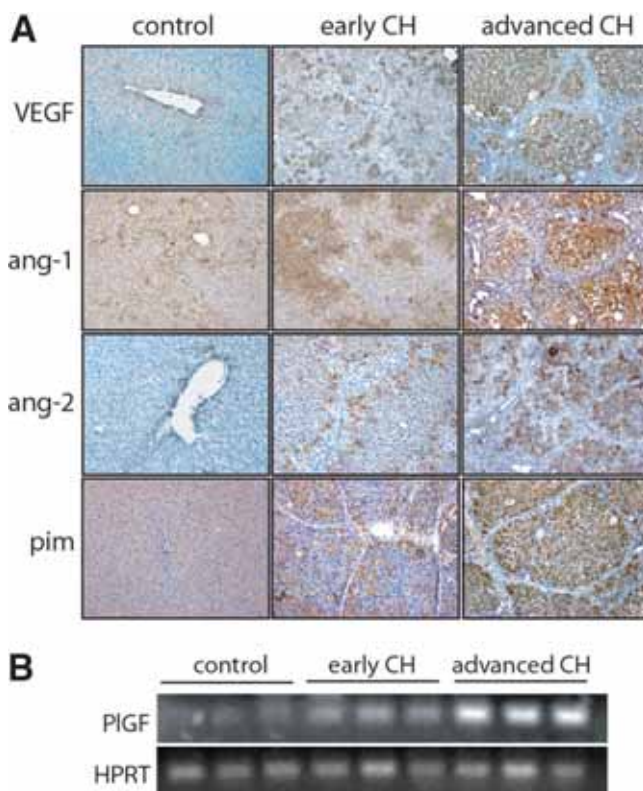


Fig. 2. Hepatic expression of angiogenic growth factors and colocalization with hypoxic tissue during cirrhosis progression. (A) Immunostaining profile is shown for VEGF-A, ang-1, ang-2, and pimonidazole (pim) adducts in livers of control rats ( $n = 10$ ), cirrhotic rats with early cirrhosis (early CH,  $n = 10$ ), and cirrhotic rats with advanced cirrhosis (advanced CH,  $n = 10$ ). In all panels, the brown color indicates positive immunostaining. (Original magnification  $\times 100$ .) (B) Levels of messenger RNA encoding placental growth factor were evaluated via reverse-transcription polymerase chain reaction using total liver RNA isolated from control rats, cirrhotic rats with early cirrhosis, and cirrhotic rats with advanced cirrhosis. Amplification of HPRT was used as a housekeeping control.

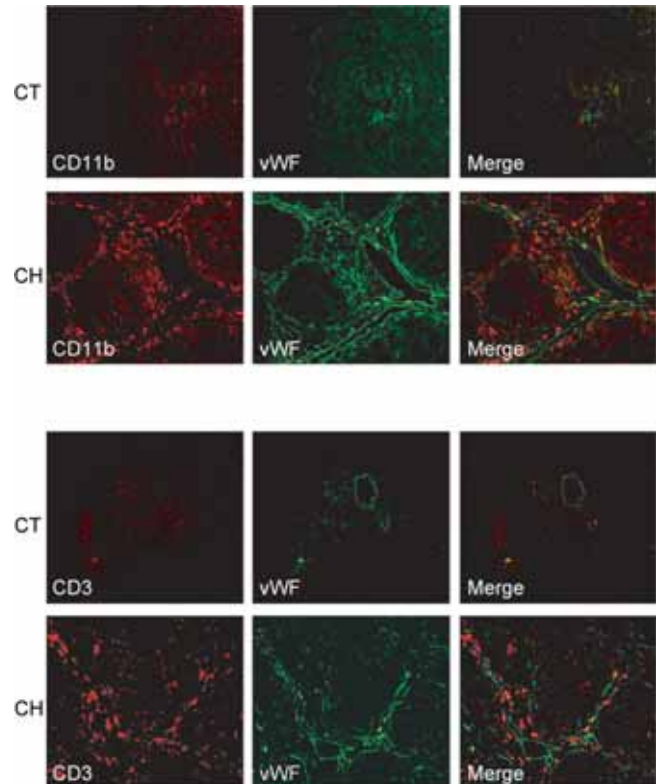


Fig. 3. Immunofluorescent localization of CD11b-positive, CD3-positive, and vWF-positive cells in cirrhotic livers. CD11b (red), CD3 (red), and vWF (green) immunofluorescent staining in control (CT) and cirrhotic livers (CH) was performed using specific antibodies. In cirrhotic livers, staining with CD11b and CD3 revealed a significant increase in areas of inflammatory infiltrate that were adjacent to the neovasculature without significant colocalization with the vWF vascular marker. (Original magnification  $\times 100$ .)

VCAM-1 and ICAM-1 cell adhesion molecules in these newly formed blood vessels was examined with VCAM-1/ICAM-1 and vWF immunofluorescent staining (Fig. 4). VCAM-1 was weakly expressed in the sinusoidal lining cells of control livers and did not colocalize with blood vessels. In contrast, VCAM-1 immunostaining in cirrhotic livers was stronger and colocalized well with the neovasculature (yellow color in the merge panels). Similar to VCAM-1, a weak constitutive ICAM-1 expression was present in the hepatic sinusoid of control animals. In contrast, portal tracts and sinusoids of cirrhotic livers displayed a strong ICAM-1 immunoreactivity that colocalized with vWF immunostaining (yellow color in the merge panels).

**SU11248 Inhibits VEGF-A and Ang-1-Dependent Activation of Erk-1/2 In Vitro and Angiogenesis In Vivo.** The activity of SU11248 against VEGFR and Tie2 receptors was evaluated *in vitro*. Stimulation of human umbilical vein endothelial cells with VEGF-A and ang-1 induced time-dependent activation of Erk-1/2 MAPK. This effect was inhibited by preincubation of human um-

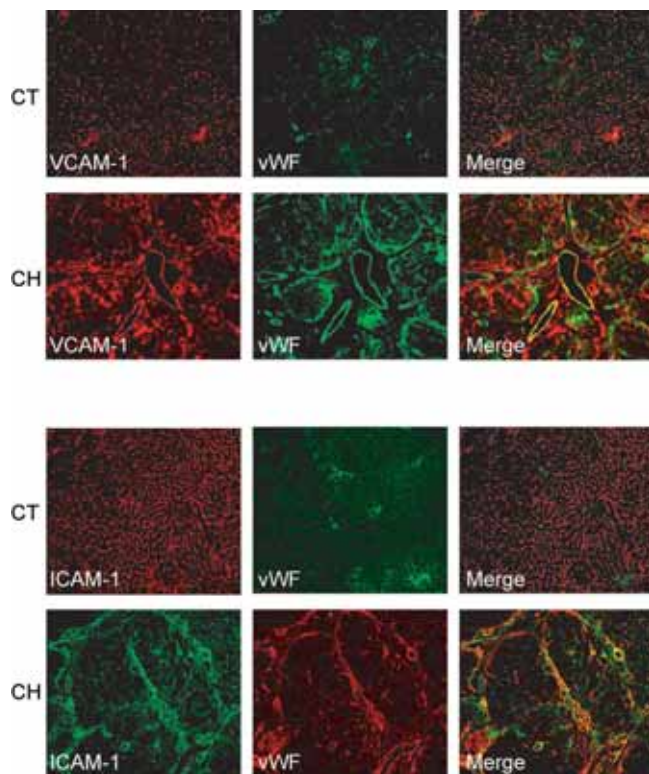


Fig. 4. Immunofluorescent localization of VCAM-1-positive, ICAM-1-positive, and vWF-positive cells in cirrhotic livers. VCAM-1, ICAM-1, and vWF immunofluorescent staining in control (CT) and cirrhotic livers (CH) was performed using specific antibodies. In cirrhotic livers, the extent of VCAM-1 and ICAM-1 staining was greater than in control animals and was mainly expressed in the newly formed blood vessels as visualized by colocalization with the vWF marker in the merge panels (yellow). FITC-conjugated secondary antibody was used for vWF detection—except for the ICAM-1 and vWF combination in cirrhosis, where Cy3-conjugated secondary antibody was used for vWF immunofluorescent detection instead. (Original magnification  $\times 100$ .)

bilical vein endothelial cells with  $1 \mu\text{M}$  SU11248 (Fig. 5A).

Next, the antiangiogenic activity of SU11248 was evaluated *in vivo* via immunostaining with an anti-vWF antibody and via FITC-dextran angiography. As shown in Fig. 5B, cirrhotic rats treated with SU11248 (panel b) exhibited a significant reduction ( $P < 0.001$ ) in hepatic vascularization compared with cirrhotic rats treated with vehicle (panel a) ( $5.1 \pm 0.2$  vessels/field versus  $16.4 \pm 0.4$  vessels/field, respectively). This decrease in hepatic vascular density was also observed on FITC-dextran angiography (panels c and d). Similarly, the number of secondary vessel branches quantified in the small intestine was significantly lower ( $P < 0.001$ ) in SU11248-treated cirrhotic animals (panel f) than in cirrhotic rats treated with vehicle (panel e) ( $2.8 \pm 0.2$  vessels/field versus  $20.2 \pm 1.7$  vessels/field, respectively). No tertiary vessel branches were detected in the bowel of SU11248-treated animals compared with the significant number of tertiary

branches detected in vehicle-treated cirrhotic animals. Furthermore, SU11248 treatment was also associated with a significant decrease in vessel density in the tissue adjacent to the portal vein (data not shown). These results demonstrated that the treatment of cirrhotic rats with SU11248 effectively inhibits angiogenesis in all of the tissues examined.

**SU11248 Treatment Decreases Inflammatory Infiltrate in Cirrhotic Livers.** In agreement with Fig. 3, portal tracts of cirrhotic livers displayed a strong immunoreactivity for anti-CD11b and anti-CD3 antibodies (Fig. 6, panels a and c, respectively) that was adjacent to

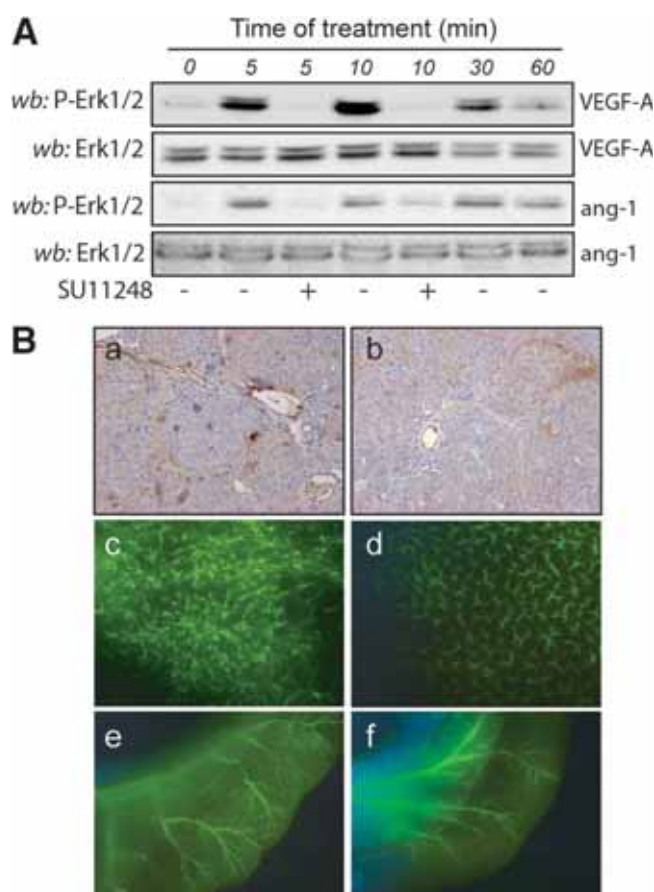


Fig. 5. *In vitro* and *in vivo* efficacy of SU11248 treatment. (A) Human umbilical vein endothelial cells were preincubated with or without SU11248 ( $1 \mu\text{M}$ ) and then stimulated with VEGF-A or ang-1 for different time points. Lysates ( $40 \mu\text{g}$  of proteins) were analyzed via Western blotting (wb) with the specific antibodies anti-phospho-Erk-1/2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> or anti-Erk-1/2, ( $n = 4$ ). (B) Hepatic vasculature of cirrhotic rats was analyzed via immunostaining with anti-vWF antibodies (panels a and b; original magnification  $\times 100$ ) and FITC-dextran angiography (panels c and d). As detected using both techniques, SU11248 treatment [panels b and d ( $n = 10$ )] was associated with a significant decrease in the number of hepatic microvessels compared with nontreated cirrhotic rats [panels a and c ( $n = 10$ )]. This inhibitory effect of SU11248 was also evident in the small intestines of cirrhotic rats treated chronically with SU11248 (panel f), compared with cirrhotic animals that received vehicle (panel e).



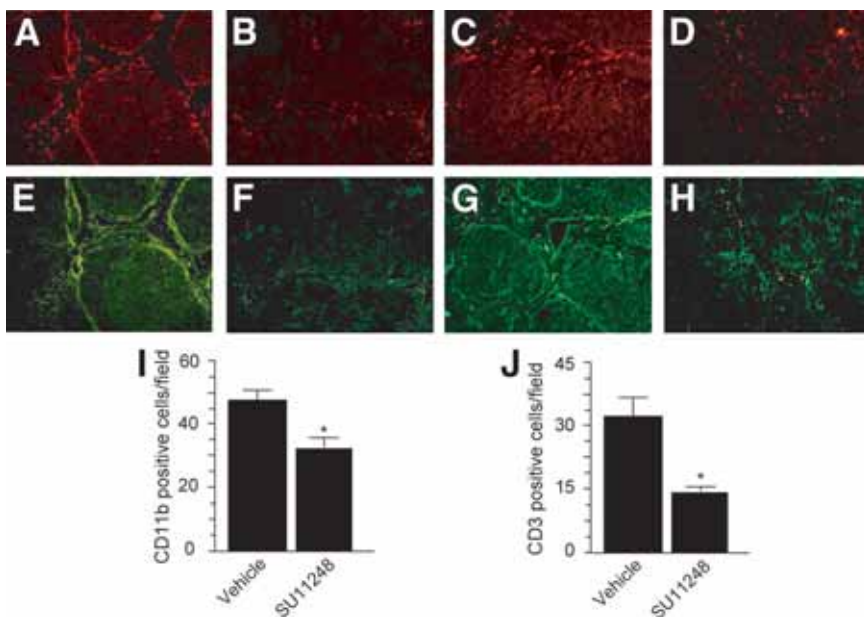


Fig. 6. SU11248 treatment decreased inflammatory infiltrate in cirrhotic livers. (A,B) CD11b, (C,D) CD3, and (E-H) vWF immunofluorescent staining in (A,C,E,G) nontreated cirrhotic animals ( $n = 10$ ) and (B,D,F,H) cirrhotic rats treated with SU11248 ( $n = 10$ ) was performed using specific antibodies. (Original magnification  $\times 100$ .) (I,J) The inflammatory infiltrate of macrophages (CD11b-positive cells) and lymphocytes (CD3-positive cells) was quantitatively measured as described in Experimental Procedures. Each column represents the mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $P < 0.01$  compared with cirrhotic rats not treated with SU11248.

vWF-positive areas (Fig. 6, panels e and g). After inhibition of angiogenesis by SU11248, a significant reduction in macrophages and lymphocyte infiltrate was detected in cirrhotic livers (Fig. 6, panels b and d and histograms i and j, respectively) which correlated well with the diminution of the vasculature detected in portal areas (Fig. 6, panels f and h). Similar results were obtained by quantifying CD68-positive cells as a measure of macrophage cell infiltration in cirrhotic livers (Supplementary Fig. 1).

**Effect of SU11248 Treatment on HSC Activation, Fibrosis, and Portal Pressure.** Immunostaining demonstrated that many  $\alpha$ -SMA-positive cells accumulated along the fibrous septa (Fig. 7A, panel a). Treatment with SU11248 drastically reduced the number of positive cells in cirrhotic livers as shown via immunohistochemistry and computer-assisted quantification (Fig. 7A, panel b; Fig. 7B). Next, liver fibrosis was assessed using Masson's trichrome stain. As expected, strong collagen staining was seen around the portal tracks and fibrotic septa in livers of cirrhotic rats (Fig. 7A, panel c). Importantly, cirrhotic rats treated with SU11248 showed a significant 30% decrease in hepatic collagen accumulation (Fig. 7A, panel d; Fig. 7C).

