



**FISIOPATOLOGÍA DEL EDEMA Y DE LA FORMACIÓN DE  
ASCITIS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

Memoria presentada por

**PEDRO MELGAR LESMES**

para optar al título de Doctor en Bioquímica

por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Departamento de Ciencias Fisiológicas I

Hospital Clínic/Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Tesis inscrita en el programa de doctorado Biopatología en Medicina.

Departamento de Ciencias Fisiológicas I.

Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona



Dedicada a mi madre  
y a los/las que me quieren de corazón



## **ABREVIATURAS**

ACTH: Hormona adrenocorticotropa.

AE: Azul de Evans.

AII: Angiotensina II.

ALT: Alanino aminotransferasa.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

Ang-1 o 2: Angiopoyetina 1 o 2

APJ o AGTRL-1: Receptor de apelina.

$\alpha$ -SMA: Alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin).

AT1: Receptor de angiotensina II de tipo 1.

AT2: Receptor de angiotensina II de tipo 2.

ATP: Adenosin trifosfato.

AVP = ADH = Vasopresina u hormona antidiurética,

CC: Carbono coloidal.

CCl<sub>4</sub>: Tetracloruro de Carbono.

CE: Célula endotelial.

CEH: Célula estrellada hepática.

CO: Monóxido de carbono.

DPIT: Derivación portosistémica intrahepática transyugular.

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

eNOS: Sintasa endotelial del Óxido Nítrico.

ET-1: Endotelina-1.

ETA: Receptor de endotelina tipo A.

ETB: Receptor de endotelina tipo B.

FAK: Quinasa de adhesión focal.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

GC: Gasto cardíaco.

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IC: Índice cardíaco.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

IL: Interleuquina.

L-NAME: N omega-nitro-L-arginina metil éster.

LPS: Lipopolisacárido.

MC-R: Receptor de mineralocorticoides.

MEC: Matriz extracelular.

NF-κB: Factor nuclear kappa B.

NO: Óxido Nítrico.

NP2: Neuropilina de tipo 2.

PAM; Presión arterial media.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PIGF: Factor de crecimiento placentario.

PP: Presión portal.

RAS: Sistema Renina Angiotensina.

ROS: Especies reactivas de oxígeno .

RPT: Resistencias periféricas totales.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral  $\beta$ .

TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ .

TSH: Hormona estimulante de la tiroides.

uPA: Activador del plasminógeno uroquinasa.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VPF: Factor de permeabilidad vascular.

VVO: Organela vesículo-vacuolar.





# Índice



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. CIRROSIS HEPÁTICA:**

1.1.	<u>Definición. Clasificación según etiología. Aspectos Generales.</u>	1
1.2.	<u>Alteraciones intrahepáticas:</u>	4
1.2.1.	Fibrosis. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y ET-1.	4
1.2.2.	Angiogénesis e inflamación.	7
1.3.	<u>Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis. Hipertensión portal y circulación hiperdinámica.</u>	9
1.4.	<u>Edema y ascitis.</u>	12
2.	<b>PERMEABILIDAD VASCULAR:</b>	13
2.1.	<u>Aspectos Generales. Tipos de uniones célula-célula. Uniones endoteliales.</u>	13
2.2.	<u>Mecanismos que regulan la permeabilidad vascular:</u>	19
2.2.1.	Mecanismos físicos.	19
2.2.2.	Sustancias vasoactivas.	21
2.3.	<u>Neovascularización y permeabilidad vascular:</u>	22
2.3.1.	Factores proangiogénicos:	22
2.3.1.1.	Familia del VEGF.	22
2.3.1.2.	Receptores de VEGF. Funciones.	25
2.3.1.3.	Familia de las angiopoyetinas.	29
2.3.1.4.	Receptores de las angiopoyetinas. Funciones.	31
2.3.1.5.	Apelina. Características generales.	33
2.3.1.6.	Receptor de la apelina. Funciones.	34
2.3.2.	Vasos inmaduros y extravasación vascular.	36

<b>OBJETIVOS</b>	39
<b>RESULTADOS</b>	45
<b>1. Artículo 1.</b> El factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina-2 juegan un papel clave en la patogénesis de la extravasación vascular en las ratas cirróticas. <i>Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats.</i>	47
<b>2. Artículo 2.</b> El sistema hepático de la apelina: Una nueva diana terapéutica para la enfermedad hepática. <i>The Hepatic Apelin System: A New Therapeutic Target for Liver Disease.</i>	53
<b>3. Artículo 3.</b> La apelina media la inducción de genes profibrogénicos en las células estrelladas hepáticas humanas. <i>Apelin mediates the induction of profibrogenic genes in human hepatic stellate cells.</i>	59
<b>DISCUSIÓN</b>	63
<b>CONCLUSIONES</b>	75
<b>ANEXO</b>	79
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	83
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso proinflamatorio sinuosidal durante la fibrosis hepática.	4
<b>Figura 2.</b> Sistema Renina Angiotensina. ECA.	5
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de formación de nuevos capilares.	8
<b>Figura 4.</b> Uniones de oclusión.	14
<b>Figura 5.</b> Uniones de hendidura.	15
<b>Figura 6.</b> Uniones adherentes.	16
<b>Figura 7.</b> Contactos focales.	16
<b>Figura 8.</b> Desmosomas.	17
<b>Figura 9.</b> Hemidesmosomas.	17
<b>Figura 10.</b> Uniones interendoteliales.	18
<b>Figura 11.</b> Esquema de difusión pasiva de soluto a través de membrana celular.	20
<b>Figura 12.</b> Mecanismos de transporte activo de sustancias.	21
<b>Figura 13.</b> Estructura exónica del mRNA de VEGF.	23
<b>Figura 14.</b> Receptores de la familia de VEGF.	25
<b>Figura 15.</b> Vías de señalización implicadas en la permeabilidad vascular inducida por VEGF y VEGFR <sub>2</sub> .	28
<b>Figura 16.</b> Receptores de la familia de las angiopoyetinas.	31
<b>Figura 17.</b> Receptor de la apelina (APJ).	34
<b>Figura 18.</b> Esquema de neovascularización y regulación de vasos inmaduros.	38



# **Introducción**





## 1. CIRROSIS HEPÁTICA:

### 1.1. Definición. Clasificación según etiología. Aspectos Generales.

La cirrosis hepática es el estadio final de una hepatopatía crónica que se caracteriza por la aparición de un proceso difuso de fibrosis y por la conversión de la arquitectura normal del hígado en nódulos estructuralmente anómalos.<sup>1</sup> Esta enfermedad es una de las que posee mayor prevalencia e incidencia en España. De hecho representa el 20% de ingresos hospitalarios y es la quinta causa de muerte en el adulto en nuestro país.

La etiología de la cirrosis es diversa. La causa más habitual en la actualidad es, sin duda, de origen vírico. La infección crónica por el virus de la hepatitis C y B representa alrededor del 40 y el 10% de los pacientes afectados por cirrosis, respectivamente. Más del 3% de la población española se encuentra infectada por alguna de las especies de estos virus hepáticos y, a medida que pasan los años, esta cifra va aumentando como consecuencia de la detección del genoma vírico en individuos que permanecieron durante años asintomáticos y, con el paso del tiempo, han terminado por desarrollar la enfermedad. Este hecho es debido a que fueron infectados en una época en que no se habían descrito todavía dichos virus ni existía ningún sistema de detección eficaz de los mismos. La ingesta abusiva y crónica de alcohol todavía sigue siendo el origen del 40% de los casos de cirrosis. El 60% de la población consume alcohol habitualmente y el 4% lo hace en exceso. Otras causas menos frecuentes de cirrosis hepática son la esteatohepatitis no alcohólica, desórdenes metabólicos (enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, galactosemia), enfermedades biliares intra y extrahepáticas, obstrucciones del flujo venoso (enfermedad veno-oclusiva y síndrome de Budd-Chiari) o las producidas por toxinas o

fármacos de uso terapéutico.<sup>1</sup> Entre dichas etiologías de menor incidencia, la esteatohepatitis no alcohólica está experimentando un crecimiento muy rápido debido, fundamentalmente, al cambio de hábitos alimenticios y al sedentarismo. De hecho, el 36% de la población española tiene sobrepeso y un 13% obesidad.<sup>2</sup>

La cirrosis hepática es la consecución final de una serie de procesos de adaptación en respuesta a un insulto o daño hepatocelular sostenido que, con el tiempo, evoluciona hasta la formación de nódulos de regeneración y contracción del órgano. La primera fase del proceso es consecuencia del daño hepático persistente. El agente causante del daño conduce a la necrosis de las células hepáticas, y dicha necrosis desencadena un proceso inflamatorio y, posteriormente, la regeneración tisular. Si el daño persiste, el proceso de regeneración deriva en cambios en la formación, composición y degradación de la matriz extracelular del hígado que resultan en una excesiva formación de matriz extracelular. Dicho fenómeno se denomina fibrosis. El exceso de matriz se acumula en la zona perisinusoidal, formándose de este modo una barrera que impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes y, por tanto, provocando la muerte celular de los hepatocitos. Es un proceso que se retroalimenta y en último término conduce a la distorsión de la arquitectura lobular normal del parénquima y de la red vascular, derivando en la formación de nódulos hepáticos separados por fibras, conocidos como nódulos de regeneración. Esta fase final del proceso es la que se conoce como cirrosis.

Una de las dificultades que se plantean a la hora de diagnosticar correctamente la enfermedad es que puede ser clínicamente latente y asintomática. Se habla de cirrosis compensada cuando se desarrolla sin originar ningún síntoma. En este caso, puede ser descubierta mediante un examen clínico o bioquímico rutinario, diagnosticada en exploraciones por síntomas inespecíficos como anorexia, astenia o adelgazamiento o

durante alguna operación quirúrgica en el abdomen. Se estima que del 30 al 40% de los pacientes con cirrosis son asintomáticos.<sup>3</sup> Las complicaciones más frecuentes asociadas a cirrosis hepática son la aparición de ascitis, hemorragia digestiva, ictericia o encefalopatía. Se denomina cirrosis descompensada cuando aparece alguna de las complicaciones mencionadas. La posibilidad de que aparezca alguna de las susodichas alteraciones aumenta con el tiempo y con la gravedad de los trastornos hemodinámicos o renales derivados tanto de la alteración vascular intrahepática como de la reducción del parénquima hepático funcional.

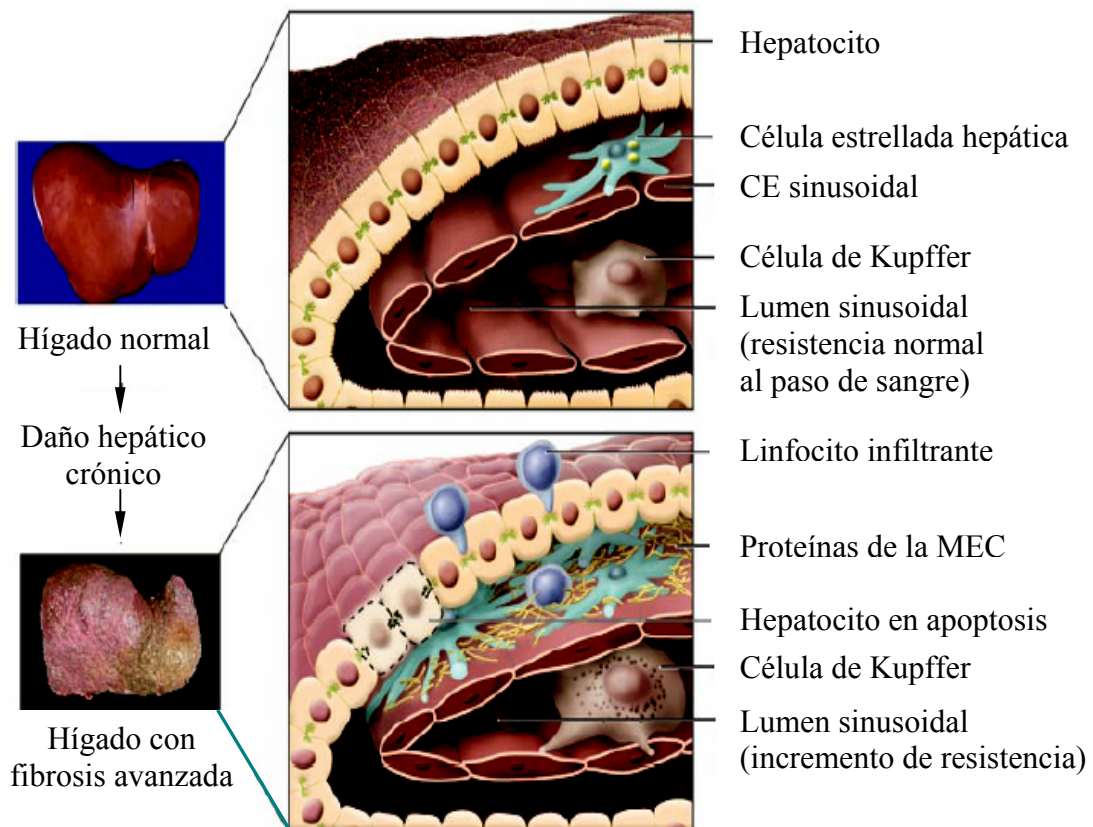
El tratamiento de la cirrosis hepática está encaminado a combatir el agente causante de la enfermedad y paliar las complicaciones derivadas de la misma. En el caso de las hepatitis víricas se realiza un tratamiento crónico combinado de un antiviral (normalmente ribavirina) con un estimulador linfocitario como interferón gamma (actualmente se utiliza el interferón gamma pegilado). En términos generales, independientemente del causante de la hepatopatía, se recomienda a los pacientes cirróticos reducir la ingesta de sodio, y se prohíbe completamente la ingestión de alcohol. En muchos casos, el tratamiento se complementa con diuréticos que ayudan a atenuar la retención de sodio. La derivación portosistémica intrahepática transyugular (DPIT) también ha sido utilizada con éxito para reducir la presión portal y el síndrome hepatorenal. En aquellos pacientes que desarrollan ascitis, la profilaxis con antibióticos (para prevenir peritonitis bacteriana espontánea) y la paracentesis con administración de albúmina son métodos de elección. Sin embargo, a día de hoy, la única cura para la cirrosis muy avanzada sigue siendo el trasplante de hígado que posee un alto éxito de supervivencia a los 5 años (75%).<sup>4</sup> Desgraciadamente, los pacientes cirróticos por virus C recidivan después del trasplante dando lugar a una hepatitis crónica que puede volver a ocasionar cirrosis. Además de este hecho, la poca disponibilidad de órganos, la

elevada cantidad de peticiones de trasplante y las largas listas de espera reflejan la enorme necesidad de explorar nuevas dianas terapéuticas que puedan ayudar a mejorar el tratamiento de la enfermedad hepática así como paliar las complicaciones originadas por la misma.

1.2. Alteraciones intrahepáticas:

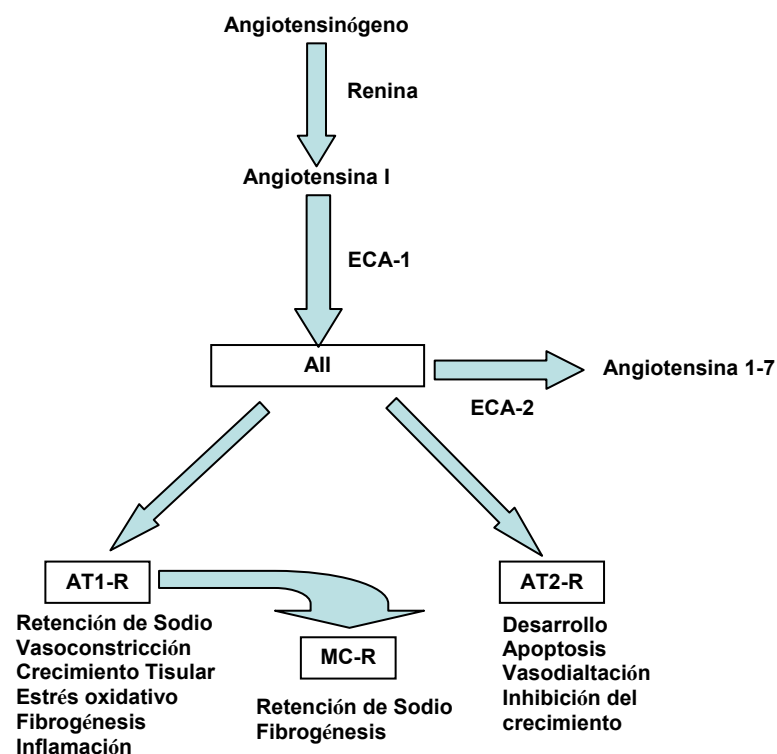
1.2.1. Fibrosis. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y endotelina-1.

La fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular en respuesta a un daño hepático crónico. La fibrosis es el resultado de un complejo sistema de interacciones entre los distintos tipos celulares residentes del hígado (Figura 1), las células del infiltrado inflamatorio y diversos mediadores peptídicos (o citoquinas) liberados de manera local.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Proceso proinflamatorio sinusoidal durante la fibrosis hepática. (Figura adaptada de Bataller y Brenner 2005).

En las enfermedades virales crónicas, los hepatocitos infectados y los linfocitos infiltrados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), quimoquinas inflamatorias y mediadores fibrogénicos. Dichas sustancias son los responsables del inicio de las alteraciones estructurales y funcionales del parénquima. En la enfermedad hepática alcohólica, además de los hepatocitos, las células de Kupffer y los neutrófilos infiltrados secretan grandes cantidades de ROS y citoquinas tales como  $\text{TNF}\alpha$  e interleukina-8, favoreciendo la muerte celular y la acumulación de miofibroblastos. Asimismo, recientes estudios indican que ciertas adipoquinas producidas por las CEH también pueden jugar un importante papel en la fibrogénesis hepática amplificando las señales inflamatorias y fibrogénicas sobre los mismos miofibroblastos activados.<sup>6,7</sup>



**Figura 2.** Sistema Renina Angiotensina. ECA, enzima conversor de angiotensina; AT1-R, receptor de angiotensina de tipo 1; AT2-R, receptor de angiotensina de tipo 2; MC-R, Receptor de mineralocorticoides. Figura adaptada de Moreno et al. 2008

Este hecho ha originado que en los últimos años haya habido un gran aumento de estudios con fármacos interfiriendo las vías de señalización implicadas en el aumento de la producción de colágeno como potencial vía terapéutica para la fibrosis hepática. Numerosas evidencias indican que el sistema renina-angiotensina (RAS, Figura 2) es un mediador clave en la fibrogénesis hepática<sup>5</sup>.

Los componentes claves del RAS se encuentran expresados en los hígados dañados crónicamente. Las CEH activadas generan angiotensina II (AII) *de novo*, el péptido efector principal de dicho sistema. La AII induce un amplio abanico de efectos profibrogénicos en las CEH incluyendo proliferación celular, migración, secreción de citoquinas proinflamatorias y síntesis de colágeno.<sup>8,9</sup> Además se encuentra bien descrito que la atenuación farmacológica o ablación genética del RAS atenúa la fibrosis hepática experimental.<sup>5</sup>

La endotelina-1 (ET-1), al igual que la AII, además de ser un importante agente vasoconstrictor se encuentra implicada en la fibrosis hepática. Se conocen tres isoformas de la endotelina que actúan a través de dos receptores (ETA y ETB).<sup>10</sup> La ET-1 y sus receptores se encuentran sobreexpresados en el hígado fibrótico y su expresión se correlaciona con la severidad de la enfermedad.<sup>11</sup> Mientras que la activación del receptor ETA estimula el aumento de la concentración de calcio libre intracelular en las CEH, y por tanto potencia la contracción y la proliferación celular, la activación del receptor ETB produce un efecto mayoritariamente antiproliferativo. En etapas tempranas de estimulación profibrogénica, el receptor mayoritario en las CEH es ETA y su activación tiene como consecuencia la estimulación de la fibrogénesis. Sin embargo, en etapas tardías, es el receptor ETB el que resulta más abundante en las CEH. Por ello el uso de antagonistas inespecíficos de ambos receptores ETA/ETB en ratas con

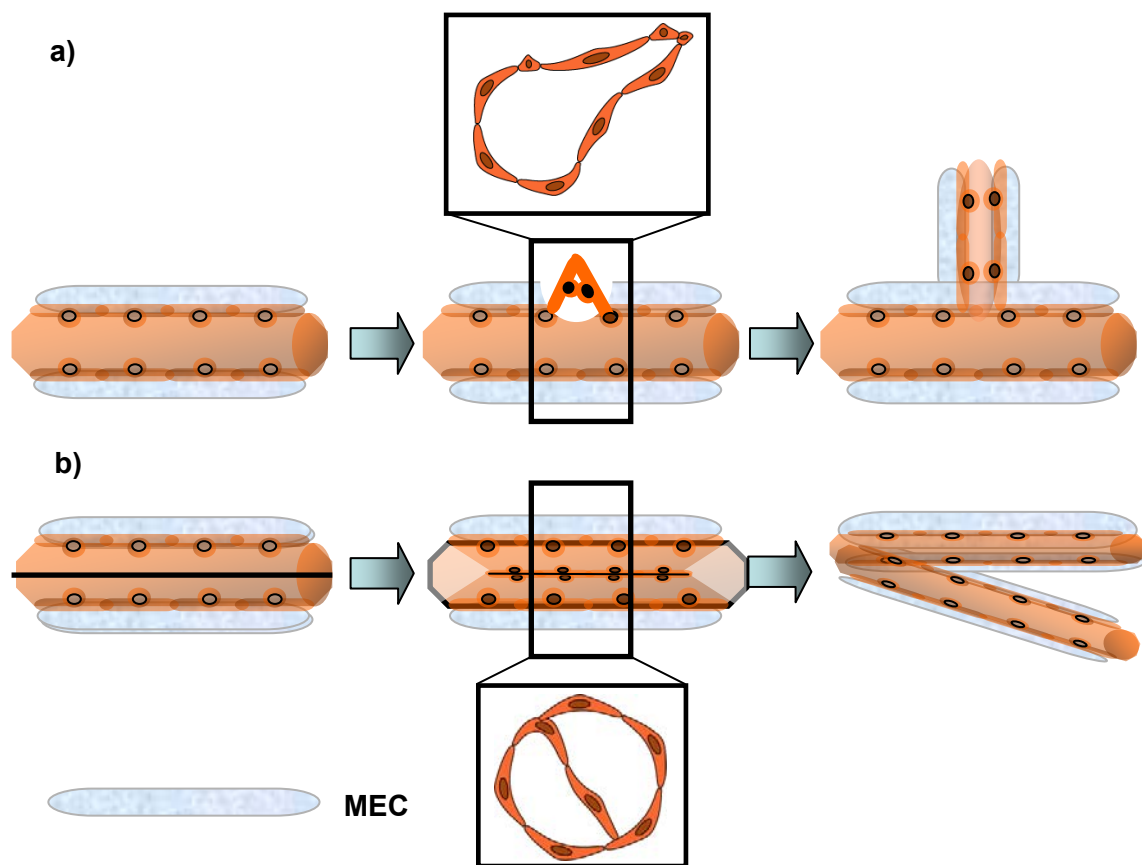
cirrosis experimental y ascitis ha tenido como resultado un aumento de la producción de colágeno hepático y por tanto de la fibrogénesis.<sup>12</sup>

### 1.2.2. Angiogénesis e inflamación:

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares a partir de una red vascular preexistente sin la participación de CEs precursoras. Este proceso es fundamental en el adulto, tanto para el proceso reproductivo como para la reparación tisular, y se encuentra altamente regulado en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando se altera el balance entre factores angiogénicos y antiangiogénicos, la angiogénesis se convierte en un importante agente etiopatogénico de un gran número de enfermedades. En este sentido, existen patologías que se caracterizan por excesiva angiogénesis (el cáncer, la artritis reumatoide, la psoriasis, y retinopatías derivadas de diabetes, la obesidad, el asma y el SIDA) y otras por insuficiente formación capilar (fibrosis pulmonar y enfermedad de Crohn, entre otras).<sup>13</sup> Hasta el momento se han descrito dos tipos de mecanismos de formación de nuevos capilares para formar una nueva red vascular:

El primero se refiere a angiogénesis generada a partir de una pequeña zona concreta de un vaso preexistente. Este proceso requiere la acción de enzimas proteolíticas tales como metaloproteinasas, plasmina, colagenasa o el activador del plasminógeno para catalizar la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal localizada entre el vaso preexistente y el tejido adyacente (Figura 3a). Tras debilitar la estructura matricial que contiene la expansión del vaso, las CEs inician la proliferación, adhesión y migración que dará lugar a una nueva extensión capilar. En fases posteriores, necesitará reclutar células murales para estabilizar dicha estructura inmadura e iniciar la formación de nueva matriz extracelular que generará la membrana basal altamente específica característica del endotelio.<sup>14</sup>

El segundo mecanismo es la invaginación longitudinal de un capilar en dos o más capilares (Figura 3b). Este tipo de angiogénesis tiene lugar por división interna de un vaso preexistente a través de la formación de pilares transcapilares dando lugar a dos nuevas entidades vasculares. En este proceso, la estabilización del tejido que divide el vaso en dos es debida a la invaginación de la matriz extracelular y de los pericitos que lo rodean. La repetición de esta serie de procesos contribuye a la expansión de la red capilar.<sup>15</sup>



**Figura 3.** Mecanismos de formación de nuevos capilares; a) Modelo de angiogénesis a partir de una región puntual. b) Modelo de angiogénesis a partir de la invaginación longitudinal de un capilar. Figura inspirada en el artículo de Carmeliet et al. 2000.

La angiogénesis y las alteraciones estructurales en los vasos sanguíneos en el adulto son claves en circunstancias de reparación tisular, isquemia cardiaca o enfermedad vascular periférica, crecimiento tumoral o metástasis.<sup>16</sup>



En la cirrosis hepática conviven los procesos de reparación tisular e inflamación crónica. Muchos tipos celulares liberan diversos mediadores inflamatorios como  $TNF\alpha$ ,  $TGF-\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8 o IL-18 que estimulan la angiogénesis de manera directa actuando sobre las CEs o indirectamente estimulando la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A) u otros factores proangiogénicos<sup>17</sup>. El infiltrado inflamatorio hepático se hace patente desde etapas muy tempranas, incluso anteriores a las manifestaciones clínicas. Esto sucede especialmente en la hepatitis viral crónica.<sup>18</sup> Dicha inflamación sostenida contribuye a la progresión de la fibrogénesis y la cirrosis.<sup>19</sup> A su vez, la angiogénesis es un elemento esencial para la persistencia y cronicidad del proceso inflamatorio. Numerosas evidencias *in vivo* demuestran la existencia de un intenso proceso de angiogénesis hepática y esplácnica durante la cirrosis.<sup>20</sup> En este contexto, la angiogénesis en el hígado cirrótico es una reacción compensatoria para combatir la falta de oxígeno y nutrientes de las células presentes en el lugar de la inflamación. Los vasos sanguíneos que se desarrollan en dicho contexto proinflamatorio son inmaduros y, por tanto, inestables. El hecho de que sean vasos inmaduros, con mayor plasticidad, por un lado favorece la elongación de los capilares pero, como contrapartida, los convierte en más susceptibles a sustancias que alteren la permeabilidad vascular.

### 1.3. Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis. Hipertensión portal y circulación hiperdinámica.

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente en la cirrosis hepática como consecuencia del aumento de la resistencia intrahepática. Se caracteriza por un incremento patológico de la presión hidrostática en el interior de la vena porta por encima de sus valores estándares de normalidad. Dicho fenómeno origina, como reacción compensatoria, la formación de un plexo vascular colateral para derivar parte

de ese incremento de flujo sanguíneo a la circulación sistémica. Este síndrome es un componente importante del origen de algunas de las complicaciones asociadas a la cirrosis como la aparición de varices gastroesofágicas o la ascitis.<sup>21</sup>

Como en cualquier sistema hidrodinámico, la presión portal (PP) viene determinada por la relación entre el flujo sanguíneo portal y la resistencia que se opone a dicho flujo (intrahepática).

La relación entre la presión, el flujo y la resistencia se define por la ley de Ohm en la siguiente ecuación:

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

P1 y P2 corresponden al gradiente de presión portal de perfusión hepática, esto es, la diferencia entre presión sanguínea de la vena porta y la de la vena cava inferior; Q se corresponde con el flujo sanguíneo de todo el sistema venoso portal y R es la resistencia vascular que supone el sistema venoso portal, las posibles venas colaterales y el mismo sinusoides hepático. Por tanto, un aumento de la presión portal puede ser consecuencia de dos fenómenos: aumento de la resistencia vascular hepática o incremento del flujo sanguíneo portal (proveniente del árbol vascular esplácnico). Normalmente, el mantenimiento de una presión portal alta es consecuencia de una combinación de ambos fenómenos. A medida que la cirrosis se cronifica, esta situación da lugar a derivaciones vasculares portosistémicas que originan varices gastroesofágicas, lo que aumenta el riesgo de posibles hemorragias gastrointestinales.<sup>22</sup> Debido a la importancia de la regulación dinámica de este sistema, existe un estricto control de la secreción de sustancias vasoconstrictoras (ET-1, AII, noradrenalina, AVP, etc) y vasodilatadoras (NO, CO y adrenomedulina, entre otros) para mantener el equilibrio hidrodinámico. Después del daño hepático este equilibrio se desplaza. Se potencia la síntesis de agentes vasoconstrictores como la ET-1 y la AII y, paralelamente, se reduce la producción de

sustancias vasodilatadoras como el NO hepático. La disminución del NO es debida a la menor actividad de vías de señalización reguladoras de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) como lo es Akt.<sup>23</sup> Además de afectar al componente hemodinámico de la ecuación, ciertas sustancias como la ET-1 y la AII aumentan también la resistencia intrahepática debido a su actividad como estimulantes de la CEH. De este modo, dichas sustancias incrementan la formación de MEC. La acumulación patológica de MEC provoca, con el tiempo, la desestructuración de la arquitectura normal de la microcirculación hepática. La distorsión acinar provoca, en último término, la formación de nódulos de regeneración y trombosis vascular. La influencia que ejerce la acumulación de MEC en la resistencia intrahepática contribuye a agravar las alteraciones hemodinámicas en la enfermedad hepática.

En 1953 Kowalski y Abelman describieron por primera vez el síndrome de circulación hiperdinámica en pacientes con cirrosis hepática. Este síndrome se caracteriza por una marcada reducción de las resistencias vasculares sistémicas, hipotensión arterial, hipervolemia y aumento del gasto cardíaco (GC). Todas estas alteraciones dan lugar a un aumento del flujo sanguíneo total. El síndrome de la circulación hiperdinámica es consecuencia de la conjunción de dos fenómenos fisiopatológicos: la vasodilatación de la circulación periférica y esplácnica, y la expansión del volumen plasmático. La vasodilatación periférica provoca la activación de los sistemas neurohumorales endógenos como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que estimula la liberación de la hormona antidiurética (ADH). La ADH promueve la retención de sal y agua a nivel renal incrementando, de este modo, el volumen plasmático. A pesar de ese intento de compensar la hipotensión, si la enfermedad progresa, la vasodilatación empeora y acaba por afectar también a la perfusión renal y pulmonar, lo que provoca, una alteración en la filtración glomerular y

el intercambio de gases, respectivamente. Dichos fenómenos se conocen como síndrome hepatorenal y síndrome hepatopulmonar, y son dos de las principales causas de muerte en pacientes cirróticos.<sup>24</sup>

### 1.4. Edema y Ascitis:

Una de las principales complicaciones de la cirrosis hepática avanzada es la producción de elevadas cantidades de líquido ascítico en el interior de la cavidad peritoneal. Aproximadamente el 50% de pacientes con cirrosis compensada desarrollan ascitis en un período de diez años desde el inicio de la cirrosis. Este suceso es un aspecto muy relevante en la historia natural de la enfermedad hepática en su fase final porque solamente un 40% de pacientes sobreviven al cabo de 2 años después de su inicio (dependiendo de la causa de la cirrosis). La restricción de la sal y la diuresis son los apoyos principales de la terapia, y estas medidas son eficaces en aproximadamente el 90% de los pacientes. La paracentesis de gran capacidad o la desviación portosistémica intrahepática transyugular se pueden utilizar en pacientes con ascitis refractarias como puente o medida paliativa frente a un futuro trasplante.

Un prerequisite básico para la formación de ascitis en pacientes con enfermedad hepática es el aumento de las resistencias vasculares en el hígado y la hipertensión portal.<sup>25</sup> La descompensación de los sistemas neurohumorales con propiedades antinatriuréticas y la disfunción en la hemodinámica sistémica son los principales factores que colaboran en la acumulación de ascitis intraperitoneal.<sup>26</sup> Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que el endotelio vascular no es una mera barrera física de separación entre el riego sanguíneo y el resto de tejidos sino que posee un papel activo muy importante tanto en procesos de transcitosis y señalización celular como en la secreción de sustancias vasoactivas.<sup>27</sup>

La ascitis en los pacientes cirróticos está formada principalmente por sal, agua, cantidades variables de albúmina y globulinas, y un relativamente bajo número de células mesoteliales y leucocitos. Debido a su relativamente simple composición, clásicamente se consideraba que la presencia de ascitis tenía poca o ninguna influencia en la red vascular peritoneal. Sin embargo, dicha afirmación ha sido puesta en duda en los últimos años ya que se ha demostrado que la ascitis posee actividad proangiogénica en modelos *in vivo* y contiene gran número de citoquinas proinflamatorias, agentes vasoactivos y proteínas de la matriz extracelular.<sup>28</sup> De hecho, algunos de dichos factores convierten a la ascitis en un fluido con propiedades vasodilatadoras, proinflamatorias y proangiogénicas.<sup>29,30</sup> Esa actividad convierte, por tanto, a la ascitis en un fluido bioactivo que puede contribuir a cronificar el proceso de extravasación vascular una vez que éste se ha iniciado.