Next, the transcriptional modifications induced by SU11248 in cirrhotic livers were investigated. Gene expression was analyzed on high-density oligonucleotide microarrays. In agreement with Fig. 7A-C, SU11248 treatment induced a significant down-regulation of genes mainly related to HSC activation and extracellular matrix formation such as  $\alpha$ -SMA, Col4 $\alpha$ 1, Col1 $\alpha$ 2, Col5 $\alpha$ 2, and Col1 $\alpha$ 1 (Supplementary Table 1).

The hemodynamic effect of SU11248 was evaluated through the measurement of mean arterial pressure and

portal pressure in cirrhotic rats. As expected, cirrhotic rats had hypotension, a characteristic feature of cirrhosis (107 mm Hg). However, treatment with SU11248 did not modify mean arterial pressure (data not shown). In contrast, the SU11248-treated group exhibited a significant 40% decrease in portal pressure compared with nontreated cirrhotic rats (Fig. 7D).

To test the inhibitory effect of SU11248 treatment on PDGFR activation, we treated serum-starved LX-2 cells with PDGF-BB (20 ng/mL) for 0 to 30 minutes in the presence or absence of 1  $\mu$ M SU11248. PDGFR- $\beta$  activity was assessed by measuring activation-specific phosphorylation of Erk-1/2 MAPK and Akt via immunoblotting. As seen in Fig. 7E, PDGF-BB treatment markedly increased Erk-1/2 MAPK and Akt phosphorylation, which were detectable at the earliest time point examined (5 minutes). SU11248 inhibited Erk-1/2 MAPK and Akt activation at all time points examined.

We next determined the effect of SU11248 on PDGF-stimulated LX-2 viability. Cells were supplemented with PDGF-BB (20 ng/mL) in the presence or absence of SU11248 for 48 hours. Cell viability was then determined by measuring MTT reduction. As shown in Fig. 7F, incubation with 20 ng/mL PDGF-BB resulted in a significant increase in LX-2 viability compared with the control condition. In contrast, LX-2 cell viability was reduced significantly after 48 hours of incubation with SU11248. These results suggest that the inhibitory effect of SU11248 on PDGFR activity may contribute to the antifibrotic effect observed in cirrhotic livers after SU11248 treatment.



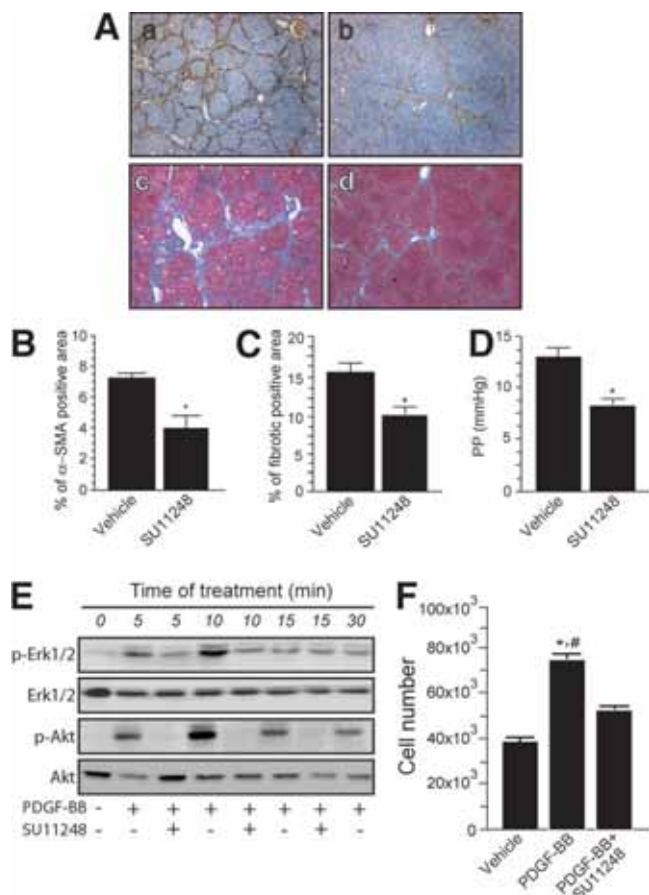


Fig. 7. Cirrhotic rats treated with SU11248 showed a significant decrease in HSC activation, extracellular matrix accumulation, and portal pressure. (A) Liver sections from cirrhotic rats were immunostained for  $\alpha$ -SMA. Abundant  $\alpha$ -SMA staining (brown) indicated the presence of activated HSCs in cirrhosis [panel a (n = 10)]. In SU11248-treated cirrhotic rats, the number of  $\alpha$ -SMA positive cells was reduced significantly [panel b (n = 10)]. (Original magnification  $\times 40$ .) In addition, liver sections from cirrhotic rats were stained with Masson's trichrome stain. Abundant collagen deposition (blue) indicates the presence of liver fibrosis [panel c (n = 10)]. In SU11248-treated cirrhotic rats, collagen deposition was significantly reduced [panel d (n = 10)]. (Original magnification  $\times 40$ .) (B,C)  $\alpha$ -SMA and fibrotic positive areas were quantitatively measured as described in Experimental Procedures. (D) Portal pressure was measured in nontreated and SU11248-treated cirrhotic rats as described. SU11248 significantly decreased portal pressure in cirrhotic rats (n = 10). \* $P < 0.01$  compared with cirrhotic rats not treated with SU11248. (E) LX-2 cells were preincubated with or without SU11248 (1  $\mu$ M) and then stimulated with 20 ng/mL PDGF-BB for different time points. Lysates (40  $\mu$ g of proteins) were analyzed via Western blotting with antibodies anti-phospho-Erk-1/2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, anti-Erk-1/2, anti-phospho-Akt-Ser<sup>473</sup>, or anti-Akt (n = 3). (F) LX-2 cell viability was determined by measuring MTT reduction. Cells were incubated for 48 hours with PDGF-BB in the absence or presence of 1  $\mu$ M SU11248. Each column represents the mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $P < 0.01$  compared with vehicle. # $P < 0.01$  compared with PDGF-BB treatment (n = 3).

## Discussion

This study revealed that cirrhosis is accompanied not only by splanchnic vessel growth but also by extensive

hepatic angiogenesis. Additionally, newly formed hepatic vasculature expressed VCAM-1 and ICAM-1. The nature of the inflammatory response is regulated by the induction of adhesion molecules in endothelial cells, which is a necessary event in the recruitment of inflammatory cells to sites of inflammation. Among these adhesion molecules, VCAM-1 and ICAM-1 appear to play a major role in the adhesion and transmigration of macrophages and lymphocytes across endothelial cells in a variety of acute and chronic inflammatory diseases.<sup>19,20</sup> Double immunohistochemical staining demonstrated that VCAM-1 and ICAM-1 expression in the hepatic vasculature was adjacent to areas of local inflammatory infiltrate. Interestingly, hepatic vascular density as well as VCAM-1 and ICAM-1 endothelial expression were higher as cirrhosis progressed. In this scenario, we hypothesized that liver endothelial cells are activated to form new vessels and to express adhesion molecules. Circulating cells are then attracted to the activated vasculature, where they adhere to and migrate into the liver parenchyma.

VEGF-A and the angiopoietin families of growth factors are essential for vascular growth.<sup>21,22</sup> We found a significant correlation between placental growth factor, VEGF-A, ang-1, and ang-2 expression and vascular density during cirrhosis progression. Several studies have shown that these angiogenic factors are up-regulated by cytokines and chemokines that are released by leukocytes and damaged hepatocytes.<sup>23</sup> These observations suggest that initially, proinflammatory cytokines may contribute to the up-regulation of these growth factors. Because tissue hypoxia often occurs in inflamed tissue after extensive fibrosis,<sup>24</sup> the colocalization of VEGF-A and ang-2 with hypoxic areas was assessed. Our findings showed a clear colocalization between VEGF-A/ang-2 overexpression and hypoxia, in agreement with earlier studies.<sup>25</sup>

Linkage of angiogenesis to inflammatory infiltrate in cirrhotic livers suggests that angiogenesis inhibitors may interfere with progression of the disease. In fact, studies in experimental models of cirrhosis have shown that angiogenic inhibitors such as TNP-470 and neutralizing monoclonal antibodies anti-VEGFR1 or anti-VEGFR2 can effectively decrease liver fibrosis.<sup>26,27</sup> Consistent with these reports, we have also demonstrated that cirrhotic rats treated with SU11248 showed a significant decrease in hepatic fibrosis. However, our study extends these findings in several significant ways. First, SU11248 treatment decreases inflammatory infiltrate in cirrhotic livers (Fig. 6). This beneficial effect of SU11248 is likely due to the decrease in the number of hepatic vessels expressing VCAM-1 and ICAM-1. Second, SU11248 treatment significantly decreased portal pressure in cirrhotic rats (Fig. 7D), which may be ascribed to several mechanisms. First,

considerable evidence has demonstrated that HSCs are the primary source of extracellular matrix accumulation in livers, and PDGFR signaling is known to have a major role in this process. Therefore, it is likely that SU11248 decreased  $\alpha$ -SMA and extracellular matrix accumulation in cirrhotic livers through the inhibition of the PDGF signaling pathway in HSCs. This hypothesis is supported by the results obtained with the LX-2 cell line where we demonstrated that the PDGF-BB-dependent increase in cell viability was reduced significantly after SU11248 treatment (Fig. 7F).

The increase in portal blood flow is another important component contributing to portal hypertension. There is significant evidence suggesting that the increase in portal blood flow is due not only to splanchnic vasodilation but also to an enlargement of the splanchnic vascular tree caused by angiogenesis.<sup>7,28,29</sup> Therefore, we anticipated that the significant inhibition of angiogenesis promoted by SU11248 in this anatomic region might translate into a significant decrease in portal blood flow.

In conclusion, this study demonstrates that therapies with several molecular targets against angiogenesis, inflammation, and fibrosis might be beneficial in the treatment of cirrhosis. The advantage of using multitargeted inhibitors such as SU11248 is further supported by the observation that SU5416, which is similar to SU11248 but exclusively targets VEGFRs, failed to modify portal pressure in the experimental model of partial portal vein ligation.<sup>30</sup> This discrepancy may be explained by the lack of specificity of SU5416 for targeting PDGFR compared with the multitargeting capability of SU11248.

*Acknowledgment:* SU11248 was generously supplied by Pfizer Inc.

## References

- Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol* 1998;33:295-302.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-936.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741.
- Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997;11:457-465.
- Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;402:107-137.
- Morales-Ruiz M, Jimenez W. Neovascularization, angiogenesis, and vascular remodeling in portal hypertension. In: Sanyal AJ, Shah VH, eds. *Portal Hypertension: Pathobiology, Evaluation, and Treatment*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005:99-112.
- Smith JK, Mamoon NM, Duhé RJ. Emerging roles of targeted small molecule protein-tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Oncol Res* 2004;14:175-225.
- Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2003;2:471-478.
- Deeks ED, Keating GM. Sunitinib. *Drugs* 2006;66:2255-2266.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97:512-523.
- Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989;84:1786-1793.
- Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest* 1994;94:1563-1569.
- Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, Ros J, Arteta D, Munoz-Luque J, et al. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2005;129:1686-1695.
- Ros J, Leivas A, Jimenez W, Morales M, Bosch-Marce M, Arroyo V, et al. Effect of bacterial lipopolysaccharide on endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *J Hepatol* 1997;26:81-87.
- Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-151.
- Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522-531.
- Arteel GE, Thurman RG, Yates JM, Raleigh JA. Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazole and retrograde perfusion of rat liver. *Br J Cancer* 1995;72:889-895.
- Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;77:487-495.
- Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, Manning AM, Youker K, Lane C, et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993;92:1504-1516.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-693.
- Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect Immun* 2002;70:6294-6301.
- Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:989-996.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-684.
- Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, et al. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semi-synthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *HEPATOLOGY* 2000;32:980-989.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;52:1347-1354.
- Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004;126:886-894.
- Morales-Ruiz M, Tugues S, Cejudo-Martin P, Ros J, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Llama P, et al. Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Hepatol* 2005;43:85-91.
- Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005;43:98-103.

## ***Supplementary Expanded Experimental Procedures***

**Cell Viability assay:** For the quantification of cell viability, we performed the MTT assay using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide reagent (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). LX-2 cells were seeded in 24-well plates, at a cell density of  $3 \times 10^4$  cells/well in complete RPMI-1640 media. Cells were serum-deprived for 24 h and incubated in serum-free media in the presence of 20 ng/ml human PDGF-BB (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) alone or in combination with 1  $\mu$ M SU11248 for 48 h at 37°C. Cell viability was determined by adding 50  $\mu$ l of MTT (5 mg/ml) to each well for 3h. The absorbance was measured spectrophotometrically at 570 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Each condition was performed in sextuplicate and reported as mean  $\pm$  sem. Data were confirmed by at least three independent experiments.

**FITC-Dextran angiography:** Fluorescent microangiography was conducted on control and cirrhotic animals. Briefly, rats were perfused transcardially via the right and left ventricles with phosphate buffered saline (PBS) followed by an injection of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran, MW  $2 \times 10^6$  Da., Sigma, St. Louis, MO). Finally, fluorescence was visualized under a fluorescence stereomicroscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). For blood vessel quantification, the number of secondary and tertiary vessel branches was quantified from six random fields. Values reported represent the mean number of vessel branches  $\pm$  s.e.m.

**Histology, immunohistochemistry and immunofluorescence:** Liver samples were fixed in 10% buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin. Immunolabeling was performed using the following antibodies: rabbit

anti-VEGF-A, goat anti-angiopoietin-1 (ang-1), rabbit anti-angiopoietin-2 (ang-2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-von Willebrand factor (vWF) (Dako, Glostrup, Denmark), mouse anti- $\alpha$ -SMA (Dako, Glostrup, Denmark), and mouse anti-CD68 (Serotec Oxford, UK). Immunolabeled cells were detected with the Dako LSAB2 System, HRP (Dako, Glostrup, Denmark). Collagen deposition was detected by Masson's trichrome staining. For measuring liver hypoxia, pimonidazole (Chemicon international, Temecula, CA) was administered at 60 mg/Kg 1 hour before sacrifice. Pimonidazole adducts were detected in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissues using a mouse primary anti-pimonidazole antibody. Immunoreactivity and liver histology were visualized using a light microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

For immunofluorescence, tissues were fixed with 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight in a 20% sucrose solution, and embedded in OCT. Frozen sections of 8  $\mu$ m were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum, and incubated with mouse anti-ICAM-1, mouse anti-VCAM-1, mouse anti-CD11b, mouse anti-CD3, and rabbit anti-vWf antibodies. Controls without primary antibodies were used as negative controls. Binding sites of the primary antibodies were revealed with Cy3-conjugated goat-anti-mouse IgG and with FITC-conjugated goat-anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Samples were analyzed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

Quantification of vWF-labeled microvessels, CD68, CD11b, and CD3 positive cells was performed in 20 randomly selected fields for each rat and the mean value for the 20 counts was calculated. The degree of blue stained

collagen fibers (detected by Masson's trichrome staining) and  $\alpha$ -SMA staining was analyzed using the Soft Imaging System (GmbH, Münster, Germany). The fraction of positively stained pixels relative to the whole number of pixels was expressed as the percentage of area positive for  $\alpha$ -SMA or collagen staining.

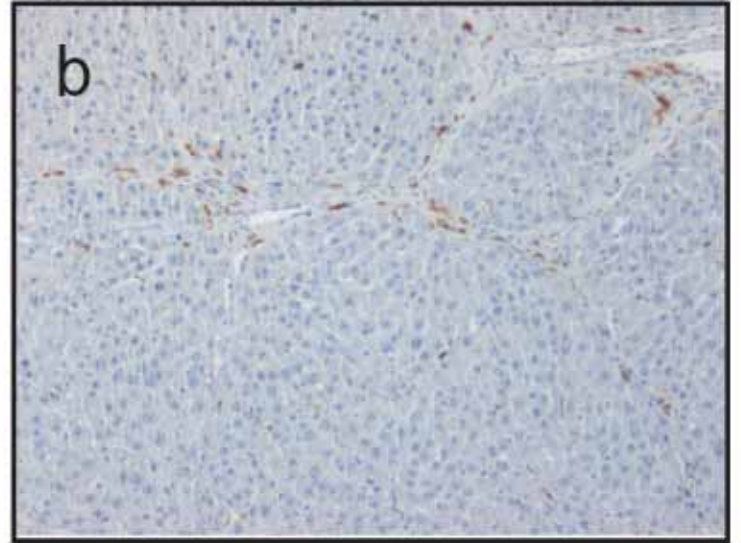
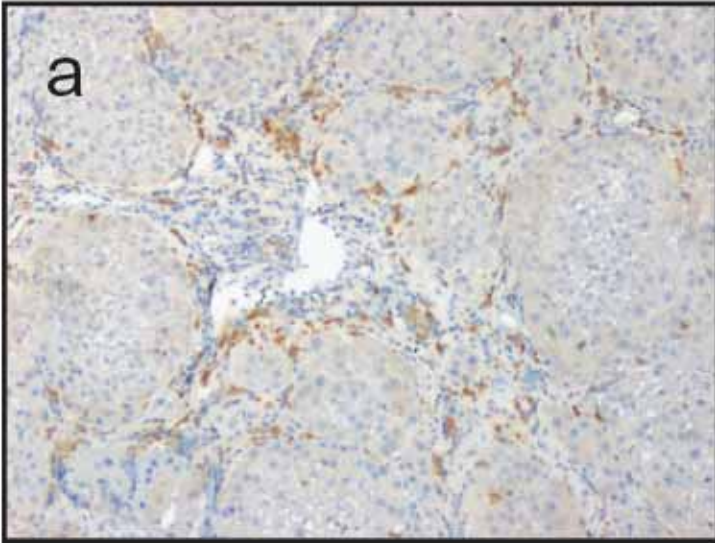
**Gene expression analysis.** Gene expression analysis was performed using libraries from the Bioconductor project (<http://www.bioconductor.org>) rooted in the computing environment R. Briefly, the following steps were performed: i) normalization with robust multi-array analysis (RMA package) (1), ii) gene filtering expression considering only expression levels greater than  $\log(100)$  in at least 25% of the samples and with an interquartile range larger than 0.5 (genefilter package), and iii) analysis of the differentially expressed genes using both Significance Analysis of Microarrays (SAM) (siggenes package) (2) and a moderated  $t$ -statistic calculation (Limma package). Findings were only considered significant for those genes that appeared differentially expressed using both statistical approximations ( $p < 0.05$  for the moderated  $t$ -statistic and a fold discovery rate of 0.32 for SAM). Detection of significantly overrepresented Gene Ontology categories was performed using the GOSTat program (3).

### ***Supplementary References***

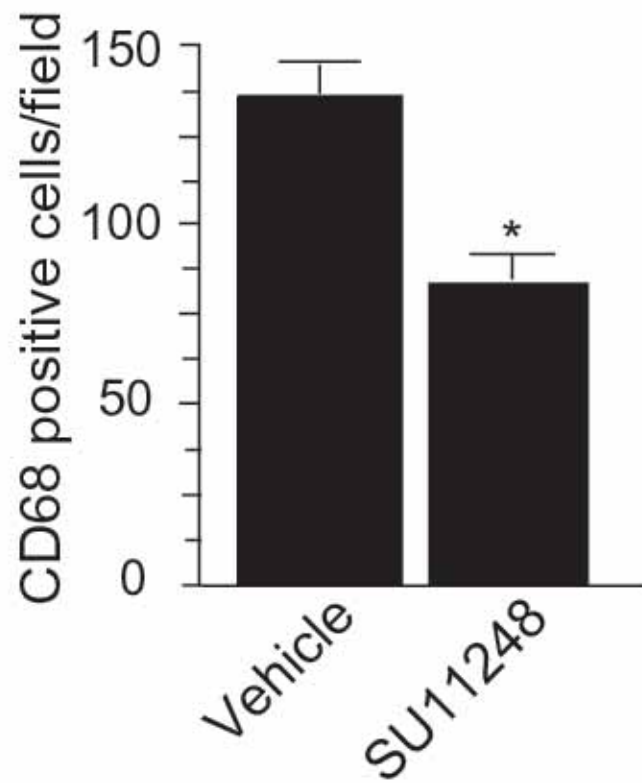
1. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e15.
2. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116-5121.
3. Beissbarth T, Speed TP. GOstat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics* 2004;20:1464-1465.



**A**



**B**



**SUPPLEMENTARY TABLE 1: Genes down-regulated by SU11248 in cirrhotic livers.**

<b>Symbol and gene description</b>	<b>Locus Link</b>	<b>Gene Ontology</b>	<b>p-value</b>
Mcpt10: mast cell protease10	54269	serine-type endopeptidase activity	0.00051022
Mcpt9: mast cell protease 9	54272	serine-type endopeptidase activity	0.0012867
Mcpt2: mast cell peptidase 2	29266	serine-type endopeptidase activity	0.00136627
Cpa3: carboxypeptidase A3	54242	carboxypeptidase A activity	0.00139333
Hba-a1: hemoglobin alpha, adult chain 1	25632	oxygen transporter activity, hemoglobin complex	0.00218189
Hbb: hemoglobin beta chain complex	24440	oxygen transporter activity, hemoglobin complex	0.00245488
Aldh1b1_predicted: aldehyde dehydrogenase 1 family, B1	298079	aldehyde dehydrogenase (NAD) activity	0.00261475
Ccl21b_predicted: chemokine (C-C motif) ligand 21b(serine)	298006	inflammatory response, immune response	0.00543532
Pde10a:phosphodiesterase10A	63885	hydrolase activity,3',5'-cGMP binding	0.00581391
RT1-Ba: RT1class II,locus Ba	309621	MHC class II protein complex	0.00745938
Akap12: A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	83425	signal transduction, protein kinase A binding	0.0079393
Cldn5: claudin 5	65131	tight junction, cell-cell adhesion	0.00824288
Napsa: napsin A aspartic peptidase	60575	pepsin A activity	0.00938204
Nr4a2: nuclear receptor subfamily 4,group A, member 2	54278	transcription factor activity, T cell differentiation	0.00954022
Slfn3: schlafen 3	114247	T cell differentiation	0.00996306
RT1-Da: RT1class II,locus Da	294269	MHC class II protein complex	0.0112488
Kit: v-kit Hardy-Zuckerman 4 sarcoma viral oncogene homolog	64030	protein tyrosine kinase activity	0.011945



Emp1: epithelial membrane protein 1	25314	development, cell growth	0.0134609
Thbs4: thrombospondin 4	29220	cell adhesion	0.0138862
Col4a1_predicted: procollagen, type IV, alpha 1	290905	collagen	0.0141121
Xlkd1_predicted: extra cellular link domain-containing 1	293186	hyaluronic acid binding, cell-matrix adhesion	0.0149342
Coro1a: coronin, actin binding protein 1A	155151	actin cytoskeleton, T cell differentiation	0.0154166
RT1-Aw2:RT1 class Ib, Aw2	24737		0.0154783
Rsb30_predicted: RAB30, member RAS oncogene family	308821	small GTPase mediated signal transduction	0.0157846
Mgl1: macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1	64195	sugar binding	0.0164171
Cd74: CD74 antigen	25599	immune response	0.0169957
Mhc2ta: MHC class II transactivator	85483	MHC class II biosynthesis	0.017892
Aqp1: aquaporin 1	25240	water transporter activity	0.0181426
RT1-Bb: RT1class II,locus Bb	309622	MHC class II protein complex	0.0185101
Spn: sialophorin	24796	positive regulation of T cell proliferation	0.0207121
Depdc2_predicted: DEP domain containing 2	312912	guanyl-nucleotide exchange factor activity	0.0217282
Pcdh17_predicted: protocadherin 17	306055	cell adhesion	0.0218012
Rgs10: regulator of G-protein signalling 10	54290	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0.0225112
Rgs2: regulator of G-protein signaling 2	84583	negative regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0.0227521

Col1a2: procollagen, type I, $\alpha$ 2	84352	collagen	0.0232583
RT1-Db1:RT1class II,locusDb1	294270	MHC class II protein complex	0.023364
Sparc: secreted acidic cysteine rich glycoprotein	24791	calcium ion binding, extracellular matrix	0.025036
RGD621676: smooth muscle alpha-actin	81633	muscle contraction	0.0251202
Cdh11: cadherin 11	84407	cell-cell adhesion	0.0258402
Cd44: CD44 antigen	25406	collagen binding, hyaluronic acid binding	0.0267894
Emcn: endomucin	295490		0.0282414
Gatm:glycineamidino transferase (L-arg: glycineamidinotransferase)	81660	creatine biosynthesis	0.028496
Gucy2c:guanylate cyclase 2C	25711	guanylate cyclase activity, cGMP biosynthesis	0.0286827
Tm4sf13_predicted: transmembrane 4 superfamily member 13	366602	membrane fraction	0.029425
Brf2_predicted: BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor, BRF1-like	306542	cell cycle	0.0299785
C5r1: complement component 5, receptor 1	113959	complement component, immune response	0.0301094
Col6a3_predicted: procollagen, type VI, alpha 3	367313	collagen	0.0302674
Prnp: prion protein	24686	copper ion binding, lipid raft	0.0311268
Col5a2: collagen, type V, $\alpha$ 2	85250	collagen	0.0312646
Alox5ap: arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	29624	leukotriene biosynthesis, immune response	0.031372

Tagle: transgelin	25123	actin binding, muscle development	0.0324767
Srpx: sushi-repeat-containing protein	64316	protein binding, cell adhesion	0.0329379
Cyp2c40: cytochrome P450, family 2, subfamily c, 40	25011	monooxygenase activity, oxidoreductase activity	0.0334314
Slc25a25: solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	246771		0.0339204
Ccnd1: cyclin D1	58919	cell cycle	0.034321
Loxl1_predicted: lysyl oxidase-like 1	315714	protein-lysine 6-oxidase activity	0.0343916
Plod2: procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	300901		0.0352222
Podxl: podocalyxin-like	192181	negative regulation of cell adhesion	0.0355053
Pkia: protein kinase inhibitor, $\alpha$	114906	protein kinase inhibitor activity	0.035669
Plat: plasminogen activator, tissue	25692	platelet-derived growth factor receptor signaling	0.0362412
Popdc2: popeye domain containing 2	360718	integral to membrane	0.0362733
Elk3_predicted: ELK3, member of ETS oncogene family	362871	transcription cofactor activity	0.0363418
Irf7_predicted: interferon regulatory factor 7	293624	inflammatory response, response to virus	0.0368263
Ptrf_predicted: polymerase I and transcript release factor	287710	transcription	0.0372007
Mki67_predicted: antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	291234	meiosis, cell proliferation	0.0379715
Fndc1_predicted: fibronectin type III domain containing 1	308099		0.0382778

Prkcb1: protein kinase C, beta 1	25023	protein kinase C activity, calcium ion transport	0.0383864
Fcgr2b: Fc receptor, IgG, low affinity IIb	289211	defense response, immune response	0.0394365
Kctd12_predicted: potassium channel tetramerisation domain containing 12	364458	voltage-gated potassium channel complex	0.0394393
Fgd5_predicted: FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5	362402	zinc ion binding	0.0399751
Senp5_predicted: SUMO/sentrin specific protease 5	303874	proteolysis and peptidolysis	0.040238
Ccnb2_predicted: cyclin B2	363088	cell cycle, mitosis	0.041158
Ect2_predicted: ect2 oncogene	361921	regulation of progression through cell cycle	0.0415417
Ccnb1: cyclin B1	25203	cell cycle, mitosis	0.0417916
RT1-M3:RT1 class Ib, M3	24747	immune response	0.042952
Col1a1: collagen, type 1, $\alpha$ 1	29393	collagen	0.0430284
Lox: lysyl oxidase	24914	lysine 6-oxidase activity, extracellular matrix	0.0440036
Vldlr: very low density lipoprotein receptor	25696	cholesterol metabolism	0.0442166
Ogn_predicted: osteoglycin	291015	growth factor activity	0.0443129
Tmem14a_predicted: transmembrane protein 14A	363206	integral to membrane	0.0451412
Top2a:topoisomerase (DNA) $2\alpha$	360243	DNA topoisomerase activity	0.0451948
Ramp2: receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	58966	G-protein-coupled receptor binding	0.0454678

Ramp2: receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	58966	G-protein-coupled receptor binding	0.0454678
Hmgb2:high mobility group box 2	29395	chromatin,transcription factor activity	0.0461292
Smc2l1_predicted: SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1	362519	DNA replication and chromosome cycle	0.0462542
Prc1_predicted: protein regulator of cytokinesis 1	308761	mitotic spindle elongation, cytokinesis	0.0464054
Stab1_predicted: stabilin 1	290559	hyaluronic acid binding, inflammatory response	0.0464447
Plac8_predicted: placenta-specific 8	360914		0.0468907
Apbb1ip_predicted: amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B,	307171	neuropeptide signaling pathway	0.0470232
Flt1:FMS-like tyrosine kinase 1	54251	angiogenesis,patterning of blood vessels	0.0483451
Cd9: CD9 antigen	24936	cell adhesion, platelet activation	0.0483867

Genes significantly down-regulated by SU11248 treatment are listed. Differential expression was called statistically significant with a  $P < 0.05$  for the moderated t-statistic and a fold discovery rate (FDR)  $\leq 0.32$  for SAM. In addition, the GOSTats program was used to compare the gene ontology distribution of the significant genes. The genes differentially down-regulated by SU11248 treatment were mainly related to the following functional groups: the MHC class II protein complex (GO:0042613,  $p \leq 2.06 \times 10^{-7}$ ), antigen presentation (GO:0019884,  $p \leq 1.19 \times 10^{-5}$ ), immune response (GO:0006955,  $p \leq 0.009$ ), collagen (GO:0005581,  $p \leq 0.009$ ), and lymphocyte differentiation (GO:0030098,  $p \leq 0.0127$ ).



# **Discussió**





---

## ***DISCUSSIÓ***

El sinusoides hepàtic i especialment la cèl·lula endotelial té un paper molt important com a modulador de la resistència intrahepàtica, tant en condicions fisiològiques com patològiques (Rockey, 2003). En la cirrosi hepàtica, les CESSs experimenten una sèrie d'alteracions caracteritzades per la formació de làmina basal i la disminució del número de fenestracions, així com per una deficiència en l'activació d'eNOS i en la consegüent síntesi de NO (Gupta et al., 1998; Martínez-Hernandez and Martínez, 1991; Rockey and Chung, 1998). Tot i que es coneixen alguns dels mecanismes fisiopatològics que donen lloc a aquests canvis morfològics i funcionals que experimenta la cèl·lula endotelial sinusoidal en la cirrosi, és necessari identificar noves dianes terapèutiques específiques d'endoteli que permetin identificar els mecanismes que condueixen a la disfunció endotelial característica d'aquesta malaltia.

En el moment de començar els estudis que conformen aquesta tesi doctoral, no es coneixien en profunditat els mecanismes que donen lloc a la producció deficient de NO per part de les CESSs, així com altres mecanismes implicats en processos patològics en els quals poden participar les CEs, com ara la neovascularització. En aquest context, tot i que alguns estudis havien mostrat que moltes malalties hepàtiques cròniques s'associen a un procés de neovascularització hepàtica, es desconeixia si aquest procés exerceix un paper beneficiós contribuint a la reparació tissular i la regeneració després del dany hepàtic o, per contra, representa un factor de risc per la progressió de la malaltia (Corpechot et al., 2002; El Assal et al., 1998; Rosmorduc et al., 1999). Altres estudis amb diferents models experimentals de cirrosi van demostrar que aquest augment de neovascularització també tenia lloc en altres òrgans de la cavitat abdominal, principalment a l'àrea esplàcnica. Alguns mediadors vasoactius, com VEGF o NO havien estat associats a aquestes complicacions (Sumanovski et al., 1999; Sieber et al., 2001).

Per altra banda, alguns estudis publicats en el nostre laboratori havien mostrat que els macròfags peritoneals provinents del líquid ascític de pacients cirròtics amb PBE produeixen diferents substàncies vasoactives com VEGF, NO o adrenomedulina. En aquest context, l'acumulació de líquid a la cavitat peritoneal constituiria un factor

addicional de risc degut a la presència en l'ascitis de substàncies morfogèniques capaces de modificar l'abundància, la permeabilitat i la tonicitat capil·lar de la circulació peritoneal adjacent (Cejudo-Martin et al., 2001; Cejudo-Martin et al., 2002; Jimenez et al., 1999; Perez-Ruiz et al., 1999). Tot i aquestes observacions, es desconeixia si el líquid ascític d'aquests pacients podia tenir alguna activitat morfogènica sobre les CEs i quins mediadors i mecanismes moleculars podrien estar implicats en aquest fenomen.