Puesto que la ascitis se encuentra localizada en la cavidad peritoneal del paciente cirrótico, tradicionalmente se ha culpado directamente al hígado como causante de su formación. De hecho se demostró en un modelo experimental canino que el hígado cirrótico deja escapar exudado a su entorno.<sup>31</sup> Sin embargo, no quedaba claro si podía ser el único órgano abdominal implicado en su formación, ni tampoco los mecanismos moleculares que gobernaban dicho suceso en la cirrosis hepática.

## 2. PERMEABILIDAD VASCULAR:

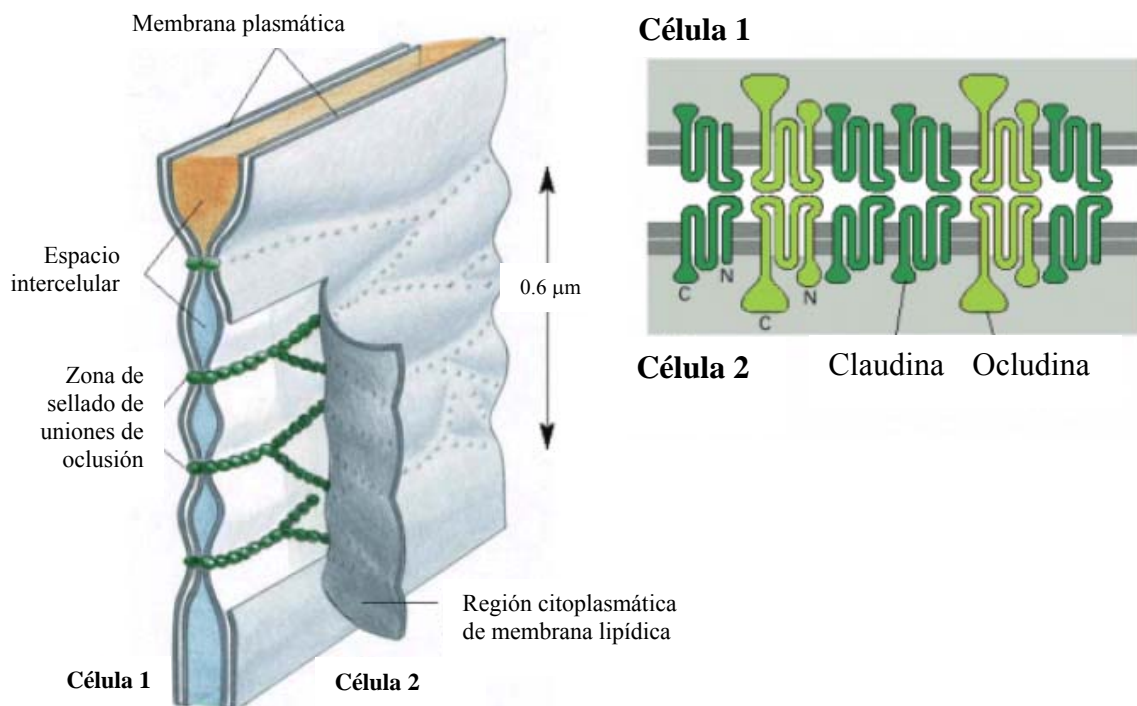
### 2.1 Aspectos Generales. Tipos de uniones célula-célula. Uniones endoteliales.

La permeabilidad vascular puede ser definida como el movimiento de fluidos y moléculas entre el compartimiento vascular y el extravascular. El proceso de permeabilidad vascular es muy complejo y depende de un gran número de variables como, por ejemplo, las propiedades físicas del fluido o las moléculas que son transportadas (tamaño, carga o configuración), gradientes entre compartimentos (presión o concentración) y el modo de transporte (a través de canales o vesículas dentro de una

célula individual o a través de las uniones interendoteliales entre células adyacentes).<sup>32</sup> La integridad de la unión endotelial célula-célula y la función de la barrera vascular se encuentran reguladas por una serie de moléculas de adhesión que reciben el nombre de uniones celulares. Las uniones celulares son regiones especializadas de la membrana plasmática en las que se concentran proteínas transmembrana especiales, mediante las cuales se establecen conexiones entre dos células o entre una célula y la matriz extracelular. Existen diversos tipos de uniones celulares:

**A- Uniones de oclusión (o estrechas):**

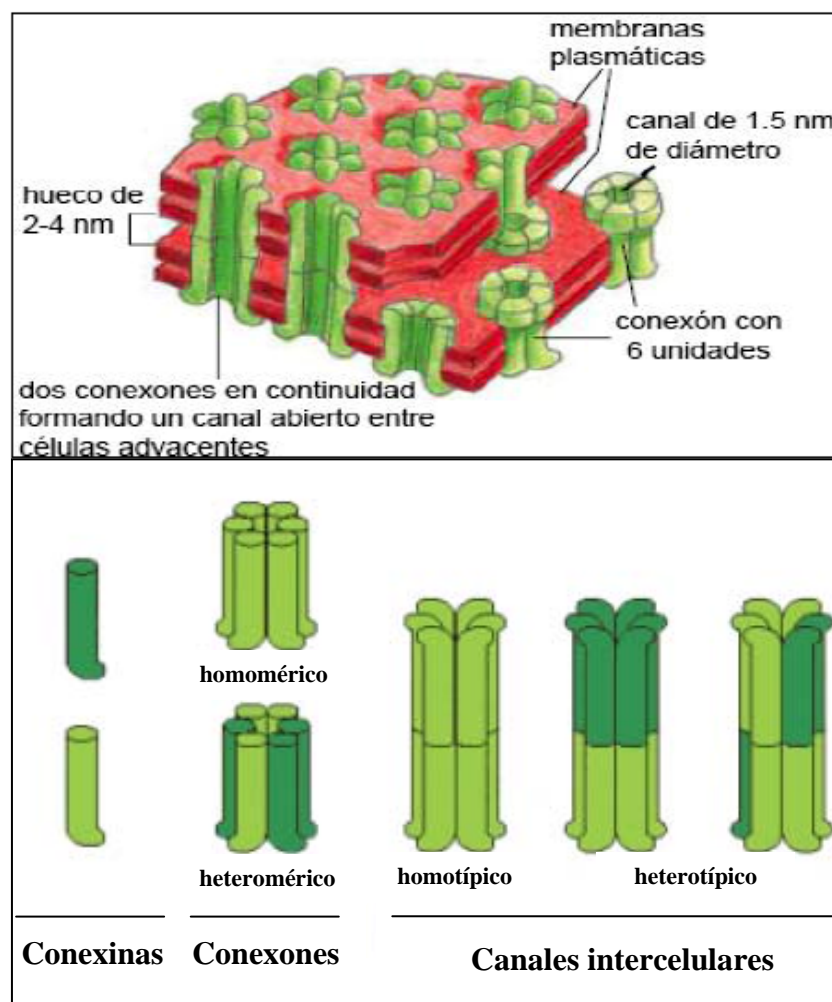
Separan medios de composición muy diferente. Están compuestas por las proteínas claudinas y ocludinas que se disponen en cadenas a lo largo de la línea de unión para formar una barrera (Figura 4). Su función es impedir la libre difusión de los solutos o moléculas hidrosolubles. Además, mantienen la polaridad de los epitelios impidiendo que las proteínas transportadoras puedan difundir de un dominio a otro de la célula. Se localizan en gran cantidad entre las células epiteliales intestinales.



**Figura 4.** Uniones de oclusión. Figura adaptada de Alberts et al. 2002

### B- Uniones de comunicación o de hendidura (tipo GAP)

Se componen de canales entre dos membranas plasmáticas de tal manera que se produce una comunicación directa entre los citoplasmas de dos células vecinas. Este fenómeno permite el paso de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles. Un canal es un conexón formado por 6 subunidades denominadas conexinas (Figura 5). Su función es la de permitir el acoplamiento eléctrico y metabólico entre células vecinas. Son importantes en el sistema nervioso, el músculo cardíaco y el músculo liso.



**Figura 5.** Uniones de hendidura. Figura adaptada de Alberts et al. 2002.

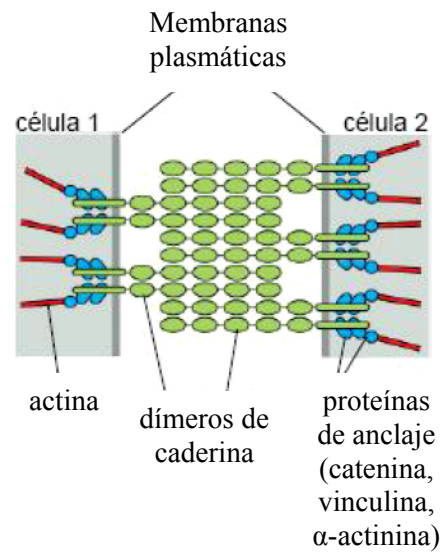
### C- Uniones de anclaje:

Son uniones que conectan los citoesqueletos de dos células vecinas o el citoesqueleto a la matriz extracelular dando resistencia a los epitelios. Son especialmente importantes en los tejidos sometidos a tensión mecánica como el endotelio vascular.

Clasificación:

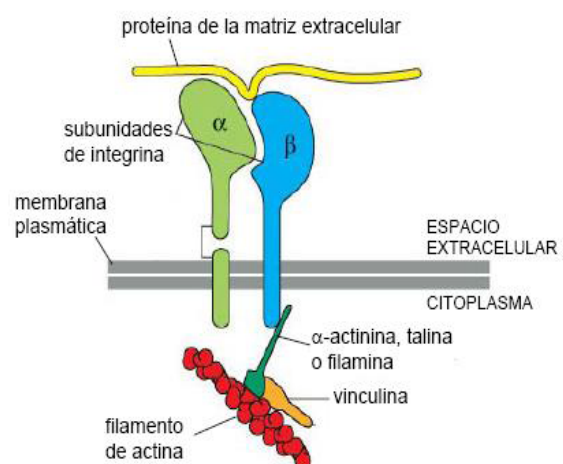
#### C1. Unión de filamentos de actina:

- Uniones adherentes (célula-célula): Son uniones estables célula-célula que se extienden a lo largo de todo el perímetro celular. Las caderinas de ambas células se unen directamente por su región extracelular. Por su dominio citosólico se unen a filamentos de actina a través de proteínas de anclaje (Figura 6). La polimerización de las caderinas se regula sobretodo a través de la modificación de los niveles de calcio intracelular.



**Figura 6.** Uniones adherentes. Figura adaptada Alberts et al. 2002.

- Contactos focales (célula-matriz extracelular): Son uniones estables entre la célula y la MEC. Las integrinas se unen por su dominio extracelular a una proteína de la MEC y a través de su región intracelular a los filamentos de actina mediante un complejo proteico formado por diferentes proteínas acopladoras (Figura 7).

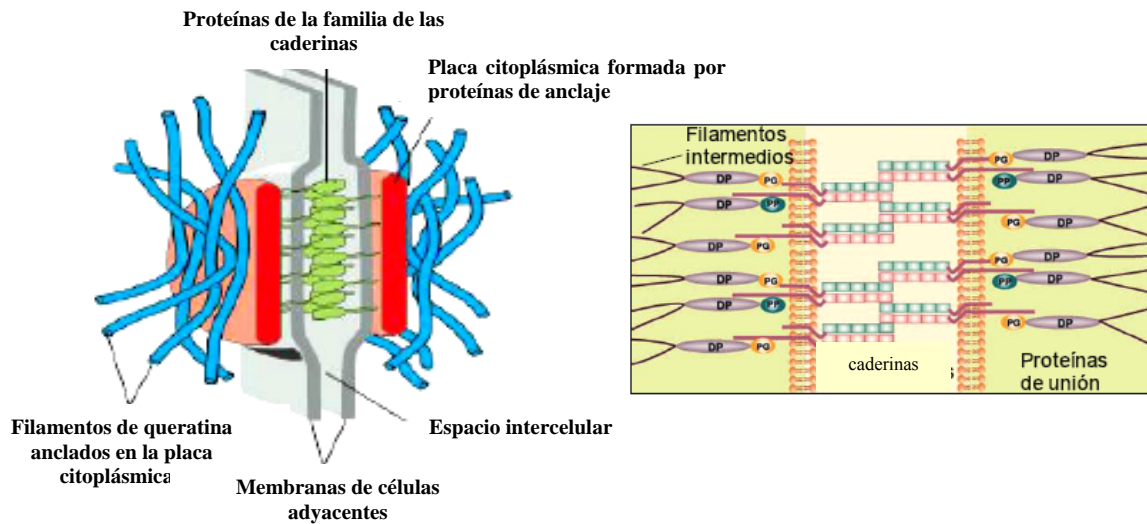


**Figura 7.** Contactos focales. Figura adaptada de Alberts et al. 2002.



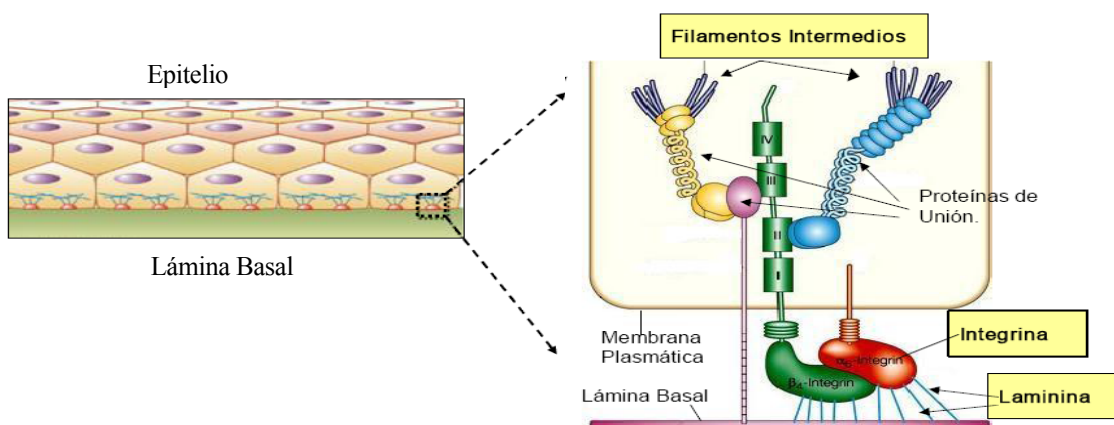
**C2. Unión a filamentos intermedios:**

- Desmosomas (célula-célula): Son contactos puntuales célula-célula. Proteínas de la familia de las caderinas que se unen directamente a través de su dominio extracelular. Por su región citosólica se unen a los filamentos intermedios o queratinas mediante proteínas de unión (Figura 8). Proporciona a la célula fuerza de tracción.



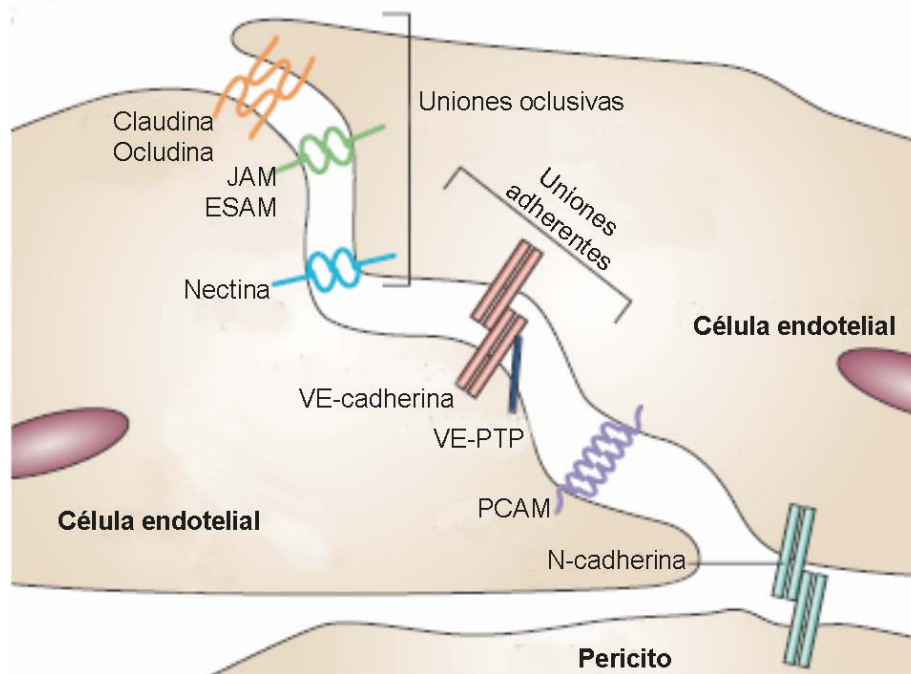
**Figura 8.** Desmosomas. Figura adaptada de Alberts et al. 2002.

- Hemidesmosomas (célula-MEC): Son uniones célula-matriz extracelular. Las integrinas se unen por su región extracelular a la laminina de la lámina basal y por su dominio citosólico a los filamentos de queratina mediante proteínas de unión (Figura 9).



**Figura 9.** Hemidesmosomas. Figura adaptada Alberts et al. 2002.

**Uniones celulares endoteliales:** En el endotelio vascular conviven diversos tipos de uniones intercelulares de las mencionadas para mantener la homeostasis hidrosalina de la sangre (Figura 10).



**Figura 10.** Uniones interendoteliales. Figura adaptada de Dejana et al. 2004.

Además del importante papel de las uniones celulares, el flujo sanguíneo es un componente que ejerce una notable influencia como fuerza impulsora del movimiento de fluidos a través de los vasos sanguíneos. Pero además de dichos componentes fisicoquímicos, existen diversos factores sintetizados y liberados por diversos tipos celulares en respuesta a diferentes estímulos físicos o químicos que pueden afectar al proceso de permeabilidad vascular. Dichas sustancias constituyen un amplio abanico de mediadores inflamatorios o proangiogénicos. Por ejemplo, la Histamina, VEGF-A o la Angiopoyetina 2 (Ang-2) pueden actuar a diferentes niveles de regulación de la extravasación por diferentes vías de señalización, o colaborar sinérgicamente en un mismo proceso fisiológico o fisiopatológico. Por todas estas razones, los mecanismos de

permeabilidad vascular se pueden clasificar, a grandes rasgos, en dos grandes grupos: Mecanismos físicos y mecanismos mediados por sustancias vasoactivas.

## 2.2. Mecanismos que regulan la permeabilidad vascular:

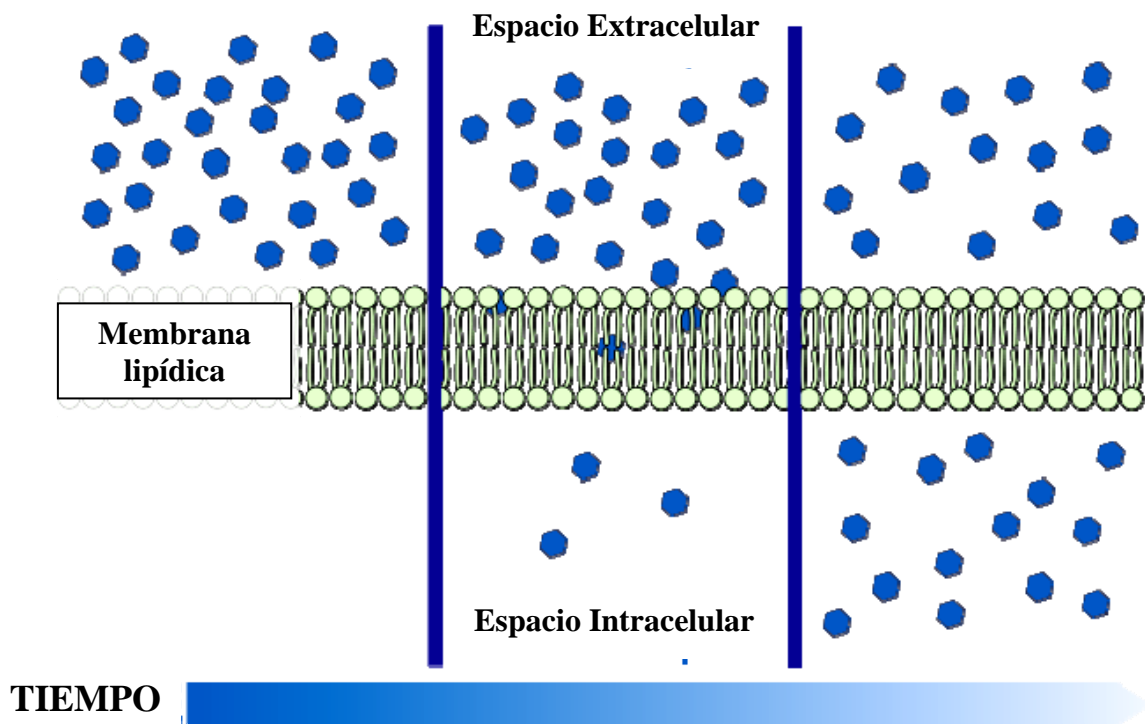
### 2.2.1. Mecanismos físicos.

Un vaso sanguíneo puede ser considerado como un conducto semipermeable por el que circula un fluido con una determinada concentración proteica (presión oncótica), a un determinado flujo y, por tanto, es posible aplicar a este sistema la ley de Fick. La ley de Fick es una ley cuantitativa formulada como ecuación diferencial que describe diversos casos de difusión de materia o energía en un medio en el que inicialmente no existe equilibrio químico o térmico. En situaciones en las que existen gradientes de concentración de una sustancia, se origina un flujo que tiende a homogenizar la disolución y uniformizar la concentración. El flujo homogenizador sería una consecuencia estadística del movimiento azaroso de las partículas que da lugar al segundo principio de la termodinámica. Así que los procesos físicos de difusión pueden ser analizados como procesos físicos o termodinámicos irreversibles. El enunciado general para membranas semipermeables de la ley de Fick reza que, en el caso de existir diferencia de concentración de cualquier especie (concentración de sustancia o temperatura) entre ambos lados de la membrana, el paso aleatorio de moléculas a través de la misma tendrá lugar desde las regiones con mayor concentración hacia las regiones de menor concentración (Figura 11). El flujo de sustancia irá en sentido opuesto al gradiente de concentración y, si éste es débil, podrá aproximarse por el primer término de la serie de Taylor, resultando la ley de Fick:

$$\mathbf{J = - D \nabla C}$$

Siendo  $D$  el coeficiente de difusión de la especie de concentración  $C$ .  $D$  es característica tanto del soluto como de la especie en que se disuelve.  $J$  es el flujo de sustancia.

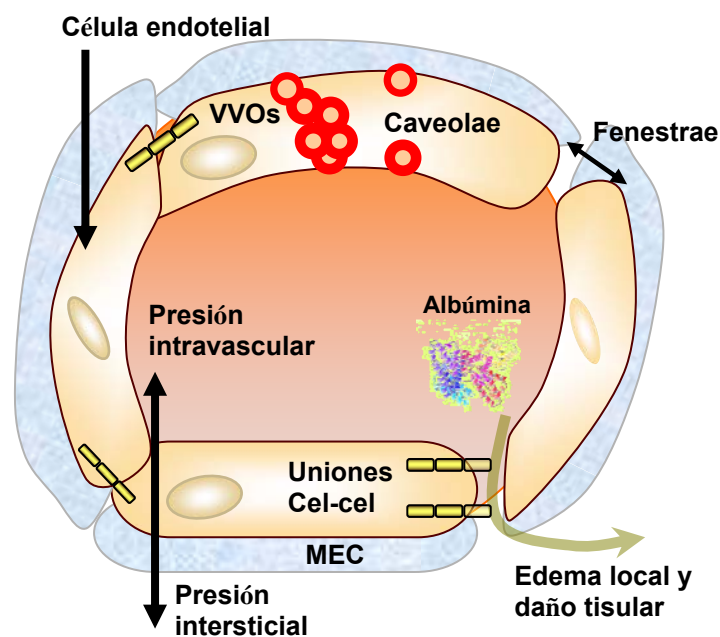
Por lo general, los procesos de difusión de solutos están sujetos a la ley de Fick permitiendo el paso de partículas y disolvente siempre a favor de gradiente de concentración (Figura 11). La difusión es un proceso que no requiere aporte energético y es el método más habitual como forma de intercambio celular de solutos. Aunque se han realizado aproximaciones matemáticas mucho más complejas que las mencionadas utilizando vasos sanguíneos aislados,<sup>33</sup> resulta prácticamente imposible cuantificar con un modelo matemático estático la enorme dinámica que suponen los cambios de señalización en la membrana celular endotelial. También suma dificultades a este respecto el diferente comportamiento de las distintas regiones que forman la membrana endotelial (luminal, interendotelial, vasolateral) en respuesta a sustancias vasoactivas o cambios hemodinámicos *in vivo*.



**Figura 11.** Esquema de difusión pasiva de soluto a través de membrana celular

### 2.2.2. Sustancias vasoactivas.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que el endotelio vascular posee un papel activo muy importante en la regulación de la permeabilidad vascular, sobretodo en procesos tumorales,<sup>34</sup> pero también en todas aquellas enfermedades que cursan con edema y/o ascitis. Contrariamente a los mecanismos físicos o pasivos, la mediación de vías de señalización para estimular la circulación de sustancias a través de la membrana endotelial es un proceso activo y, por tanto, requiere gasto energético en forma de ATP. Determinadas sustancias vasoactivas como VEGF y Angiopoyetina-2 pueden inducir extravasación de solutos de diferentes tamaños a través del endotelio por medio de un gran número de mecanismos como son las fenestraciones (o fenestrae), caveolas (o caveolae), organelas vesículo-vacuolares (VVOs), a través del paso de las uniones interendoteliales o por difusión simple (Figura 12). La hiperpermeabilidad, en última instancia, depende de los gradientes de presión relativa entre el compartimento vascular y el extravascular. Por tanto, no se contempla que un vaso pueda ser hiperpermeable si no existe una presión intersticial superior a la del interior del vaso sanguíneo.



**Figura 12.** Mecanismos de transporte activo de sustancias. Figura inspirada en Weiss et al. 2005.

### 2.3. Neovascularización y permeabilidad vascular:

#### 2.3.1. Factores proangiogénicos:

El hígado cirrótico experimenta un intenso proceso de angiogénesis en respuesta a la hipoxia tisular y al aumento de la resistencia intrahepática. Como en cualquier otro proceso fisiopatológico, existe un estrecho equilibrio entre todos los agentes que colaboran para llevar a cabo la generación de un vaso sanguíneo a partir de uno ya existente. Algunos de dichos agentes se comportan como desestabilizadores de la estructura basal, volviéndola más elástica, para permitir la proliferación y migración de las CEs de manera direccionada, o polarizada, hacia aquellas regiones que necesiten riego sanguíneo. Dichos agentes proangiogénicos, junto con otros factores, reclutarán finalmente células alrededor del vaso sanguíneo (pericitos) para estabilizar la estructura formada. En aquellos procesos donde la angiogénesis concurre con la inflamación dichos vasos inmaduros son especialmente susceptibles de sufrir pérdidas de plasma hacia el entorno perivascular (edema).

##### 2.3.1.1. Familia del factor de crecimiento endotelial vascular.

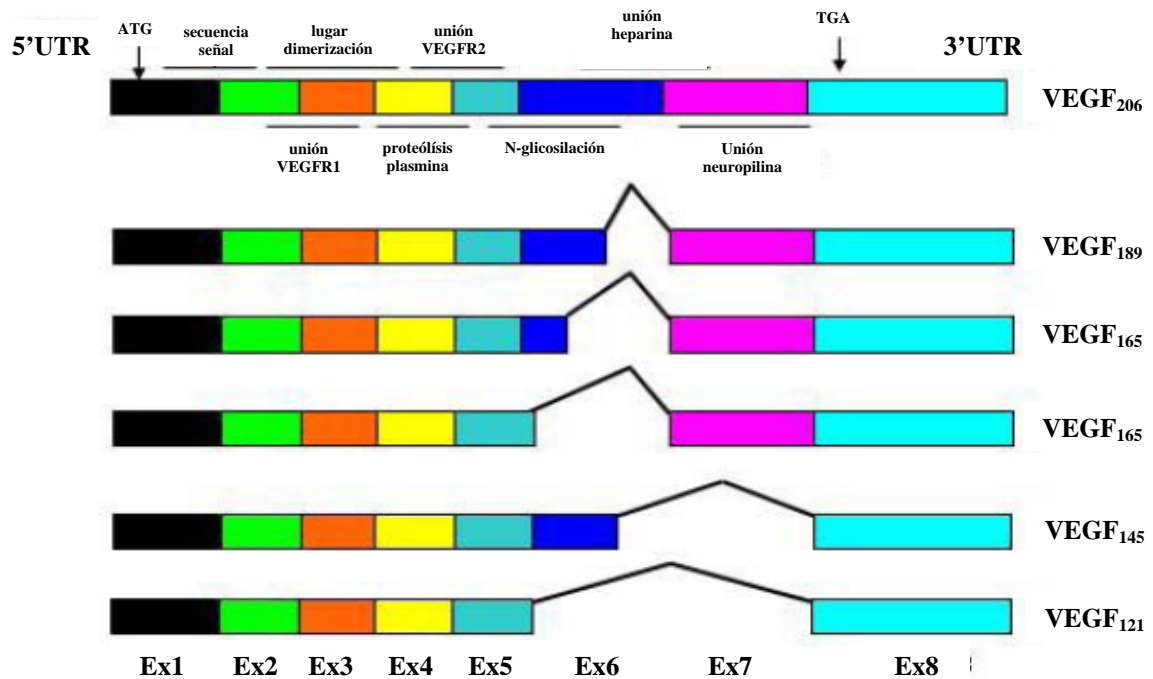
VEGF fue purificado en el año 1989 por Napoleone Ferrara que lo describió como un potente mitógeno proveniente de las células foliculares de la pituitaria bovina. Dicho polipéptido ya había sido previamente aislado por Harold Dvorak quien lo bautizó en 1983 como factor de permeabilidad vascular (VPF) debido a su gran capacidad de inducir extravasación plasmática.

La familia del VEGF es esencial para los procesos de diferenciación, proliferación y quimiotaxis en la vasculogénesis, angiogénesis fisiológica y patológica y en la linfangiogénesis. La importancia de la función de este sistema en el organismo se ejemplifica en que la pérdida de un alelo de VEGF causa defectos vasculares embrionarios letales.<sup>35</sup>

La familia del VEGF está formada por 7 genes que dan lugar a glicoproteínas diméricas estructuralmente relacionadas:

- VEGF-A (conocido como VEGF)
- VEGF-B
- VEGF-C
- VEGF-D
- VEGF-E (del virus huérfano parapox)
- VEGF-F (del veneno de serpiente)
- PlGF (Factor de crecimiento Placentario)

El gen de VEGF-A genera 5 isoformas a partir de un splicing alternativo dando lugar a péptidos de 121, 145, 165, 189 o 206 aminoácidos (las formas murinas tienen un aminoácido menos). Las isoformas 121, 165 y 189 son las que se encuentran con mayor frecuencia tanto a nivel circulante como en los tejidos y, por tanto, son las que desempeñan las funciones principales características de dicha familia (Figura 13).



**Figura 13.** Estructura exónica del mRNA de VEGF. Figura adaptada de Bates DO et al. 2002.

Aunque muchas de las acciones “in vitro” de dichas isoformas de VEGF-A son comunes, su comportamiento es divergente cuando se trata de sistemas “in vivo”. Esto es debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas de cada fragmento.<sup>36</sup> Por ejemplo, VEGF<sub>165</sub> es la isoforma más abundante y estudiada. Es una molécula con carga positiva que se une a dominios de heparina, y se puede encontrar tanto en forma soluble como unida a membrana a través de la MEC. Tanto esta isoforma como VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> (que también se unen a dominios heparina) tras unirse a la MEC pueden ser liberadas mediante la acción de proteasas (como la uroquinasa) secretadas en el entorno de manera autocrina o paracrina. VEGF<sub>121</sub> es un polipéptido ácido que no se une a heparina y, por tanto, se encuentra de manera soluble pudiendo difundir, de este modo, con mucha más facilidad. Sin embargo, la pérdida del dominio de unión con heparina produce una disminución de la actividad mitogénica de VEGF-A. Esto significa que VEGF<sub>165</sub> posee las características óptimas en cuanto a disponibilidad y actividad biológica.<sup>37,38</sup>

La expresión de VEGF se encuentra altamente regulada principalmente a nivel transcripcional. En este sentido, la hipoxia es uno de los principales estimulantes de la síntesis de VEGF, tanto por estimulación directa del promotor del gen como por estabilización del mRNA. Diversos factores de crecimiento pueden promover su síntesis (EGF, PDGFBB, IGF-1, FGF, TNF, HGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  y otras interleuquinas proinflamatorias como IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-13). También pueden inducir su transcripción algunas hormonas como la TSH, ACTH, gonadotropinas, estradiol y las progestinas.<sup>39</sup>

No solamente incrementando la expresión de VEGF se puede potenciar su acción vascular sino también aumentando la actividad de la proteína encargada de liberarlo de la membrana, esto es, el activador de la uroquinasa de plasminógeno y su

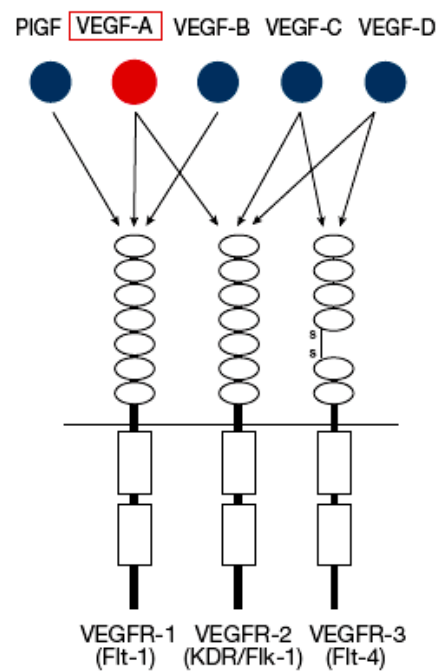


receptor (uPA/uPAR).<sup>40</sup> De hecho, este sistema de activación permite un aumento sostenido de actividad de forma localizada en aquella región del tejido afectado sin perturbar la red periférica vascular. En última instancia, el control de su liberación permite llevar a cabo una mejor regulación de la actividad de VEGF tanto para realizar de manera continua y progresiva el complejo proceso de angiogénesis como para cronificar procesos inflamatorios localizados.