Per tal de fer front a la producció deficient de NO que característica dels fetges cirròtics, s'havien utilitzat diferents aproximacions farmacològiques que consistien en subministrar NO de manera específica a aquest òrgan. Aquestes noves teràpies incloïen l'ús de donadors de NO dirigits al fetge, com el l'alliberador de NO derivat de l'àcid ursodeoxicòlic NCX-1000 i la transferència hepàtica de nNOS i eNOS (Fiorucci et al., 2003; Van de et al., 2002; Yu et al., 2000). Tot i que aquestes aproximacions van disminuir la pressió portal en models experimentals animals, cap d'elles mostrava els mecanismes que conduïen a l'activació deficient d'eNOS. En aquest context, l'estudi 1 del primer article d'aquesta tesi doctoral pretenia determinar el paper fisiopatològic de la via de senyalització Akt/eNOS en el context de la cirrosi hepàtica. En aquest estudi, es va demostrar que els fetges cirròtics tenen una activació deficient d'Akt i, en conseqüència, una disminució de la incorporació de grups fosfats a la serina 1177/1179 de la seqüència d'eNOS. A partir d'aquests resultats, es va utilitzar una aproximació de transferència gènica per restaurar l'activitat intrahepàtica d'eNOS en la cirrosi mitjançant l'ús d'un adenovirus recombinant deficient en la replicació que codificava per un mutant constitutivament actiu d'Akt. Els estudis *in vivo* van mostrar que l'administració intravenosa de myr-Akt als fetges cirròtics a una dosi de  $5 \times 10^{10}$  pfu donava lloc a l'expressió del transgen, un increment de la fosforilació d'eNOS i de l'alliberació intrahepàtica de NO. A més, el fet de restaurar l'activitat d'eNOS amb la transferència gènica de myr-Akt normalitzava la pressió portal, disminuïa el flux sanguini mesentèric superior i millorava la hipotensió arterial en rates cirròtiques. Finalment, l'anàlisi histològic dels fetges d'aquests animals va mostrar que els septus fibròtics eren més fins i incomplets.

En primer lloc, el fet que aquest estudi hagi estat realitzat en animals de 17 a 19

setmanes de tractament amb CCl<sub>4</sub> demostra que, en aquest estadi de la cirrosi, el to vascular hepàtic encara pot ser modulats pel component vasoactiu. No es coneix, però, si aquesta teràpia hauria estat tan efectiva en un estadi de la malaltia més avançat, on la deposició de col·lagen i l'obstrucció mecànica serien els principals causants de la resistència intrahepàtica.

Tal com ja s'ha comentat, eNOS és un dels principals substrats de la serina treonina cinasa Akt, fet pel qual l'activació de la PI3-K es relaciona de manera directa amb l'alliberament de NO per part de les CEs (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). En consistència amb aquestes observacions, aquest estudi va demostrar que la fosforilació intrahepàtica d'eNOS a partir de la forma activa d'Akt donava lloc a un increment en la producció de NO per part de les CEs, fet que suggereix que la fosforilació d'eNOS dependent d'Akt és un mecanisme important pel control de la funció vascular. En aquest sentit, alguns estudis ja havien fet referència al paper fisiopatològic d'Akt en el control del to vascular (Luo et al., 2000; Scotland et al., 2002). Tot i això, abans de començar aquest primer estudi, només un d'ells havia analitzat el paper de la via de senyalització Akt/eNOS en la hipertensió portal (Iwakiri et al., 2002). Els resultats d'aquest treball suggerien que l'activació d'eNOS per part d'Akt seria el primer pas per donar lloc a un increment inicial en la producció de NO per part del llit arterial mesentèric, fet que contribueix a la vasodilatació esplàcnica i a un increment de la pressió portal. La concordància dels nostres resultats amb els obtinguts en aquest estudi presenta Akt com un dels principals moduladors del flux sanguini portal en la cirrosi.

Tot i que aquest primer estudi va mostrar que la transducció hepàtica de myr-Akt correlaciona amb un increment de la fosforilació d'eNOS, no es pot descartar la possibilitat que altres reguladors d'eNOS com AMPK, PKA i PKG puguin també fosforilar eNOS en el residu 1177/1179 i afectar la producció de NO intrahepàtic en la cirrosi (Butt et al., 2000; Chen et al., 1999).

Una altra qüestió important que quedava per resoldre consistia en identificar els mecanismes que promouen l'activació diferencial d'Akt en el context de la hipertensió portal. Com ja s'ha comentat, Akt és fosforilada per diferents cinases, entre les quals cal

destacar PDK1 i el complex diana de rapamicina de mamífers (mTOR)-Rictor. Per altra banda, aquesta fosforilació està modulada per diferents fosfatases com PP2A o PHLPP (Brazil et al., 2004). Es desconeix si l'activació d'aquestes cinases i fosfatases està alterada en aquest context d'activació diferencial d'Akt en la hipertensió portal. Queda també per resoldre l'estat d'activació de la principal via d'activació d'Akt, com és la PI3K i alguna de fosfatases que regulen aquesta via, com ara PTEN o SHIP.

Pel que fa a la circulació sistèmica i esplàcnica, l'activació d'eNOS i la consegüent producció de NO segueix un patró ben diferent al descrit pel territori hepàtic. En aquest context, alguns treballs realitzats en el nostre laboratori van demostrar un increment de la producció de NO en la patogènesi de la vasodilatació arterial en la cirrosi (Claria et al., 1992). En concordància amb aquests resultants, altres estudis també havien mostrat un increment de l'activitat de la NOS en la circulació sistèmica i esplàcnica, tant en pacients cirròtics com en models animals de cirrosi experimental (Albillos et al., 1995; Campillo et al., 1995; Ros et al., 1995; Sieber et al., 1993). En aquesta situació, cal anar en compte amb els intents de restaurar l'activitat intrahepàtica d'eNOS en aquesta condició fisiopatològica, ja que es podrien produir efectes secundaris perjudicials sobre l'hemodinàmica sistèmica, tal com ja s'ha observat amb els donadors de NO convencionals (Groszmann, 1997). En aquest estudi, però, es parteix d'una administració intravenosa dels adenovirus i es demostra que el fetge és la diana principal de l'expressió dels transgens, fet que és consistent amb estudis anteriors realitzats en models murins i permet la fosforilació d'eNOS hepàtica de manera selectiva sense produir un efecte d'hipotensió sistèmica. A més, la normalització de la pressió portal anava acompanyada d'una correcció de la hipotensió arterial (Jaffé et al., 1992; Kurata et al., 1999; Shah et al., 2000). En aquest context, en un estudi posterior es va analitzar l'efecte de la transducció intrahepàtica d'una forma constitutivament activa d'eNOS (S1179DeNOS) en rates amb BDL utilitzant un vector adenovíric que codifica per aquesta proteïna. Tot i que la sobreexpressió de S1179DeNOS va augmentar la generació de NO per part dels fetges cirròtics, aquests animals no van mostrar cap millora en els paràmetres hemodinàmics, fet que es va associar a l'augment d'expressió de caveolina en les cèl·lules no parenquimals hepàtiques d'aquests animals

(Hendrickson et al., 2003). El fet que els resultats d'aquest estudi difereixin dels obtinguts en l'estudi 1 pot ser degut a que les diferències en els vectors utilitzats per tal d'augmentar la producció de NO. Així doncs, el fet d'utilitzar un mutant constitutivament actiu d'Akt suposa un avantatge respecte a l'estudi anterior degut a la gran capacitat citoprotectora d'Akt i al fet que la unió d'Akt a eNOS interfereix en la unió d'aquesta proteïna amb la proteïna inhibidora d'eNOS caveolina-1. En concordància amb el nostre estudi, un treball publicat recentment a Nature Medicine va mostrar que les CESs provinents de fetges de rates amb BDL presentaven una disminució de la fosforilació d'Akt i, com a conseqüència, de l'activació d'eNOS i la producció de NO. Aquesta fosforilació deficient d'Akt es va atribuir a la interacció d'aquesta proteïna amb una cinasa inhibidora de la senyalització mediada per receptors acoblats a proteïna G coneguda com GRK2 (Liu et al., 2005).

Per altra banda, un dels termes que genera més controvèrsia després de l'administració amb adenovirus és la resposta inflamatòria que es pugui generar. En aquest estudi, però, no es va detectar cap signe d'inflamació i tampoc van augmentar els nivells dels enzims hepàtics LDH o ALT. Tot i això, cal dir que aquest problema podria veure's amplificat de manera important en estudis amb humans. Aquestes observacions suggereixen que, en estudis futurs, es podria plantejar l'ús d'altres vectors virals o estratègies farmacològiques dirigides de manera específica al teixit hepàtic i que assegurin un balanç correcte entre la toxicitat viral i l'expressió del transgen.

De manera global, els resultats d'aquest estudi revelen la importància de la via de senyalització d'Akt com a responsable, en part, de la disminució de la producció de NO observada en els fetges cirròtics. Aquests resultats avalen l'ús d'una forma constitutivament activa d'Akt com a possible tractament per la hipertensió portal en pacients cirròtics, així com en altres patologies on té lloc una disminució de l'activitat d'eNOS, com ara l'arteriosclerosi.

El segon estudi d'aquesta tesi doctoral fa referència a les propietats morfogèniques i proangiogèniques característiques del líquid ascític provinent de pacients cirròtics. En aquest estudi es va demostrar que l'ascitis és un líquid bioactiu que presenta propietats angiogèniques *in vitro* i *in vivo* a través de l'activació de les vies

de senyalització Erk-1/2 MAPK, JNK MAPK i Akt en CEs. Aquesta activitat proangiogènica del líquid ascític contrasta amb el que s'observa amb el líquid peritoneal, tot i que s'ha descrit que, després de diverses diàlisis, el peritoneu dels pacients amb malaltia renal avançada presenta canvis histològics, entre els quals s'inclou un augment de la vascularització (Margetts et al., 2002; Miyata et al., 2002).

La resposta angiogènica de l'ascitis sobre les CEs és mediada, en part, per la via de senyalització PI3K/Akt, ja que el pretractament de les CEs amb l'inhibidor de la PI3K LY294002 va donar lloc a una disminució de la quimiotaxi, la formació tubular i, en el model *in vivo*, a una disminució del nombre de vasos i ramificacions induïts pel líquid ascític. Aquests resultats concorden amb estudis que demostren la importància d'Akt en processos angiogènics relacionats amb la supervivència cel·lular, migració, diferenciació de les CEs i inducció del creixement de vasos sanguinis (Lee et al., 2001; Luo et al., 2000; Morales-Ruiz et al., 2000; Morales-Ruiz et al., 2001). L'ascitis, però, no només és va ser capaç d'activar la via de senyalització d'Akt, sinó també altres cascades de senyalització com Erk-1/2 MAPK o JNK MAPK, que també contribuïrien a les propietats proangiogèniques d'aquest líquid.

Moltes de les substàncies angiogèniques que conté l'ascitis dels pacients cirròtics són capaces d'activar la via de senyalització PI3K/Akt (Gu et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2000; Zeng et al., 2002). Per tal d'identificar algunes de les substàncies involucrades en el procés angiogènic induït per l'ascitis, es van utilitzar anticossos que neutralitzaven VEGF-A, HGF, bFGF, IL-8 i FN. Entre ells, només l'anticòs contra la FN va ser capaç de bloquejar les propietats angiogèniques de l'ascitis, tot i que de manera parcial, fet que indica que probablement altres factors de creixement o components de la ECM que no han estat analitzats en aquest treball podrien participar en el procés angiogènic induït per l'ascitis.

Alguns estudis anteriors havien suggerit la idea que la cirrosi està associada a un increment de l'angiogènesi esplàcnica en models experimentals d'hipertensió portal induïda per PVL (Fernandez et al., 2004; Sumanovski et al., 1999). En aquest context, els resultats d'aquest segon estudi donen suport a la hipòtesi que l'angiogènesi esplàcnica podria formar part d'un procés multifactorial complex involucrat en la

fisiopatologia de la disfunció circulatoria que té lloc en la cirrosi. D'aquesta manera, el sistema vascular remodelaria la seva arquitectura per tal de distribuir un flux sanguini adequat als teixits mitjançant dos mecanismes. El primer mecanisme consisteix en una modulació passiva del to vascular a través de l'acció de substàncies vasoactives com nivells elevats de NO i cannabinoides endògens o la hiporesposta a vasoconstrictors endògens (Castro et al., 1993; Ros et al., 1995; Wiest and Groszmann, 2002). El segon mecanisme contempla la inducció de canvis estructurals a llarg termini en l'arquitectura del sistema vascular. Aquestes modificacions vasculares, però, serien incapaces de fer front a les anomalies hemodinàmiques associades a la cirrosi induint la formació d'ascitis, que, com s'ha demostrat en aquest estudi, és un component important per la regulació de processos angiogènics amb les CEs i, per tant, serien capaços d'amplificar les modificacions vascular associades a la progressió d'aquesta malaltia.

El tercer estudi d'aquesta tesi doctoral es va dur a terme degut a l'enorme interès que existia per identificar noves dianes terapèutiques específiques d'endoteli que permetin el tractament de les alteracions vasculares hepàtiques característiques de la cirrosi. En aquest estudi, es van identificar diversos gens sobreexpressats o reprimits en CESs, fet que va permetre definir millor el paper fisiopatològic de l'endoteli en aquesta malaltia. Degut al gran nombre de gens obtinguts, es va fer una classificació per categories funcionals que permetia un estudi més detallat de cada grup de gens expressats diferencialment en aquest tipus cel·lular.

*- Remodelat de la ECM:*

Dins d'aquest grup, un dels gens que s'expressava diferencialment en les CESs era la *Lox*. Tot i que diferents estudis han mostrat que la inhibició de l'expressió d'aquest factor podria ser útil pel control de la fibrosi hepàtica, aquest estudi és el primer que mostra la seva expressió en CESs (Grenard et al., 2001). Aquest resultat concorda amb alguns estudis que demostren que *Lox* s'expressa a l'endoteli durant la progressió d'altres malalties associades a un fenomen de disfunció endotelial (Herrera et al., 2002). Dins d'aquest mateix grup, les LECs provinents de rates cirròtiques sobreexpressen diferents tipus de col·lagens com *Colla1*, *Coll18a1* i *Colla2*, en

consistència amb observacions anteriors que demostraven l'expressió endotelial d'aquests gens en fetges fibròtics (Maher and McGuire, 1990; Milani et al., 1990; Musso et al., 1998). Altres gens sobreexpressats en CESs dins d'aquesta categoria funcional són les metal·loproteïnases Mmp2 i Mmp23. Pel que fa a aquests gens, estudis previs havien demostrat la sobreexpressió de Mmp2 per part de fetges fibròtics i de Mmp23 per part de les CESs (Arthur, 2000; Takahara et al., 1997).

*- Activació endotelial i interacció cèl·lula-cèl·lula:*

Els resultats d'aquest segon estudi mostraven la sobreexpressió de diferents gens associats al procés inflamatori com Olr1, Sele, Selp, Tnfrsf4, Il1rl1 i Il6, suggerint que les alteracions associades a les CESs podrien jugar un paper important en el desenvolupament i la progressió del procés inflamatori en la cirrosi. Concretament, la sobreexpressió de Olr1 té un interès especial en la cirrosi, ja que diferents estudis han demostrat la capacitat d'aquest receptor d'inhibir l'activitat d'eNOS en vasos ateroscleròtics (Honjo et al., 2003; Mehta et al., 2001).

Les CESs provinents de fetges cirròtics també sobreexpressen IL-5, Sele i Selp, fet que reafirma la capacitat de l'endoteli de produir citoquines i molècules d'adhesió cel·lular després de l'exposició a senyals ambientals (Adams et al., 1996; Mantovani et al., 1992). Dins d'aquest grup també es van identificar quatre factors sobreexpressats ens CESs de rates cirròtiques amb una funció important pel manteniment de les unions intercel·lulars, com són Cdh1, Cdh2, Cldn3 i Cldn5. Aquests resultats permeten hipotetitzar que els canvis en l'expressió gènica d'aquestes molècules podrien afectar el transport bidireccional de molècules entre les CEs i els hepatòcits afectant la fisiologia normal del fetge i contribuint de manera activa als canvis morfològics descrits en el sinusoide hepàtic durant la cirrosi.