### 2.3.1.2. Receptores de VEGF. Funciones.

La familia de VEGF se une y activa tres receptores tirosina quinasa transmembrana (Figura 14):

- **VEGFR<sub>1</sub> o Flt-1.** Posee afinidad por los factores VEGF-A, VEGF-B y PlGF-1 y 2. Este receptor se expresa en las CE, células musculares lisas y monocitos, entre otras.
- **VEGFR<sub>2</sub>, KDR o Flk-1.** Posee afinidad por los factores VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Este receptor se expresa predominantemente en las CE vasculares sanguíneas.
- **VEGFR<sub>3</sub> o Flt-4.** Posee gran afinidad por los factores VEGF-C y VEGF-D. Este receptor se localiza principalmente en las CE linfáticas.



**Figura 14.** Receptores de la familia de VEGF  
Yancopoulos GD et al. 2000

Además de los mencionados receptores de membrana existen tres receptores más en esta familia pero sin dominio tirosina quinasa: Una forma soluble del VEGFR<sub>1</sub> (sVEGFR<sub>1</sub>), NP1 y NP2. La forma sVEGFR<sub>1</sub> podría funcionar como un secuestrador natural de VEGF ya que competiría por la unión del polipéptido sin posibilidad de

realizar un efecto intracelular. Respecto a NP1, dicho receptor es capaz de unir PlGF, VEGF-B y VEGFA<sub>165</sub> pero no VEGFA<sub>121</sub>. Dicho receptor funciona como co-receptor sinérgico de la interacción de VEGF con VEGFR<sub>2</sub> y VEGFR<sub>1</sub> incrementando la angiogénesis tumoral “in vivo”. En cambio, NP2 se une a VEGFA<sub>145</sub>, VEGFA<sub>165</sub>, PlGF y VEGF-C y se encuentra más relacionado con formación de vasos linfáticos.<sup>41</sup>

La mayoría de las señales angiogénicas y promotoras de permeabilidad vascular inducidas por la molécula VEGF-A en las CEes están mediadas por el receptor 2 de VEGF. VEGFR<sub>2</sub> está formado por una región extracelular de 7 dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y un dominio tirosina quinasa de 70 aminoácidos. Además de expresarse en las CEes, también se expresa en células neuronales, osteoblastos, megacariocitos y células progenitoras hematopoyéticas. La expresión del receptor se encuentra regulada por sus mismos ligandos. Al igual que sucedía con su ligando, la expresión de este receptor resulta esencial para el desarrollo vascular. Los ratones deficientes en VEGFR<sub>2</sub> mueren por deficiencias en el proceso de vasculogénesis y en la formación de células hematopoyéticas.<sup>42</sup>

Las células endoteliales expuestas a VEGF permiten el paso de sustancias de diferentes tamaños por una gran variedad de mecanismos moleculares. VEGF puede inducir la formación de fenestraciones o de pequeños poros permitiendo el paso de solutos de bajo peso molecular.<sup>43</sup> VEGF también induce la formación de caveolas, (pequeñas invaginaciones del plasmalema) y organelas vesículo vacuolares (VVO, fusión de vesículas para formar un canal a través del citoplasma de la célula endotelial) que permiten el transporte vesicular de pequeñas proteínas a través del citoplasma de una célula endotelial singular. El paso de proteínas de alto peso molecular, en cambio, ocurre muy probablemente a través de las uniones entre células endoteliales adyacentes. Se han descrito como límites funcionales del transporte transvascular los valores de

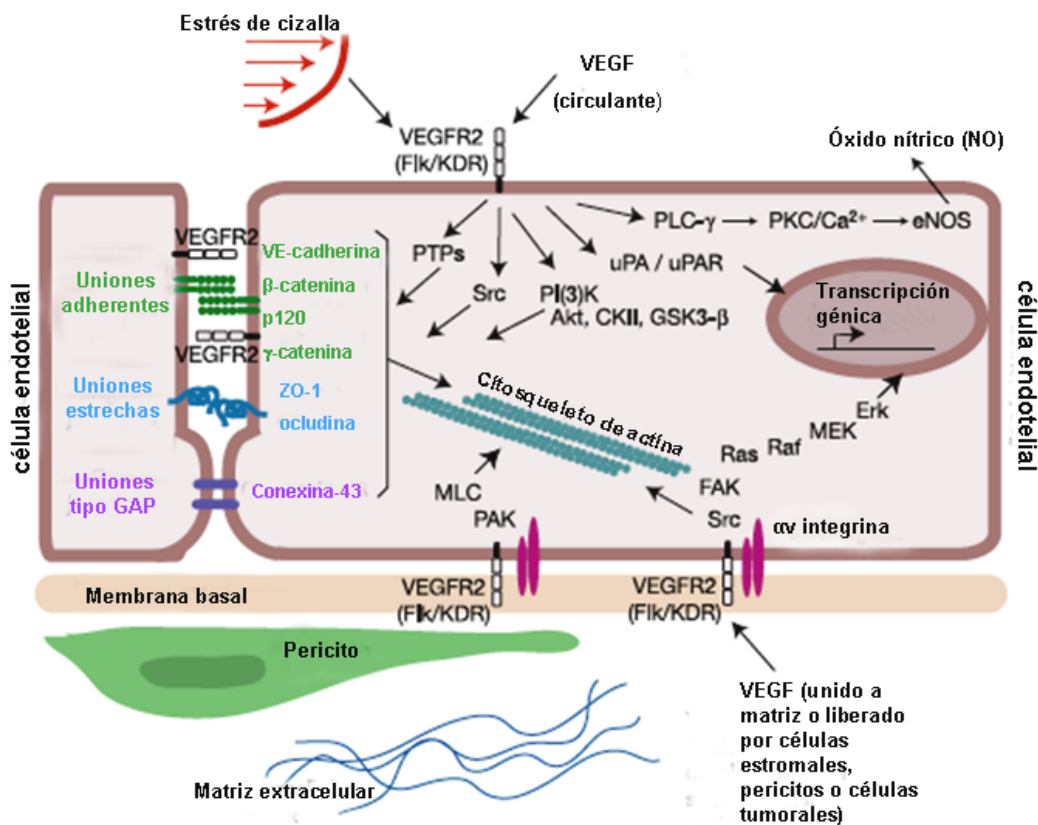
corte de tamaño de poro entre 200 nm y 1,2  $\mu$ m en vasos asociados a tumores subcutáneos.<sup>44</sup>

El tamaño y el número de uniones celulares y poros se ven afectados por VEGF de manera dosis-dependiente y varía entre lechos vasculares. Esto sugiere que existen diferentes umbrales de dosis para VEGF en diferentes tejidos o tipos de tumores. Diversos estudios han demostrado que concentraciones muy concretas de VEGF exógeno podrían ser utilizadas para manipular la barrera vascular y aumentar la liberación de agentes antitumorales.<sup>45</sup> Cuando la integridad de las uniones entre CEs se deteriora *in vivo*, la consecuencia es la extravasación de proteínas del plasma y células sanguíneas.

La unión de VEGF al receptor VEGFR<sub>2</sub> bloquea la comunicación entre uniones de células endoteliales adyacentes, en gran medida a través de la activación de las quinasa Src y Yes<sup>41</sup> y de la fosforilación de la proteína conexina-43 (Figura 15). VEGF también es capaz de alterar la estabilidad de las uniones estrechas por medio de la fosforilación de la proteína zonula ocludens (ZO-1) y ocludina, también en gran parte a través de la vía de Src.<sup>46</sup> Muchas proteínas de las uniones adherentes (VE-caderina,  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina/placoglobulina y p120 catenina) son también fosforiladas por el dominio tirosina quinasa del propio VEGFR<sub>2</sub>, tras la activación del mismo,<sup>47</sup> conduciendo al debilitamiento de los contactos célula-célula entre CEs *in vitro*. *In vivo*, se ha comprobado que el bloqueo de la actividad de la VE-caderina (mediante un anticuerpo) es suficiente para provocar extravasación vascular y hemorragia.<sup>48</sup>

Una gran variedad de otras vías de señalización iniciadas por VEGF y VEGFR<sub>2</sub> pueden actuar contribuyendo a la extravasación. Por ejemplo, la fosforilación de eNOS, PLC- $\gamma$ , la proteína quinasa C o la vía clásica de proliferación celular RAS-Raf-1-MEK-MAPK, entre otras. A parte de estas vías, VEGF activa la quinasa p21 (PAK) que se

localiza en las uniones interendoteliales y se requiere para la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y la contractibilidad celular.<sup>49</sup> En ausencia de VEGF, la activación del VEGFR<sub>2</sub> debida a estrés de cizalla es suficiente para inducir una respuesta de permeabilidad vascular mediada por integrinas (Figura 15). Dicha activación resulta en la reorganización de las proteínas de las uniones adherentes.<sup>50,51</sup> Incluso la proteína de adhesión focal (FAK) de la vía de señalización mediada por integrinas es efectiva en el proceso de hiperpermeabilidad inducido por VEGF.<sup>52</sup> Aunque la transducción de señales de quinasas, fosfatasa, moléculas de adhesión célula-célula o célula-matriz, y las fuerzas físicas son todas requeridas para estimular la extravasación vascular, continua siendo poco comprendido como estas vías de señalización tan dispares pueden converger para crear un estímulo único de hiperpermeabilidad en respuesta a VEGF.



**Figura 15.** Vías de señalización implicadas en la permeabilidad vascular inducida por VEGF y VEGFR<sub>2</sub>. Figura adaptada de Weiss SM et al. 2005.

El edema es la acumulación de fluidos en el espacio extravascular y se asocia con hinchazón local y aumento de la presión intersticial. Los lugares de extravasación donde la membrana basal queda expuesta pueden atraer plaquetas<sup>53</sup> o incluso células tumorales<sup>54</sup> para utilizar esa zona como lugar de adhesión o de migración transendotelial. Las propias plaquetas adheridas a la obertura entre células endoteliales pueden, a menudo, liberar grandes cantidades de VEGF, por tanto induciendo más extravasación y atrayendo más plaquetas. Además, pueden rápidamente ocluir un vaso pequeño y causar isquemia local, lo que puede inducir todavía mucha más expresión de VEGF y por tanto estimular la aparición de más oberturas interendoteliales.

VEGFR<sub>1</sub> también está formado por un dominio extracelular con siete dominios de tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa. Tal como sucede con VEGF-A, la expresión de VEGFR<sub>1</sub> se estimula también directamente por hipoxia. Aunque su dominio quinasa tiene una actividad muy baja, algunos estudios sugieren que VEGFR<sub>1</sub> es crítico en el proceso de angiogénesis en adultos, mayoritariamente en condiciones patológicas.<sup>55</sup> La importancia de este receptor queda patente en que los ratones deficientes en VEGFR<sub>1</sub> mueren a causa de una desorganización vascular causada por el crecimiento exagerado de las CEs. Por tanto, VEGFR<sub>1</sub> podría funcionar como un secuestrador de VEGF-A durante la embriogénesis regulando la actividad de VEGFR<sub>2</sub> por competición con el sustrato en los vasos sanguíneos en desarrollo.<sup>39</sup>

#### 2.3.1.3. Familia de las angiopoyetinas.

Otro sistema de señalización involucrado en el mantenimiento, crecimiento y estabilización de los vasos sanguíneos es el formado por las angiopoyetinas y sus receptores. Este sistema consta de dos receptores tirosina quinasa (Tie-1 y Tie-2) y cuatro ligandos: Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4. Los ligandos más conocidos y mejor

caracterizados de Tie-2 son Ang-1 y Ang-2. Sorprendentemente, de momento no se ha identificado ningún ligando para Tie-1. De todos modos, a concentraciones muy elevadas, Ang-1 es capaz de unirse a Tie-1 a través de integrinas.<sup>56,57</sup>

Ang-1 se expresa de manera constitutiva en diferentes tipos celulares: pericitos, células de músculo liso, fibroblastos y algunas células tumorales. La expresión constitutiva de Ang-1 y los bajos niveles de fosforilación de Tie-2 en la red vascular adulta sugieren que la señalización de Tie-2 mediada por Ang-1 se encarga de controlar la quiescencia vascular.

Ang-2 se une a Tie-2 pero no induce la fosforilación del receptor, sugiriendo que Ang-2 actúa como antagonista de dicho receptor.<sup>58</sup> Los ratones deficientes para Ang-2 se desarrollan con normalidad salvo que algunos de ellos mueren al cabo de 14 días a causa de la aparición de ascitis quilosa y edema subcutáneo característicos de una malformación de los vasos linfáticos.<sup>59</sup> La liberación de Ang-2 da lugar a una desestabilización rápida del endotelio, sugiriendo que Ang-2 funciona como un regulador negativo del endotelio en estado quiescente. Además, Ang-2 desencadena una respuesta inflamatoria por medio de la activación del endotelio y la inducción de permeabilidad vascular.<sup>60</sup> La localización de la Ang-2, en condiciones normales, es casi exclusiva de las CEs aunque también se ha detectado en otros tipos celulares.

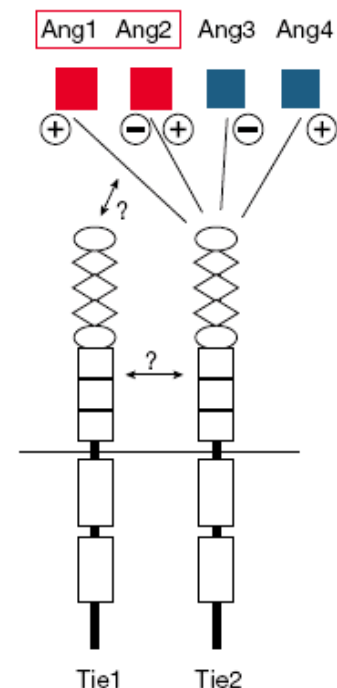
La expresión de Ang-2 está altamente regulada tanto por hipoxia como por diversas citoquinas como el FGF-2, VEGF y TNF $\alpha$  o por los niveles elevados de glucosa o superóxido.<sup>61</sup> Contrariamente a la expresión relativamente estable de Ang-1, Ang-2 se expresa principalmente en regiones de remodelado vascular, incluyendo el aparato reproductor femenino y algunos tumores.<sup>62</sup> En estos tejidos, Ang-2 se encuentra sobreexpresada conjuntamente con VEGF-A específicamente en los lugares de angiogénesis activa, mientras que en zonas de regresión vascular, la expresión de

VEGF-A en relación con Ang.-2 está disminuida. Estas observaciones sugieren un modelo donde la unión de Ang-2 a Tie-2 no induzca ninguna función específica, sino que interfiera con el efecto estabilizador de Ang-1 aumentando la sensibilidad de los vasos a la acción de otros factores proangiogénicos. En consistencia con este modelo, diversos laboratorios han demostrado que Ang-2 es capaz de potenciar la capacidad de respuesta a VEGF en diferentes territorios vasculares.<sup>63</sup>

Otros estudios han demostrado que Ang-1 y Ang-2 tienen funciones similares. Por ejemplo, la estimulación sostenida de CEs con Ang-2 es capaz de inducir la fosforilación de Tie-2, así como la señalización de Akt que promueve supervivencia y migración celular. Además, Ang-2 puede estimular la quimiotaxis y la formación tubular de CEs en geles de colágeno o en esferoides. En este contexto, estudios *in vivo* han demostrado que Ang-2 puede actuar como factor proangiogénico.<sup>64</sup>

#### 2.3.1.4. Receptores de las angiopoyetinas. Funciones.

Tanto Ang-1 como Ang-2 se unen al mismo lugar del dominio extracelular de Tie-2 con afinidades similares (Figura 16). La unión de Ang-1 a Tie-2 provoca la autofosforilación del receptor lo que promueve migración y supervivencia endotelial. Este concepto se refuerza en que los ratones deficientes en Ang-1 y Tie-2 muestran fenotipos similares, ya que mueren en el desarrollo fetal a causa de defectos en el remodelado vascular del plexo capilar primario y en el desarrollo del corazón. Esta similitud de fenotipos sugiere que la activación de Tie-2 por parte de Ang-1 media el remodelado y la estabilización de las



**Figura 16.** Receptores de la familia de las angiopoyetinas.  
Yancopoulos GD et al. 2000

interacciones célula-célula y célula-MEC, desempeñando un papel importante en el reclutamiento de células periendotheliales en los vasos sanguíneos. Los ratones deficientes en Ang-1 presentan un fenotipo menos severo que los carentes de Tie-2, sugiriendo que otras angiopoyetinas pueden participar en la señalización de Tie-2 durante el desarrollo vascular.<sup>65</sup>

Ambos receptores se expresan casi de manera exclusiva en las CEs y en células progenitoras hematopoyéticas, aunque la expresión de Tie-2 también se ha encontrado en monocitos y eosinófilos asociados a tumores. Tie-1 y Tie-2 tienen una estructura similar que consiste en un dominio extracelular con un 33% de similitud y un dominio tirosina quinasa intracelular que muestra una similitud del 67 %.

El hecho de que las células musculares lisas no expresen Tie-2 ha llevado a la hipótesis de que las CEs regulan el recubrimiento de las células musculares de manera paracrina mediante la activación de Tie-2. De esta manera Ang-1, derivada de células mesenquimales, activa Tie-2 en CEs en aquellos vasos que se encuentran en desarrollo. Estas CEs, por su parte, producen y secretan sustancias quimiotácticas como serotonina, PDGF $\beta$ , TGF $\beta$  o EGF, que se encargan de reclutar las células murales para estabilizar los nuevos vasos sanguíneos formados.<sup>66</sup>

La fosforilación de Tie-2 por parte de Ang-1 activa diferentes cascadas de señalización celular que activan diferentes proteínas efectoras. Entre esas vías se destacan la vía PI3K/Akt, que parece ser esencial para la supervivencia, migración y formación tubular inducida por Ang-1; la vía Dok-R-PAK y las GTPasas RhoA y Rac-1, involucradas en el efecto migratorio inducido por Ang-1 o la vía Ras-Raf-1-MEK-MAPK, entre otras.<sup>67,68</sup> La unión de PI3K a Tie-2 activa Akt y media los efectos antiapoptóticos de Ang-1 así como la activación de eNOS.<sup>69</sup> Además, Akt fosforila e inactiva el factor de transcripción forkhead que a su vez es un potente inductor de



expresión de Ang-2. La activación de Tie-2 también da lugar al reclutamiento del inhibidor del factor nuclear NF- $\kappa$ B ABIN-2, que inhibe la vía de NF- $\kappa$ B protegiendo las CEs de la apoptosis mediante la inhibición de respuestas inflamatorias.<sup>70</sup>

Ang-1 también posee efectos protectores sobre el endotelio vascular mediante su acción antipermeabilizante y antiinflamatoria.<sup>71,72</sup> En este contexto, Ang-1 induce la expresión y fosforilación de PECAM-1 así como la fosforilación de VE-Caderina en las uniones interendoteliales. Por otro lado, Ang-1 estabiliza los vasos mediante el reclutamiento de pericitos y la estimulación de síntesis de PDGFBB por parte de las CEs para contribuir a la sinergia de ese efecto.<sup>73</sup> La mayoría de estas acciones son mediadas por la activación de la vía de PI3K y la consiguiente activación de Akt.<sup>74</sup>

#### 2.3.1.5. Apelina. Características generales.

La apelina es un péptido que fue aislado por primera vez en 1998. Es el único ligando endógeno conocido del receptor huérfano angiotensin like receptor 1 (AGTRL-1) también conocido como APJ. Las isoformas principales de la apelina son: apelina-13, apelina-17 y apelina-36, respectivamente de 13, 17 y 36 aminoácidos.<sup>75</sup> Dichas isoformas derivan de su precursor preproapelina que ha sido clonado tanto en el hombre como en diversas especies de animales. El espectro de eficacia de las diversas isoformas varía con el peso molecular: cuanto menor es el tamaño, mayor es la afinidad del péptido por el receptor.<sup>74</sup>

La apelina fue descrita, en un principio, como un neuropéptido producido por el núcleo supraóptico capaz de inhibir la secreción de vasopresina a nivel hipotálamico.<sup>76</sup> Además de estar presente en el sistema nervioso central, la amplia localización del receptor en otros tejidos ha abierto nuevas vías de investigación y sugiere nuevas posibles interacciones fisiopatológicas.

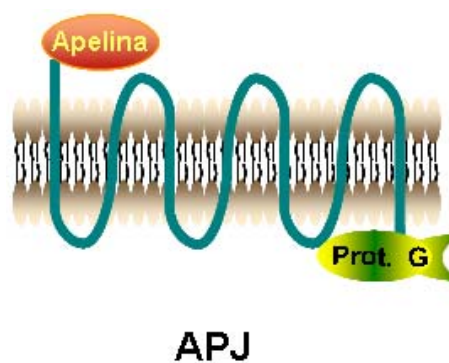
La apelina y su receptor se encuentran ampliamente expresados en el sistema nervioso central y sus tejidos periféricos, especialmente en las CEs, leucocitos, enterocitos, adipocitos y cardiomiocitos.<sup>77,78</sup>

La apelina parece que también puede estar involucrada en la fisiopatología de la diabetes puesto que estimula la utilización de glucosa por parte de los tejidos.<sup>79</sup> Además los pacientes diabéticos presentan unos bajos niveles circulantes de dicho péptido.<sup>80</sup>

La regulación de esta hormona no ha sido completamente definida todavía. Diversos estudios han demostrado que el aumento de la expresión de apelina se encuentra asociado con la activación de vías de señalización estimuladas por glucocorticoides, insulina<sup>81</sup> y somatotropina.<sup>82</sup> En el tejido adiposo, su regulación parece estar bajo el control del TNF $\alpha$ .<sup>83</sup> Otro dato que sugiere algún tipo de relación de la apelina con el proceso inflamatorio es la elevada expresión de su receptor APJ en macrófagos y en células de Kupffer.<sup>74</sup> Recientes investigaciones también demostraron que la apelina puede estimular la neovascularización en ausencia de VEGF.<sup>84</sup> Aunque en algunos estudios la sobreexpresión de apelina se relaciona con un proceso inflamatorio,<sup>85</sup> en otros se describe exactamente lo contrario,<sup>86</sup> por lo que la implicación de dicho péptido en inflamación continúa resultando controvertida. Por tanto, sus efectos han de ser cuidadosamente analizados dependiendo del órgano y de la estirpe celular a la que se haga referencia.

### 2.3.1.6. Receptor de la apelina. Funciones.

El receptor APJ (Figura 17) consta de siete dominios transmembrana y pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G.<sup>87</sup> La secuencia de aminoácidos del receptor APJ posee un 31% de homología con la del receptor 1 de



**Figura 17.** Receptor de la apelina (APJ).

angiotensina (AT1), de ahí su denominación como receptor relacionado con angiotensina o AGTRL-1. Sin embargo, se ha demostrado que AII no tiene ninguna afinidad por APJ. De hecho, la activación del sistema de la apelina vascular parece actuar como contraregulador del efecto vasoconstrictor de la AII. Mediante análisis de expresión génica se ha determinado que el tejido pulmonar y el bazo producen, en condiciones normales, la mayor cantidad de APJ.<sup>88</sup> El gen del APJ es una secuencia que carece de intrones por lo que se considera evolutivamente reciente. Su regulación transcripcional, a día de hoy, todavía está siendo analizada.

APJ se encuentra acoplado a una proteína G de tipo inhibitoria o Gi cuya activación se encuentra involucrada en un abanico de efectos fisiológicos tales como la regulación del equilibrio hidrosalino,<sup>89</sup> la regulación del tono vascular,<sup>90</sup> así como el desarrollo y la contractibilidad cardíaca.<sup>91,92</sup>

La activación de APJ provoca la inhibición de la producción de AMP cíclico (AMPC) y la activación de un intercambiador de tipo I de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. A través de la primera vía mencionada, la apelina produce vasodilatación arterial. Dicho efecto vascular es consecuencia directa de la inducción de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) que sintetiza el vasodilatador NO. La activación de eNOS también estimula una cascada de quinasas reguladas por vía de señalización extracelular.<sup>93</sup> Por otro lado, la activación del intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en cardiomiocitos produce un incremento de la contractibilidad miocárdica *in vitro* e *in vivo*.<sup>94</sup>

Los ratones deficientes en APJ no presentan ningún cambio fenotípico relevante, excepto una elevada respuesta vasoconstrictora a la AII.<sup>95</sup> Además, la infusión de apelina disminuye transitoriamente la presión arterial en animales wild-type e hipertensos. Es posible antagonizar dicha hipotensión tratando los animales con L-

NAME, un inhibidor de la producción de NO, lo que indica que la activación de eNOS media los efectos vasodilatadores provocados por la apelina.<sup>95</sup>

La infusión de apelina en corazones aislados y perfundidos de rata produce un efecto inotrópico positivo dosis-dependiente. De hecho, la apelina es uno de los inótropos positivos más potentes que se conocen.<sup>96</sup> Este efecto, conjuntamente con la vasodilatación, ha sido observado en un modelo de insuficiencia cardiaca post-infarto y en otros modelos.<sup>97</sup> En este sentido, en humanos, se ha demostrado que los niveles de apelina se encuentran aumentados en los pacientes con insuficiencia cardiaca crónica.<sup>98</sup>

El efecto de la apelina sobre la angiogénesis ha sido ampliamente descrito. La unión de la apelina a APJ estimula la proliferación de las células endoteliales principalmente a través de la activación de las proteínas ERK.<sup>99</sup> Además de este efecto sobre las células endoteliales, la apelina estimula la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en las células de músculo liso vascular. Esta activación se ha descrito que se encuentra asociada a un aumento de la permeabilidad vascular en vénulas coronarias aisladas.

### 2.3.2. Vasos inmaduros y extravasación vascular.

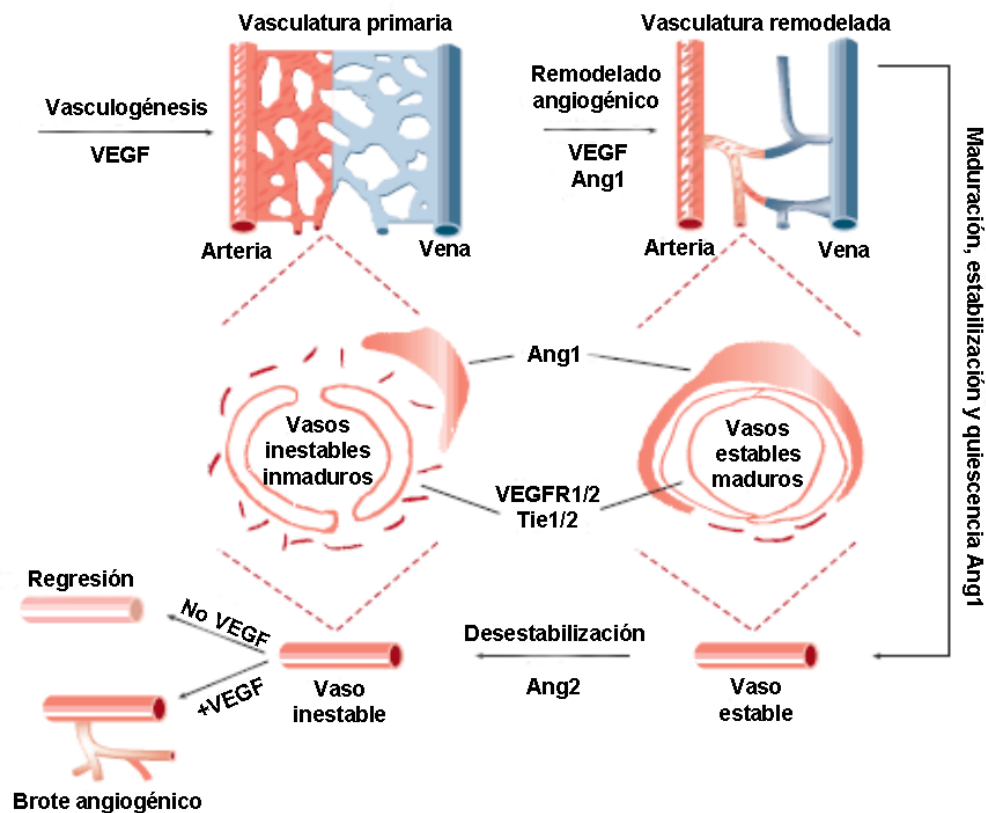
En todas las alteraciones hemodinámicas sistémicas e intrahepáticas que se producen en la cirrosis el endotelio vascular juega un papel clave tanto en la recepción de estímulos como en la mediación de la respuesta a los mismos.

El endotelio vascular es un órgano altamente especializado y metabólicamente muy activo que desempeña un papel fundamental no sólo en el mantenimiento del tono y de la permeabilidad vascular sino también en el tráfico de los leucocitos y en la modulación de la homeostasis y la trombosis. La CE produce mediadores de la vasodilatación como el óxido nítrico (NO). El NO se sintetiza como consecuencia de la activación de la eNOS en respuesta a diversos estímulos. Tanto la concentración sérica

de NO como la activación por fosforilación de la eNOS en los vasos arteriales y espláncnicos se encuentran incrementadas en ratas cirróticas con ascitis.<sup>100,101</sup> Dicho aumento de NO es responsable, en parte, de la vasodilatación arterial que se produce en la cirrosis hepática. A su vez, eso provoca distintas aportaciones de flujo sanguíneo a los órganos de la cavidad abdominal así como un remodelado funcional y estructural en los vasos sanguíneos<sup>102</sup> que puede alterar la permeabilidad de los mismos contribuyendo a la formación progresiva de edema.

Durante el desarrollo vascular, VEGF es el factor que juega el papel más relevante. Se requiere VEGF para iniciar la formación de nuevos vasos tanto en el proceso de vasculogénesis como en el de angiogénesis a partir de invaginaciones microvasculares (Figura 18), y tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. Ang-1 es, posteriormente, necesaria para continuar el remodelado y la maduración de dicha red vascular inmadura inicial (Figura 18). Ang-1 parece ser un factor clave en el mantenimiento de la quiescencia y la estabilidad de la red vascular madura. La disrupción de esta señal estabilizante coincide con el reinicio del remodelado vascular en el adulto. Tal desestabilización parece involucrar la inducción autocrina (por parte del endotelio a ser remodelado) del antagonista natural de Ang-1, la Ang-2. VEGF y las angiopoyetinas también son capaces de ejercer su actividad en el desarrollo de los vasos sanguíneos durante el remodelado vascular en el adulto. La liberación local de alguno de estos factores permite reproducir el proceso de angiogénesis de manera similar a la vasculogénesis embrionaria pero sin poder estimular el proceso al completo por si mismos. En este sentido, VEGF puede iniciar el proceso de formación vascular en animales adultos, pero pos sí solo promueve solamente la formación de vasos permeables, inmaduros e inestables. Sin embargo, VEGF trabajando en cooperación con las angiopoyetinas puede llevar a cabo el proceso

completo de angiogénesis en el adulto (Figura 18). La Ang-1, a través de la activación de Tie-2, es necesaria para favorecer la quiescencia de la red vascular mientras que Ang-2 bloquea esa estabilización constitutiva de la membrana endotelial, volviendo los vasos en desarrollo más plásticos. Dichos vasos, una vez alterados, pueden seguir dos caminos distintos: pueden regresionar en ausencia de factores de crecimiento asociados, como ocurre con los vasos primitivos durante el desarrollo, o ser más sensibles al crecimiento vascular por acción simultánea de factores angiogénicos liberados localmente, tales como VEGF (Figura 18). Finalmente, actuaría de nuevo la Ang-1 para estabilizar el nuevo vaso resultante. De hecho, Ang-1 ha demostrado estabilizar y proteger la red vascular adulta, haciéndola resistente al daño y permeabilización inducida por VEGF o moléculas proinflamatorias.



**Figura 18.** Esquema de neovascularización y regulación de vasos inmaduros.  
Figura adaptada de Yancopoulos GD et al. 2000

# Objetivos





La formación de ascitis es el trastorno más importante que presentan los pacientes cirróticos y constituye un fenómeno extraordinariamente complejo en el que se ha implicado a diversos sistemas neurohormonales y sustancias endógenas capaces de regular el metabolismo renal de sodio y agua o la reactividad vascular.<sup>103</sup> Actualmente, se considera que la disfunción renal y el desarrollo de ascitis es el resultado de una vasodilatación arterial en el territorio esplácnico, promovida por la hipertensión portal y que da lugar a dos secuencias de acontecimientos bien diferenciados. En primer lugar, la vasodilatación esplácnica aumenta el flujo sanguíneo en este territorio dando lugar a un incremento de la presión capilar y de la permeabilidad vascular, así como una mayor formación de linfa. En segundo lugar, la disminución de la presión arterial, como respuesta homeostática compensatoria, activa los sistemas vasoconstrictores endógenos. Estos sistemas, sin embargo, tienen propiedades antidiuréticas y antinatriuréticas, por lo que la activación de los mismos también produce retención renal de sodio y agua. La concurrencia simultánea de estas dos perturbaciones es lo que estimula el acumulo de líquido en la cavidad peritoneal.