*- Transducció de senyal i proliferació:*

En les CESs dels animals cirròtics, el major nombre de trànscripats sobreexpressats formaven part dels grups funcionals relacionats amb transducció de senyal i creixement cel·lular. Dins d'aquest grup, el nostre anàlisi va identificar un conjunt de gens encara



no s'havien trobat sobreexpressats durant la progressió d'aquesta malaltia. Aquest és el cas de VEGF-D, la inducció del qual suggereix un paper prolimfangiogènic d'aquest factor de creixement en la cirrosi. En concordància amb aquestes observacions, l'anàlisi immunohistoquímic amb podoplanina va mostrar un increment del nombre de vasos limfàtics en els fetges cirròtics en comparació amb els dels animals controls. Un altre resultat sorprenent d'aquest estudi va ser la identificació d'un grup de gens d'expressió reduïda relacionats amb l'activació d'eNOS dins del qual destaquen *Calm1*, *Admr*, *Npr1* i *Kdr*. Concretament, *Admr*, *Npr1* i *Kdr*, receptors específics per l'adrenomedulina, el pèptid natriurètic atrial i VEGF, respectivament, actuen com a inductors de vasodilatació a través de la producció de NO en CEs (Brunner and Wolkart, 2001; De Matteo and May, 2003; Li et al., 2002). Aquests resultats condueixen a la hipòtesi que l'activació deficient d'eNOS característica dels fetges cirròtics es podria explicar per una múltiple activació defectuosa de diferents cascades de senyalització interconnectades que regulen l'activitat intrahepàtica d'aquest enzim.

Després dels resultats obtinguts en aquest tercer treball, el següent estudi es va dirigir a la determinació del paper fisiopatològic de la neovascularització hepàtica en la cirrosi, així com la seva relació amb el fenomen d'inflamació crònica característic d'aquesta malaltia. Els resultats d'aquest estudi van revelar que la progressió de la cirrosi va acompanyada d'un augment de neovascularització no només en la zona esplànica, sinó també en el territori hepàtic. Una de les principals particularitats d'aquests nous vasos formats és que expressaven les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1. Com ja s'ha comentat, la inducció d'aquestes molècules a les CEs permet el reclutament de cèl·lules inflamatòries als llocs d'inflamació. En aquest context, els experiments d'immunohistoquímica per les molècules d'adhesió, vasos sanguinis i/o cèl·lules de l'infiltrat inflamatori van mostrar que l'expressió d'ICAM-1 i VCAM-1 en la neovascularització hepàtica correlacionava bé amb l'infiltrat inflamatori local de limfòcits i macròfags. Aquests resultats se situen en la línia d'observacions que relacionen els fenòmens d'angiogènesi i inflamació crònica. En aquest sentit, cal recordar que les CEs obtingudes de fetges cirròtics sobreexpressen E-Selectina i P-Selectina, molècules que inicien la cascada d'adhesió mitjançant el rodament de

leucòcits (Tugues et al., 2005). Per tant, aquests resultats permeten hipotetitzar que, després del dany hepàtic, les CEs hepàtiques s'activen i s'estimula la formació de nous vasos sanguinis que expressen molècules d'adhesió, afavorint l'adhesió i la migració de l'infiltrat inflamatori circulant cap a l'interior del parenquima hepàtic.

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, les famílies de factors de creixement de VEGF-A i angiopoietines desenvolupen un paper essencial pel creixement vascular (Ferrara et al., 2003; Jain, 2003). En aquest estudi es va observar que els fetges cirròtics sobreexpressen VEGF-A, Ang-1 i Ang-2, fet que correlaciona de manera significativa amb la densitat vascular hepàtica d'aquests animals. Tal com han demostrat diferents estudis, l'expressió d'aquests factors angiogènics s'indueix per citoquines i quimioquines com IL-1, IL-6, IL-8 o TNF- $\alpha$  (Cohen et al., 1996; Li et al., 1995; Osawa et al., 2002). La hipòxia tissular, fenomen que té lloc en el teixit inflammat després d'un procés extensiu de fibrosi, és un altre factor capaç d'induir aquests factors de creixement (Kong et al., 2004; Norman and Fine, 2006). Concretament, en condicions d'hipòxia s'indueix la sobreexpressió de VEGF-A, Ang-2, però no d'Ang-1. Els nostres resultats concorden amb aquestes observacions, ja que la sobreexpressió de VEGF-A i Ang-2 en els fetges cirròtics colocalitzava amb les zones d'hipòxia, fet que no es va observar amb Ang-1, que va seguir un patró d'expressió diferent i independent de la concentració d'oxigen. Aquest estudi també va mostrar que els fetges cirròtics sobreexpressen PlGF, membre de la família de VEGF que s'uneix a VEGFR-1 (Tjwa et al., 2003). En condicions patològiques, s'ha demostrat que aquest factor de creixement és capaç d'amplificar el procés inflamatori a través de la inducció d'angiogènesi i del reclutament de monòcits i de cèl·lules mare hematopoiètiques (Carmeliet et al., 2001; Lutun et al., 2002). En aquest context, seria important determinar el paper fisiopatològic de PlGF en el context de la cirrosi hepàtica.

En aquest estudi, les observacions que associaven el fenomen de neovascularització hepàtica amb la inflamació en la cirrosi suggerien que l'ús d'inhibidors d'angiogènesi, com ara els inhibidors dels receptors de VEGF i de Tie-2 podria revelar el paper fisiopatològic d'aquests processos en la progressió d'aquesta malaltia. En aquest sentit, els experiments d'immunohistoquímica i de microarrays van

mostrar que les rates cirròtiques tractades amb SU11248 presentaven una disminució important de la fibrosi hepàtica. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en estudis anteriors en models experimentals de cirrosi que havien demostrat que altres inhibidors d'angiogènesi com TNP-470 o els anticossos monoclonals anti-VEGFR-1 o anti-VEGFR-2 eren capaços de disminuir l'índex de fibrosi hepàtica (Wang et al., 2000; Yoshiji et al., 2003). De totes maneres, el nostre estudi amplia les línies experimentals seguides per aquests autors des de diversos punts de vista. En primer lloc, aquest estudi demostra que el tractament amb Sunitinib disminueix l'infiltrat inflamatori en els fetges cirròtics, fet que podria ser degut a la disminució de la neovasculatura hepàtica i de la conseqüent expressió de VCAM-1 i ICAM-1. En segon lloc, el tractament amb Sunitinib va disminuir de manera significativa la pressió portal en rates cirròtiques. En un principi, es podia pensar que la inhibició de la formació de nous vasos podria haver incrementat la resistència intrahepàtica, ja que aquests nous vasos podrien constituir una via alternativa d'arribada d'oxigen i nutrients al teixit fibròtic. No obstant, els diferents mecanismes d'acció d'aquest inhibidor fan que s'hagin de tenir en consideració diferents aspectes. En primer lloc, Sunitinib és un inhibidor molt efectiu dels receptors de PDGF (Abrams et al., 2003). En el context de la fibrosi hepàtica, s'ha demostrat que la senyalització pel receptor de PDGF juga un paper molt important en l'activació de les CHEs activades, principals responsables de l'acumulació de ECM al fetge (Bataller and Brenner, 2005; Friedman, 2000). Així doncs, el fet que el tractament amb Sunitinib disminuís l'acumulació de ECM i el número de cèl·lules positives per  $\alpha$ -SMA podria ser degut a la inhibició de la via de senyalització de PDGF en les CHEs, fet que podria modificar la resistència intrahepàtica. De fet, els estudis *in vitro* realitzats sobre la línia cel·lular de CHEs humanes LX2, van mostrar que el tractament d'aquestes cèl·lules amb Sunitinib era capaç d'inhibir la senyalització i la proliferació cel·lular induïdes per PDGF. Tot i això, queda per determinar si Sunitinib també pot afectar altres processos claus per mantenir l'activació i la funcionalitat de les CHEs com són la migració cel·lular o l'apoptosi, entre altres.

Per altra banda, se sap que l'increment del flux portal no és només degut a un fenomen de vasodilatació esplàcnica, sinó també a un fenomen de neovascularització

del llit vascular esplàncnic (Fernandez et al., 2004; Morales-Ruiz et al., 2005). Per tant, la inhibició de l'angiogènesi per part de SU11248 en aquest llit vascular podria traduir-se en una disminució del flux sanguini portal en rates cirròtiques. En aquest context, un altre estudi va mostrar que la inhibició de la senyalització de VEGF-A en un model d'hipertensió portal va atenuar la sobreexpressió d'eNOS que té lloc en la zona esplàncnica d'aquests animals (Abralde et al., 2006; Bataller and Brenner, 2005). Totes aquestes observacions permetien hipotetitzar que la disminució de la pressió portal observada en les rates cirròtiques tractades amb SU11248 podria ser deguda no només a la inhibició de l'activació de les CHEs, sinó també a la disminució dels fenòmens d'angiogènesi i vasodilatació a la zona esplàncnica, dos components involucrats en el desenvolupament de la hiperèmia esplàncnica.

Un aspecte important que cal destacar d'aquest estudi és el gran potencial terapèutic de Sunitinib degut als seus múltiples mecanismes d'acció contra l'angiogènesi, la inflamació i la fibrosi. Així doncs, l'avantatge d'utilitzar inhibidors multidiana com Sunitinib es fonamenta en el fet que SU5416, de característiques similars però que només inhibeix els receptors de VEGF, no va ser capaç de modificar la pressió portal en un model experimental de PVL (Fernandez et al., 2005). Aquestes discrepàncies es podrien explicar per la falta d'especificitat de SU5416 sobre els receptors de PDGF, a diferència de la capacitat multidiana de Sunitinib.

# **Conclusions**



---

A partir dels resultats obtinguts en els quatre estudis que conformen aquesta tesi doctoral, es pot concloure que:

1. Els fetges provinents d'animals cirròtics presenten una activació deficient de la cinasa Akt i, com a conseqüència, de l'estat de fosforilació d'eNOS.
2. El reestabliment de l'activitat enzimàtica d'Akt en el fetge de rates cirròtiques activa eNOS, augmenta la producció de NO i millora els paràmetres hemodinàmics de PP i PAM sense provocar efectes citopàtics ni alteracions en la funció hepàtica.
3. El líquid ascític de pacients cirròtics és biològicament actiu i indueix la formació d'estructures tubulars i quimiotaxi en CEs a través de la via de senyalització PI3K/Akt. La neutralització de la FN inhibeix aquest procés de manera parcial.
4. El líquid ascític estimula les vies de senyalització d'Erk-1/2 i JNK en CEs humanes.
5. L'ascites estimula el procés d'angiogènesi *in vivo* a través de la senyalització induïda per FN i la via de senyalització PI3K.
6. La cirrosi hepàtica està associada a canvis importants en el perfil d'expressió gènica de CEs hepàtiques. D'aquesta manera, les CEs aïllades de fetges cirròtics presenten un patró d'expressió gènica diferencial que dona lloc a modificacions en els processos remodelats de la ECM, inflamació, resposta a l'estrès i senyalització cel·lular.
7. La progressió de la cirrosi s'associa a un augment de la neovascularització en diferents territoris vasculars.
8. La neovascularització dels fetges cirròtics expressa les molècules d'adhesió VCAM-1 i ICAM-1 i es localitza en àrees que presenten un abundant infiltrat inflamatori de leucòcits i limfòcits.

9. Els fetges cirròtics sobreexpressen els factors proangiogènics VEGF-A, Ang-1, Ang-2 i PlGF. L'expressió de VEGF-A i Ang-2, però no la d'Ang-1, es correlaciona amb la presència d'àrees d'hipòxia.

10. El tractament de rates cirròtiques amb Sunitinib disminueix l'angiogènesi associada a la progressió de la cirrosi, la fibrosi hepàtica, la presència d'infiltrat inflamatori hepàtic i la pressió portal.

11. Sunitinib inhibeix la senyalització induïda per PDGF i disminueix la viabilitat cel·lular en CHEs humanes activades.

Globalment, i segons els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, es pot concloure que les cèl·lules endotelials contribueixen de manera significativa al desenvolupament i manteniment d'alguns dels processos fisiopatològics característics de la cirrosi hepàtica. Per tant, aquestes dades recolzen la hipòtesi de que aquestes cèl·lules poden constituir una diana terapèutica important per al tractament d'aquesta malaltia.



# **Bibliografia**



Abraldes, J.G. and Bosch, J. (2002). Novel approaches to treat portal hypertension. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17 Suppl 3, S232-S241.

Abraldes, J.G., Iwakiri, Y., Loureiro-Silva, M., Haq, O., Sessa, W.C., and Groszmann, R.J. (2006b). Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 290, G980-G987.

Abraldes, J.G., Pasarin, M., and Garcia-Pagan, J.C. (2006c). Animal models of portal hypertension. *World J. Gastroenterol.* 12, 6577-6584.

Abrams, T.J., Lee, L.B., Murray, L.J., Pryer, N.K., and Cherrington, J.M. (2003). SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2, 471-478.

Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest* 112, 1142-1151.

Adams, D.H., Hubscher, S.G., Fisher, N.C., Williams, A., and Robinson, M. (1996). Expression of E-selectin and E-selectin ligands in human liver inflammation. *Hepatology* 24, 533-538.

Adams, R.H. and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 464-478.

Adams, V.R. and Leggas, M. (2007). Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Ther.* 29, 1338-1353.

Ahmad, A. and Alvarez, F. (2004). Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J. Leukoc. Biol.* 76, 743-759.

Aird, W.C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158-173.

Aird, W.C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* 100, 174-190.

Ala, A., Dhillon, A.P., and Hodgson, H.J. (2003). Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, 1-16.

Albillos, A., Rossi, I., Cacho, G., Martinez, M.V., Millan, I., Abreu, L., Barrios, C., and Escartin, P. (1995). Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am. J. Physiol* 268, G459-G464.

Alcolado,R., Arthur,M.J., and Iredale,J.P. (1997). Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin. Sci. (Lond)* 92, 103-112.

Anthony,P.P., Ishak,K.G., Nayak,N.C., Poulsen,H.E., Scheuer,P.J., and Sobin,L.H. (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J. Clin. Pathol.* 31, 395-414.

Arroyo,V. and Jimenez,W. (2000). Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J. Hepatol.* 32, 157-170.

Arroyo,V., Ginés,P. and Rodés,J. (1999a). Pathogenesis, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. In: Bircher,J., Benhamou,J.P., McIntyre,N. Rizzeto,M. and Rodés,J., eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford Medical Publications, 697-732.

Arroyo,V., Ginés,P., Jiménez,W. and Rodés,J. (1999b). Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher,J., Benhamou,J.P., McIntyre,N. Rizzeto,M. and Rodés,J., eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford Medical Publications, 733-761.

Arthur,M.J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 279, G245-G249.

Autiero,M., Lutun,A., Tjwa,M., and Carmeliet,P. (2003). Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1356-1370.

Babaei,S., Teichert-Kuliszewska,K., Zhang,Q., Jones,N., Dumont,D.J., and Stewart,D.J. (2003). Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 162, 1927-1936.

Bach,F., Uddin,F.J., and Burke,D. (2007). Angiopoietins in malignancy. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33, 7-15.

Bachetti,T. and Morbidelli,L. (2000). Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res.* 42, 9-19.

Bataller,R., Gabele,E., Schoonhoven,R., Morris,T., Lehnert,M., Yang,L., Brenner,D.A., and Rippe,R.A. (2003). Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 285, G642-G651.

Bataller,R. and Brenner,D.A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest* 115, 209-218.

Battista,S., Bar,F., Mengozzi,G., Pollet,C., Torchio,M., Cavalli,G., Rosina,F., David,E.,

Cutrin,J.C., Cavalieri,B., Poli,G., and Molino,G. (2001). Evidence of an increased nitric oxide production in primary biliary cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* *96*, 869-875.

Bazzoni,G. and Dejana,E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* *84*, 869-901.

Benoit,J.N., Womack,W.A., Hernandez,L., and Granger,D.N. (1985). "Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in the rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology* *89*, 1092-1096.

Bertolino,P., Deckers,M., Lebrin,F., and ten Dijke,P. (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* *128*, 585S-590S.

Besse,B., Armand,J.P., and Soria,J.C. (2006). Targeting angiogenesis with oral agents. *Ann. Oncol.* *17 Suppl 10*, x71-x75.

Bhunchet,E. and Fujieda,K. (1993). Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: a mechanism to maintain liver blood flow. *Hepatology* *18*, 1450-1458.

Blendis,L. and Wong,F. (2001). The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol. Ther.* *89*, 221-231.

Boo,Y.C. and Jo,H. (2003). Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *285*, C499-C508.

Boo,Y.C., Sorescu,G., Boyd,N., Shiojima,I., Walsh,K., Du,J., and Jo,H. (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J. Biol. Chem.* *277*, 3388-3396.

Bosch,J. and Garcia-Pagan,J.C. (2000). Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J. Hepatol.* *32*, 141-156.

Braet,F., De Zanger,R., Sasaoki,T., Baekeland,M., Janssens,P., Smedsrod,B., and Wisse,E. (1994). Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab Invest* *70*, 944-952.

Brazil,D.P. and Hemmings,B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 657-664.

Brazil,D.P., Yang,Z.Z., and Hemmings,B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 233-242.

Brindle,N.P., Saharinen,P., and Alitalo,K. (2006). Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ. Res.* *98*, 1014-1023.

Brunner,F. and Wolkart,G. (2001). Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc. Res.* 61, 102-110.

Butt,E., Bernhardt,M., Smolenski,A., Kotsonis,P., Frohlich,L.G., Sickmann,A., Meyer,H.E., Lohmann,S.M., and Schmidt,H.H. (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 5179-5187.

Byrne,A.M., Bouchier-Hayes,D.J., and Harmey,J.H. (2005). Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Cell Mol. Med.* 9, 777-794.

Byzova, T.V, Goldman,C.K., Jankau,J., Chen,J., Cabrera,G., Achen,M.G., Stacker,S.A., Carnevale,K.A., Siemionow,M., Deitcher,S.R., DiCorleto,P.E. (2002). Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 99, 4434-4442.

Campillo,B., Chabrier,P.E., Pelle,G., Sediame,S., Atlan,G., Fouet,P., and Adnot,S. (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis in the forearm arterial bed of patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 22, 1423-1429.

Cantley,L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.

Carmeliet,P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389-395.

Carmeliet,P., Moons,L., Luttun,A., Vincenti,V., Compernelle,V., De Mol,M., Wu,Y., Bono,F., Devy,L., Beck,H., Scholz,D., Acker,T., DiPalma,T., Dewerchin,M., Noel,A., Stalmans,I., Barra,A., Blacher,S., Vandendriessche,T., Ponten,A., Eriksson,U., Plate,K.H., Foidart,J.M., Schaper,W., Charnock-Jones,D.S., Hicklin,D.J., Herbert,J.M., Collen,D., and Persico,M.G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575-583.

Carmeliet,P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.

Carmeliet,P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.* 255, 538-561.

Carmeliet,P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Carmeliet,P., Ferreira,V., Breier,G., Pollefeyt,S., Kieckens,L., Gertsenstein,M., Fahrig,M., Vandenhoeck,A., Harpal,K., Eberhardt,C., Declercq,C., Pawling,J., Moons,L., Collen,D., Risau,W., and Nagy,A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-

Carmeliet,P., Moons,L., Luttun,A., Vincenti,V., Compernelle,V., De Mol,M., Wu,Y., Bono,F., Devy,L., Beck,H., Scholz,D., Acker,T., DiPalma,T., Dewerchin,M., Noel,A., Stalmans,I., Barra,A., Blacher,S., Vandendriessche,T., Ponten,A., Eriksson,U., Plate,K.H., Foidart,J.M., Schaper,W., Charnock-Jones,D.S., Hicklin,D.J., Herbert,J.M., Collen,D., and Persico,M.G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575-583.

Cascone,I., Audero,E., Giraudo,E., Napione,L., Maniero,F., Philips,M.R., Collard,J.G., Serini,G., and Bussolino,F. (2003). Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 102, 2482-2490.

Castro,A., Jimenez,W., Claria,J., Ros,J., Martinez,J.M., Bosch,M., Arroyo,V., Piulats,J., Rivera,F., and Rodes,J. (1993). Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 18, 367-372.

Cebe-Suarez,S., Zehnder-Fjallman,A., and Ballmer-Hofer,K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 601-615.

Cejudo-Martin,P., Morales-Ruiz,M., Ros,J., Navasa,M., Fernandez-Varo,G., Fuster,J., Rivera,F., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (2002). Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 36, 1172-1179.

Cejudo-Martin,P., Ros,J., Navasa,M., Fernandez,J., Fernandez-Varo,G., Ruiz-del-Arbol,L., Rivera,F., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (2001). Increased production of vascular endothelial growth factor in peritoneal macrophages of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 34, 487-493.

Chen,J., Somanath,P.R., Razorenova,O., Chen,W.S., Hay,N., Bornstein,P., and Byzova,T.V. (2005). Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat. Med.* 11, 1188-1196.

Chen,Z.P., Mitchelhill,K.I., Michell,B.J., Stapleton,D., Rodriguez-Crespo,I., Witters,L.A., Power,D.A., Ortiz de Montellano,P.R., and Kemp,B.E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285-289.

Cho,J.J., Hocher,B., Herbst,H., Jia,J.D., Ruehl,M., Hahn,E.G., Riecken,E.O., and Schuppan,D. (2000). An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 118, 1169-1178.

Choi,J., Enis,D.R., Koh,K.P., Shiao,S.L., and Pober,J.S. (2004). T lymphocyte-

endothelial cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 683-709.

Chow,L.Q. and Eckhardt,S.G. (2007). Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J. Clin. Oncol.* 25, 884-896.

Claria,J., Jimenez,W., Ros,J., Asbert,M., Castro,A., Arroyo,V., Rivera,F., and Rodes,J. (1992). Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 15, 343-349.

Claria,J., Jimenez,W., Ros,J., Rigol,M., Angeli,P., Arroyo,V., Rivera,F., and Rodes,J. (1994). Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 20, 1615-1621.

Claria,J. and Jiménez,W. (1999). Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo,V., Gines,P., Rodes,J. and Schrier,R.W., eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Blackwell Science, Inc. 379-396.

Cohen,T., Nahari,D., Cerem,L.W., Neufeld,G., and Levi,B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 271, 736-741.

Collins,R.G., Velji,R., Guevara,N.V., Hicks,M.J., Chan,L., and Beaudet,A.L. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 189-194.

Collins,T., Read,M.A., Neish,A.S., Whitley,M.Z., Thanos,D., and Maniatis,T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9, 899-909.

Conn,H.O., and Atterbury, C.E. (1987). Cirrhosis. In: Schiff,L., and Schiff,E.R., eds. Diseases of the liver. JB Lippincott, Philadelphia, 725-864.

Cook-Mills,J.M. and Deem,T.L. (2005). Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77, 487-495.

Corpechot,C., Barbu,V., Wendum,D., Kinnman,N., Rey,C., Poupon,R., Housset,C., and Rosmorduc,O. (2002). Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 35, 1010-1021.

Costa,C., Incio,J., and Soares,R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*.

Cybulsky,M.I., Fries,J.W., Williams,A.J., Sultan,P., Eddy,R., Byers,M., Shows,T.,



Gimbrone, M.A., Jr., and Collins, T. (1991). Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7859-7863.

Cybulsky, M.I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J.C., Connelly, P.W., and Milstone, D.S. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest* 107, 1255-1262.

DeLeve, L.D., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M.K., and McCuskey, R.S. (2004). Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287, G757-G763.

DeLeve, L.D., Wang, X., McCuskey, M.K., and McCuskey, R.S. (2006). Rat liver endothelial cells isolated by anti-CD31 immunomagnetic separation lack fenestrae and sieve plates. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 291, G1187-G1189.

De Falco, S., Gigante, B., and Persico, M.G. (2002). Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 241-246.

De Matteo, R. and May, C.N. (2003). Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1414-1420.

Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 261-270.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.

Dudzinski, D.M. and Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* 75, 247-260.

Duffield, J.S., Forbes, S.J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., and Iredale, J.P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest* 115, 56-65.

Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368-4380.

Eklund, L. and Olsen, B.R. (2006). Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp. Cell Res.* 312, 630-641.

El Assal, O.N., Yamanoi, A., Soda, Y., Yamaguchi, M., Igarashi, M., Yamamoto, A., Nabika, T., and Nagasue, N. (1998). Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the

angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 27, 1554-1562.

Enomoto,K., Nishikawa,Y., Omori,Y., Tokairin,T., Yoshida,M., Ohi,N., Nishimura,T., Yamamoto,Y., and Li,Q. (2004). Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Med. Electron Microsc.* 37, 208-215.

Enzan,H., Himeno,H., Hiroi,M., Kiyoku,H., Saibara,T., and Onishi,S. (1997). Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc. Res. Tech.* 39, 336-349.

Epstein,R.J. (2007). VEGF signaling inhibitors: More pro-apoptotic than anti-angiogenic. *Cancer Metastasis Rev.*

Erber,R., Thurnher,A., Katsen,A.D., Groth,G., Kerger,H., Hammes,H.P., Menger,M.D., Ullrich,A., and Vajkoczy,P. (2004). Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J.* 18, 338-340.

Ezaki,T., Baluk,P., Thurston,G., La Barbara,A., Woo,C., and McDonald,D.M. (2001). Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* 158, 2043-2055.

Fayard,E., Tintignac,L.A., Baudry,A., and Hemmings,B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 5675-5678.

Fernandez,M., Mejias,M., Angermayr,B., Garcia-Pagan,J.C., Rodes,J., and Bosch,J. (2005). Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J. Hepatol.* 43, 98-103.

Fernandez,M., Vizzutti,F., Garcia-Pagan,J.C., Rodes,J., and Bosch,J. (2004). Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 126, 886-894.

Feron,O., Saldana,F., Michel,J.B., and Michel,T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 273, 3125-3128.

Ferrara,N., Hillan,K.J., Gerber,H.P., and Novotny,W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391-400.

Ferrara,N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581-611.

Ferrara,N. and Alitalo,K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* 5, 1359-1364.

Ferrara,N., Carver-Moore,K., Chen,H., Dowd,M., Lu,L., O'Shea,K.S., Powell-Braxton,L., Hillan,K.J., and Moore,M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.

Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.

Ferrara,N. and Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.

Ferrara,N. and Kerbel,R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Fiedler,U. and Augustin,H.G. (2006). Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 27, 552-558.

Fiedler,U., Reiss,Y., Scharpfenecker,M., Grunow,V., Koidl,S., Thurston,G., Gale,N.W., Witzenrath,M., Rosseau,S., Suttorp,N., Sobke,A., Herrmann,M., Preissner,K.T., Vajkoczy,P., and Augustin,H.G. (2006). Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat. Med.* 12, 235-239.

Fiorucci,S., Antonelli,E., Brancaleone,V., Sanpaolo,L., Orlandi,S., Distrutti,E., Acuto,G., Clerici,C., Baldoni,M., Del Soldato,P., and Morelli,A. (2003). NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J. Hepatol.* 39, 932-939.

Fleming,I. and Busse,R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 284, R1-12.

Folkman,J. (2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 112, 496-507.

Folkman,J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273-286.

Friedman,S.L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 275, 2247-2250.

Friedman,S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38 *Suppl* 1, S38-S53.

Fulton,D., Gratton,J.P., McCabe,T.J., Fontana,J., Fujio,Y., Walsh,K., Franke,T.F.,

Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Furchgott,R.F. and Zawadzki,J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

Gale,N.W., Thurston,G., Hackett,S.F., Renard,R., Wang,Q., McClain,J., Martin,C., Witte,C., Witte,M.H., Jackson,D., Suri,C., Campochiaro,P.A., Wiegand,S.J., and Yancopoulos,G.D. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* 3, 411-423.

Garcia-Cardena,G., Fan,R., Shah,V., Sorrentino,R., Cirino,G., Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824.

Garcia-Monzon,C., Sanchez-Madrid,F., Garcia-Buey,L., Garcia-Arroyo,A., Garcia-Sanchez,A., and Moreno-Otero,R. (1995). Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 108, 231-241.

Garcia-Tsao,G. (2001). Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 120, 726-748.

Gasparini,G., Longo,R., Toi,M., and Ferrara,N. (2005). Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, 562-577.

Geerts,A.M., De Vriese,A.S., Vanheule,E., Van Vlierberghe,H., Mortier,S., Cheung,K.J., Demetter,P., Lameire,N., De Vos,M., and Colle,I. (2006). Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int.* 26, 889-898.

Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30336-30343.

Gerhardt,H. and Betsholtz,C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 15-23.

Gille,H., Kowalski,J., Li,B., LeCouter,J., Moffat,B., Zioncheck,T.F., Pelletier,N., and Ferrara,N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 3222-3230.

Gines,P., Cardenas,A., Arroyo,V., and Rodes,J. (2004). Management of cirrhosis and

ascites. *N. Engl. J. Med.* 350, 1646-1654.

Granger,D.N. and Kubes,P. (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 55, 662-675.

Granger,D.N. (1997). Cell adhesion and migration. II. Leukocyte-endothelial cell adhesion in the digestive system. *Am. J. Physiol* 273, G982-G986.

Gratton,J.P., Bernatchez,P., and Sessa,W.C. (2004). Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 94, 1408-1417.

Green,C.J., Lichtlen,P., Huynh,N.T., Yanovsky,M., Laderoute,K.R., Schaffner,W., and Murphy,B.J. (2001). Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res.* 61, 2696-2703.

Grenard,P., Bresson-Hadni,S., El Alaoui,S., Chevallier,M., Vuitton,D.A., and Ricard-Blum,S. (2001). Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.* 35, 367-375.

Groszmann,R.J. (1997). Beta-adrenergic blockers and nitrovasodilators for the treatment of portal hypertension: the good, the bad, the ugly. *Gastroenterology* 113, 1794-1797.

Gu,J., Fujibayashi,A., Yamada,K.M., and Sekiguchi,K. (2002). Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 19922-19928.

Gupta,T.K., Toruner,M., Chung,M.K., and Groszmann,R.J. (1998). Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 28, 926-931.

Guo,D., Jia,Q., Song,H.Y., Warren,R.S., and Donner,D.B. (1995). Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 270, 6729-6733.

Gutierrez-Ruiz,M.C. and Gomez-Quiroz,L.E. (2007). Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int.* 27, 434-439.

Guttmann-Raviv,N., Kessler,O., Shraga-Heled,N., Lange,T., Herzog,Y., and Neufeld,G. (2006). The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett.* 231, 1-11.

Hanada,M., Feng,J., and Hemmings,B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3-16.

Hayes,A.J., Huang,W.Q., Mallah,J., Yang,D., Lippman,M.E., and Li,L.Y. (1999).

Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc. Res.* 58, 224-237.

Heidelbaugh, J.J. and Sherbondy, M. (2006). Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am. Fam. Physician* 74, 767-776.

Heil, M., Eitenmuller, I., Schmitz-Rixen, T., and Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell Mol. Med.* 10, 45-55.

Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 29, 1001-1010.

Heinrich, M.C., Blanke, C.D., Druker, B.J., and Corless, C.L. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J. Clin. Oncol.* 20, 1692-1703.

Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126, 3047-3055.

Henderson, N.C. and Iredale, J.P. (2007). Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin. Sci. (Lond)* 112, 265-280.

Hendrickson, H., Chatterjee, S., Cao, S., Morales, R.M., Sessa, W.C., and Shah, V. (2003). Influence of caveolin on constitutively activated recombinant eNOS: insights into eNOS dysfunction in BDL rat liver. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 285, G652-G660.

Herrera, V.M., Didishvili, T., Lopez, L.V., and Ruiz-Opazo, N. (2002). Differential regulation of functional gene clusters in overt coronary artery disease in a transgenic atherosclerosis-hypertensive rat model. *Mol. Med.* 8, 367-375.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9349-9354.

Hirota, K. and Semenza, G.L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 59, 15-26.

Ho, Q.T. and Kuo, C.J. (2007). Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1349-1357.

Hoefs, J.C. (1999). Characteristics of ascites. In: Arroyo, V., Ginés, P., Rodés, J., and Schrier, R.W., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment.* Blackwell Science Inc., 36-62.

Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K.,

- Fandl,J.P., Daly,T., Wiegand,S.J., Yancopoulos,G.D., and Rudge,J.S. (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 11393-11398.
- Homsí,J. and Daud,A.I. (2007). Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* *14*, 285-294.
- Honjo,M., Nakamura,K., Yamashiro,K., Kiryu,J., Tanihara,H., McEvoy,L.M., Honda,Y., Butcher,E.C., Masaki,T., and Sawamura,T. (2003). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 1274-1279.
- Houck,K.A., Ferrara,N., Winer,J., Cachianes,G., Li,B., and Leung,D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* *5*, 1806-1814.
- Hughes,D.P., Marron,M.B., and Brindle,N.P. (2003). The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ. Res.* *92*, 630-636.
- Ingber,D., Fujita,T., Kishimoto,S., Sudo,K., Kanamaru,T., Brem,H., and Folkman,J. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* *348*, 555-557.
- Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E., and Chaudhuri,G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 9265-9269.
- Iredale,J.P. (2003). Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* *327*, 143-147.
- Iredale,J.P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest* *117*, 539-548.
- Iwakiri,Y., Cadelina,G., Sessa,W.C., and Groszmann,R.J. (2002a). Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *283*, G1074-G1081.
- Iwakiri,Y. and Groszmann,R.J. (2006). The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* *43*, S121-S131.
- Iwakiri,Y., Tsai,M.H., McCabe,T.J., Gratton,J.P., Fulton,D., Groszmann,R.J., and Sessa,W.C. (2002b). Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* *282*, H2084-H2090.
- Jaeschke,H. and Hasegawa,T. (2006). Role of neutrophils in acute inflammatory liver

injury. *Liver Int.* 26, 912-919.