La probabilidad de fallecimiento a los 2 años en pacientes cirróticos, una vez que desarrollan ascitis, es del 40 %. A pesar de la enorme relevancia clínica de este suceso, en el momento actual no se conocen con precisión los mecanismos moleculares que regulan las alteraciones en la permeabilidad vascular que presentan estos pacientes.

El hígado cirrótico experimenta, a lo largo de todo el desarrollo de la enfermedad, una serie de cambios estructurales debidos a la acumulación de MEC (fibrosis) y a la inflamación crónica. La hipoxia tisular provoca la liberación de agentes proangiogénicos como VEGF-A y las angiopoyetinas que aumentan la irrigación del tejido para compensar esa alteración. En este proceso conviven agentes proinflamatorios y proangiogénicos que vuelven especialmente susceptibles los vasos sanguíneos a la

transcitosis y a la permeabilidad vascular. Sin embargo, todavía se desconocen los territorios vasculares implicados en la formación de ascitis ni los factores que regulan la fisiopatología de ese desorden. En ese sentido, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue investigar cuales son las áreas vasculares que presentan una permeabilidad vascular alterada en las ratas cirróticas con ascitis y, por otra parte, el efecto sobre dicha alteración que ejerce el bloqueo agudo de las vías que regulan las uniones interendoteliales. Específicamente, este objetivo se alcanzó por medio de los siguientes estudios:

- I. Averiguar cuales son los territorios vasculares que presentan una permeabilidad vascular alterada en la cavidad abdominal de las las ratas cirróticas con ascitis.
- II. Investigar la expresión y localización de los principales factores involucrados en la regulación de la permeabilidad vascular en ratas con cirrosis hepática descompensada.
- III. Analizar el efecto sobre la permeabilidad vascular del bloqueo agudo de la principal molécula implicada en la regulación de las uniones interendoteliales en ratas cirróticas con ascitis.

La familia de las sustancias vasoactivas con propiedades reguladoras de la angiogénesis se ha visto recientemente incrementada con un nuevo miembro, la apelina. Esta sustancia es un péptido de 36 aminoácidos derivado de un precursor de 77 aminoácidos denominado preopelina, que ha sido clonado en humanos y ratas. Este péptido ha sido recientemente identificado como el ligando endógeno del receptor anteriormente huérfano, apelin-angiotensin receptor-like 1, conocido también como receptor APJ.<sup>90</sup> La apelina es un potente neuropéptido diurético que contrarresta las acciones de la vasopresina mediante la inhibición de la actividad neuronal de la misma y

que promueve efectos inotrópicos in vivo en corazones sanos y en corazones con disfunción cardíaca.<sup>88</sup> La coexistencia de apelina y AVP en las neuronas magnocelulares, sus efectos biológicos opuestos y su regulación indican que tienen una función clave en el mantenimiento de la homeostasis del fluido celular.<sup>76</sup> Esto sugiere que la apelina podría estar implicada en la patogénesis de la homeostasis del líquido extracelular en la cirrosis. De hecho, esta sustancia también podría jugar un papel muy importante en el mantenimiento de la circulación hiperdinámica como consecuencia de su poderoso efecto como inotrópico cardíaco. Además, se desconoce si la apelina es capaz de intervenir directamente en la regulación de la excreción renal de sodio.

En el hígado cirrótico, además de la presencia de reconocidos factores reguladores de la permeabilidad vascular, otras sustancias vasoactivas como la apelina pueden estimular la formación de capilares inmaduros que permitan la extravasación plasmática. En este contexto, el segundo objetivo de esta tesis doctoral se enfoca a investigar el papel de la apelina en la angiogénesis hepática y en las alteraciones hemodinámicas y renales que conducen a la formación de ascitis en las ratas cirróticas. Específicamente, este objetivo se alcanzó por medio de los siguientes estudios:

- I. Investigar la expresión y localización de la apelina y su receptor específico en los diferentes tejidos de las ratas con cirrosis y ascitis.
- II. Analizar la función fisiopatológica del sistema hepático de la apelina en la angiogénesis y la fibrosis hepática así como en las alteraciones hemodinámicas y renales que tienen lugar en las ratas cirróticas con ascitis.
- III. Evaluar el efecto del bloqueo crónico de la angiogénesis sobre la formación de ascitis, en ratas con cirrosis hepática, utilizando un antagonista del receptor de la apelina.

Además de averiguar la función fisiopatológica de la apelina en la cirrosis experimental, es importante trasladar los hallazgos a la enfermedad hepática humana. El conocimiento de los agentes que regulan la expresión de la apelina en el hígado cirrótico podría mejorar las perspectivas terapéuticas en esta enfermedad. Es ampliamente conocido que muchos factores proangiogénicos presentan una función dual, actuando no sólo sobre las células endoteliales, sino también sobre las CEHs y, por tanto, estimulando la fibrogénesis. En este sentido, el tercer objetivo de la presente tesis doctoral está dirigido a investigar los factores que regulan la expresión de la apelina y analizar si este péptido también presenta actividad profibrogénica interactuando con las CEHs humanas. Específicamente, este objetivo se alcanzó por medio de los siguientes estudios:

- I. Investigar la expresión y localización de la apelina en el hígado cirrótico humano.
- II. Identificar los factores que regulan la expresión de la apelina en la enfermedad hepática humana.
- III. Averiguar el papel que desempeña el sistema hepático de la apelina en los procesos de fibrogénesis hepática.

La presente tesis doctoral está compuesta por los tres objetivos generales mencionados, los cuales se corresponden con un artículo cada uno.

# **Resultados**



**Artículo 1: El factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina-2 juegan un papel clave en la patogénesis de la extravasación vascular en las ratas cirróticas.**

Diversas evidencias circunstanciales apuntaban a que el hígado cirrótico era un importante foco de exudado plasmático que da origen a la formación de ascitis.<sup>104</sup> Sin embargo, todavía existía una gran controversia sobre la contribución relativa de otros órganos de la cavidad abdominal a dicho proceso. Como ya se ha comentado, la permeabilidad vascular depende de un gran número de variables entre las que se incluyen las propiedades físicas del fluido sanguíneo, el flujo y el gradiente entre compartimiento intra y extravascular, y el efecto de sustancias vasoactivas sobre la continuidad de la barrera endotelial. Entre las sustancias que influyen sobre la integridad endotelial se encuentra como principal exponente, el VEGF-A. De hecho, dicho péptido dimérico es unas 50000 veces más potente que la Histamina a la hora de inducir hiperpermeabilidad vascular.<sup>105</sup> Recientemente se ha descubierto que las angiopoyetinas también son factores que tienen una importante influencia sobre la regulación de la permeabilidad endotelial.<sup>106</sup> En este sentido, Ang-2 actúa sinérgicamente para aumentar la extravasación en aquellas regiones donde es simultáneamente liberado junto a VEGF-A.<sup>107</sup> Además, puesto que Ang-2 es especialmente efectiva en los vasos sanguíneos en formación, y el hígado cirrótico padece un intenso proceso de angiogénesis, esto hace suponer que su presencia en este tejido pueda alterar la estabilidad de la membrana microvascular. En cambio, Ang-1 realiza el proceso inverso, esto es, recluta células murales y estabiliza los vasos sanguíneos impidiendo de este modo la extravasación plasmática.<sup>108</sup>

En este primer trabajo realizado en el modelo de inducción de cirrosis por inhalación de CCl<sub>4</sub> en ratas (tal como se indica en el apartado material y métodos del

artículo 1), se analizó la participación de factores físicos y sustancias vasoactivas en los desórdenes de permeabilidad de dichos animales respecto a animales control. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

1. La permeabilidad vascular hepática y mesentérica se encuentra muy incrementada en las ratas cirróticas con ascitis.

En primer lugar, se analizó cuantitativamente con azul de Evans (AE) la permeabilidad vascular en hígado, mesenterio, páncreas, bazo, intestino delgado y riñón en ratas control, cirróticas y cirróticas con ascitis. Estos experimentos demostraron que los únicos territorios vasculares que presentaban una extravasación significativamente aumentada eran el hígado y el lecho mesentérico y que estas diferencias eran significativas únicamente en las ratas que desarrollaban ascitis (Figura 1, artículo 1). Sorprendentemente el páncreas de los animales cirróticos experimentó un descenso en los valores de AE extravasado.

Para establecer la localización vascular de dicho aumento de permeabilidad, se inyectó carbono coloidal (CC) por vía endovenosa y se recogieron muestras de hígado, mesenterio y páncreas para ser analizadas por técnicas de microscopía (Figura 2, artículo 1). El CC en el hígado cirrótico se localizó en el interior de los septos fibrosos a lo largo de todo el tejido cicatricial, precisamente donde el proceso de angiogénesis e inflamación es más acentuado<sup>109</sup>. La salida de CC desde los vasos hacia el espacio extracelular en el lecho mesentérico fue claramente mayor en las ratas cirróticas con ascitis que en los animales control. Dicha fuga de plasma quedaba limitada por la lámina basal de los vasos sanguíneos que permanecía intacta (en contraste con lo que sucede en procesos tumorales). Nuevamente, el plexo vascular del páncreas de las ratas cirróticas prácticamente perdió el marcaje con CC que denotaba una estructura en racimo en las ratas control (Figura 2, artículo 1).



2. La síntesis de VEGF-A, Ang-2 y Ang-1 en hígado y mesenterio así como el flujo arterial hepático y mesentérico se encuentran significativamente aumentados en las ratas cirróticas con ascitis.

Tanto la expresión génica (por PCR a tiempo real, tabla 2, artículo 1) como la proteica (por Western Blot, Figuras 3, 4 y 5, artículo 1) de VEGF-A, Ang-2 y Ang-1 fue significativamente superior en el hígado y el mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis en comparación con los animales control. Tanto el incremento de VEGF-A como de Ang-2 se localizó mayoritariamente en todo el parénquima hepático de las ratas cirróticas con ascitis (Figuras 6 y 7, artículo 1).

El flujo sanguíneo arterial fue analizado por una técnica colorimétrica tras inyectar una suspensión de microesferas. Los valores de flujo sanguíneo hepático total se encuentran aumentados debido al flujo portal, aunque el flujo arterial hepático no experimenta cambios. Como cabía esperar, el flujo arterial mesentérico experimentó un incremento significativo en las ratas cirróticas con ascitis (Tabla 1, artículo 1).

3. El bloqueo agudo del VEGFR<sub>2</sub> disminuye significativamente la permeabilidad vascular en el hígado y el mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis.

SU11248 es un potente inhibidor de la actividad tirosina quinasa de VEGFR<sub>2</sub>. El bloqueo de los efectos vasculares únicamente de VEGF-A fue suficiente para disminuir significativamente la permeabilidad hepática y mesentérica en los animales cirróticos con ascitis (Tabla 3, artículo 1).





# Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats

P Melgar-Lesmes,<sup>1</sup> S Tugues,<sup>1</sup> J Ros,<sup>1</sup> G Fernández-Varo,<sup>1</sup> M Morales-Ruiz,<sup>1</sup> J Rodés,<sup>2</sup> W Jiménez<sup>1,3</sup>

► Supplementary methods and a figure are published online only at <http://gut.bmj.com/content/vol58/issue2>

<sup>1</sup> Biochemistry and Molecular Genetics Service, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup> Liver Unit, CIBERehd, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup> Department of Physiology I, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence to: Dr W Jiménez, Servicio Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clinic Universitari, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; [wjimenez@clinic.ub.es](mailto:wjimenez@clinic.ub.es)

Revised 2 September 2008  
Accepted 14 October 2008  
Published Online First  
31 October 2008

## ABSTRACT

**Background and aims:** The extent and molecular mechanisms governing plasma extravasation and formation of ascites in cirrhosis are unknown. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and angiopoietin-2 (Ang-2) are endogenous substances with powerful vascular permeability effects. We assessed regional blood flow, vascular leakage, mRNA and tissular expression of VEGF-A and Ang-2 and vascular permeability following VEGF receptor 2 blockade in control and cirrhotic rats to define the vascular territories showing altered vascular permeability in cirrhosis and to determine whether VEGF-A and Ang-2 are involved in this phenomenon.

**Methods:** Arterial blood flow was analysed with the coloured microsphere method. Vascular leakage was measured and visualised with the dye Evan's Blue and colloidal carbon techniques, respectively. VEGF-A and Ang-2 expression were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry and western blot. The effect on vascular permeability induced by VEGFR<sub>2</sub> blockade was assessed by administration of the receptor inhibitor SU11248.

**Results:** Arterial blood flow was increased in the mesentery, pancreas and small intestine but not in the kidney and spleen of cirrhotic rats as compared to controls. Increased vascular leakage was observed in the mesentery and liver, where colloidal carbon spread from microvessels to the adjacent fibrotic tracts. Increased hepatic and mesenteric expression of VEGF-A and Ang-2 was found in cirrhotic rats as compared to controls. Blockade of VEGFR<sub>2</sub> markedly reduced hepatic and mesenteric vascular leakage in cirrhotic rats.

**Conclusions:** Enhanced endothelial permeability is restricted to the hepatic and mesenteric vascular beds in cirrhotic rats with ascites and VEGF-A and Ang-2 are key factors in the signalling pathways regulating this dysfunction.

Ascites, the most common complication in patients with advanced liver disease, is invariably associated with portal hypertension and consists of the accumulation of liquid in the peritoneal cavity.<sup>1</sup> Ascites in cirrhotic patients is mainly formed by salt and water, variable amounts of albumin and globulins, and a relatively low number of mesothelial cells and leucocytes. Because of this relatively simple composition the presence of ascites was classically considered to have little or no influence on the homeostasis of the peritoneal vasculature. Nevertheless, this has recently been challenged by several studies demonstrating that this liquid may possess vasodilator, proinflammatory and

proangiogenic properties.<sup>2-7</sup> However, whereas it is well documented that ascites in cirrhosis may behave as a bioactive fluid, the source of this liquid and the molecular gates regulating fluid extravasation in cirrhosis are less clear. Several pieces of circumstantial evidence point to the cirrhotic liver as an important source of ascites<sup>8,9</sup> but discussion still exists concerning the relative contribution of other organs located in the abdominal cavity, such as the intestine, spleen, pancreas or the mesenteric vasculature. On the other hand, vascular leakage depends on a number of variables including the physical properties of the fluid or the molecule being transported and the gradients between the intra- and the extravascular compartments.<sup>10</sup> Moreover, transvascular transport may occur through channels or vesicles within individual cells or through inter-endothelial junctions between adjacent cells.<sup>11</sup> Endothelial cells are the primary barrier to vascular extravasation, thus regulating the passage of molecules by a variety of mechanisms that are chiefly regulated by the initially called vascular permeability factor and now better known as the vascular endothelial growth factor type A (VEGF-A). This peptide belongs to the VEGF family which comprises five additional known members of structurally related dimeric glycoproteins: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E and placental growth factor (PlGF). In addition, alternative exon splicing of the VEGF-A gene generates at least five VEGF isoforms, with 121, 145, 165, 189 or 206 amino acid residues with different bioavailability and with VEGF-A<sub>121</sub> and VEGF-A<sub>165</sub> being the most frequently expressed forms.<sup>12</sup> This family of growth factors binds and activates three VEGF transmembrane tyrosine kinase receptors: VEGFR<sub>1</sub> (vascular endothelial growth factor receptor 1), VEGFR<sub>2</sub> and VEGFR<sub>3</sub>, which differ in their ligand specificities.<sup>12</sup> By interacting with the VEGFR<sub>2</sub>, VEGF-A not only induces angiogenesis but also disrupts vascular barrier function in diseased tissues.<sup>10,11</sup> The list of angiogenic substances that increase vascular permeability in vivo has recently been enlarged by angiopoietin-2 (Ang-2), a member of the angiopoietin family of proteins that dose-dependently induces oedema formation in the mouse paw assay.<sup>13</sup> Angiopoietin-1 (Ang-1) is a Tie-2 receptor agonist that induces pericyte recruitment and maturation of blood capillaries. Then, capillary endothelial cells become quiescent and unresponsive to VEGF-A action unless Ang-2 is also secreted. Therefore, Ang-2 is a natural Ang-1 antagonist

which displaces Ang-1 from its receptor, thereby disrupting Tie-2 signalling.<sup>14</sup> However, the contributory role of VEGF-A and Ang-2 to vascular leakage and oedema formation in cirrhosis is unknown. Identification of the source and molecular mechanisms governing vascular hyperpermeability in cirrhosis may potentially favour future strategies to reduce tissue injury in these patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

This study was performed in 38 male adult cirrhotic Wistar rats and in 23 control Wistar rats (Charles–River, Saint Aubin les Elseuf, France). Both groups were fed ad libitum with standard chow and distilled water containing phenobarbital. Cirrhosis was induced as described elsewhere.<sup>15</sup> Cirrhotic rats without ascites were studied between 12 and 14 weeks and cirrhotic rats with ascites between 13 and 18 weeks. When present, ascites was tested for bacterial culture and was negative in all cirrhotic rats included in the study. Control rats were studied following a similar period of phenobarbital administration.

### Measurement of vascular permeability

The dye Evan's Blue (EB; Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) technique was used to measure capillary permeability to albumin. This technique is based on the principle that this dye binds avidly to the negatively charged intravascular albumin, therefore being a reliable estimate of transvascular fluxes of macromolecules.<sup>16</sup> The dye was quantified by spectrophotometry at 620 nm and the results were calculated from a standard curve of Evan's Blue (0.05–25 µg/ml) and expressed as µg EB/g dry weight of tissue.

### Identification of hyperpermeable blood vessels of tissues and organs with colloidal carbon

Colloidal carbon is a tracer that can be visualised in tissues by both macroscopy and high-resolution light microscopy.<sup>17</sup> Control and cirrhotic rats with ascites were anaesthetised with ketamine (50 mg/kg) and injected intravenously (i.v.) with 2 ml/kg body weight of a 1:5 dilution (in PBS) of colloidal

carbon (C11/1431A, Guenther Wagner, Hannover, Germany). One hour later, animals were killed by CO<sub>2</sub> narcosis and liver specimens obtained from the middle lobe, the mesentery with the attached bowel, pancreas, spleen and right kidney were fixed in 4% formaldehyde. Liver, spleen and kidney were embedded in paraffin and processed for Giemsa staining. Tissue slides were visualised by high-resolution light microscopy (Olympus Bx51, Tokyo, Japan). Mesentery–bowel and pancreas were mounted under PBS immersion for viewing in a macro-scope (MZ6; Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

### Measurement of haemodynamic parameters

See supplementary data.

### mRNA expression of VEGF-A and Ang-2 in abdominal organs of cirrhotic rats

See supplementary data.

### Western blot of VEGF-A, Ang-1, Ang-2 and phosphorylated VEGFR<sub>2</sub> and immunohistochemistry of VEGF-A and Ang-2

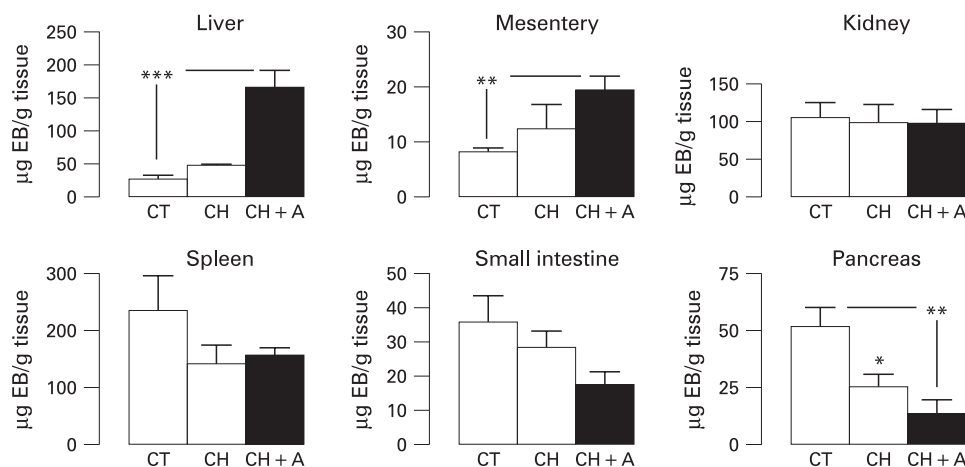
See supplementary data.

### Effect of VEGFR<sub>2</sub> blockade on vascular permeability

To test whether VEGFR<sub>2</sub> mediates vascular hyperpermeability in cirrhotic animals, 10 rats with cirrhosis and ascites were anaesthetised with inactine (100 mg/kg) and randomly received an oral administration of the VEGFR<sub>2</sub> antagonist SU11248 (n = 5; 20 mg/kg body weight) or vehicle (n = 5; citrate-buffered solution, pH 3.5). After 2.5 h, vascular permeability was assessed in both groups of animals as described above and liver samples were frozen at –80°C to further analyse VEGFR<sub>2</sub> phosphorylation.

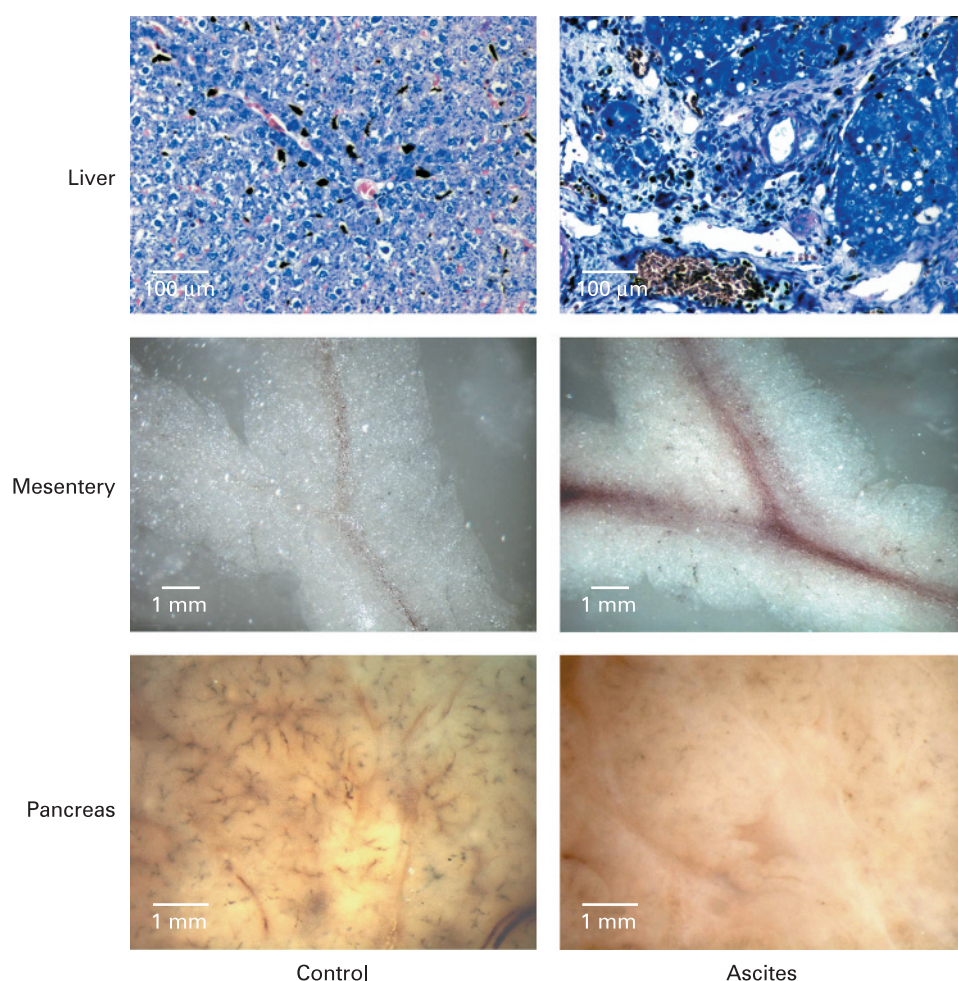
### Statistical analysis

Data are expressed as mean with the SE. Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) the Newman–Keuls test, and the unpaired Student t



**Figure 1** Measurement of vascular leakage in abdominal tissues with the Evan's Blue (EB) dye method. Animals were anaesthetised with ketamine (50 mg/kg) and injected in the penile vein with Evan's Blue (30 mg/kg) which was allowed to circulate for 30 min. The dye was washed out by perfusing the vascular tree with phosphate-buffered saline (PBS) containing heparin (50 U/ml) for 5 min and then the vasculature was perfusion-fixed (1% paraformaldehyde in 50 mmol/l citrate buffer, pH 3.5) for 2 min at a constant flow of 100 ml/min. The liver, mesentery, right kidney, spleen, small intestine and pancreas were obtained from control rats (CT, n = 8) cirrhotic rats without ascites (CH, n = 5) and cirrhotic rats with ascites (CH+A, n = 8) to assess the degree of vascular extravasation. The amount of the extracted dye was expressed as micrograms of Evan's Blue per gram of dry weight of each tissue. \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01 and \*p<0.05 vs control rats (one-way ANOVA and Newman–Keuls tests).

**Figure 2** Giemsa-stained sections illustrating microvascular permeability in the liver of control and cirrhotic rats (upper panels). Low-power macrographs of leaky blood vessels of mesentery and pancreas of control and cirrhotic rats are also shown in the middle and lower panels, respectively. Colloidal carbon was injected intravenously and used as a tracer of local extravasation. Original magnifications: liver,  $\times 200$ ; mesentery,  $\times 10$ ; and pancreas,  $\times 20$ .



test when appropriate. Differences were considered to be significant at a *p* value of 0.05 or less.

## RESULTS

### Vascular permeability in intra-abdominal tissues

Basal leakage of Evan's Blue varied from one organ to other, ranging between 235.8 (SE 61.5)  $\mu\text{g EB/g}$  tissue in the spleen and 8.3 (SE 0.8)  $\mu\text{g EB/g}$  tissue in the mesentery. These fluctuations

in basal permeability among the different organs are not uncommon and have been shown to depend on the degree of vascularisation of these organs.<sup>18</sup> It is important to stress that the albumin-bound Evan's Blue remaining within the vascular compartment after tissue washout is considered to be negligible.<sup>18</sup> Figure 1 shows plasma extravasation in the liver, mesentery, kidney, spleen, small intestine and pancreas of control and cirrhotic rats, without and with ascites. A marked increase in plasma permeability was found in the liver and

**Table 1** Systemic haemodynamics and arterial blood flow in the different organs in control and cirrhotic rats included in the haemodynamic protocol

	Control rats (n = 7)	Cirrhotic rats (n = 7)
<b>Systemic haemodynamics</b>		
Mean arterial pressure (mm Hg)	125 (1)	102 (1)*
Heart rate (beats/min)	371 (5)	374 (9)
Cardiac index (ml/min/100 g)	21.9 (0.5)	40.8 (2.9)**
Systemic vascular resistance (mm Hg min/ml)	5.72 (0.16)	2.59 (0.20)**
<b>Regional blood flow (ml/min/100 g)</b>		
Liver	34.5 (5.2)	31.4 (5.4)
Mesentery	18.2 (2.8)	53.3 (10.6)*
Pancreas	59.3 (5.3)	160.3 (13.1)**
Spleen	123.5 (18.4)	123.4 (16.6)
Small intestine	81.8 (13.5)	235.7 (40.0)*
Kidney	340.5 (43.6)	455.6 (36.4)

Results are given as mean (standard error).

\**p*<0.01 and \*\**p*<0.001 vs control rats.



mesentery of cirrhotic rats with ascites as compared to controls, with the differences between the two groups being 7-fold and more than 2-fold higher, respectively. No differences in this parameter were observed between the kidneys of cirrhotic and control animals. In contrast, spleen, small intestine and pancreas of rats with cirrhosis and ascites showed a tendency towards decreased capillary permeability in comparison to control rats, although differences only reached statistical significance in the pancreas. In fact, extravasation of Evan's Blue in the pancreas of cirrhotic rats was around four times lower than that in controls (fig 1). No differences were found in vessel permeability between control animals and cirrhotic rats without ascites in any of the organs in which this parameter was assessed, with the exception of the pancreas in which vessel permeability was reduced in comparison to control rats.

### Identification of hyperpermeable blood vessels using colloidal carbon

Colloidal carbon is a precise marker for identifying leaky blood vessels at the ultrastructural level.<sup>19</sup> Colloidal carbon particles are able to penetrate hyperpermeable endothelium but are retained by the underlying basal lamina if it is intact and continuous. Therefore, vascular leakage can be identified by deposits of colloidal carbon in the vascular basal lamina. No significant differences were found in the labelling pattern of the spleen, small intestine and right kidney between control and cirrhotic animals (data not shown). In contrast, cirrhotic animals displayed an altered distribution pattern of the tracer in the liver, mesentery and pancreas as compared to control rats. Figure 2 shows representative hepatic sections from a control rat and a cirrhotic rat with ascites. Whereas in control rats colloidal carbon was uniformly distributed over the liver parenchyma and spread from the portal space towards the hepatic sinusoids, in cirrhotic animals the presence of the tracer was more abundant and its distribution did not follow a regular pattern. It is of note that colloidal carbon was extensively located close to or within the fibrous septa.

Paralleling the results obtained at quantifying the mesenteric permeability, mesenteric vessels of cirrhotic rats became markedly leaky to colloidal carbon. In these animals the tracer escaped to the basal lamina, while in normal rats carbon particles were practically all retained in the interior of the mesenteric vasculature (fig 2). Thus, hepatic dysfunction is also associated with increased endothelial fenestration in the mesenteric vascular bed.

A final remarkable observation of this protocol was that the abnormal colloidal carbon distribution pattern found in the pancreas of cirrhotic rats followed an opposite direction to that observed in the liver and mesentery of these animals. As shown in fig 2, pancreatic vessels of control rats are highly permeable to

the tracer, which results in the identification of a dense vascular network of capillaries. By contrast, this almost disappears on analysing the pancreatic tissue of cirrhotic animals.

### Systemic haemodynamics and arterial blood flow

Since changes in blood flow may modulate vascular permeability,<sup>20</sup> we next assessed systemic haemodynamics and arterial blood flow in cirrhotic and control rats. As anticipated, cirrhotic rats displayed an important hypercirculatory syndrome characterised by arterial hypotension, high cardiac index and markedly reduced systemic vascular resistance (table 1).

Moreover, cirrhotic rats also showed a significantly increased arterial blood flow in the mesentery, pancreas and small intestine while no differences were registered in the spleen, kidney and liver. It should be noted, however, that total liver blood flow has a dual component: the arterial blood flow and the portal venous inflow, this latter parameter not being measured when using the microsphere method to assess blood flow. Since several studies have previously demonstrated an enhanced portal venous inflow in humans and rats with advanced liver disease,<sup>21 22</sup> it is very likely that the total hepatic blood flow was increased in our cirrhotic animals.

### mRNA expression of VEGF-A and Ang-2 in intra-abdominal tissues

Since VEGF-A and Ang-2 are two major regulators of microvessel permeability, we next assessed whether organ permeability dysregulations are associated with altered expression of these messengers. As shown in table 2, changes in mRNA expression of VEGF-A and Ang-2 followed a parallel pattern to that observed in the analysis of regional alterations of vascular permeability.

These transcripts were significantly enhanced in the liver and mesentery of cirrhotic animals as compared to controls. In contrast, a marked reduction in VEGF-A and Ang-2 mRNAs was found in the pancreas of cirrhotic rats as compared to controls. Interestingly, a highly significant increase in Ang-2 mRNA, but not VEGF-A mRNA, was observed in the small intestine of cirrhotic animals compared to control animals. Finally, no differences in mRNA levels were observed between spleen and kidney of cirrhotic and control animals.

### VEGF-A and Ang-2 protein expression in the organs with altered vascular permeability

Western blot analysis for VEGF-A in the liver showed two bands at 38 kDa and 45 kDa corresponding to the VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> isoforms, respectively (fig 3). Densitometric analysis revealed increased VEGF-A protein content in cirrhotic livers as compared to controls, which was due to a rise in the VEGF<sub>165</sub>

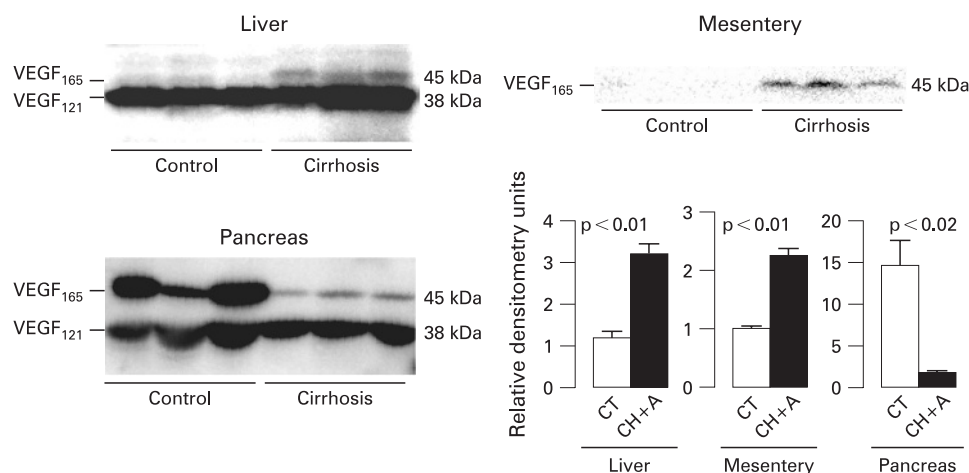
**Table 2** Quantitative real-time polymerase chain reaction of vascular endothelial growth factor-A and angiopoietin-2 in abdominal tissues of control and cirrhotic rats with ascites

Tissue	Vascular endothelial growth factor-A		Angiopoietin-2	
	Control (n = 5)	Cirrhosis (n = 5)	Control (n = 5)	Cirrhosis (n = 5)
Liver	1.14 (0.2)	1.91 (0.2)*	1.17 (0.2)	2.41 (0.4)*
Mesentery	1.09 (0.2)	5.59 (0.8)*	1.09 (0.1)	3.58 (0.6)*
Small intestine	1.07 (0.1)	1.55 (0.4)	1.17 (0.1)	4.36 (0.6)**
Pancreas	1.04 (0.2)	0.53 (0.1)*	1.17 (0.2)	0.57 (0.1)*
Spleen	1.07 (0.2)	0.89 (0.2)	1.07 (0.2)	1.49 (0.2)
Kidney	1.13 (0.1)	1.38 (0.1)	1.12 (0.2)	1.03 (0.2)

Results are given as mean (SE) for mRNA expression (fold change compared to reference controls).

\*p<0.01 and \*\*p<0.001 vs control rats.

**Figure 3** Representative western blots for vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in the liver, mesentery and pancreas of three control (CT) and three cirrhotic rats with ascites (CH + A). Densitometric analysis of all samples is shown in the bottom right panel.



isoform. The protein signal of the VEGF<sub>121</sub> isoform was similar in both groups of animals. The densitometric analysis of VEGF-A expression in the mesentery delivers qualitatively similar conclusions, indicating increased abundance of VEGF-A in cirrhotic animals. Conversely, western blot analysis of VEGF-A in pancreatic homogenates resulted in an reduced expression of this substance, thus mirroring the results found when vascular permeability was assessed.

As shown in fig 4, the protein content of Ang-2 in the different organs yielded very similar results to those obtained with VEGF-A. Actually, the liver and mesentery of cirrhotic rats showed enhanced abundance of Ang-2, whereas an acute reduction of this peptide was noted in the pancreas of these animals in comparison to controls. Moreover, and in agreement with the results obtained on assessing mRNA expression, the protein abundance of Ang-2 was significantly higher in the small intestine than in controls. The protein content of Ang-1 was also assessed in the liver, mesentery, small intestine and pancreas of control and cirrhotic rats. In agreement with previous findings obtained in our laboratory,<sup>23</sup> all these organs, except the pancreas, showed increased abundance of Ang-1 in cirrhotic rats with ascites compared with control animals (fig 5).

In an attempt to identify the cellular source of the altered expression of vascular permeability factors, we performed histological immunolocalisation of VEGF-A and Ang-2 in liver and pancreas of cirrhotic and control rats. VEGF-A and Ang-2 immunolabelling was only detected in the first row of perivascular hepatocytes of control rats. In cirrhotic animals, most hepatocytes appeared as VEGF-A and Ang-2 positive cells and no signal was detected in bile duct epithelial cells and

myofibroblasts (figs 6 and 7, respectively). Expression of VEGF-A and Ang-2 in the pancreas of control rats was restricted to cells located in the pancreatic islets of control animals and this signal almost disappeared on examining pancreatic sections from cirrhotic rats (figs 6 and 7, respectively).

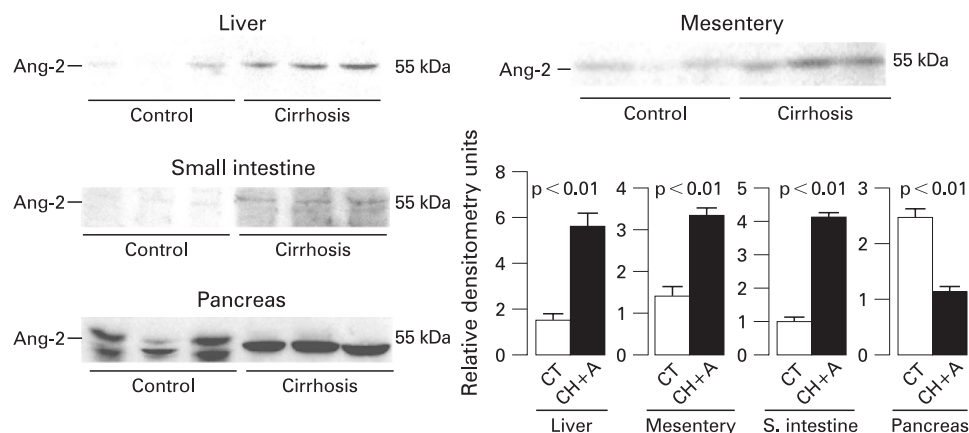
#### Effect of VEGFR<sub>2</sub> blockade on vascular leakage in cirrhotic rats

In a further attempt to establish a direct relationship between the increased expression of vascular permeability factors and altered tissue leakage in liver disease we assessed the effect of acutely blocking VEGFR<sub>2</sub> on vascular permeability in cirrhotic rats with ascites. In vivo efficacy of SU11248 was assessed by comparing hepatic VEGFR<sub>2</sub> phosphorylation between treated and untreated cirrhotic animals. As shown in supplementary fig 1, VEGFR<sub>2</sub> blockade almost suppressed the presence of the phosphorylated form of this receptor in the liver of cirrhotic rats. The administration of the VEGFR<sub>2</sub> inhibitor markedly reduced vascular hyperpermeability in the liver and mesentery of these animals. In fact, extravasation of Evan's Blue in these organs was 3- and 2-fold lower in cirrhotic rats receiving SU11248 than in those treated with vehicle (table 3).

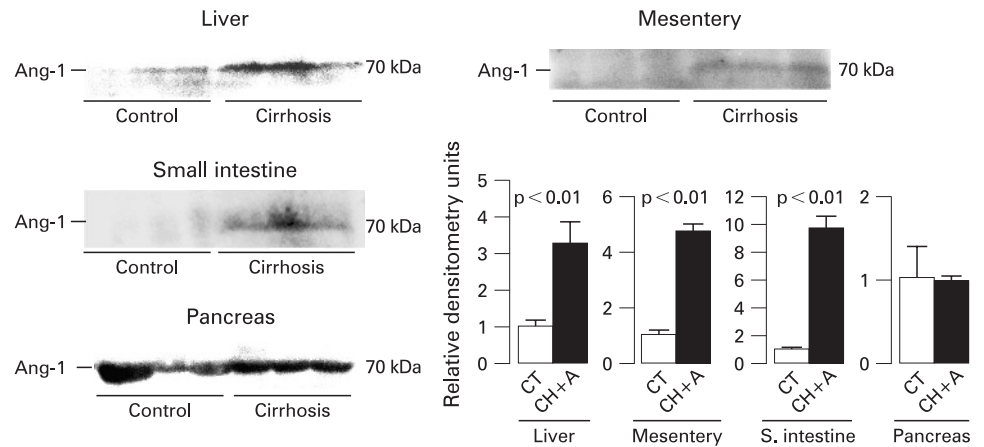
#### DISCUSSION

The results of the current investigation indicate that hyperpermeability selectively occurs in the liver and the mesenteric vasculature, but not in the spleen, pancreas, small intestine or kidney of cirrhotic rats. This is accompanied by a strong positive signal for VEGF-A and Ang-2 in hepatic parenchymal cells and paralleled by enhanced messenger and protein expression of

**Figure 4** Representative western blots for angiopoietin-2 (Ang-2) in the liver, small intestine, pancreas and mesentery of three control (CT) and three cirrhotic rats with ascites (CH + A). Densitometric analysis of all samples is shown in the bottom right panel.



**Figure 5** Representative western blots for angiopoietin-1 (Ang-1) in the liver, small intestine pancreas and mesentery of three control (CT) and three cirrhotic rats with ascites (CH + A). Densitometric analysis of all samples is shown in the bottom right panel.

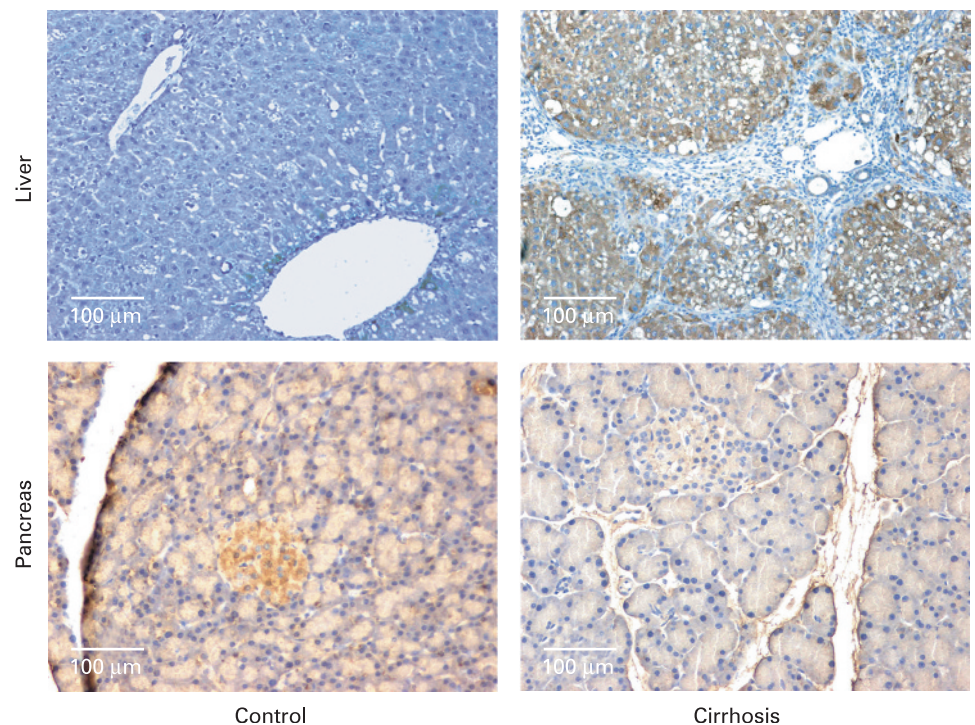


these vascular permeability factors in both, liver and mesentery of cirrhotic animals. Moreover, acute VEGFR<sub>2</sub> blockade reduces hepatic and mesenteric vascular permeability to nearly normal values in cirrhotic rats. Altogether, these results indicate that both VEGF-A and Ang-2 are involved in vascular hyperpermeability and the formation of ascites in experimental cirrhosis.

Histological examination of local leakage using colloidal carbon confirmed that the cirrhotic liver and the mesentery are hyperpermeable to macromolecules. In normal livers, the ink was only found within the sinusoids, thus reflecting the architectural integrity of the hepatic tissue. Narrowing and collagenisation of the hepatic sinusoids were associated with a strong presence of the marker close to the fibrous septa. Previous studies have demonstrated that these areas are surrounded by a dense and relatively immature vasculature,<sup>23 24</sup> thus our results indicate that the increased vascular leakage in the cirrhotic liver is a consequence of the previously described angiogenic processes associated with fibrogenesis.<sup>23</sup> Accordingly, it is very likely that our observation of enhanced vascular

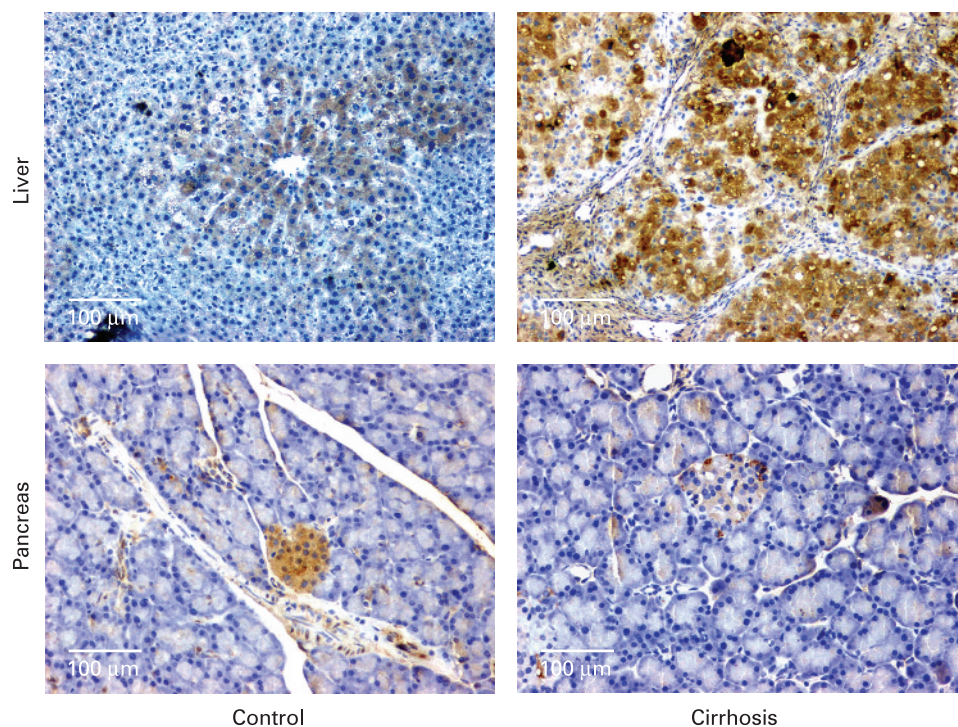
permeability in the mesenteric vasculature is also related to the existence of ongoing angiogenesis in this territory. This would be consistent with recent investigations demonstrating increased abundance of CD31, a marker of endothelial cells, in the mesentery of rats with portal hypertension as compared to control rats.<sup>25</sup> Conversely, the pancreas of cirrhotic animals showed markedly decreased vascular permeability in comparison to control rats. This finding was associated with impaired vascularisation and decreased expression of VEGF-A and Ang-2. As far we know, this is the first study describing diminished pancreatic vessel density in experimental cirrhosis. Since vascularisation of the pancreatic tissue is highly dependent on proangiogenic signalling pathways,<sup>26</sup> it is possible that disruption of these regulatory mechanisms by inflammatory substances produced in response to the hepatic injury<sup>3</sup> result in the islet vascularisation and permeability abnormalities observed in cirrhotic rats. Furthermore, this could be a new mechanism involved in the frequent impaired islet insulin output of patients with liver disease.

**Figure 6** Representative images corresponding to the immunohistochemistry for vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in the liver and pancreas of control rats and cirrhotic rats with ascites.





**Figure 7** Representative images corresponding to the immunohistochemistry for angiotensin-2 (Ang-2) in the liver and pancreas of control rats and cirrhotic rats with ascites.



It is widely accepted that alterations in blood flow exert a direct influence on microvascular permeability.<sup>27</sup> Since cirrhotic animals displayed increased total blood flow in the organs that showed enhanced vascular permeability, the contributory role of the hepatic and mesenteric hyperperfusion to the excessive leakage observed in these territories cannot be excluded. However, this is not the sole factor explaining this phenomenon. In fact, pancreas and small intestine of cirrhotic animals showed enhanced total blood flow but reduced, or unaltered vascular extravasation, respectively.

We found that mRNA and protein expression of the permeability factors VEGF-A and Ang-2 rose in the liver and the mesentery, but not in the spleen, pancreas, small intestine and kidney of cirrhotic rats. Indeed, the former were those showing significantly increased permeability values. Immunolocalisation experiments revealed a strong positive signal for both factors throughout the hepatic parenchyma of cirrhotic animals. This probably results from the extensive hypoxic areas previously described in the cirrhotic liver.<sup>23, 28</sup> Interestingly, we also found VEGF-A and Ang-2 expression in normal hepatic tissue albeit restricted to the perivenular hepatocytes, thus reflecting the lower partial pressure of oxygen ( $PO_2$ ) surrounding these cells.

**Table 3** Effect of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR<sub>2</sub>) blockade on vascular leakage in cirrhotic rats with ascites

Tissue	Cirrhotic rats (n = 5)	Cirrhotic rats + SU11248 (n = 5)
Liver	148.2 (20.9)	59.7 (5.3)**
Mesentery	13.4 (2.2)	6.0 (1.0)*
Pancreas	10.1 (2.9)	17.9 (3.6)
Spleen	120.4 (12.4)	155.0 (21.2)
Small intestine	17.1 (2.9)	14.9 (2.5)
Kidney	118.3 (27.9)	65.3 (23.0)

Results (mean (SE)) are given for the regional vascular permeability ( $\mu$ g Evan's Blue per g tissue).

\* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  vs control rats.

These data suggest a cooperative and dependent role for both, VEGF-A and Ang-2, in the regulation of vascular permeability in the liver and mesentery of cirrhotic animals. These two factors are critical to explain vascular leakage in the cirrhotic tissues. Both are expressed in response to hypoxia and VEGF-A possesses a potent ability to permeate capillaries to a level 50 000-fold higher than histamine.<sup>29</sup> Ang-2 is a receptor ligand acting on endothelial cells which allows vascular remodelling by antagonising angiotensin-1 (Ang-1), a member of the same family of molecules.<sup>30</sup> Ang-1 induces capillary maturation which then becomes quiescent and unresponsive to VEGF-A action unless Ang-2 is also secreted.<sup>31</sup> Hence, Ang-2 is an endogenous Ang-1 antagonist that displaces Ang-1 from its receptor and induces vessel destabilisation.<sup>14</sup> Consequently, in a scenario in which Ang-1 is activated, as occurs in the liver and mesentery of cirrhotic rats, the concomitant activation of Ang-2 is a critical event allowing vessel remodelling upon VEGF-A action. This is in line with our findings showing that upregulation of Ang-1 and Ang-2, but not VEGF, does not result in vascular hyperpermeability in the intestine of cirrhotic animals.

Endothelial cells exposed to VEGF-A allow passage of small solutes by inducing the formation of fenestration and/or caveolae.<sup>32, 33</sup> Leakage of larger proteins likely occurs between adjacent endothelial cells.<sup>10</sup> Disruption of cell-to-cell junctional integrity results in extravasation of serum/plasma proteins, leading to accumulation of fluids in the extracellular space. VEGFR<sub>2</sub> mediates regulation of junctional integrity and constitutes a major mechanism for localised disruption by VEGF-A.<sup>10</sup> SU11248 is an indolinone molecule which has been shown to possess potent antiangiogenic properties owing to its selective inhibition of VEGFR<sub>2</sub> and platelet derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) phosphorylation.<sup>34</sup> This tyrosine kinase inhibitor appears to be a powerful tool for elucidating the contribution of VEGF-A activation to the increased vascular permeability in cirrhosis since PDGFR- $\beta$  is related to functions other than regulation of vascular extravasation, including pericyte recruitment and maturation of blood capillaries.<sup>14</sup> In

fact, acute inhibition of VEGFR<sub>2</sub> phosphorylation markedly reduced vessel permeability in the liver and mesentery of cirrhotic rats with ascites, further emphasising the importance of this signalling pathway in the pathogenesis of vascular leakage in experimental cirrhosis.

**Funding:** This work was supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF03-02597 and SAF06-07053 to WJ, and SAF07-63069 to MM-R). PM-L had a grant from DGICYT (BES-2004-5186). ST had a grant from IDIBAPS. GF-V had a clinical chemistry fellowship from Siemens Medical Solutions Diagnostics (Tarrytown, New York, USA). SU11248 was generously supplied by Pfizer, South San Francisco, California, USA. CIBERhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

**Competing interests:** None declared.

**Ethics approval:** Approval for this study was obtained from the Investigation and Ethics Committees of the Hospital Clinic on 17 December 2002.

## REFERENCES

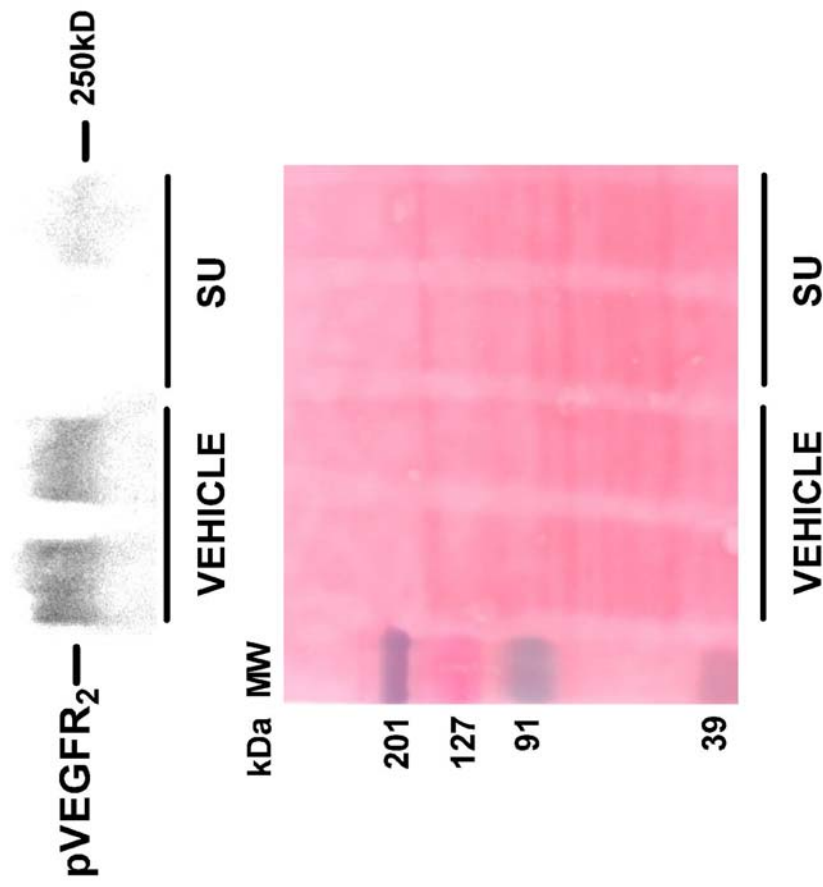
1. Arroyo V, Ginés P, Jiménez W, *et al*. Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, *et al*, eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*, 2nd edn. Oxford: Oxford Medical Publications, 1999: 733–61.
2. Laffi G, Foschi M, Masini E, *et al*. Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1995;**22**:1666–73.
3. Navasa M, Follo A, Filella X, *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**:1227–32.
4. Jiménez W, Ros J, Morales-Ruiz M, *et al*. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 1999;**30**:670–6.
5. Cejudo-Martin P, Morales-Ruiz M, Ros J, *et al*. Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 2002;**36**:1172–9.
6. Pérez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, *et al*. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999;**29**:1057–63.
7. Morales-Ruiz M, Tugues S, Cejudo-Martin P, *et al*. Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Hepatol* 2005;**43**:85–91.
8. Hyatt RE, Smith JR. The mechanism of ascites, a physiologic appraisal. *Am J Med* 1954;**16**:434–8.
9. Levy M, Wexler MJ. Renal sodium retention and ascites formation in dogs with experimental cirrhosis but without portal hypertension or increased splanchnic vascular capacity. *J Lab Clin Med* 1978;**91**:520–36.
10. Weis S M, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF-A induced vascular permeability. *Nature* 2005;**437**:497–504.
11. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al*. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;**407**:242–8.
12. Morales-Ruiz M, Jiménez W. Neovascularization, angiogenesis, and vascular remodeling in portal hypertension. In: Sanyal AJ, Shah VH, eds. *Portal hypertension. Pathogenesis, evaluation and treatment*, 1st edn. Totowa: Humana Press, 2005: 99–112.
13. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, *et al*. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**314**:738–44.
14. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;**441**:437–43.
15. Clària J, Jiménez W. Renal dysfunction and ascites in carbon-tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Ginés P, Arroyo V, Rodès J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis diagnosis and treatment*, 2nd edn. Malden, MA: Blackwell Science, 2005: 215–26.
16. Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 1989;**21**:309–15.
17. Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, *et al*. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res* 1995;**55**:360–8.
18. Lortie M, Sirois MG, Couture R, *et al*. Regional changes in the extravasation of albumin in the canine kidney: comparison of bradykinin and water diuresis. *Microvasc Res* 1994;**48**:282–94.
19. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, *et al*. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 1988;**133**:95–109.
20. Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, *et al*. Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. *Am J Physiol* 1992;**263**:H641–6.
21. Bosch J, García-Pagan JC. The splanchnic circulation in cirrhosis. In: Ginés P, Arroyo V, Rodès J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease*, 2nd edn. Malden: Blackwell Publishing, 2005: 156–63.
22. Bosch J, García-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;**32**:141–56.
23. Tugues S, Fernández-Varo G, Muñoz-Luque J, *et al*. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;**46**:1919–26.
24. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, *et al*. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Vinchovs Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;**402**:107–37.
25. Fernández M, Mejías M, Angermayr B, *et al*. 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.
26. Brissova M, Shostak A, Shiota M, *et al*. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor-A is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 2006;**55**:2974–85.
27. Sarelius IH, Kuebel JM, Wang J, *et al*. Macromolecule permeability of in situ and excised rodent skeletal muscle arterioles and venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**290**:H474–80.
28. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, *et al*. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999;**155**:1065–73.
29. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, *et al*. Tumors cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;**219**:983–5.
30. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al*. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;**277**:55–60.
31. Nosedá M, Chang L, McLean G, *et al*. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:8813–22.
32. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;**108**:2369–79.
33. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, *et al*. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;**140**:947–59.
34. Mendel DB, Laird AD, Xin X, *et al*. 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* 2003;**9**:327–37.

**Supplementary Data:****Western Blotting and immunohistochemistry:**

Tissue samples from liver, mesentery, small intestine and pancreas of five cirrhotic and five control rats were individually homogenized (PT 10-35, Polytron Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland) in a buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 H<sub>2</sub>O, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM Pefabloc and a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, Roche). VEGF-A and Ang-2 were separated on a 10% SDS-polyacrilamide gel (Mini Protean III, Bio-Rad, Hercules, Ca) and transferred for 2 h at 4 °C to nitrocellulose membranes (Transblot Transfer Medium, Bio-Rad), which were stained with Ponceau-S red as a control for protein loading. Membranes were incubated at 4°C with rabbit polyclonal anti-VEGF-A and Ang-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight in a 1:200 dilution. Thereafter, membranes were blocked with 2 % powdered defatted milk in TTBS buffer for 2 h. Membranes were incubated at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated antibody against rabbit IgG (ECL Western blotting analysis system; GE Healthcare) in a 1:2000 TTBS buffer containing 2 % powdered defatted milk. The bands for VEGF-A and Ang-2 were visualized by chemiluminescence (LAS3000, Fujifilm, Tokyo, Japan). Quantification of protein signals was performed using computer-assisted densitometry (Quantify One, Bio-Rad Laboratories).

Liver and pancreatic samples were fixed in 4% buffered formalin, paraffin-embedded, and sectioned at 5 μm. Before immunostaining, the tissue slides underwent microwave antigen retrieval (750 W 1 minute, 350 W 9 minutes in citrate buffer 0.01 mol/L, pH 6). Endogenous peroxidase activity was inhibited for 10 minutes and the tissue sections were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal monospecific antibodies anti-

VEGF-A and Ang-2 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The samples were revealed with the Dako LSAB2 System, HRP (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) following the manufacturers' instruction. Controls were performed by omitting the first antibody. Immunoreactivity was visualized by light microscope (Olympus Bx51, Tokyo, Japan).



**Supplementary Figure 1:** Representative Western Blot for the phosphorylated form of VEGFR<sub>2</sub> in the liver of 2 cirrhotic rats receiving vehicle and 2 cirrhotic rats treated with SU11248 (20 mg.kg<sup>-1</sup>.bw). Ponceau staining of the nitrocellulose membrane is shown in the bottom of the panel.

**Artículo 2: El sistema hepático de la apelina: Una nueva diana terapéutica para la enfermedad hepática.**

Durante la última década se ha producido un auge de investigaciones para intentar averiguar la función fisiológica y fisiopatológica de la apelina y su receptor específico APJ. Aunque todas las evidencias iniciales apuntaban a que la apelina era solamente esencial para la función y el desarrollo cardíaco, recientes estudios han abierto el abanico conceptual de posibilidades a otros tipos celulares y tejidos como origen y diana de dicho péptido. De hecho, el receptor de la apelina se expresa en un gran número de estirpes celulares, desde cardiomiocitos y CEs hasta leucocitos, enterocitos, y adipocitos. Es de especial importancia el papel que desempeña la apelina en la neovascularización, en la regulación del tono vascular y en la contractibilidad cardíaca. Está bien demostrado que la apelina tiene un papel activo en el desarrollo vascular incluso en ausencia de VEGF. Asimismo la activación de APJ en la red vascular produce una vasodilatación mediada por la activación de eNOS y la producción de NO. Paralelamente, la apelina provoca un aumento de la contractibilidad cardíaca. De hecho, es una de las sustancias inotrópicas positivas más potentes que se conocen.

En este segundo trabajo se analizó el papel de la apelina en las alteraciones hemodinámicas y renales así como en los procesos de angiogénesis y fibrosis hepática que conducen a la formación de ascitis en la cirrosis. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

1. Los niveles circulantes de apelina se encuentran incrementados en las ratas cirróticas.

Las alteraciones bioquímicas típicas de los animales con cirrosis hepática (descenso de la concentración sérica de albúmina, incremento de la actividad transaminasa ALT y bilirrubina sérica elevada) se vieron acompañadas por un aumento,

del orden del triple, de la concentración sérica de apelina respecto a los animales control (tabla 3, artículo 2).

2. La apelina se encuentra involucrada en la disfunción cardiocirculatoria en las ratas cirróticas con ascitis.

La administración de apelina por vía endovenosa a ratas control produjo, como cabía esperar, un marcado efecto vasodilatador con una reducción del 30% de las resistencias periféricas totales (RPT). Dicho efecto se vio acompañado por un incremento del índice cardíaco (IC) sin hacer variar, como consecuencia, la presión arterial media (PAM, tabla 1, artículo 2). En cambio, esta respuesta a la apelina no se observó en las ratas cirróticas. Por otro parte, mientras que la apelina disminuyó la excreción de agua y sodio en las ratas normales, dicho péptido no modificó la reducida excreción en los animales cirróticos tras administrar una sobrecarga de agua. Los efectos hemodinámicos y renales observados tras el bloqueo de APJ fueron exactamente los contrarios, esto es, invariabilidad en el resultado de los parámetros analizados en animales control y mejora cardiovascular (disminución del IC), incremento de las RPT y un aumento de la excreción renal de agua y sodio (tabla 2, artículo 2).

3. El sistema de la apelina se encuentra hiperactivado en el hígado de las ratas cirróticas.

No se observaron diferencias significativas en la abundancia de RNA mensajero de apelina o APJ en corazón o riñón entre animales cirróticos y control. Sin embargo se observó una disminución tanto en la expresión génica de apelina como de su receptor en el pulmón de las ratas cirróticas respecto a los animales control, siendo solamente significativa para la apelina. En cambio, se observó una intensa sobreexpresión del sistema de apelina-receptor en el hígado de los animales cirróticos respecto a los animales control (Figura 1, artículo 2).



#### 4. La apelina se produce en las células estrelladas hepáticas activadas.

La tinción positiva para apelina y APJ fue casi indetectable en el hígado de las ratas control. En cambio, se observó una clara expresión de apelina en los septos fibrosos y los tractos portales hepáticos de las ratas cirróticas (Figura 3, artículo 2). La expresión de APJ experimentó un patrón de distribución inverso a la de su ligando, es decir, se localizó extendido a lo largo de todo el parénquima hepático y en menos intensidad en algunas células de las áreas fibróticas (Figura 3). Puesto que la apelina colocalizaba con  $\alpha$ -SMA, la activación de la producción de apelina en el hígado de las ratas con cirrosis tiene lugar selectivamente en las células miofibroblásticas localizadas en el margen de los septos fibrosos.

#### 5. El bloqueo crónico de APJ mejora la hemodinámica sistémica, la fibrosis y la angiogénesis hepática en las ratas cirróticas.

La administración de F13A para antagonizar los efectos de la apelina supuso una mejora tanto en la PAM como en el CI y las RPT en los animales cirróticos respecto a los vehículo. La PP no se vio afectada debido al aumento de la presión de perfusión esplácnica (calculada como MAP-PP). El tratamiento también produjo un descenso del 25% y 50% de la fibrosis y angiogénesis hepática, respectivamente. El descenso del plexo vascular inmaduro del hígado cirrótico se tradujo en un descenso del 60% del volumen de ascitis. De hecho ese espectacular descenso de permeabilidad vascular provocó que fuera indetectable la presencia de líquido ascítico en 4 de los 8 animales tratados con el antagonista del receptor de apelina.



# The Hepatic Apelin System: A New Therapeutic Target for Liver Disease

Alessandro Principe,<sup>1</sup> Pedro Melgar-Lesmes,<sup>1</sup> Guillermo Fernández-Varo,<sup>1</sup> Luis Ruiz del Arbol,<sup>4</sup> Josefa Ros,<sup>1</sup> Manuel Morales-Ruiz,<sup>1</sup> Mauro Bernardi,<sup>2</sup> Vicente Arroyo,<sup>3</sup> and Wladimiro Jiménez<sup>1,5</sup>

**Apelin is a peptide that plays an important role in heart physiology and pathophysiology, inflammation, and angiogenesis. We evaluated whether the endogenous apelin system is involved in the pathogenesis of the hepatic remodeling and cardiovascular and renal complications occurring in advanced liver disease. The circulating levels of apelin, the messenger RNA (mRNA) and protein expression of apelin and apelin receptor, the immunohistological detection of apelin and apelin receptor, and the effects induced by the chronic administration of an apelin receptor antagonist on fibrosis and vessel density were evaluated in rats with cirrhosis and ascites and in control rats. The serum levels of apelin in patients with cirrhosis were also measured. Apelin levels were higher in rats with cirrhosis than in controls. Apelin mRNA showed a four-fold rise only in hepatic tissue, but not in the lung, heart, or kidney of rats with cirrhosis. These animals also showed hepatic apelin receptor mRNA levels 300 times higher than controls. Apelin was highly expressed by stellate cells, whereas apelin receptor was overexpressed in the hepatic parenchyma of animals with cirrhosis. Rats with cirrhosis treated with the apelin receptor antagonist showed diminished hepatic fibrosis and vessel density, improved cardiovascular performance, and renal function and lost ascites. Human patients also showed a marked increase in apelin levels. *Conclusion:* The selective hepatic activation of the apelin system, together with the drop in fibrosis and neoangiogenesis and the improvement in cardiovascular and excretory function resulting from apelin receptor blockade, points to the hepatic apelin system as a novel therapeutic target in liver disease. (HEPATOLOGY 2008;48:1193-1201.)**

**A**pelin is the endogenous ligand of the angiotensin-like-receptor 1 (AGTRL1), a G-protein-coupled receptor that has been found to be involved in an array of physiologic events, such as water homeostasis,<sup>1</sup> regulation of the cardiovascular tone,<sup>2</sup> and cardiac contractility.<sup>3</sup> Apelin and its receptor are widely expressed in the central nervous system and in peripheral tissues, especially in endothelial cells

but also in leukocytes, enterocytes, adipocytes, and cardiomyocytes.<sup>4-8</sup> AGTRL1 activation leads to inhibition of cyclic adenosine monophosphate production and activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1.<sup>9</sup> Through the former pathway, apelin enhances the vascular dilatation after the induction of endothelial nitric oxide (NO) synthase, in a molecular cascade leading to extracellular-signal regulated kinases and

*Abbreviations:* AGTRL1, angiotensin-like-receptor 1; ALDO, aldosterone; bw, body weight; CI, cardiac index; CO, cardiac output; MAP, mean arterial pressure; mRNA, messenger RNA; NO, nitric oxide; PP, portal pressure; SPP, splanchnic perfusion pressure; TPR, total peripheral resistance; VEGF, vascular endothelial growth factor

*From the* <sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Genetics Service, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, University of Bologna, Bologna, Italy; <sup>3</sup>Liver Unit, CIBEREHD, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Hospital Ramón y Cajal, University of Alcalá, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Department of Physiology I, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received March 31, 2008; accepted June 3, 2008.

Supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (grants SAF03-02597 and SAF06-07053 to W.J. and SAF07-63069 to M.M.-R.). A.P. had a Dame Sheila Sherlock fellowship from the European Association for the Study of the Liver. P.M.-L. had a grant from DGICYT (BES-2004-5186). G.F.-V. had a Clinical Chemistry fellowship from Siemens Medical Solutions Diagnostics (Tarrytown, NY). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Address reprint requests to: Dr. Wladimiro Jiménez, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: wjimenez@clinic.ub.es; fax: (3493)2275697.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

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

DOI 10.1002/hep.22467

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

P70S6K activation.<sup>10,11</sup> On the other hand, the burst of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type 1 activity in cardiomyocytes leads to a dose-dependent increase in *in vivo* and *in vitro* myocardial contractility.<sup>3,12</sup> Recent studies also suggest a role for apelin in inflammation and angiogenesis since its expression is regulated by tumor necrosis factor- $\alpha$ ,<sup>6</sup> and it has been demonstrated that apelin could trigger vascular sprouting in absence of vascular endothelial growth factor (VEGF).<sup>13</sup>

Hepatic cirrhosis is among the most prevalent diseases in Western countries. The prognosis of these patients is grim, except for those who may benefit from liver transplantation. This is due to the multiple organic derangements, including renal failure, variceal bleeding, or bacterial peritonitis, developed by these individuals.<sup>14</sup> Several clinical and experimental studies have demonstrated that the trigger for these disturbances is the existence of an important and progressively accentuated cardiocirculatory dysfunction, of which portal hypertension, arterial hypotension, high cardiac output (CO), and diminished systemic vascular resistance are the most relevant features.<sup>15</sup> Thus, during the last decade the mechanisms leading to decreased arterial pressure and concomitant arterial vasodilation in cirrhosis have been a subject of major interest. Although it is generally believed that increased endothelial production of NO is of major importance in the pathogenesis of this phenomenon,<sup>15</sup> the contribution of other recently identified endogenous systems has also been considered.<sup>16</sup>

In the current investigation, we assessed the circulating levels of apelin, the hemodynamic and renal effects induced by either the administration of apelin or the acute blockade of the apelin receptor, and the tissue expression of these peptides in rats with cirrhosis and ascites. Furthermore, we assessed whether chronic blockade of AGTRL1 may influence hepatic remodeling, fibrosis, and neoangiogenesis in rats with cirrhosis. Finally, the relationship between the degree of activation of the renin-angiotensin-aldosterone (ALDO) and sympathetic nervous systems and the circulating levels of apelin in patients with cirrhosis and ascites was also evaluated. The hypothesis of the investigation was that the endogenous apelin system is involved in the pathogenesis of the hepatic remodeling and cardiovascular and renal complications occurring in advanced liver disease.

## Patients and Methods

**Induction of Cirrhosis in Rats.** Studies were performed in male adult Wistar rats (Charles River, Saint Aubin les Elseuf, France). Rats with cirrhosis and control rats were fed ad libitum with standard chow and distilled water containing phenobarbital ( $0.3 \text{ gm}\cdot\text{L}^{-1}$ ) as drinking

fluid. Cirrhosis was induced by  $\text{CCl}_4$  as described elsewhere.<sup>17</sup> Rats with cirrhosis and ascites were studied between 16 and 21 weeks when ascites had fully developed. Control rats were studied following a similar period of phenobarbital administration.

**Hemodynamic and Renal Effects of Apelin Administration in Rats with Cirrhosis.** To assess the systemic and renal effects of apelin, 12 control rats and 12 rats with cirrhosis and ascites were randomly assigned to a hemodynamic (six rats with cirrhosis and six control rats) or a renal excretory function study (six rats with cirrhosis and six control rats) as described below. Thereafter, hemodynamic or renal parameters were measured in basal conditions and following the intravenous injection of Apelin-13 ( $15 \mu\text{g}/\text{kg}$  of body weight [kg.bw]; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinherim, Germany).

**Hemodynamic and Renal Effects of Apelin Receptor Blockade in Rats with Cirrhosis.** The systemic and renal effects of apelin receptor blockade were assessed in 12 control rats and 12 rats with cirrhosis and ascites. Animals were randomly assigned to a hemodynamic (six rats with cirrhosis and six control rats) or renal excretory function study (six rats with cirrhosis and six control rats) as described below. Thereafter, hemodynamic or renal parameters were measured in basal conditions and following the intravenous injection of the specific antagonist of apelin receptor F13A<sup>18</sup> ( $15 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ , Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA).

**Circulating Levels and Tissue Expression of Apelin and Apelin Receptor in Rats with Cirrhosis.** Serum concentration of apelin was measured in 24 control and 24 rats with cirrhosis and ascites. Blood samples were collected from the femoral vein; following centrifugation ( $1,800 \text{ g}$  for 10 minutes,  $4^\circ\text{C}$ ), plasma was frozen at  $-20^\circ\text{C}$  in aliquots until further analysis. Liver, kidney, lung, and heart specimens were collected from 10 control and 10 rats with cirrhosis, washed in diethyl pyrocarbonate (0.1%)-treated phosphate buffered saline salt solution (in mM: NaCl 140,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  1.84, pH 7.4), immediately frozen in dry ice, and stored in liquid nitrogen to evaluate messenger expression of apelin and messenger RNA (mRNA) and protein abundance of AGTRL1.

**Chronic Blockade of the Apelin Receptor, AGTRL1, in Rats with Cirrhosis.** Rats with cirrhosis and ascites were included in the protocol after developing stable ascites. Thereafter,  $\text{CCl}_4$  treatment was discontinued and animals were randomly assigned to one of the following groups: group A ( $n = 8$ ), daily subcutaneous injection of the AGTRL1 antagonist, F13A<sup>18</sup> ( $75 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ ; Phoenix Pharmaceuticals) for 9 days beginning the second week after the detection of sustained ascites and group B ( $n =$

8), daily subcutaneous injection of saline solution (1 mL/kg.bw). At the end of the treatment animals were anesthetized and mean arterial pressure (MAP), CO, and portal pressure (PP) were recorded as described below. Splanchnic perfusion pressure (SPP) was defined as MAP – PP. Thereafter, ascites volume was measured by laparotomy and liver samples from treated and untreated animals were fixed in 10% buffered formalin for further hematoxylin-eosin and immunostaining analysis.

**Hemodynamic Studies.** Rats with cirrhosis and control rats were anesthetized with Inactin (100 mg/kg.bw; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) and prepared with a polyvinyl-50 catheter in the left femoral artery. A blood sample (2 mL) was taken to measure standard parameters of hepatic and renal function and plasma concentration of apelin. Packed cells were reconstituted to an equal volume with Ringer solution and reinfused over 3 minutes. Animals were prepared for measurements of hemodynamic parameters as described.<sup>19</sup> Total peripheral resistance (TPR) was obtained using the formula  $TPR = MAP/CO$ . Hemodynamic parameters were allowed to equilibrate for 30 minutes and values of MAP, heart rate, CO, and TPR were recorded in basal conditions and 15 minutes after the intravenous administration of Apelin-13 or F13A. The cardiac index (CI) was calculated as  $CO/bw$ . Each value represents the average of two measurements.

**Renal Excretory Function.** Rats with cirrhosis and ascites and control rats were placed in metabolic cages and the excretion of free water was determined once weekly (Tuesday) as described.<sup>20</sup> When a moderate impairment in the renal ability to excrete free water was detected (% of water load excreted <85%) animals with cirrhosis were included in the protocol. After 24 hours, animals received an intravenous administration of Apelin-13 (15  $\mu$ g/kg.bw) or F13A (15  $\mu$ g/kg.bw) through the tail vein. Thereafter, animals were submitted to a second water overload, as previously described, and % of water excreted was determined in the 3-hour urine collection. After 24 hours, the animals were killed by isoflurane overdose and trunk blood was obtained by decapitation to measure standard parameters of hepatic and renal function and plasma concentration of apelin.

**Messenger Expression of Apelin and AGTRL1 in Different Organs of Rats with Cirrhosis.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**AGTRL1 Protein Expression in Hepatic Tissue of Control and Rats with Cirrhosis.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**Immunodetection of Apelin, AGTRL1, and Von Willebrand Factor.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**Immunofluorescence.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**Fibrosis Quantification.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**Human Studies.** A total of 59 patients with cirrhosis and ascites and 10 healthy subjects were included in the study. After admission, patients were given a 50-70 mmol/day sodium diet without diuretics. At 8 AM of the fifth day, after overnight fasting and following 1 hour of bed rest, samples were obtained to measure liver and renal function, plasma renin activity, and plasma concentrations of ALDO, norepinephrine, and apelin. An antecubital vein was catheterized and blood samples were obtained under ice and centrifuged at 4°C and the serum was stored at –80°C until assayed.

**Measurements and Statistical Analysis.** See online expanded experimental procedures in the Supplementary Materials.

**Ethical Approval.** The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committees of the Hospital Clínic Universitari and the Hospital Ramón y Cajal. Patients gave written informed consent to participate in the study, which was conducted according to the guidelines of Good Clinical Practice.

## Results

Liver histology of all the animals treated with  $CCl_4$  included in the study had a finely granulated surface and histological examination showed the characteristic features of cirrhosis. Ascites volume ranged between 5 and 60 mL. Control rats showed no appreciable alterations in liver histology.

**Increased Circulating Levels of Apelin in Cirrhotic Rats.** Cirrhotic rats were investigated after they had developed marked abnormalities in liver function tests. As anticipated, rats submitted to the cirrhosis induction protocol showed decreased serum albumin ( $25.3 \pm 6.6$  g/L,  $P < 0.001$ ) increased activity of alanine aminotransferase ( $49.5 \pm 6.2$  U/L,  $P < 0.01$ ), and enhanced serum concentration of bilirubin ( $1.48 \pm 0.20$  mg/dL,  $P < 0.001$ ) in comparison to control rats ( $37.7 \pm 1.2$  g/L,  $17.8 \pm 7.1$  U/L, and  $0.18 \pm 0.02$  mg/dL, respectively). This marked hepatic dysfunction was associated with a significant increase in the circulating levels of apelin in comparison to healthy animals ( $1,235 \pm 49$  versus  $930 \pm 42$  pg/mL,  $P < 0.001$ ). In fact, only three out of the 24 rats with cirrhosis analyzed showed values of apelin within the range of control rats. No differences in serum creatinine

**Table 1. Hemodynamic and Renal Effects Induced by the Intravenous Administration of Apelin-13**

	Control Rats (n = 12)		Cirrhotic Rats (n = 12)	
	Basal	Posttreatment	Basal	Posttreatment
Hemodynamic study (n = 12)				
Mean arterial pressure (mmHg)	117 ± 3	116 ± 4	96 ± 7†	91 ± 7
Cardiac index (mL·minute <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	0.38 ± 0.01	0.54 ± 0.04***	0.80 ± 0.06†	0.92 ± 0.05
Total peripheral resistance (mmHg·mL <sup>-1</sup> ·minute)	0.71 ± 0.05	0.49 ± 0.02**	0.26 ± 0.02†	0.21 ± 0.01
Renal study (n = 12)				
Water excreted (%)	99 ± 2	79 ± 11**	72 ± 4†	73 ± 4
Urine sodium (μEq/minute)	0.91 ± 0.19	0.36 ± 0.10*	0.07 ± 0.02†	0.04 ± 0.01

Apelin-13 dosage 15 μg/kg of body weight. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.005, in comparison to basal values (paired Student t test). †P < 0.001 in comparison to control rats (unpaired Student t test).

were found between rats with cirrhosis and control rats (0.39 ± 0.01 versus 0.43 ± 0.03 mg/dL).

**Apelin Is Involved in the Cardiocirculatory Dysfunction in Cirrhotic Rats.** To investigate the pathophysiological significance of the increased production of apelin in cirrhosis, we next assessed the hemodynamic and renal effects resulting from stimulating or inhibiting the apelin receptor in control and rats with cirrhosis. The results obtained in 12 control and 12 animals with cirrhosis following the intravenous administration of Apelin-13 are shown in Table 1. Rats were randomly assigned to either the hemodynamic or the renal response group. As expected, apelin administration to control rats resulted in a marked vasodilator effect as reflected by an approximately 30% reduction in TPR. This was associated with a concomitant increase in CI, thus resulting in no significant changes in MAP. By contrast, this characteristic hemodynamic response to the intravenous administration of apelin in healthy animals was not seen in cirrhotic rats. In fact, neither CI nor TPR experienced any noticeable change following the administration of the peptide. The renal response to a water load in basal conditions and after the administration of apelin is also shown in Table 1. Whereas apelin administration decreased water and sodium excretion in normal rats, the peptide did not further modify the already impaired ability to excrete a water load in cirrhotic animals.

The hemodynamic and renal effects observed after AGTRL1 blockade were qualitatively opposite to those seen after the administration of Apelin-13 (Table 2). Actually, F13A administration did not modify any of the hemodynamic parameters assessed in control animals. By contrast, AGTRL1 blockade significantly improved cardiovascular function in cirrhotic rats, as indicated by a marked reduction in CI and a significant increase in TPR. The results observed on assessing renal function were in line with the cardiovascular findings. AGTRL1 blockade did not modify the renal ability to excrete a water load in control rats but significantly increased water and sodium excretion in cirrhotic rats with and ascites (Table 2).

**The Apelin System Is Overactivated in the Liver of Cirrhotic Rats.** To further delineate whether the apelin system is selectively activated in cirrhosis, we measured mRNA expression of apelin and AGTRL1 in heart, kidney, lung, and liver of rats with cirrhosis and control rats (Fig. 1). No significant differences were found in the abundance of both messengers between hearts or kidneys of animals with cirrhosis and control animals. A decreased expression of apelin and apelin receptor was observed in the lung of rats with cirrhosis in comparison to controls, although values only reached statistical significance in the former case. However, an intense upregulation of the endogenous apelin system was observed in the liver of rats with cirrhosis. The amount of apelin and AGTRL1 tran-

**Table 2. Hemodynamic and Renal Effects Induced by the Intravenous Administration of the Apelin Receptor Antagonist F13A**

	Control Rats (n = 12)		Cirrhotic Rats (n = 12)	
	Basal	Posttreatment	Basal	Posttreatment
Hemodynamic study (n = 12)				
Mean arterial pressure (mmHg)	115 ± 4	120 ± 2	83 ± 4†	91 ± 7
Cardiac index (mL·minute <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	0.41 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.80 ± 0.02†	0.59 ± 0.02***
Total peripheral resistance (mmHg·minute·mL <sup>-1</sup> )	0.62 ± 0.04	0.80 ± 0.08	0.23 ± 0.02†	0.32 ± 0.02**
Renal study (n = 12)				
Water excreted (%)	96 ± 2	96 ± 1	69 ± 2†	89 ± 3**
Urine sodium (μEq/minute)	0.86 ± 0.19	1.04 ± 0.10	0.08 ± 0.04†	0.29 ± 0.09*

F13A dosage 15 μg/kg body weight. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.005, in comparison to basal (paired Student t test) values. †P < 0.001 in comparison to control rats (unpaired Student t test).



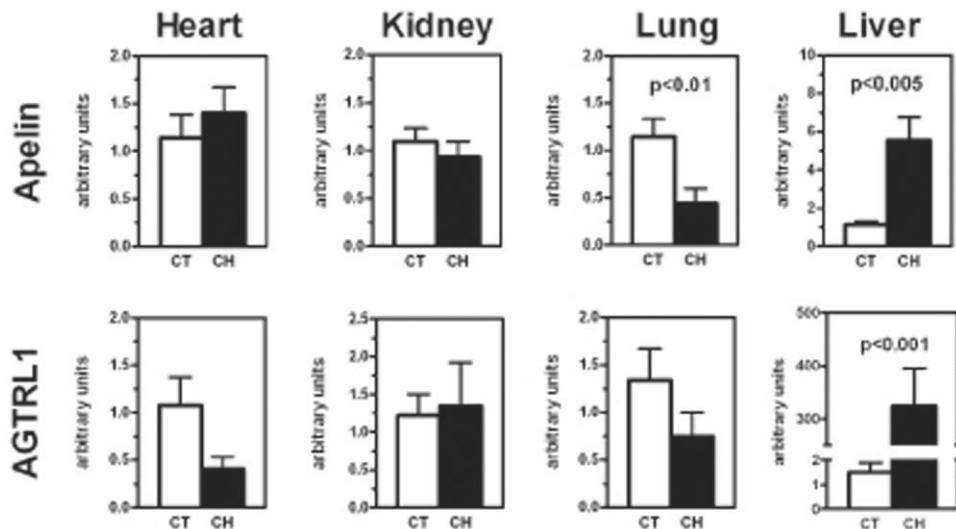


Fig. 1. mRNA expression of apelin and AGTRL1 (apelin receptor) by real-time polymerase chain reaction (PCR). Liver, kidney, heart, and lung mRNAs taken from 10 control rats and 10 rats with cirrhosis were retrotranscribed and amplified. hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as the housekeeping gene.

scripts was three-fold to four-fold and around 300-fold-higher in the hepatic tissue of rats with cirrhosis than in controls, respectively (Fig. 1). This overactivation of the hepatic apelin system in cirrhosis was also noted at the posttranslational level. AGTRL1 content in protein extracts obtained from hepatic homogenates of rats with cirrhosis was markedly higher than in control animals (Fig. 2).

**Apelin Is Produced by Stellate Cells.** In an attempt to identify the cellular source of the altered expression of apelin and AGTRL1, we performed histological immu-

nolocalization of these peptides in the liver of cirrhotic and control rats. Apelin immunolabeling was almost undetectable in control rats, but in animals with cirrhosis was identified as linear staining in the portal tracts and fibrous septa and was more intense in the severely fibrotic tissue (Fig. 3). As occurred with the expression pattern of apelin, hepatic AGTRL1 detection was restricted to some perivenular areas in control animals, whereas in rats with cirrhosis, labeling-positive cells extended throughout all

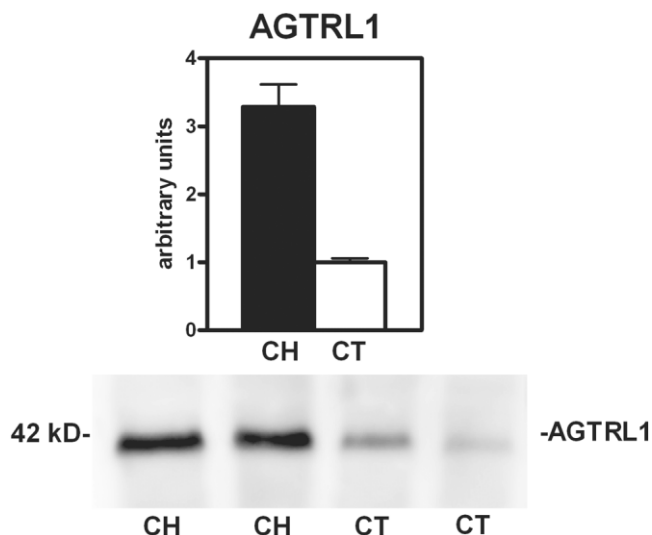


Fig. 2. Protein expression of the apelin receptor, AGTRL1. Representative western blot of whole protein extracts taken from two cirrhotic and two control livers. Densitometric analysis in all animals (six rats with cirrhosis and six control rats) is shown at the top of the figure.

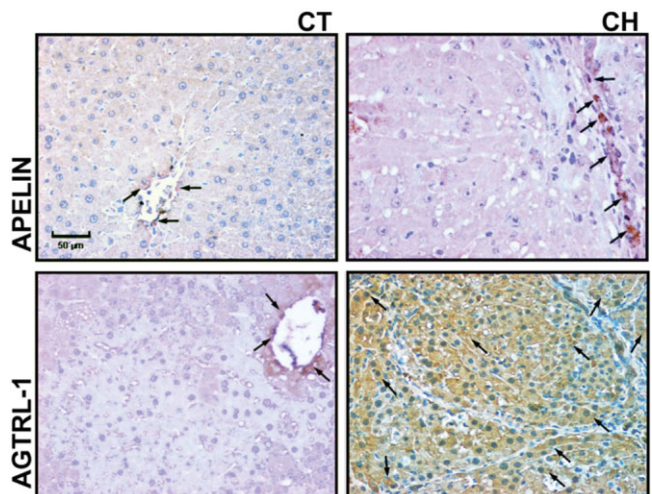


Fig. 3. Protein expression of apelin and apelin receptor (AGTRL1) was immunolocalized in liver sections of control (CT) and rats with cirrhosis and ascites (CH). Apelin expression was restricted to perivenular areas (arrows) in control rats, while a stronger signal was detected in rats with cirrhosis, especially across the fibrous septa. AGTRL1 was faintly detected in perivenular areas (arrow) in control rats, while a marked increase in its expression was detectable throughout the cirrhotic parenchyma, but not in the scar tissue. Original magnification:  $\times 200$ .

the hepatic parenchyma with the exception of the fibrotic areas (Fig. 3). Interestingly, apelin immunostaining colocalized with  $\alpha$ -smooth muscle actin (Fig. 4). These findings indicate that activation of apelin production in the liver of rats with cirrhosis selectively occurs in myofibroblastic cell types located in the margin of the fibrous septa.

**Effect of Chronic AGTRL1 Blockade on Systemic Hemodynamics, Hepatic Fibrosis, and Vessel Density in Cirrhotic Rats.** As anticipated, cirrhotic rats receiving vehicle had a marked hyperdynamic circulatory syndrome (MAP:  $82 \pm 3$  mmHg; CI:  $1.13 \pm 0.1$  mL.kg<sup>-1</sup>.minute<sup>-1</sup>; TPR:  $0.20 \pm 0.01$  mmHg.mL<sup>-1</sup>.minute; PP:  $14 \pm 1$  mmHg; and SPP:  $70 \pm 4$  mmHg). Administration of the AGTRL1 antagonist for 9 days to rats with cirrhosis significantly improved systemic hemodynamics (MAP:  $97 \pm 3$  mmHg,  $P < 0.05$ ; CI:  $0.85 \pm 0.06$  mL.kg<sup>-1</sup>.minute<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ; TPR:  $0.32 \pm 0.04$  mmHg.mL<sup>-1</sup>.minute,  $P < 0.05$ ) when there were no changes in PP ( $13 \pm 1$  mmHg) but a significant increase in SPP ( $84 \pm 4$  mmHg,  $P < 0.05$ ). At the end of the study, ascites volume significantly differs between nontreated and treated cirrhotic rats ( $42 \pm 8$  versus  $16 \pm 8$  mL,  $P < 0.05$ ). Furthermore, ascites was undetectable in four out of the eight rats with cirrhosis treated with the apelin receptor antagonist, whereas noticeable volumes of this liquid were detected in all cirrhotic rats treated with vehicle. No significant differences in creatinine clearance were observed between treated and nontreated rats with cirrhosis ( $0.54 \pm 0.12$  versus  $0.59 \pm 0.05$  mL/minute). Anti-von Willebrand Factor antibody and Sirius red were used to identify vascular proliferation and collagen fibrils, respectively. Both groups of rats have pronounced vascular growth

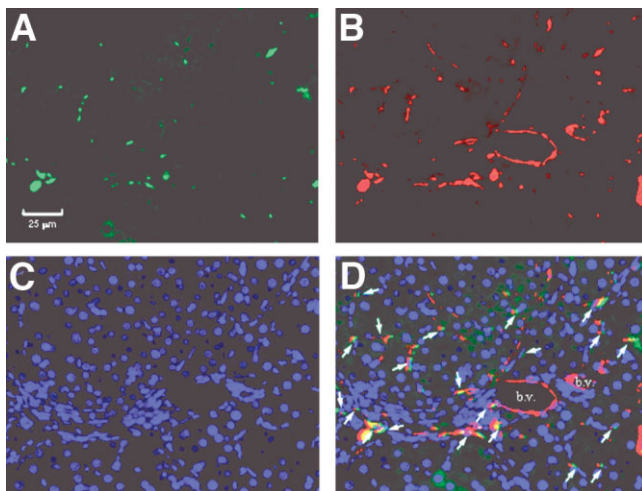


Fig. 4. Immunofluorescent localization of apelin and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) in livers of cirrhotic rats with ascites. Apelin (A, green),  $\alpha$ -SMA (B, red), and cell nuclei (C, blue) fluorescent staining was performed using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and specific antibodies. Colocalization of  $\alpha$ -SMA and apelin (arrow, yellow) is shown in the merge panel (D). b.v., blood vessel. Original magnification:  $\times 100$ .

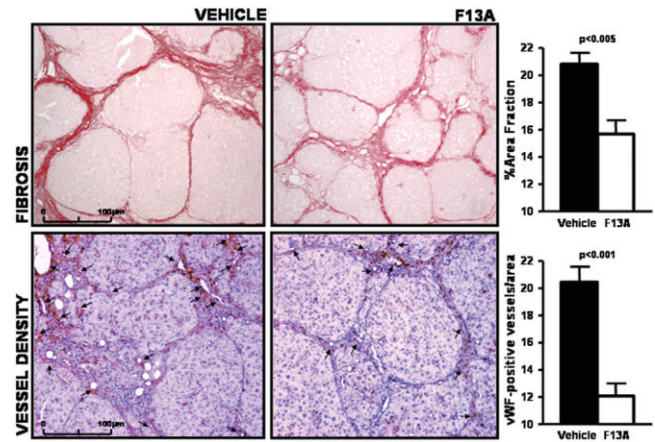


Fig. 5. Effect of apelin receptor AGTRL1 blockade on liver fibrosis and vessel density. Top panels: Sirius red staining of representative liver sections obtained from cirrhotic rats with ascites treated either with vehicle ( $n = 8$ ) or F13A ( $n = 8$ ). Bottom panels: Immunolocalization of von Willebrand Factor (vWF) was used to quantify vessel density in liver sections taken from rats with cirrhosis treated either with vehicle ( $n = 8$ ) or F13A ( $n = 8$ ). Bars on the right show the quantitative measurement of relative fibrosis and vessel density in all animals. Original magnification,  $\times 100$ .

and abundant fibrosis (Fig. 5). However, liver sections obtained from cirrhotic rats receiving F13A showed an approximately 40% lower vessel density and 25% decrease of fibrosis area than sections of vehicle-treated cirrhotic rats (Fig. 5).

**Patients with Cirrhosis Have Increased Circulating Levels of Apelin.** The demographic and laboratory data in healthy subjects and patients with cirrhosis are shown in Table 3. Marked hepatic failure was present in patients with cirrhosis, as indicated by high serum bilirubin and low serum albumin and prothrombin activity. Serum cre-

**Table 3. Demographic Data, Liver and Renal Function Test, and Endogenous Vasoactive Systems in Subjects with Cirrhosis and Control Subjects**

	Healthy Subjects (n = 10)	Subjects with Cirrhosis and Ascites (n = 59)
Sex (M/F)	5/5	49/10
Age (years)	$43 \pm 10$	$52 \pm 12$
Etiology (viral/alcohol)	N/A	32/27
Serum bilirubin (mg/dL)	$0.38 \pm 0.05$	$4.8 \pm 0.7^*$
Serum albumin (g/L)	$40.2 \pm 0.6$	$31.4 \pm 0.1\ddagger$
Blood urea nitrogen (mg/dL)	$14.4 \pm 0.9$	$45.42 \pm 5.0^*$
Serum creatinine (mg/dL)	$0.75 \pm 0.05$	$1.17 \pm 0.1$
Plasma renin activity (ng/mL.hour)	$0.14 \pm 0.04$	$4.47 \pm 0.5\ddagger$
Aldosterone (ng/dL)	$10.34 \pm 1.4$	$86.48 \pm 11.2\ddagger$
Norepinephrine (ng/mL)	$196 \pm 17.4$	$471 \pm 34.7\ddagger$
Serum apelin (pg/mL)	$282 \pm 11$	$855 \pm 75\ddagger$

\* $P < 0.05$ ;  $\ddagger P < 0.01$ ;  $\ddagger P < 0.005$ ; with respect to healthy subjects (unpaired Student *t* test).

atinine ranged between 0.64 and 3.26 mg/dL in patients with cirrhosis, although no statistical differences were found when compared with healthy subjects. As anticipated, patients displayed marked overactivity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems (Table 3). Patients with cirrhosis also presented a striking increase in the circulating levels of apelin. In most patients apelin plasma levels were at least two-fold higher than in healthy subjects and in some individuals figures reached values 10-fold higher than in controls. An indirect significant relationship was found between apelin levels and serum creatinine ( $r = -0.351$ ,  $P < 0.01$ ), whereas no correlation was found between apelin concentration and plasma renin activity ( $r = 0.138$ ), ALDO ( $r = 0.307$ ), or norepinephrine ( $r = 0.173$ ) in patients with cirrhosis.

## Discussion

Hepatic architectural disruption is a major feature of patients with chronic liver disease. Actually, the liver of these patients undergoes an intense process of tissue remodeling characterized by chronic inflammation, neoangiogenesis, and fibrogenesis.<sup>21,22</sup> In end-stage liver disease, hepatic failure occurs, with liver transplantation being the only therapeutic alternative. Apelin is a recently described endogenous peptide that plays an important role in heart physiology, pathophysiology,<sup>7,12</sup> as well as inflammation<sup>4</sup> and angiogenesis.<sup>13</sup>

The current study evaluated whether the endogenous apelin system is involved in the hepatic remodeling and the cardiovascular and renal complications occurring in advanced liver disease. First, we measured the circulating levels of apelin, which were markedly enhanced in rats with cirrhosis in comparison to control animals. This represents the first circumstantial evidence linking apelin activation to decompensated cirrhosis. The pathophysiological meaning of this finding was next evaluated by assessing the changes induced by either systemically challenging or blocking the apelin system in rats with cirrhosis.

Acute single intravenous administration of apelin to control animals resulted in a pronounced reduction in peripheral resistance, which is consistent with previous investigations demonstrating that this peptide possesses vasodilator properties, exerted through the NO signaling pathway.<sup>2,23</sup> This effect was not associated with significant modifications in the MAP of these animals due to the marked rise in CO induced by the peptide. In fact, apelin has been described as one of the most powerful endogenous positive inotropic substances known so far.<sup>3</sup> Administration of this peptide also deteriorated renal excretory function in control animals. The impaired ability to excrete water and sodium observed after a water load was

probably due to the decrease in peripheral resistance and/or a direct renal effect induced by apelin in these animals. This would be in line with an investigation describing the presence of AGTRL1 in the renal tissue of adult and neonate rats.<sup>9</sup> However, contrary to control animals, cirrhotic rats with ascites exhibited marked resistance to the cardiovascular and renal effects of apelin, since this peptide did not modify the already impaired hemodynamic and excretory function of cirrhotic rats. Conversely, AGTRL1 blockade improved systemic hemodynamics and significantly ameliorated the renal excretory function in cirrhotic rats with ascites. The most interesting finding was that the administration of the antagonist had a marked negative inotropic effect that resulted in an almost 30% decrease in CI and a significant rise in TPR with no evident effects on MAP. F13A did not produce any significant change in control animals. As far as we know, these results are the first indication that the increased circulating levels of apelin are of pathogenic cardiovascular significance in cirrhosis.

Studies assessing tissue distribution of apelin and AGTRL1 in normal adult rats demonstrated that the highest expression of both messengers was in the lung and also found quite strong levels in the heart; however, the abundance of these transcripts was very faint in the liver.<sup>8,9</sup> Therefore, to establish whether cirrhosis is associated with an altered expression pattern of apelin and AGTRL1 mRNAs, we next extracted total mRNA from liver, lung, heart, and kidney from the two groups of animals. Only the hepatic tissue of cirrhotic rats showed significantly increased abundance of both messengers with respect to control rats. This difference was markedly striking in the case of AGTRL1 mRNA and was paralleled by higher abundance of the AGTRL1 protein in the hepatic tissue of cirrhotic rats than in controls. Our findings indicate that the hepatic apelin system is markedly and selectively activated in cirrhosis. These results are in line with the concept that the increased circulating levels of apelin in cirrhotic rats mainly result from an increased hepatic production rather than an impaired renal catabolism of this peptide. This is further supported by the absence of differences in serum creatinine between cirrhotic and control rats. Immunolocalization experiments revealed a strong positive signal for apelin and AGTRL1 in the liver of cirrhotic animals. In the former case the signal was located in stellate cells, whereas the apelin receptor was mainly identified in hepatocytes. These results indicate that, beyond its cardiotropic and vasodilator effects, apelin may also behave as a hepatic paracrine substance in the cirrhotic liver, secreted by the activated stellate cells interacting with the nearby paren-



chymal cells, and hence triggering proinflammatory and neoangiogenic signaling pathways. Fibrosis, therefore, can no longer be considered as a simple deposition of fibrillar extracellular matrix. Rather, hepatic remodeling should be considered as a process in which neoformed vessels are embedded in an active evolving scar tissue, where a complex interplay occurs between several cell types and soluble substances.