Jaffe,H.A., Danel,C., Longenecker,G., Metzger,M., Setoguchi,Y., Rosenfeld,M.A., Gant,T.W., Thorgeirsson,S.S., Stratford-Perricaudet,L.D., Perricaudet,M., and . (1992). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat. Genet.* 1, 372-378.

Jain,R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685-693.

Jimenez,W., Claria,J., Arroyo,V., and Rodes,J. (1992). 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.

Jimenez,W., Ros,J., Morales-Ruiz,M., Navasa,M., Sole,M., Colmenero,J., Sort,P., Rivera,F., Arroyo,V., and Rodes,J. (1999). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 30, 670-676.

Jones,P.F. (2003). Not just angiogenesis--wider roles for the angiopoietins. *J. Pathol.* 201, 515-527.

Jonsson,J.R., Clouston,A.D., Ando,Y., Kelemen,L.I., Horn,M.J., Adamson,M.D., Purdie,D.M., and Powell,E.E. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 121, 148-155.

Kanda,S., Miyata,Y., and Kanetake,H. (2004). Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt. *J. Biol. Chem.* 279, 4007-4016.

Karkkainen,M.J., Haiko,P., Sainio,K., Partanen,J., Taipale,J., Petrova,T.V., Jeltsch,M., Jackson,D.G., Talikka,M., Rauvala,H., Betsholtz,C., and Alitalo,K. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74-80.

Karpanen,T. and Makinen,T. (2006). Regulation of lymphangiogenesis--from cell fate determination to vessel remodeling. *Exp. Cell Res.* 312, 575-583.

Kelly,M., Hwang,J.M., and Kubes,P. (2007). Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 3-10.

Kerbel,R. and Folkman,J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 727-739.

Knolle,P.A. and Gerken,G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174, 21-34.



- Knowles,R.G. and Moncada,S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* *298 ( Pt 2)*, 249-258.
- Kone,B.C., Kuncewicz,T., Zhang,W., and Yu,Z.Y. (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol Renal Physiol* *285*, F178-F190.
- Kong,T., Eltzschig,H.K., Karhausen,J., Colgan,S.P., and Shelley,C.S. (2004). Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 10440-10445.
- Krause,P., Markus,P.M., Schwartz,P., Unthan-Fechner,K., Pestel,S., Fandrey,J., and Probst,I. (2000). Hepatocyte-supported serum-free culture of rat liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* *32*, 718-726.
- Kurata,H., Liu,C.B., Valkova,J., Koch,A.E., Yssel,H., Hirabayashi,Y., Inoue,T., Yokota,T., and Arai,K. (1999). Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* *103*, S471-S484.
- Kwak,H.J., So,J.N., Lee,S.J., Kim,I., and Koh,G.Y. (1999). Angiotensin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett.* *448*, 249-253.
- Lai,W.K. and Adams,D.H. (2005). Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *J. Hepatol.* *42*, 7-11.
- Lai,W.K., Sun,P.J., Zhang,J., Jennings,A., Lalor,P.F., Hubscher,S., McKeating,J.A., and Adams,D.H. (2006). Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am. J. Pathol.* *169*, 200-208
- Laleman,W., Vander,E., I, Zeegers,M., Servaes,R., Libbrecht,L., Roskams,T., Fevery,J., and Nevens,F. (2006). A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur. J. Clin. Invest* *36*, 242-249.
- Lalor,P.F., Lai,W.K., Curbishley,S.M., Shetty,S., and Adams,D.H. (2006). Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J. Gastroenterol.* *12*, 5429-5439.
- Lamas,S., Marsden,P.A., Li,G.K., Tempst,P., and Michel,T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 6348-6352.
- Langer,D.A. and Shah,V.H. (2006). Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J. Hepatol.* *44*, 209-216.
- Lara-Pezzi,E., Roche,S., Andrisani,O.M., Sanchez-Madrid,F., and Lopez-Cabrera,M.

(2001). The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* 20, 3323-3331.

Lebrin,F., Deckers,M., Bertolino,P., and ten Dijke,P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65, 599-608.

LeCouter,J., Moritz,D.R., Li,B., Phillips,G.L., Liang,X.H., Gerber,H.P., Hillan,K.J., and Ferrara,N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.

Lee,M.J., Thangada,S., Paik,J.H., Sapkota,G.P., Ancellin,N., Chae,S.S., Wu,M., Morales-Ruiz,M., Sessa,W.C., Alessi,D.R., and Hla,T. (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* 8, 693-704.

Lee,F.Y., and Groszmann, R.J. (1999). Experimental models in the investigation of portal hypertension. In: Arroyo,V., Ginés,P., Rodés,J. and Schrier,R.W., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment.* Blackwell Science Inc., 365-378.

Leivas,A., Jimenez,W., Bruix,J., Boix,L., Bosch,J., Arroyo,V., Rivera,F., and Rodes,J. (1998). Gene expression of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J. Vasc. Res.* 35, 186-193.

Levy,M. (1988). Pathophysiology of ascites formation. In: Epstein,M., and Baltimore,M., eds. *The kidney in liver disease.* Williams & Wilkins., 209-243.

Li,B., Ogasawara,A.K., Yang,R., Wei,W., He,G.W., Zioncheck,T.F., Bunting,S., de Vos,A.M., and Jin,H. (2002). KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 39, 1095-1100.

Li,J., Perrella,M.A., Tsai,J.C., Yet,S.F., Hsieh,C.M., Yoshizumi,M., Patterson,C., Endege,W.O., Zhou,F., and Lee,M.E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270, 308-312.

Li,X., Benjamin,I.S., and Alexander,B. (2002b). Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J. Hepatol.* 36, 488-493.

Liao,D. and Johnson,R.S. (2007). Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 281-290.

Lichtinghagen,R., Bahr,M.J., Wehmeier,M., Michels,D., Haberkorn,C.I., Arndt,B., Flemming,P., Manns,M.P., and Boeker,K.H. (2003). Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-

induced liver cirrhosis. *Clin. Sci. (Lond)* *105*, 373-382.

Lindahl,P., Johansson,B.R., Leveen,P., and Betsholtz,C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* *277*, 242-245.

Lindblom,P., Gerhardt,H., Liebner,S., Abramsson,A., Enge,M., Hellstrom,M., Backstrom,G., Fredriksson,S., Landegren,U., Nystrom,H.C., Bergstrom,G., Dejana,E., Ostman,A., Lindahl,P., and Betsholtz,C. (2003). Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* *17*, 1835-1840.

Liu,S., Gallo,D.J., Green,A.M., Williams,D.L., Gong,X., Shapiro,R.A., Gambotto,A.A., Humphris,E.L., Vodovotz,Y., and Billiar,T.R. (2002). Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* *70*, 3433-3442.

Liu,S., Premont,R.T., Kontos,C.D. Zhu,S. and Rockey,D.C. (2005). A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat. Med.* *11*, 952-958.

Liu,V.W. and Huang,P.L. (2007). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.*

Liu,W., Tang,L., Zhang,G., Wei,H., Cui,Y., Guo,L., Gou,Z., Chen,X., Jiang,D., Zhu,Y., Kang,G., and He,F. (2004). Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J. Biol. Chem.* *279*, 18748-18758.

Luo,Z., Fujio,Y., Kureishi,Y., Rudic,R.D., Daumerie,G., Fulton,D., Sessa,W.C., and Walsh,K. (2000). Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J. Clin. Invest* *106*, 493-499.

Luttun,A., Brusselmans,K., Fukao,H., Tjwa,M., Ueshima,S., Herbert,J.M., Matsuo,O., Collen,D., Carmeliet,P., and Moons,L. (2002a). Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *295*, 428-434.

Luttun,A., Tjwa,M., Moons,L., Wu,Y., Angelillo-Scherrer,A., Liao,F., Nagy,J.A., Hooper,A., Priller,J., De Klerck,B., Compennolle,V., Daci,E., Bohlen,P., Dewerchin,M., Herbert,J.M., Fava,R., Matthys,P., Carmeliet,G., Collen,D., Dvorak,H.F., Hicklin,D.J., and Carmeliet,P. (2002b). Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* *8*, 831-840.

Maglione,D., Guerriero,V., Viglietto,G., Delli-Bovi,P., and Persico,M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular

permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 9267-9271.

Maher,J.J. and McGuire,R.F. (1990). Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J. Clin. Invest* 86, 1641-1648.

Maisonpierre,P.C., Suri,C., Jones,P.F., Bartunkova,S., Wiegand,S.J., Radziejewski,C., Compton,D., McClain,J., Aldrich,T.H., Papadopoulos,N., Daly,T.J., Davis,S., Sato,T.N., and Yancopoulos,G.D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60.

Majano,P., Lara-Pezzi,E., Lopez-Cabrera,M., Apolinario,A., Moreno-Otero,R., and Garcia-Monzon,C. (2001). Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 34, 1218-1224.

Mandriota,S.J. and Pepper,M.S. (1998). Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ. Res.* 83, 852-859.

Mantovani,A., Bussolino,F., and Dejana,E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 6, 2591-2599.

Margetts,P.J., Kolb,M., Yu,L., Hoff,C.M., Holmes,C.J., Anthony,D.C., and Gauldie,J. (2002). Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am. J. Pathol.* 160, 2285-2294.

Marron,M.B., Hughes,D.P., McCarthy,M.J., Beaumont,E.R., and Brindle,N.P. (2000). Tie-1 receptor tyrosine kinase endodomain interaction with SHP2: potential signalling mechanisms and roles in angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 476, 35-46.

Martinez-Hernandez,A. and Martinez,J. (1991). The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 14, 864-874.

Master,Z., Jones,N., Tran,J., Jones,J., Kerbel,R.S., and Dumont,D.J. (2001). Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J.* 20, 5919-5928.

Mazzanti,R., Messerini,L., Monsacchi,L., Buzzelli,G., Zignego,A.L., Foschi,M., Monti,M., Laffi,G., Morbidelli,L., Fantappie,O., Bartoloni Saint,O.F., and Ziche,M. (1997). Chronic viral hepatitis induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology* 25, 229-234.

Medina,J., Arroyo,A.G., Sanchez-Madrid,F., and Moreno-Otero,R. (2004). Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 39, 1185-1195.

Medina,J., Caveda,L., Sanz-Cameno,P., Arroyo,A.G., Martin-Vilchez,S., Majano,P.L., Garcia-Buey,L., Sanchez-Madrid,F., and Moreno-Otero,R. (2003). Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. *J. Hepatol.* *38*, 660-667.

Mehrad,B., Keane,M.P., and Strieter,R.M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb. Haemost.* *97*, 755-762.

Mehta,D. and Malik,A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* *86*, 279-367.

Mehta,J.L., Li,D.Y., Chen,H.J., Joseph,J., and Romeo,F. (2001). Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *289*, 857-861.

Mendel,D.B., Laird,A.D., Xin,X., Louie,S.G., Christensen,J.G., Li,G., Schreck,R.E., Abrams,T.J., Ngai,T.J., Lee,L.B., Murray,L.J., Carver,J., Chan,E., Moss,K.G., Haznedar,J.O., Sukbuntherng,J., Blake,R.A., Sun,L., Tang,C., Miller,T., Shirazian,S., McMahon,G., and Cherrington,J.M. (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* *9*, 327-337.

Michel,C.C. and Curry,F.E. (1999). Microvascular permeability. *Physiol Rev.* *79*, 703-761.

Michiels,C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell Physiol* *196*, 430-443.

Milani,S., Herbst,H., Schuppan,D., Surrenti,C., Riecken,E.O., and Stein,H. (1990). Cellular localization of type I III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am. J. Pathol.* *137*, 59-70.

Milkiewicz,M., Ispanovic,E., Doyle,J.L., and Haas,T.L. (2006). Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 333-357.

Minami,T. and Aird,W.C. (2005). Endothelial cell gene regulation. *Trends Cardiovasc. Med.* *15*, 174-184.

Miyata,T., Devuyst,O., Kurokawa,K., and van Ypersele,d.S. (2002). Toward better dialysis compatibility: advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int.* *61*, 375-386.

Moncada,S., Palmer,R.M., and Higgs,E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* *43*, 109-142.

Monshouwer,M. and Hoebe,K.H. (2003). Hepatic (dys-)function during inflammation.

---

Toxicol. In Vitro 17, 681-686.

Morales-Ruiz,M., Fulton,D., Sowa,G., Languino,L.R., Fujio,Y., Walsh,K., and Sessa,W.C. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ. Res.* 86, 892-896.

Morales-Ruiz,M., Jimenez,W., Ros,J., Sole,M., Leivas,A., Bosch-Marce,M., Rivera,F., Arroyo,V., and Rodes,J. (1997). Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: a host response against bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 112, 2056-2064.

Morales-Ruiz,M., Lee,M.J., Zollner,S., Gratton,J.P., Scotland,R., Shiojima,I., Walsh,K., Hla,T., and Sessa,W.C. (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 19672-19677.

Morales-Ruiz,M. (2004). Pathophysiological role of Akt and endothelial nitric oxide synthase in cirrhosis. In: Bosch,J., and Groszman,R.J., eds. *Portal Hypertension in the 21st Century*. Humana Press, 121-126.

Morales-Ruiz,M., and Jiménez, W. (2005a). Pathophysiological role of nitric oxide in cirrhosis. In: Ginés,P., Arroyo,V., and Schrier,R.W., eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Blackwell Science Inc., 105-114.

Morales-Ruiz,M., and Jiménez, W. (2005b). Neovascularization, angiogenesis and vascular remodeling in portal hypertension. In: Sanyal,A.J., and Shah,V., eds. *Portal Hypertension: Pathobiology, Evaluation and Treatment*. Humana Press, 99-112.

Morales-Ruiz,M., Tugues,S., Cejudo-Martin,P., Ros,J., Melgar-Lesmes,P., Fernandez-Llama,P., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (2005). Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Hepatol.* 43, 85-91.

Mori,T., Okanoue,T., Sawa,Y., Hori,N., Ohta,M., and Kagawa,K. (1993). Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 17, 891-897.

Muddu,A.K., Guha,I.N., Elsharkawy,A.M., and Mann,D.A. (2007). Resolving fibrosis in the diseased liver: Translating the scientific promise to the clinic. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 695-714.

Muller,W.A., Weigl,S.A., Deng,X., and Phillips,D.M. (1993). PECAM-1 is required for

transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449-460.

Murad,F. (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* 355, 2003-2011.

Muro,S., Koval,M., and Muzykantov,V. (2004). Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2, 281-299.

Musso,O., Rehn,M., Saarela,J., Theret,N., Lietard,J., Hintikka, Lotrian,D., Champion,J.P., Pihlajaniemi,T., and Clement,B. (1998). Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology* 28, 98-107.

Niederberger,M., Gines,P., Martin,P.Y., Tsai,P., Morris,K., McMurtry,I., and Schrier,R.W. (1996). Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 24, 947-951.

Niederberger,M., Martin,P.Y., Gines,P., Morris,K., Tsai,P., Xu,D.L., McMurtry,I., and Schrier,R.W. (1995). Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 109, 1624-1630.

Norman,J.T. and Fine,L.G. (2006). Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 33, 989-996.

Nourshargh,S. and Marelli-Berg,F.M. (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 26, 157-165.

O'Farrell,A.M., Abrams,T.J., Yuen,H.A., Ngai,T.J., Louie,S.G., Yee,K.W., Wong,L.M., Hong,W., Lee,L.B., Town,A., Smolich,B.D., Manning,W.C., Murray,L.J., Heinrich,M.C., and Cherrington,J.M. (2003). SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101, 3597-3605.

O'Neill,B.T. and Abel,E.D. (2005). Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J. Clin. Invest* 115, 2059-2064.

Oda,M. (2004). Series introduction: hepatic sinusoidal cells in liver physiology and pathology. *Med. Electron Microsc.* 37, 1-2.

Olsson,A.K., Dimberg,A., Kreuger,J., and Claesson-Welsh,L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359-371.

Oosthuysen,B., Moons,L., Storkebaum,E., Beck,H., Nuyens,D., Brusselmans,K., Van Dorpe,J., Hellings,P., Gorselink,M., Heymans,S., Theilmeier,G., Dewerchin,M., Laudénbach,V., Vermylen,P., Raat,H., Acker,T., Vleminckx,V., Van Den,B.L., Cashman,N., Fujisawa,H., Drost,M.R., Sciot,R., Bruyninckx,F., Hicklin,D.J., Ince,C.,

## Bibliografia

Gressens,P., Lupu,F., Plate,K.H., Robberecht,W., Herbert,J.M., Collen,D., and Carmeliet,P. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131-138.