Previous investigations have shown that apelin and AGTRL1 are induced by tumor necrosis factor- $\alpha^6$  and VEGF,<sup>24</sup> respectively. Activation of these peptides in the fibrotic liver results from the chronic inflammation and reduced oxygenation<sup>19</sup> that takes place in the injured viscera. Therefore, we speculated that the hepatic apelin system could be an important mediator in the initiation and maintenance of the inflammatory and fibrogenic processes occurring in the fibrotic liver. To confirm this hypothesis, we disrupted the apelin signaling pathway by chronically blocking AGTRL1. The degree of hepatic fibrosis and angiogenesis of cirrhotic rats chronically treated with the receptor antagonist dropped 25% and 40%, respectively, as compared with cirrhotic rats receiving vehicle. Moreover, these animals also showed an improvement in both cardiovascular performance and renal function and consequently, lost ascites. However, no differences in PP were observed between rats treated and not treated with the AGTRL1 antagonist. This is likely due to the increased SPP resulting from the vasoconstrictor effect of the apelin antagonist. Thus, in cirrhotic rats receiving F13A, the reduction in fibrosis was not paralleled by an amelioration in portal hypertension because of the counteracting effect of the increase in SPP. These results, therefore, indicate that selective chronic inhibition of the apelin receptor improves recovery from cirrhosis and causes a faster reversal of neoangiogenesis in experimental cirrhosis.

While the mechanisms of action of the hepatic apelin system have not been fully clarified, impaired oxygen availability in the hepatic tissue could play a pivotal position in upregulating both components of this system. Direct regulation of apelin expression and secretion by hypoxia has been shown in rat cardiac myocytes,<sup>25</sup> whereas hypoxia is also a well-known inducer of VEGF, which in turn stimulates AGTRL1 expression in endothelial cells of blood vessels.<sup>24</sup> This suggests that under liver injury-associated hypoxia, the hepatic apelin system could play a central role in mediating inflammatory response and fibrogenesis.

Finally, we sought to determine whether apelin activation also occurs in humans with liver disease. Patients with cirrhosis and ascites also showed a highly significant increase in the circulating levels of apelin, with almost no

overlap with values of healthy subjects, thereby supporting the concept that the hepatic apelin system is of pathogenic significance in cirrhosis. Moreover, the selective hepatic activation of the apelin system in cirrhotic rats, together with the important drop in fibrogenesis and angiogenesis resulting from AGTRL1 blockade, suggests that therapeutic agents interfering with this signaling pathway might not only help to stabilize decompensated patients waiting for transplant, but may also alter the natural course of the disease.

## References

1. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10464-10469.
2. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274-26279.
3. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91:434-440.
4. Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, Kawashima K. The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J Neuroimmunol* 2003;144:46-52.
5. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471-476.
6. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, et al. TNF- $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 2006;20:1528-1530.
7. Scott IC, Masri B, D'Amico LA, Jin SW, Jungblut B, Wehman AM, et al. The G protein-coupled receptor agr11b regulates early development of myocardial progenitors. *Dev Cell* 2007;12:403-413.
8. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:162-171.
9. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000;275:21061-21067.
10. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:539-545.
11. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004;18:1909-1911.
12. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004;110(Suppl 1):II187-II193.
13. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296:177-189.
14. Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, Rodés J. Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, Mc Intyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2nd ed. Oxford, UK: Oxford Medical Publications; 1999:733-761.
15. Morales-Ruiz M, Jimenez W. Nitric oxide and systemic and renal hemodynamic disturbances in cirrhosis. In: Ginès P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd; 2005:105-114.



16. Jiménez W. Endocannabinoids and liver disease. *HEPATOLOGY* 2005;41:983-985.
17. Clària J, Jimenez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Ginès P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd; 2005:215-226.
18. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005;146:231-236.
19. Fernández-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Arroyo V, Solé M, et al. Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol* 2003;162:1985-1993.
20. Ros J, Fernández-Varo G, Muñoz-Luque J, Arroyo V, Rodés J, Gunnat JW, et al. Sustained aquaretic effect of the V2-AVP receptor antagonist, RWJ-351647, in cirrhotic rats with ascites and water retention. *Br J Pharmacol* 2005;146:654-661.
21. Tugues S, Fernández-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, et al. Antiangiogenic treatment with Sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *HEPATOLOGY* 2007;46:1919-1926.
22. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.
23. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide dependent mechanism. *Regul Pept* 2001;99:87-92.
24. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the calibre size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J* 2008;27:522-534.
25. Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T, et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* 2007; 21:1821-1830.

## **EXPANDED EXPERIMENTAL PROCEDURES**

**Messenger expression of Apelin and AGTRL1 in different organs of cirrhotic rats:** Total RNA was extracted from the middle liver lobe, left kidney, left lung and left ventricle of control and cirrhotic rats with ascites using a commercially available kit (RNAeasy, Qiagen, Germany). One  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed (RT) by using a complementary DNA synthesis kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for Apelin (left: 5'-CTCTGGCTCTCCTTGACTGC-3' right: 5'-GCCTTCTTCTAGCCCTTCC-3'), Apelin-receptor AGTRL1 (left: 5'-TCAACCATGACTGGGACAGA-3' right: 5'-GCATTCTGAAGGTGGGATG-3') and HPRT, a constitutively expressed gene (left: 5'-GACCGTTCTGTCATGTCG-3' right: 5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3') were designed according to rat Apelin, AGTRL1 and HPRT sequences (GenBank NM\_031612.2, NM\_031349.2, NM\_012583.2 respectively) using the ProbeFinder software (Probefinder v 2.35, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Real time quantitative PCR was analyzed in duplicate and performed with Opticon 2 (MJ Research, Capital Court, Reno, NV). Twenty  $\mu\text{l}$  total volume reaction of diluted 1:16 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM pre-validated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics) and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) was used in each PCR reaction. Fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturizing 10 sec at 95°C, annealing 15 sec at 60°C and extension 20 sec at 72°C). HPRT was used as reference gene for normalization and water was used as negative control. Relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (CT), which is inversely related to the abundance of mRNA transcripts in the initial sample. The mean CT of duplicate measurements was used to calculate  $\Delta\text{CT}$  as the difference in CT for target and reference. Relative quantity

of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the control primers according to the formula  $2^{-\Delta CT}$ . The mean CT of duplicate measurements was used to calculate  $\Delta CT$  as the difference in CT for target and reference. The relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , where  $\Delta\Delta CT$  represents  $\Delta CT$  values normalized with the mean  $\Delta CT$  of control samples.

**AGTRL1 protein expression in hepatic tissue of control and cirrhotic rats:**

Samples from six cirrhotic and six control rats were individually homogenized (PT 10-35, Polytron Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland) in a buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM Pefabloc and a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, Roche). AGTRL1 was separated on a 10 % SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, Bio Rad, Richmond, Ca) and transferred for 2 h at 4 °C to nitrocellulose membranes (Transblot Transfer Medium, Bio Rad), which were stained with Ponceau-S red as a control for protein loading. Then they were incubated overnight with a primary rabbit polyclonal antibody against AGTRL1 (1:400, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA), followed by incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (1:2000, Amersham Biosciences). Bands were visualized by chemiluminescence (ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences). The relative expression of AGTRL1 was determined by densitometric scanning.

**Measurements and statistical analysis:** Urinary osmolality was determined from osmometric depression of the freezing point (Advanced Instruments Osmometer 3300, Needham, HTs MA, USA) and sodium concentration by flame photometry (IL 943, Instrumentation Laboratory, Lexington MA, USA). Serum albumin, ALT and

bilirubin were measured by the ADVIA 1650 Instrument (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown NY). PRA was determined by radioimmunoassay (GammaCoat Plasma Renin Activity, DiaSorin, Stillwater, MN) of angiotensin I generated after 1-hour incubation of the plasma sample at 37°C (pH 7.4) in conditions inhibiting further conversion of angiotensin I. ALDO and NE were also measured by radioimmunoassay (Coat-A-Count Aldosterone. Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA and CAIBL Laboratories, Hamburg, Germany, respectively). Apelin was measured using the Apelin-12 microplate ELISA assay kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. The antibody cross-reacts 100% with human and rat Apelin-12, -13 and -36.

Statistical analysis of results was performed with the paired and unpaired Student's t tests when appropriate. Data are expressed as mean±SEM and were considered significant at a p level of 0.05 or less.

---

**Artículo 3: La apelina media la inducción de genes profibrogénicos en células estrelladas hepáticas humanas.**

En el estudio anterior había quedado demostrado que la apelina se comporta como un potente agente proangiogénico y profibrogénico en el hígado de las ratas cirróticas favoreciendo el proceso de acumulación de ascitis. Sin embargo, los mecanismos que regulan la síntesis de apelina en las CEHs todavía eran un enigma. El papel que desempeñan la hipoxia y el TNF $\alpha$  en la inducción de la apelina y APJ en ciertos tipos celulares resultaba una prometedora guía práctica para escudriñar aquellos estímulos que podrían ser responsables de la inducción del péptido en las CEHs. En la cirrosis hepática conviven también otra serie de estímulos proinflamatorios y profibrogénicos que se han descrito como activadores de las CEHs tales como AII y ET-1, así como LPS en estados más avanzados de la enfermedad. Puesto que la relevancia de la inducción del sistema hepático de la apelina había quedado patente en las ratas cirróticas, se necesitaba realizar un estudio traslacional en pacientes cirróticos. En este sentido, se debía intentar desarrollar un modelo de estudio en una línea celular derivada de CEH humana para poder evaluar los posibles efectos de la apelina sobre la fibrogénesis y las sustancias que participan en la regulación de dicho péptido. Estudios de este tipo podrían ayudar a dar un sentido clínico a los hallazgos que se obtuvieron en el modelo animal. Además, puesto que el sistema de la apelina promovía el síndrome hiperdinámico y la angiogénesis hepática, y su bloqueo reducía la formación de ascitis, el estudio de los factores que regulan su expresión génica podría resultar de interés para el tratamiento de las alteraciones de la permeabilidad vascular en la cirrosis.

Durante la última década, se ha estudiado ampliamente la regulación de la expresión de la apelina en el tejido cardíaco y adiposo. Se conoce que el tejido adiposo tiene hiperactivada la expresión de apelina (mucho más en individuos obesos, por tanto)

y que esa inducción se encuentra principalmente mediada por TNF $\alpha$  e insulina. Sin embargo, existe todavía controversia en cuanto a si el sistema de la apelina puede jugar un papel clave en el síndrome metabólico o en la obesidad.

La polémica alcanza su punto álgido en cuanto a la implicación de la apelina en la inflamación. Dependiendo del contexto, del tejido o de la patología de la que se esté hablando, la inflamación puede inducir o reprimir la expresión de apelina. En la cirrosis hepática el daño hepatocelular promueve un potente proceso inflamatorio crónico que convive con un fenómeno de neovascularización. Tanto citoquinas inflamatorias como factores angiogénicos pueden estimular las CEHs promoviendo fibrogénesis y extravasación vascular. Así que cabía pensar que el sistema de la apelina podría jugar un papel importante no solamente en la angiogénesis hepática sino también en los procesos de fibrogénesis que tiene lugar en la enfermedad hepática.

En este tercer trabajo se analizó la expresión y localización de la apelina en el hígado cirrótico humano. Asimismo, se investigaron los posibles agentes inductores de la sobreexpresión de apelina en las CEHs, así como la participación de ese péptido en la estimulación de genes profibrogénicos en dichas células. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

1) La apelina se encuentra sobreexpresada en las CEHs de los pacientes cirróticos.

La tinción positiva para apelina fue casi indetectable en las muestras humanas de hígado control. En cambio, se observó una clara expresión de apelina en los septos fibrosos y los tractos portales hepáticos de las muestras de hígado cirrótico humano (Figura 1, artículo 3). Puesto que la apelina colocalizaba con  $\alpha$ -SMA, la activación de la producción de apelina en el hígado de pacientes cirróticos tiene lugar preferentemente en las células miofibroblásticas (CEHs) localizadas en el margen de los septos fibrosos.

2) La AII y la ET-1 estimulan la expresión de apelina en las CEH humanas (LX-2).

La estimulación de la línea celular LX-2 (derivada de CEHs) con diferentes factores presentes en la cirrosis dio como resultado que, inesperadamente, ni la hipoxia, ni el TNF $\alpha$  ni el LPS estimularon la expresión de la apelina en esas células. De hecho, los niveles de RNA mensajero de apelina descendieron tras incubar las CEHs con TNF $\alpha$  y LPS. Solamente los agentes profibrogénicos AII y ET-1 aumentaron significativamente la expresión de apelina en las células LX-2 (Figura 3, artículo 3).

3) La apelina hiperactiva la expresión de colágeno I y PDGFR $\beta$  en las células LX-2.

La incubación de las células LX-2 con apelina produjo un incremento en la expresión génica y proteica del colágeno I y PDGFR $\beta$  pero no en los niveles de RNA mensajero de  $\alpha$ -SMA ni de TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Figura 4, artículo 3).

4) El bloqueo del receptor de la apelina previene la inducción “in vitro” de colágeno I y PDGFR $\beta$  activada por AII y ET-1 en las células LX-2.

Las células LX-2 fueron incubadas con AII o ET-1 en presencia o ausencia del antagonista específico del receptor de la apelina (F13A) y se evaluó la expresión génica y proteica de colágeno I y PDGFR $\beta$ . Como cabía esperar, tanto AII como ET-1 estimularon significativamente la expresión tanto de apelina como de colágeno I y PDGFR $\beta$ , y dichos efectos profibrogénicos fueron drásticamente reducidos cuando se bloqueó el receptor de la apelina utilizando F13A. Estos resultados sugieren que la apelina está mediando de manera autocrina algunos de los efectos relacionados con fibrogénesis que ejercen la AII y la ET-1 en las CEHs (Figura 5, artículo 3).

5) La inactivación de la expresión de la apelina reduce la inducción de colágeno I y PDGFR $\beta$  en las ratas fibróticas.

Trasladando los resultados a un modelo “in vivo”, el tratamiento en ratas fibróticas con un antagonista específico del receptor de la AII (AT1R) o un antagonista de los receptores de la ET-1 produjo una marcada reducción de la expresión de apelina hepática en los animales tratados respecto a los animales que recibieron vehículo, en ambos casos. (Figura 6, artículo 3). Dicho descenso en la expresión hepática de apelina se vio asociado a una reducción significativa de la expresión génica y proteica de colágeno I y PDGFR $\beta$  en el hígado de las ratas fibróticas tratadas con ambos antagonistas, en comparación a los animales que recibieron vehículo (Figura 7, artículo 3). Estos resultados se corresponden con los datos obtenidos “in vitro” indicando que la apelina se comporta como un importante mediador de algunos de los efectos profibrogénicos que la AII y ET-1 ejercen sobre las CEHs en la enfermedad hepática.



## **APELIN MEDIATES THE INDUCTION OF PROFIBROGENIC GENES IN HUMAN HEPATIC STELLATE CELLS**

Pedro Melgar-Lesmes<sup>1</sup>, Gregori Casals<sup>1</sup>, Montserrat Pauta<sup>1</sup>, Josefa Ros<sup>1</sup>, Vedrana Reichenbach<sup>1</sup>, Ramon Bataller<sup>2,4</sup>, Manuel Morales-Ruiz<sup>1,3,4</sup>, Wladimiro Jimenez<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Service of Biochemistry and Molecular Genetics, <sup>2</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, SPAIN. <sup>3</sup> Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, SPAIN. and <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)

### **ACCEPTED IN ENDOCRINOLOGY**

**Keywords:** Apelin, fibrosis, angiotensin II, endothelin-1, HSC.

#### **Contact information:**

Dr. Wladimiro Jiménez

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Hospital Clinic Universitari

Villarroel 170, Barcelona 08036, SPAIN

Phone: (3493)2275400 ext 3091

Fax: (3493)2275697

E-mail: [wjimenez@clinic.ub.es](mailto:wjimenez@clinic.ub.es)

**List of Abbreviations:** APJ, Apelin receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; ERKs, Extracellular-Signal Regulated Kinases; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; Hypoxanthine Guanyln Ribosyl Transferase, HPRT; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HSC, hepatic stellate cell; Apelin, AP.

**Financial Support:** This work was supported by grants from Direccion General de Investigacion Cientifica y Tecnica (SAF06-07053 and SAF09-08839 to W.Jimenez and SAF07-63069 to M.Morales-Ruiz) and from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca (SGR 2009/1496). P.Melgar-Lesmes had a grant from DGICYT (BES-2004-5186 and SAF07-63069). G. Casals is a recipient of a "Contrato post formación sanitaria especializada" from the Instituto de Salud Carlos III (FIS CM07/00043). M. Pauta had a grant from DGICYT (BES-2007-16906). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

**All authors have nothing to disclose**

**Word count:** 4474 words

## ABSTRACT

Apelin is a peptide with relevant functions in angiogenesis and inflammation. Recent studies have demonstrated that Apelin is overexpressed in hepatic stellate cells (HSCs) of cirrhotic rats. Moreover, patients with cirrhosis show high circulating levels of this peptide. We evaluated whether the activation of endogenous Apelin system plays a role in the induction of profibrogenic genes in human HSCs. Messenger expression and immunological detection of Apelin were analyzed in human cirrhotic liver and in control samples. Apelin expression was analyzed in a human HSC line (LX-2) under hypoxic conditions or in the presence of proinflammatory or profibrogenic stimuli. The expression of a selected profile of fibrogenesis-related genes in LX-2 was measured by Real-time PCR to quantify the profibrogenic effect of Apelin. In vivo inactivation of Apelin was analyzed in the liver of fibrotic rats after administrating specific blockers of the molecules triggering Apelin induction. Apelin was overexpressed in HSCs from human cirrhotic liver. Neither hypoxia, nor proinflammatory substances induced the expression of Apelin in LX-2. By contrast, both profibrogenic molecules angiotensin-II (All) and endothelin-1 (ET-1) enhanced Apelin expression in these cells. Apelin increased the synthesis of collagen-I and platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ ) in LX-2. All and ET-1 stimulated collagen-I and PDGFR $\beta$  expression and this induction was drastically reduced when AP receptor was blocked using F13A in these cells. In accordance, All or ET-1 receptor antagonists reduced the hepatic synthesis of Apelin, collagen-I and PDGFR $\beta$  in fibrotic rats. **Conclusions:** Apelin is overexpressed in HSCs from cirrhotic patients and mediates some of the fibrogenic effects triggered by All and ET-1 thus suggesting that Apelin could be an important mediator of fibrogenesis in human liver disease.

Fibrosis is a response of the injured liver where tissular healing results from the activation of several cell types and in which numerous cell mediators are involved (1). The nature of the mechanisms regulating fibrosis is overall dual: indirect by attracting inflammatory cells and direct through binding of molecules to specific receptors on myofibroblasts which in turn stimulate proliferation, collagen production, and secretion of autocrine factors (2). The implication of the hepatic immune response in the fibrogenic process is reflected by the fact that treatment with anti-inflammatory drugs has demonstrated to be effective in reducing hepatic infiltrate and fibrosis in experimental cirrhosis (3). Several vasoactive substances are also locally produced in the injured liver and have an autocrine or paracrine effect on hepatic stellate cells (HSCs). Among these substances, angiotensin II (All) and endothelin-1 (ET-1) have attracted particular attention in the last years. Recent data indicate that key components of the Renin-Angiotensin System (RAS) are locally expressed in chronically injured livers and activated HSCs can de novo generate All, the main effector peptide of this system (4). All induces an array of fibrogenic actions in activated HSCs including cell proliferation, migration, secretion of proinflammatory cytokines, and collagen synthesis (5). On the other hand, ET-1 appears to be an important factor involved in the pathogenesis of hepatic fibrosis as well. Actually, ET-1 and its receptors are up-regulated in the fibrotic liver and their expression correlates with the severity of the disease (6,7). Moreover, ET-1 has demonstrated to contribute to stellate cell activation and fibrogenesis in experimental hepatic fibrosis (8).

Aside from classical proinflammatory cytokines and vasoactive substances the list of mediators involved in liver fibrosis by direct action on HSCs includes numerous chemokines as well as growth factors (2). The blockade of hepatic

angiogenesis also results in inhibition of fibrogenic activity thereby indicating that angiogenic and fibrogenic processes are closely integrated phenomena (9). In this regard, recent studies have demonstrated that Apelin (AP), the endogenous ligand of the angiotensin-like receptor 1 (APJ), is overexpressed in activated HSCs and plays an important role in both angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats (10).

AP is a peptide that has shown to be an essential molecule for embryonic and tumor angiogenesis (11). The binding of AP to APJ stimulates endothelial cell proliferation mainly through phosphorylation and subsequent activation of the intracellular effectors P70S6K and Extracellular-Signal Regulated Kinases (ERK) (12). Indeed, AP can trigger vascular sprouting *in vivo* even in the absence of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (13). Among the stimuli upregulating AP, hypoxia and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) have emerged as possible gatekeepers of the expression for this peptide in cardiomyocytes and adipocytes, respectively (14,15). However, the effectors implicated in AP regulation in cirrhosis and the role of this peptide in fibrogenesis has not been clarified so far.

## MATERIAL AND METHODS

**Human study:** Twelve liver samples from cirrhotic patients with chronic hepatitis C and eleven healthy liver sections were collected during either liver resection or transplantation. Proven-biopsy cirrhotic or healthy sections of liver were used for the measurements. Tissue was collected with the required approvals from the Institutional Review Boards and patients' written consent. After admission, patients were given a 50-70 mmol/day sodium diet without diuretics. At 8 a.m. of the 5th day, after overnight fasting and following one hour of bed rest, samples were obtained to measure liver and renal function tests. An antecubital vein was catheterized and blood samples were obtained under ice and centrifuged at 4°C and the serum was stored at -80°C until assayed.

**Immunofluorescence of AP and  $\alpha$ -SMA:** Human liver tissue was fixed in 10% buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin. Sections underwent microwave antigen retrieval, were blocked with 5% normal goat serum, and incubated with rabbit anti-AP and mouse anti- $\alpha$ -SMA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA and Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark, respectively). In addition, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vectashield, Vector laboratories, Burlingame Ca) was used to counterstain cell nuclei. 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 visualized with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

**Cell culture:** LX-2 cells were a generous gift from Dr. Scott L. Friedman and were obtained from primary HSCs, as described (16). HepG2 cells were obtained

from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). These immortalized, stable cell lines can be repeatedly frozen, thawed and propagated. LX-2 and HepG2 cells were seeded ( $2 \times 10^5$  cells/well) in six-well plates to grown to confluence for 24 hours in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin and supplemented with 2 or 10% fetal calf serum, respectively. Thereafter, cells were switched to serum-free for 24 hours. To identify the mechanisms governing AP induction, LX-2 cells were incubated (37°C) at variable time intervals in DMEM under normoxic (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) or hypoxic conditions (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) in a controlled O<sub>2</sub> water-jacketed CO<sub>2</sub> incubator (Forma Scientific Series II, 3131, Marietta, OH) or treated with TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml), All (80 pM) or ET-1 (2 nM) for 24 hours. To assess whether AP may act as a specific profibrogenic factor, LX-2 cells were treated with AP (1 nM) for 24 hours and a selected profile of fibrogenesis-related genes was assessed (collagen-I,  $\alpha$ -smooth muscle actin, PDGFR $\beta$  and Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor 1). To investigate whether AP mediates the induction of fibrogenic signaling pathways in response to All or ET-1, LX-2 cells were stimulated with these vasoactive factors (80pM and 2 nM, respectively) in the presence or absence of the APJ antagonist, F13A (200 nM, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) for 24 hours and the expression of AP and fibrogenesis-related genes was determined. Total RNA and protein were extracted using commercial kits as described below. All experiments carried out in cell lines were reproduced six times in 2 independent assays.

**Messenger RNA expression of AP, collagen-I,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), PDGFR $\beta$  and Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor 1 (TGF $\beta$ R<sub>1</sub>) from cultured cells and liver tissue:** Total RNA from cultured cells and liver tissue was extracted using commercially available kits: TRIZOL (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK)

and RNAeasy (Qiagen, Germany), respectively. One  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed (RT) by using a complementary DNA synthesis kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). As shown in table 1, primers for human AP,  $\alpha$ -SMA, collagen-I, PDGFR $\beta$ , TGF $\beta$ R $_1$  and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), used as an endogenous standard, were designed according to human AP,  $\alpha$ -SMA, collagen-I, PDGFR $\beta$ , TGF $\beta$ R $_1$  and GAPDH sequences (GenBank NM\_017413.3, NM\_001613.1, NM\_000088.3, NM\_002609.3, NM\_004612.2, NM\_002046.2 respectively) using the ProbeFinder software (Probefinder v 2.35, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). As shown in table 1, primers for rat AP, collagen-I, PDGFR $\beta$  and HPRT, a constitutively expressed gene, were designed according to rat AP, collagen-I, PDGFR $\beta$  and HPRT sequences (GenBank NM\_031612.2, NM\_053356.1, NM\_031525.1 and NM\_012583.2 respectively) using the same software as described above. Real time quantitative PCR was analyzed in duplicate and performed with Lightcycler-480 (Roche Diagnostics). Ten  $\mu\text{l}$  of total volume reaction of diluted 1:16 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM of pre-validated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics) and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) was used in each PCR reaction. Fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturizing 10 sec at 95°C, annealing 15 sec at 60°C and extension 20 sec at 72°C). GAPDH and HPRT were used as reference genes for normalization and water was used as negative control. Relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (CT), which is inversely related to the abundance of mRNA transcripts in the initial sample. The mean CT of duplicate measurements was used to calculate  $\Delta\text{CT}$  as the difference in CT for target and reference. The relative quantity of the product was expressed as fold-induction of the target gene



compared with the control primers according to the formula  $2^{-\Delta CT}$ . The mean CT of duplicate measurements was used to calculate  $\Delta CT$  as the difference in CT for target and reference. The relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , where  $\Delta\Delta CT$  represents  $\Delta CT$  values normalized with the mean  $\Delta CT$  of control samples.

**Western blot of AP, collagen-I, PDGFR $\beta$  and  $\beta$ -actin from cultured cells and liver tissue:** Liver tissue from the middle liver lobe was individually homogenized (PT 10-35, Polytron Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland) in a buffer solution with Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM Pefabloc and a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, Roche). Cultured cells were treated with the same lysis solution. Cells were scrapped, placed in appropriate tubes and frozen at -80°C until further analysis. Collagen-I, PDGFR $\beta$  and  $\beta$ -actin were separated on a 7.5 % SDS-polyacrylamide and AP on a 15 % SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, Bio Rad, Richmond, Ca) and transferred for 2 h at 4°C to nitrocellulose membranes (Transblot Transfer Medium, Bio Rad), which were stained with Ponceau-S red as a control for protein loading. Thereafter, membranes were blocked (2 h) with 5 % powdered defatted milk in TTBS buffer. Then they were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-collagen-I or anti-AP (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) or with rabbit polyclonal anti-PDGFR $\beta$  or anti- $\beta$ -actin (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) followed by incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (1:2000, Amersham Biosciences). Bands were visualized by chemiluminescence (ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences). The relative expression of these proteins

was determined by densitometric scanning and calculating the ratios of each protein to constitutively expressed  $\beta$ -actin bands.

**Animal studies:** This protocol was performed in 36 male adult fibrotic Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). Animals were fed ad libitum with standard chow and water containing phenobarbital. Fibrosis was induced as described elsewhere (17). All fibrotic rats were studied between the 9th and 10th week. The specific blockade of the  $\text{Ang II}$  receptor of HSCs was performed in fibrotic rats as follows: Twenty animals were randomly assigned to receive a daily intravenous injection of losartan-M6PHSA (3.3 mg/kg/day, corresponding to 125  $\mu\text{g}$  losartan/kg) or M6PHSA alone as vehicle (3.3 mg/kg/day) at 72, 48 and 24 hours before sacrifice as previously described (18). On the other hand, the specific blockade of endothelin receptors was performed in fibrotic rats as follows: Sixteen animals were randomly assigned to receive a daily intragastric administration of RO 48-5695 (30 mg/kg/day, microsuspension of 4 ml/kg in 5% gummi arabicum) or vehicle (4 ml/kg/day of 5% gummi arabicum) for 9 days as described previously (19).

**Ethical approval:** The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari.

**Statistical analysis:** Data are expressed as mean $\pm$ SE. Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) the Newman-Keuls test, the Mann-Whitney test and the unpaired Student's t test when appropriate. Differences were considered to be significant at a p value of 0.05 or less.

## RESULTS

**AP is overexpressed in human HSCs of cirrhotic patients:** Table 2 shows the laboratory data in control subjects and patients with cirrhosis. As anticipated, marked hepatic failure was present in cirrhotic patients, as indicated by high serum bilirubin and transaminases, and low serum albumin and platelet number. The amount of AP transcripts in the hepatic tissue of cirrhotic patients was around 12 fold-higher than in control samples (Figure 1 a). In an attempt to identify the cellular source of the altered expression of AP in human hepatic tissue, we performed histological immunolocalization of this peptide in human cirrhotic and control livers. AP immunolabeling was almost undetectable in control samples (data not shown), but in cirrhotic livers was identified as linear staining in the portal tracts and fibrous septa and was more intense in the severely fibrotic tissue (Figure 1 b, top left panel). Interestingly, AP immunostaining co-localized with  $\alpha$ -SMA (Figure 1 b, merge). These findings indicate that activation of AP production in the liver of cirrhotic patients selectively occurs in myofibroblastic cell types located in the margin of the fibrous septa.

**Agents regulating AP activation in human HSCs:** In agreement with the results obtained at identifying HSCs as the major source of the overexpression of AP in cirrhotic liver, we found that the HSC line LX-2 expressed much more AP than a hepatocyte cell line such as HepG2. In fact, the amount of AP transcripts was around 49 fold-higher in LX-2 than in HepG2 cells (Figure 2). To identify the stimuli governing AP induction in HSCs, LX-2 cells were incubated under hypoxia (5% O<sub>2</sub>) or treated with well-known proinflammatory stimuli (TNF- $\alpha$  or LPS) or with profibrogenic substances (All or ET-1) for 24 hours. Unexpectedly, neither hypoxia, nor TNF- $\alpha$  nor LPS were effective stimulators of AP expression in LX-2 cells. In fact,

mRNA levels of AP fell after incubation with both proinflammatory agents in these cells. Only both profibrogenic factors, All and ET-1, significantly enhanced AP mRNA expression in LX-2 cells (Figure 3). Likewise, AP protein expression rose in a similar fashion after incubation with All and ET-1, thereby certifying the effect of both substances as inducers of this peptide (Figure 3).

**AP activates fibrogenesis-related genes in human HSCs:** To assess whether AP may act as a specific profibrogenic factor, mRNA and protein abundance of collagen-I,  $\alpha$ -SMA, PDGFR $\beta$  and TGF $\beta$ R<sub>1</sub> were quantified in basal conditions and after stimulation with AP. This peptide increased mRNA expression of collagen-I (from 1.0 $\pm$ 0.1 to 1.6 $\pm$ 0.2 Fold change (Fc), p<0.05) and PDGFR $\beta$  (from 1.0 $\pm$ 0.1 to 2.3 $\pm$ 0.3 Fc, p<0.01) in LX-2 but there were no effects on  $\alpha$ -SMA or TGF $\beta$ R<sub>1</sub> expression in these cells (Figure 4). These results were then confirmed at the protein level since western Blot results paralleled those found on assessing mRNA expression (Figure 4).

**AP receptor blockade prevents the in vitro induction of fibrogenesis-related genes in LX-2 cells.** LX-2 cells were incubated with All or ET-1 in the presence or absence of the specific APJ antagonist F13A, and messenger and protein abundance of AP, collagen-I and PDGFR $\beta$  levels was assessed. As anticipated both All and ET-1 significantly increased AP expression in LX-2 cells; a response that was not modified by the presence of the AP receptor antagonist F13A (data not shown). As shown in Figure 5, both All and ET-1 significantly stimulated the messenger and protein expression of collagen-I and PDGFR $\beta$  and these fibrogenic outcomes on HSCs were drastically reduced when AP receptor was blocked using F13A. These results strongly suggest that the profibrogenic effects of All and ET-1 are mediated by the autocrine effects of AP in LX-2 cells (Figure 5).

**AP inactivation suppresses the induction of fibrogenesis-related genes in CCl<sub>4</sub>-treated rats,** As shown in Figure 6, treatment with the HSC-targeted losartan-M6PHSA resulted in a marked reduction of AP messenger expression in fibrotic rats as compared to animals receiving vehicle. These results were then confirmed at the protein level. Densitometric analysis of AP protein content in the liver of fibrotic rats after losartan-M6PHSA administration yielded an important reduction in AP levels (Figure 6). This drop in hepatic AP expression was associated with a significant reduction in mRNA and protein levels of collagen-I and PDGFR $\beta$  in the liver of treated rats in comparison to animals receiving vehicle (Figure 7). Similar results were found when RO 48-5695 was used to antagonize endothelin receptors in fibrotic rats. In fact, this drug promoted a significant fall in hepatic AP mRNA and protein production as compared with animals receiving vehicle (Figure 6). This decrease in hepatic AP expression also occurred in parallel with a significant reduction in mRNA and protein levels of collagen-I and PDGFR $\beta$  in fibrotic animals as compared to untreated animals (Figure 7). These results are in line with the in vitro data pointing to AP as a major player regulating the profibrogenic effects of All and ET-1 in liver disease.