Osawa,Y., Nagaki,M., Banno,Y., Brenner,D.A., Asano,T., Nozawa,Y., Moriwaki,H., and Nakashima,S. (2002). Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect. Immun.* 70, 6294-6301.

Oshima,Y., Oshima,S., Nambu,H., Kachi,S., Takahashi,K., Umeda,N., Shen,J., Dong,A., Apte,R.S., Duh,E., Hackett,S.F., Okoye,G., Ishibashi,K., Handa,J., Melia,M., Wiegand,S., Yancopoulos,G., Zack,D.J., and Campochiaro,P.A. (2005). Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB J.* 19, 963-965.

Osusky,K.L., Hallahan,D.E., Fu,A., Ye,F., Shyr,Y., and Geng,L. (2004). The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels. *Angiogenesis.* 7, 225-233.

Otrock,Z.K., Makarem,J.A., and Shamseddine,A.I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 258-268.

Paizis,G., Gilbert,R.E., Cooper,M.E., Murthi,P., Schembri,J.M., Wu,L.L., Rumble,J.R., Kelly,D.J., Tikellis,C., Cox,A., Smallwood,R.A., and Angus,P.W. (2001). Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* 35, 376-385.

Palmer,R.M., Ferrige,A.G., and Moncada,S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Pankov,R. and Yamada,K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861-3863.

Papapetropoulos,A., Fulton,D., Mahboubi,K., Kalb,R.G., O'Connor,D.S., Li,F., Altieri,D.C., and Sessa,W.C. (2000). Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 9102-9105.

Papapetropoulos,A., Garcia-Cardena,G., Dengler,T.J., Maisonpierre,P.C., Yancopoulos,G.D., and Sessa,W.C. (1999a). Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 79, 213-223  
Papapetropoulos,A., Rudic,R.D., and Sessa,W.C. (1999). Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 43, 509-520.

Perez-Ruiz,M., Ros,J., Morales-Ruiz,M., Navasa,M., Colmenero,J., Ruiz-del-Arbol,L.,



## Bibliografia

Cejudo,P., Claria,J., Rivera,F., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (1999a). Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 29, 1057-1063.

Perez-Ruiz,M., Ros,J., Morales-Ruiz,M., Navasa,M., Colmenero,J., Ruiz-del-Arbol,L., Cejudo,P., Claria,J., Rivera,F., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (1999). Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 29, 1057-1063.

Persico,M.G., Vincenti,V., and DiPalma,T. (1999). Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237, 31-40.

Pinzani,M., Rombouts,K., and Colagrande,S. (2005). Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J. Hepatol.* 42 *Suppl*, S22-S36.

Pizcueta,P., Pique,J.M., Fernandez,M., Bosch,J., Rodes,J., Whittle,B.J., and Moncada,S. (1992). Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 103, 1909-1915.

Pober,J.S. and Cotran,R.S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544.

Pober,J.S. and Sessa,W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803-815.

Pruimboom,W.M., Bac,D.J., van Dijk,A.P., Garrelds,I.M., Tak,C.J., Bonta,I.L., Wilson,J.H., and Zijlstra,F.J. (1995). Levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, eicosanoids and cytokines in ascites of patients with liver cirrhosis, peritoneal cancer and spontaneous bacterial peritonitis. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 375-384.

Racanelli,V. and Rehermann,B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-S62.

Rakic,J.M., Lambert,V., Devy,L., Lutun,A., Carmeliet,P., Claes,C., Nguyen,L., Foidart,J.M., Noel,A., and Munaut,C. (2003). Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3186-3193.

Ramadori,G. and Saile,B. (2004). Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 127, 997-1000.

Ramalho,L.N., Ramalho,F.S., Zucoloto,S., Castro-e-Silva Junior, Correa,F.M., Elias,J.J., and Magalhaes,J.F. (2002). Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on secondary biliary cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 49, 1499-1502.

Rao,R.M., Yang,L., Garcia-Cardena,G., and Lusinskas,F.W. (2007). Endothelial-

dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ. Res.* *101*, 234-247.

Reichen,J. (1999). The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol Sci.* *14*, 117-121.

Rhodes,J.M. and Simons,M. (2007). The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J. Cell Mol. Med.* *11*, 176-205.

Rissanen,T.T., Markkanen,J.E., Gruchala,M., Heikura,T., Puranen,A., Kettunen,M.I., Kholová,I., Kauppinen,R.A., Achen,M.G., Stacker,S.A., Alitalo,K. and Ylä-Herttuala,S. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses (2002). *Circ. Res.* *92*, 1098–1106.

Rockey,D.C. (2001). Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin. Liver Dis.* *21*, 337-349.

Rockey,D.C. (2003). Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* *37*, 4-12.

Rockey,D.C. and Chung,J.J. (1998). Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* *114*, 344-351.

Rockey,D.C. and Shah,V. (2004). Nitric oxide biology and the liver: report of an AASLD research workshop. *Hepatology* *39*, 250-257.

Ros,J., Jimenez,W., Lamas,S., Claria,J., Arroyo,V., Rivera,F., and Rodes,J. (1995). Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* *21*, 554-560.

Rosenberg,R.D. and Aird,W.C. (1999). Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N. Engl. J. Med.* *340*, 1555-1564.

Rosmorduc,O., Wendum,D., Corpechot,C., Galy,B., Sebbagh,N., Raleigh,J., Housset,C., and Poupon,R. (1999). Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am. J. Pathol.* *155*, 1065-1073.

Ross,M.A., Sander,C.M., Kleeb,T.B., Watkins,S.C., and Stolz,D.B. (2001). Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* *34*, 1135-1148.

Roy,R., Zhang,B., and Moses,M.A. (2006). Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp. Cell Res.* *312*, 608-622.

Ruckman,J., Green,L.S., Beeson,J., Waugh,S., Gillette,W.L., Henninger,D.D., Claesson-Welsh,L., and Janjic,N. (1998). 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to

the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* *273*, 20556-20567.

Ruhrberg,C. (2001). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *J. Cell Sci.* *114*, 3215-3216.

Rundhaug,J.E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* *9*, 267-285.

Sanz-Cameno,P., Martin-Vilchez,S., Lara-Pezzi,E., Borque,M.J., Salmeron,J., Munoz,d.R., Solis,J.A., Lopez-Cabrera,M., and Moreno-Otero,R. (2006). Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am. J. Pathol.* *169*, 1215-1222.

Sato,N., Kamada,T., Kawano,S., Hayashi,N., Kishida,Y., Meren,H., Yoshihara,H., and Abe,H. (1983). Effect of acute and chronic ethanol consumption on hepatic tissue oxygen tension in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *18 Suppl 1*, 443-447.

Scotland,R.S., Morales-Ruiz,M., Chen,Y., Yu,J., Rudic,R.D., Fulton,D., Gratton,J.P., and Sessa,W.C. (2002). Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion. *Circ. Res.* *90*, 904-910.

Semino,C.E., Kamm,R.D., and Lauffenburger,D.A. (2006). Autocrine EGF receptor activation mediates endothelial cell migration and vascular morphogenesis induced by VEGF under interstitial flow. *Exp. Cell Res.* *312*, 289-298.

Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., and Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* *219*, 983-985.

Sengupta,S., Gherardi,E., Sellers,L.A., Wood,J.M., Sasisekharan,R., and Fan,T.P. (2003). Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 69-75.

Serini,G., Valdembri,D., and Bussolino,F. (2006). Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp. Cell Res.* *312*, 651-658.

Sessa,W.C. (2004). eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* *117*, 2427-2429.

Shah,V., Chen,A.F., Cao,S., Hendrickson,H., Weiler,D., Smith,L., Yao,J., and Katusic,Z.S. (2000). Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *279*, G1023-G1030.

Shah,V., Toruner,M., Haddad,F., Cadelina,G., Papapetropoulos,A., Choo,K., Sessa,W.C., and Groszmann,R.J. (1999). Impaired endothelial nitric oxide synthase

activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117, 1222-1228.

Shah,V., Wiest,R., Garcia-Cardena,G., Cadelina,G., Groszmann,R.J., and Sessa,W.C. (1999). Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am. J. Physiol* 277, G463-G468.

Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.

Sherman,I.A., Pappas,S.C., and Fisher,M.M. (1990). Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis. *Am. J. Physiol* 258, H460-H465.

Shibuya,M. and Claesson-Welsh,L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 549-560.

Shimoda,K., Mori,M., Shibuta,K., Banner,B.F., and Barnard,G.F. (1999). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor mRNA expression in patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 14, 353-359.

Shiojima,I. and Walsh,K. (2006). Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 20, 3347-3365.

Sieber,C.C. and Groszmann,R.J. (1992). In vitro hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am. J. Physiol* 262, G996-1001.

Sieber,C.C., Lopez-Talavera,J.C., and Groszmann,R.J. (1993). Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 104, 1750-1754.

Sieber,C.C., Sumanovski,L.T., Stumm,M., Van der,K.M., and Battegay,E. (2001). In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J. Hepatol.* 34, 644-650.

Simons,M. (2005). Angiogenesis: where do we stand now?

Smedsrod,B., Pertoft,H., Gustafson,S., and Laurent,T.C. (1990). Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem. J.* 266, 313-327.

Song,E., Ouyang,N., Horbelt,M., Antus,B., Wang,M., and Exton,M.S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol.* 204, 19-28.

Somanath,P.R., Razorenova,O.V., Chen,J., and Byzova,T.V. (2006). Akt1 in endothelial

cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 5, 512-518.

Stacker,S.A., Caesar,C., Baldwin,M.E., Thornton,G.E., Williams, R.A., Prevo,R., Jackson,D.G., Nikishawa,S., Kubo,H. and Achen,M.G. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics (2001). *Nat. Med.* 7, 186–191.

Stambolic,V. and Woodgett,J.R. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol.* 16, 461-466.

Stevens,T., Garcia,J.G., Shasby,D.M., Bhattacharya,J., and Malik,A.B. (2000). Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279, L419-L422.

Stoeltzing,O., Ahmad,S.A., Liu,W., McCarty,M.F., Wey,J.S., Parikh,A.A., Fan,F., Reinmuth,N., Kawaguchi,M., Bucana,C.D., and Ellis,L.M. (2003). Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* 63, 3370-3377.

Stramer,B.M., Mori,R., and Martin,P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J. Invest Dermatol.* 127, 1009-1017.

Sumanovski,L.T., Battegay,E., Stumm,M., Van der,K.M., and Sieber,C.C. (1999). Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 29, 1044-1049.

Takahara,T., Furui,K., Yata,Y., Jin,B., Zhang,L.P., Nambu,S., Sato,H., Seiki,M., and Watanabe,A. (1997). Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 26, 1521-1529.

Tallquist,M. and Kazlauskas,A. (2004). PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 205-213.

Tallquist,M.D., Soriano,P., and Klinghoffer,R.A. (1999). Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene* 18, 7917-7932.

Tamaki,S., Ueno,T., Torimura,T., Sata,M., and Tanikawa,K. (1996). Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 111, 1049-1057.

Tammela,T., Enholm,B., Alitalo,K., and Paavonen,K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 550-563.

Thabut,D. and Bernard-Chabert,B. (2007). Management of acute bleeding from portal hypertension. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21, 19-29.

Theodorakis,N.G., Wang,Y.N., Skill,N.J., Metz,M.A., Cahill,P.A., Redmond,E.M., and Sitzmann,J.V. (2003). The role of nitric oxide synthase isoforms in extrahepatic portal

- hypertension: studies in gene-knockout mice. *Gastroenterology* 124, 1500-1508.
- Thurston,G., Rudge,J.S., Ioffe,E., Zhou,H., Ross,L., Croll,S.D., Glazer,N., Holash,J., McDonald,D.M., and Yancopoulos,G.D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* 6, 460-463.
- Tischer,E., Mitchell,R., Hartman,T., Silva,M., Gospodarowicz,D., Fiddes,J.C., and Abraham,J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954.
- Tjwa,M., Luttun,A., Autiero,M., and Carmeliet,P. (2003). VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res.* 314, 5-14.
- Tokairin,T., Nishikawa,Y., Doi,Y., Watanabe,H., Yoshioka,T., Su,M., Omori,Y., and Enomoto,K. (2002). A highly specific isolation of rat sinusoidal endothelial cells by the immunomagnetic bead method using SE-1 monoclonal antibody. *J. Hepatol.* 36, 725-733.
- Tugues,S., Morales-Ruiz,M., Fernandez-Varo,G., Ros,J., Arteta,D., Munoz-Luque,J., Arroyo,V., Rodes,J., and Jimenez,W. (2005). Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 129, 1686-1695.
- Uemura,A., Ogawa,M., Hirashima,M., Fujiwara,T., Koyama,S., Takagi,H., Honda,Y., Wiegand,S.J., Yancopoulos,G.D., and Nishikawa,S. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest* 110, 1619-1628.
- Ueno,T., Inuzuka,S., and Tanikawa,K. (1993). Changes of the extracellular matrix and cells producing it in acute liver injury. *Gastroenterol. Jpn.* 28 Suppl 4, 107-111.
- Van de,C.M., Omasta,A., Janssens,S., Roskams,T., Desmet,V., Nevens,F., and Fevery,J. (2002). In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 51, 440-445.
- Vollmar,B., Siegmund,S., and Menger,M.D. (1998). An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats. *Hepatology* 27, 1544-1553.
- von Tell,D., Armulik,A., and Betsholtz,C. (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res.* 312, 623-629.
- Wang,G.L. and Semenza,G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237.

## Bibliografia

Wang,Y.Q., Ikeda,K., Ikebe,T., Hirakawa,K., Sowa,M., Nakatani,K., Kawada,N., and Kaneda,K. (2000). Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 32, 980-989.

Ward,N.L. and Dumont,D.J. (2002). The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 19-27.

Watt,F.M. and Hodivala,K.J. (1994). Cell adhesion. Fibronectin and integrin knockouts come unstuck. *Curr. Biol.* 4, 270-272.

Wei,H.S., Li,D.G., Lu,H.M., Zhan,Y.T., Wang,Z.R., Huang,X., Zhang,J., Cheng,J.L., and Xu,Q.F. (2000). Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J. Gastroenterol.* 6, 540-545.

Wiest,R., Cadelina,G., Milstien,S., McCuskey,R.S., Garcia-Tsao,G., and Groszmann,R.J. (2003). Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 38, 1508-1515.

Wiest,R. and Groszmann,R.J. (2002). The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 35, 478-491.

Wisse,E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125-150.

Wisse,E., Braet,F., Luo,D., De Zanger,R., Jans,D., Crabbe,E., and Vermoesen,A. (1996). Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol. Pathol.* 24, 100-111.

Yla-Herttuala,S., Rissanen,T.T., Vajanto,I., and Hartikainen,J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 1015-1026.

Yokomori,H., Oda,M., Ogi,M., Sakai,K., and Ishii,H. (2002). Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver* 22, 150-158.

Yoshiji,H., Kuriyama,S., Noguchi,R., Ikenaka,Y., Kitade,M., Kaji,K., Yoshii,J., Yanase,K., Yamazaki,M., Asada,K., Tsujimoto,T., Akahane,T., Uemura,M., and Fukui,H. (2006). Angiotensin-II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development. *Hepatol. Res.* 36, 124-129.

Yoshiji,H., Kuriyama,S., Yoshii,J., Ikenaka,Y., Noguchi,R., Hicklin,D.J., Wu,Y., Yanase,K., Namisaki,T., Yamazaki,M., Tsujinoue,H., Imazu,H., Masaki,T., and Fukui,H. (2003). Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 52, 1347-1354.

Yu,Q., Shao,R., Qian,H.S., George,S.E., and Rockey,D.C. (2000). Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J.*

---

Clin. Invest *105*, 741-748.

Zachary,I. and Gliko,G. (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res.* *49*, 568-581.

Zeng,Q., Chen,S., You,Z., Yang,F., Carey,T.E., Saims,D., and Wang,C.Y. (2002). Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *J. Biol. Chem.* *277*, 25203-25208.

Zhang,L., Yang,N., Park,J.W., Katsaros,D., Fracchioli,S., Cao,G., O'Brien-Jenkins,A., Randall,T.C., Rubin,S.C., and Coukos,G. (2003). Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res.* *63*, 3403-3412.

Zhang,Y.W. and Vande Woude,G.F. (2003). HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J. Cell Biochem.* *88*, 408-417.