## DISCUSSION

Hepatic architectural disruption is a major feature of patients with chronic liver disease. Actually, the liver of these patients undergoes an intense process of tissue remodelling characterized by chronic inflammation, neoangiogenesis and fibrogenesis (20). In agreement with previous studies demonstrating that patients with cirrhosis showed a significant increase in the circulating levels of AP, the current study has demonstrated that this proangiogenic peptide is selectively overexpressed in HSCs of cirrhotic patients. This represents the first circumstantial evidence linking hepatic AP induction to human liver cirrhosis and is in line with a previous investigation from our laboratory describing the presence of AP in HSCs of cirrhotic rats (10).

Direct regulation of AP expression and secretion by hypoxia has been shown in rat cardiac myocytes (14). In the current study, hypoxia did not stimulate AP expression in LX-2 cells, suggesting a different regulation for this peptide in HSCs. On the other hand, previous investigations had pointed to TNF- $\alpha$  as an inducer of AP synthesis in adipocytes (15) but unexpectedly, we found that AP was downregulated following the culture of LX-2 cells in the presence of TNF- $\alpha$ . This, together with the drop in AP transcripts when LX-2 cells were treated with LPS, suggest that AP induction in liver disease follows alternative signalling pathways from what has been reported to date.

Among all the agents tested to induce AP synthesis, only the profibrogenic substances All and ET-1 enhanced AP expression in human LX-2 cells. Since hepatic activation of the AP system has demonstrated to be implicated in fibrogenesis in cirrhotic rats (10), we speculated that AP could be an important mediator of the profibrogenic gene induction promoted by All and ET-1 in HSCs. To

confirm this hypothesis we first assessed whether AP in vitro induces fibrogenesis-related genes. Multiple signaling pathways are activated by cytokines in fibrogenesis. Most of these pathways have been identified in cultured HSCs (2). In this regard, our results indicate that AP markedly stimulates PDGFR $\beta$  and collagen-I synthesis in LX-2 cells. Activation of PDGFR $\beta$  promotes proliferation, chemotaxis and cytokine release (21), and collagen-I, the main component of the extracellular matrix, is mainly released by fibroblastic-like cell types such as HSCs. Therefore, AP emerges as a major contributor to fibrogenic processes in liver disease.

Next we assessed whether AP receptor blockade is able to prevent the induction of PDGFR $\beta$  and collagen-I expression produced by the stimulation of HSCs with AII and ET-1. We disrupted the AP signaling pathway by using F13A. This is an analogue of Apelin-13 in which the phenylalanine at the C-terminus of the peptide is substituted by an alanine residue. Interaction of this competitive antagonist with APJ fully abolishes the biological activity of AP (22). Moreover, our in vitro results indicate that F13A has negligible binding affinity on both AII and ET-1 receptors, since these two agents displayed similar AP-induction effects on LX-2 cells in the presence than in the absence of the competitive APJ antagonist. This is coincident with previous investigations demonstrating that F13A did not affect the activity of AII on blood pressure in SHR rats (22). Taken together these results indicate that F13A behaves as an AP-specific antagonist.

AP receptor blockade fully abolished the ET-1 and AII-dependent induction of profibrogenic-related genes in LX-2 cells, both at the messenger and protein level. This finding indicates that following induction, AP autocrinally interacts with APJ in activated HSC, thus leading to enhanced abundance of PDGFR $\beta$  and increased production of collagen-I in these cells. Therefore, our results indicate that the AP

system is a major gatekeeper of the signaling pathway through which ET-1 and All exert their profibrogenic effects in human HSCs. Whether these in vitro results could be translated to an in vivo scenario was assessed in the next set of experiments by selectively blockade ET-1 and All receptors, in CCl<sub>4</sub>-treated rats. In both cases, inactivation of these peptides normalized AP mRNA and protein expression in the liver of rats with fibrosis, a phenomenon that was associated with a marked reduction in PDGFR $\beta$  and collagen-I overexpression. Therefore, our results in LX-2 cells were paralleled by similar findings in fibrotic animals.

The rationale to use RAS inhibitors in human cirrhosis is that they attenuate experimentally induced liver fibrosis and are safe and effective in preventing renal or cardiac fibrosis in patients with type II diabetes and arterial hypertension (23,24). Although the experimental evidence supporting a role for the RAS in liver fibrogenesis is overwhelming, clinical evidence is limited. Actually, RAS inhibitors can cause arterial hypotension or renal impairment in patients who have advanced cirrhosis and subsequent activation of the systemic RAS. In this clinical setting, the efficacy of RAS inhibitors is probably very limited. The present study demonstrates that All and ET-1 exert some of their profibrogenic effects in cirrhosis by activating the AP signaling pathway. This together with the fact that AP blockade additionally improves systemic hemodynamics and cardiac and renal excretory function in cirrhotic rats (10) provide a rationale to investigate new drugs targeting the AP signaling pathway to reduce fibrosis and to improve hemodynamics and renal function in chronic liver disease.



## REFERENCES

1. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008 May;134(6):1655-69. Review.
2. Moreno M, Battaller R. Cytokines and Renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12(4):825-52. Review.
3. Muñoz-Luque J, Ros J, Fernández-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, et al. Regression of Fibrosis after Chronic Stimulation of Cannabinoid CB2 Receptor in Cirrhotic Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(2):475-83.
4. Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003;125(1):117-125.
5. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Palk YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(9):1383-94.
6. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996;110(2):534-48.
7. Leivas A, Jiménez W, Bruix J, Boix L, Bosch J, Arroyo V et al. Gene expression of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res* 1998;35:186-193.
8. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1998;98(6):1381-8.

9. Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1919-1926.
10. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, Ruiz del Árbol L, Ros J, Morales-Ruiz M, et al. The Hepatic Apelin, System: A New Therapeutic Target For Liver Disease. *Hepatology* 2008; 48: 1193-1201
11. W. Roland EK, Martin PK, Andrea MM, Andreas K, Frank LH, André WB. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signalling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol* 2007 May 15;305(2):599-614.
12. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004;18:1909-1911.
13. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296:177-189.
14. Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of Apelin. *FASEB J* 2007;21:1821-1830.
15. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, et al. TNF- $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 2006;20:1528-1530.
16. 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(1):142-51.

17. Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, Rodés J. Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, Mc Intyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2th ed. Oxford: Oxford Medical Publications, 1999:733-761.
18. Moreno M, Gonzalo T, Kok RJ, Sancho-Bru P, van Beuge M, Swart J, et al. Reduction of advanced liver fibrosis by short-term targeted delivery of an angiotensin receptor blocker to hepatic stellate cells in rats. *Hepatology* 2010; 51(3):942-52.
19. Poo JL, Jiménez W, María Muñoz R, Bosch-Marcé M, Bordas N, Morales-Ruiz M, et al. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology*. 1999;116(1):161-7.
20. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125-172.
21. Li D, Friedman SL. Molecular Mechanism of Stellate Cell Activation and Extracellular Matrix Remodeling. Edited by: Okazaki I, Ninomiya Y, Friedman SL, Tanikawa K. *Extracellular Matrix and the Liver. Approach to Gene Therapy*. 1st ed. San Diego CA: Academic Press, 2003:155-178.
22. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005; 146(1):231-6.
23. Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(9-10):1346-55.
24. Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med* 2002;113(5):409-18.

## LEGENDS FOR FIGURES

**Figure 1:** A) Messenger RNA expression of AP by real-time PCR in liver from 7 control and 9 cirrhotic subjects. mRNA samples were retrotranscribed and amplified. GAPDH was used as the housekeeping gene. B) Immunofluorescent localization of AP and  $\alpha$ -SMA in livers of cirrhotic patients. AP (green),  $\alpha$ -SMA (red) and cell nuclei (blue) fluorescent staining was performed using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and specific antibodies. Colocalization of  $\alpha$ -SMA and AP (yellow) is shown in the merge panel. Original magnification: 320x.

**Figure 2:** Messenger RNA expression of AP by real-time PCR in HepG2 in comparison to LX-2 cells. mRNA samples were retrotranscribed and amplified. GAPDH was used as the housekeeping gene.

**Figure 3:** Messenger RNA expression of AP by real-time PCR in LX-2 under normoxic (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) or hypoxic conditions (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) in a controlled-O<sub>2</sub> water jacketed CO<sub>2</sub> incubator or treated with LPS, TNF- $\alpha$ , All or ET-1 for 24 hours. Representative western blot for AP in LX-2 cells treated with All or ET-1 is shown in the bottom of the panel.  $\beta$ -actin was used as the control protein for loading.

**Figure 4:** Messenger RNA expression of  $\alpha$ -SMA, TGF $\beta$ R-1, collagen-I and PDGFR $\beta$  by real-time PCR in LX-2 cells after treatment with AP (1 nM). Representative Western blot for those genes reaching significant differences after AP incubation is shown in the bottom of the panel.  $\beta$ -actin was used as the control protein for loading.

**Figure 5:** Messenger RNA expression of collagen-I and PDGFR $\beta$  by real-time PCR in LX2 cells treated with the AP receptor antagonist F13A, All, ET-1 or a combination of F13A with All or ET-1. Representative Western blot for collagen-I and PDGFR $\beta$  of these samples is shown in the right of the panel.  $\beta$ -actin was used as the control protein for loading.

\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  with respect to vehicle incubation; %  $p < 0.05$  and %%  $p < 0.01$  with respect to All incubation; #  $p < 0.05$  with respect to ET-1 incubation.

**Figure 6:** Messenger RNA expression of AP by real-time PCR in the liver of fibrotic rats treated with losartan-M6PHSA or RO 48-5695 as compared with vehicle animals. Representative Western blot for AP and densitometric analysis of these samples are shown at the bottom of the panel.  $\beta$ -actin was used as the control protein for loading.

**Figure 7:** Messenger RNA expression of collagen-I and PDGFR $\beta$  by real-time PCR in the liver of fibrotic rats treated with losartan-M6PHSA or RO 48-5695 as compared with vehicle animals. Representative Western blot for collagen-I and PDGFR $\beta$  and densitometric analysis of these samples are shown at the bottom of the panel.  $\beta$ -actin was used as the control protein for loading.

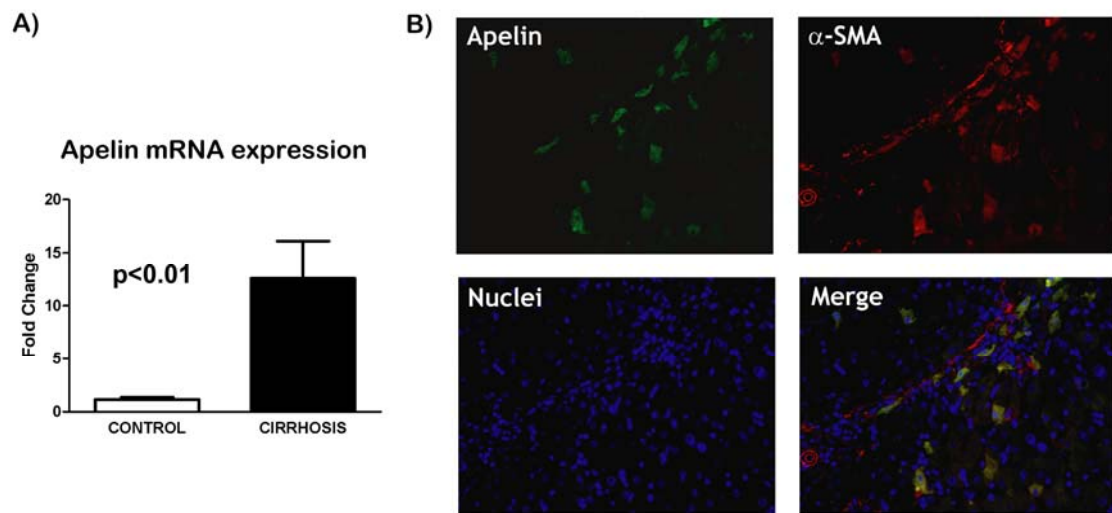
**Table 1:** Sequences of the primers used in the Real-Time PCR experiments

<b>Gene analyzed</b>	<b>Sequence 5'→3'</b>
<b>Human AP</b>	left: GCTCTGGCTCTCCTTGACC right: CCATTCCTTGACCCTCTGG
<b>Human <math>\alpha</math>-SMA</b>	left: CACCCAGCACCATGAAGAT right: CGTATTCCTGTTTGCTGATCC
<b>Human collagen-I</b>	left: CCCCTGGAAAGAATGGAGAT right: AATCCTCGAGCACCCCTGA
<b>Human PDGFR-<math>\beta</math></b>	left: TTCCATGAGGATGCTGAGGT right: CAGGGTGGCTCTCACTTAGC
<b>Human TGF<math>\beta</math><sub>1</sub></b>	left: AAGGCCAAATATCCCAAACA right: CCAACATTCTCTCATAATTTTAGCC
<b>Human GAPDH</b>	left: AGCCACATCGCTCAGACAC right: CGCCCAATACGACCAAAT
<b>Rat AP</b>	left: CTCTGGCTCTCCTTGACTGC right: GCCTTCTTCTAGCCCTTTCC
<b>Rat collagen-I</b>	left: AGACCTGGCGAGAGAGGAGT right: ATCCAGACCGTTGTGTCCTC
<b>Rat PDGFR-<math>\beta</math></b>	left: GCGGAAGCGCATCTATATCT right: AATGAATAGGTCCTCAGAGTCCAT
<b>Rat HPRT</b>	left: GACCGGTTCTGTCATGTCG right: ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC

**Table 2:** Demographic data, liver and renal function tests in cirrhotic and control serum samples.

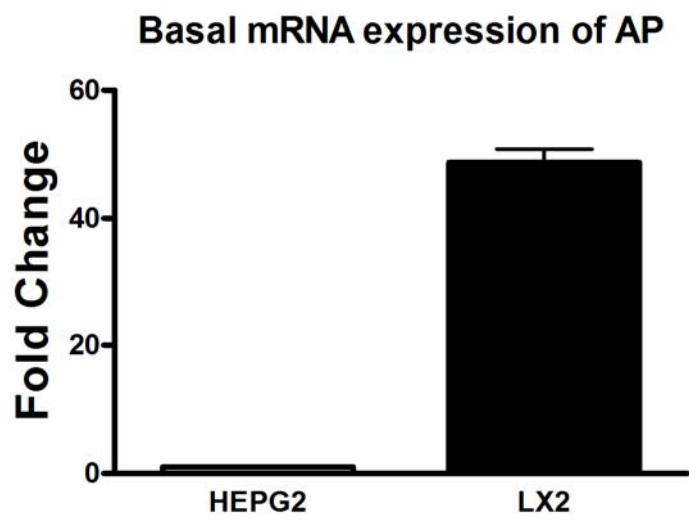
	<b>CONTROL SAMPLES (n= 11)</b>	<b>CIRRHOSIS (n= 12)</b>
<b>Age (yr)</b>	60±2	59±5
<b>Platelets (10<sup>6</sup>/L)</b>	169±4	106±2 <sup>a</sup>
<b>Serum creatinine (mg/dl)</b>	0.96±0.4	1.27±0.2
<b>Serum albumin (g/L)</b>	36.0±0.6	30.8±1.3 <sup>a</sup>
<b>Serum bilirubin (mg/dl)</b>	0.93±0.12	4.11±1.1 <sup>a</sup>
<b>ALT (U/L)</b>	18±3	96±19 <sup>b</sup>
<b>AST (U/L)</b>	17±1	180±70 <sup>a</sup>

a: p<0.05 and b: p<0.01; with respect to control samples

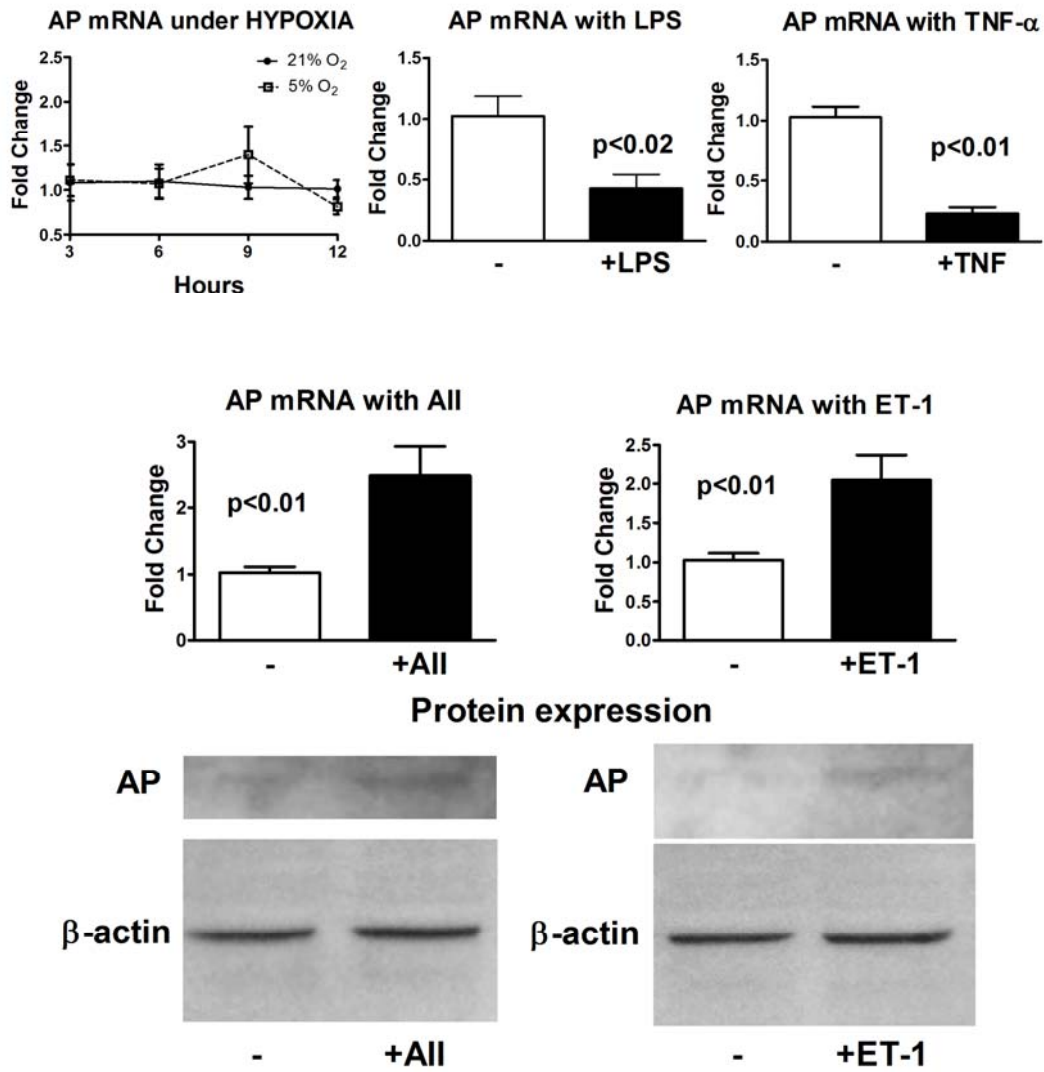


**Figure 1**

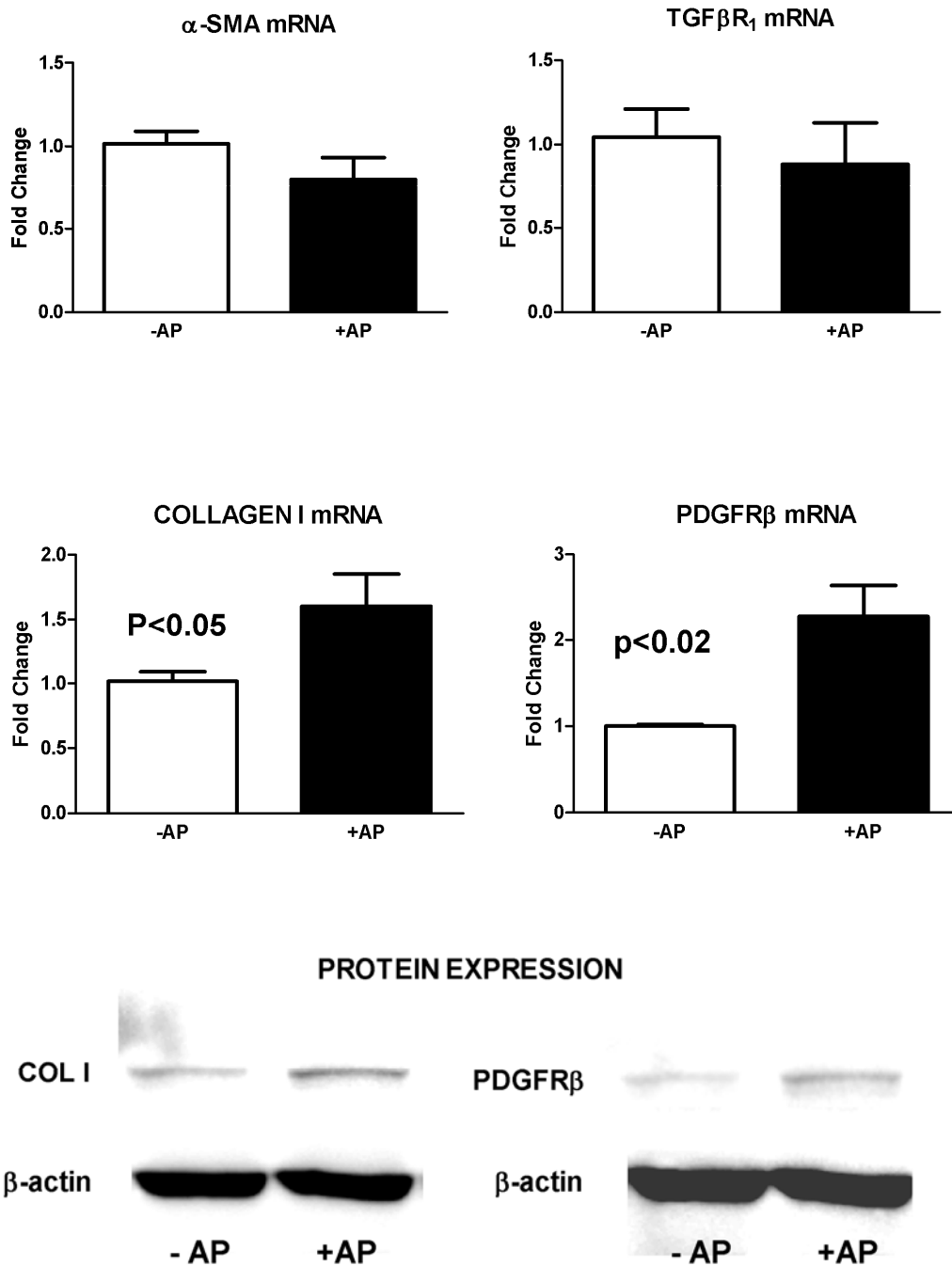




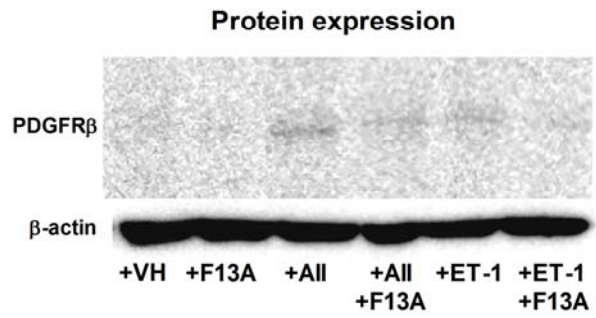
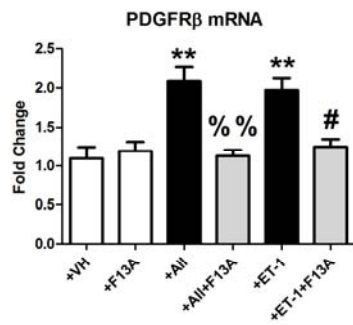
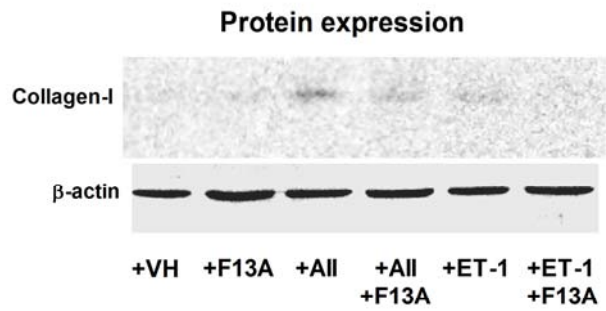
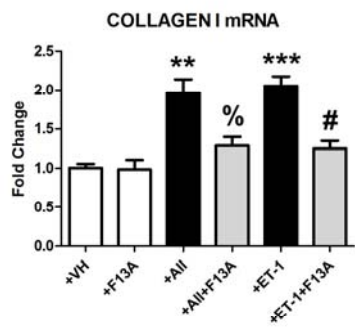
**Figure 2**



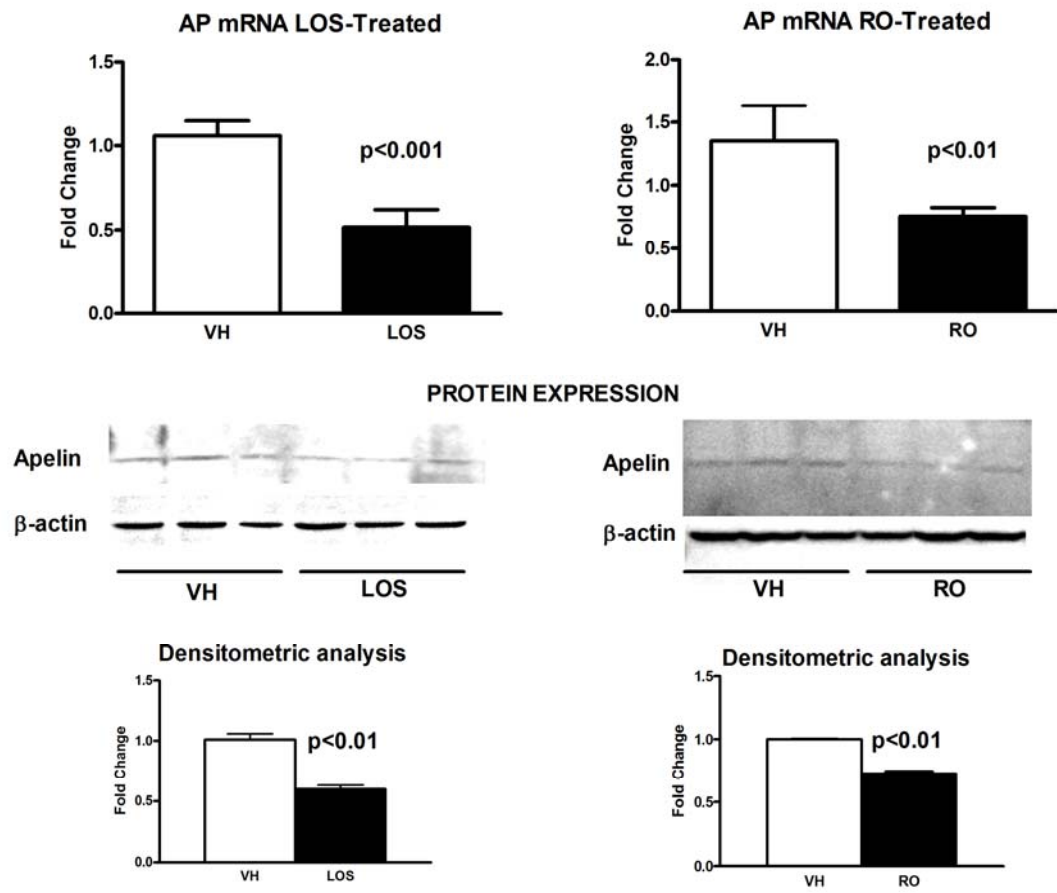
**Figure 3**



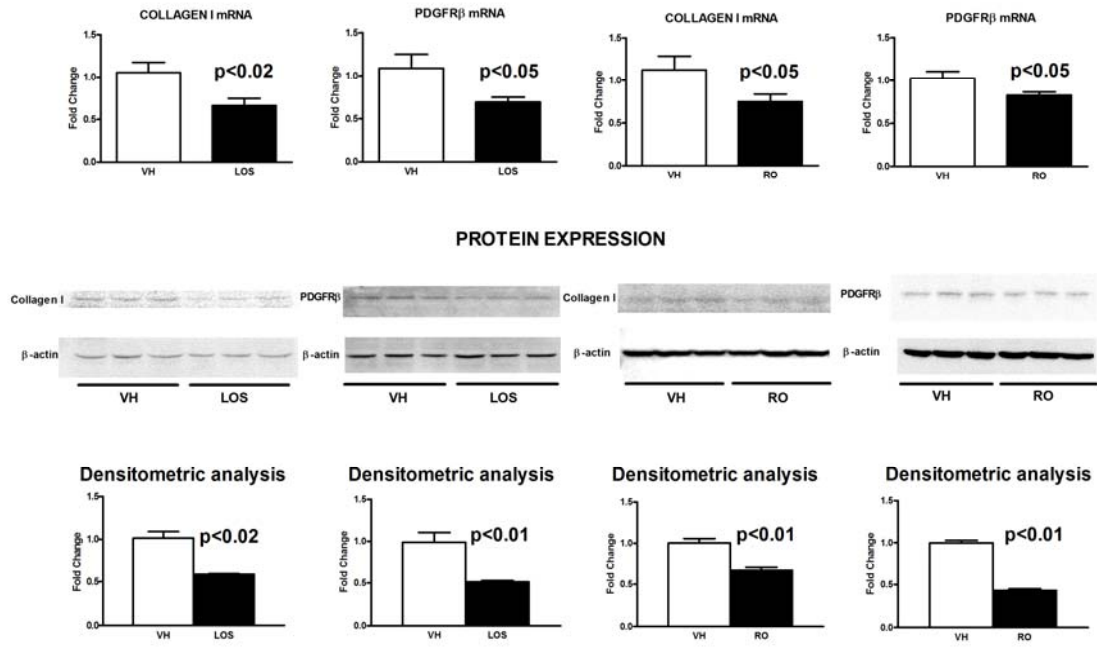
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

# Discusión





Las alteraciones de la permeabilidad vascular que tienen lugar en la cirrosis descompensada han sido tradicionalmente asociadas a un problema de dinámica de fluidos. Tomando como base que el endotelio vascular fuera un sistema estático (una simple membrana semipermeable), el hecho que los pacientes cirróticos tengan una baja presión oncótica en el plasma (baja concentración proteica, sobretodo de albúmina), provocaría una extravasación de fluido desde el interior de los vasos al espacio extravascular a favor de gradiente. Sin embargo, durante los últimos años se ha constatado que el endotelio vascular no es una simple barrera física entre la sangre y los tejidos adyacentes sino que es un órgano altamente especializado y metabólicamente muy activo. El endotelio vascular desempeña un papel fundamental no sólo en el mantenimiento del tono y la permeabilidad vascular sino también en el tráfico de leucocitos y en la modulación de la homeostasis y la trombosis. La célula endotelial produce mediadores de la vasodilatación como el NO que promueve la vasodilatación arterial periférica característica de la cirrosis. La vasodilatación arterial, así como el aumento de la resistencia intrahepática contribuyen a la variación del flujo sanguíneo que irriga los diferentes territorios vasculares espláncnicos lo que provoca un remodelado vascular tanto a nivel estructural<sup>102</sup> como funcional. Este hecho puede promover alteraciones en la permeabilidad vascular dando lugar al edema local. En el contexto del hígado cirrótico, el remodelado vascular se circunscribe a las regiones cicatriciales donde dicho fenómeno coexiste con un proceso inflamatorio crónico y con la formación de grandes cantidades de matriz extracelular (fibrogénesis). Por tanto, estos tres procesos parecen estar íntimamente ligados a la fisiopatología de la cirrosis hepática. Cuando la fibrosis se extiende y distorsiona la arquitectura hepática normal, la hipoxia tisular también se convierte en un importante modulador de la expresión de factores proinflamatorios y proangiogénicos<sup>108,110</sup>. Por tanto, en los septos fibrosos del hígado

cirrótico tiene lugar un intenso proceso de nueva formación de vasos sanguíneos con características proinflamatorias que se encuentra estimulado tanto por las citoquinas liberadas por los diferentes tipos celulares como por la hipoxia tisular.

Diversas evidencias circunstanciales apuntaban al hígado cirrótico como un importante foco de edema pero existía mucha discusión sobre la contribución relativa de otros órganos de la cavidad abdominal. El primer estudio de la presente tesis doctoral ha demostrado que el fenómeno de hiperpermeabilidad ocurre selectivamente en la red vascular del hígado y del mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis. Más específicamente, el aumento de la permeabilidad vascular hepática se localizó preferentemente en los septos fibrosos, allí donde tiene lugar un intenso proceso de angiogénesis. Además, las alteraciones de la permeabilidad que se hallaron en hígado y mesenterio se vieron acompañadas por una mayor expresión génica y proteica de los más reconocidos agentes estimulantes de la permeabilidad vascular, esto es, VEGF-A y Ang-2. Ambos factores se expresan en respuesta a hipoxia. VEGF-A es 50.000 veces más potente que la histamina induciendo permeabilidad vascular.<sup>104</sup> Entre los mecanismos conocidos que regulan el paso de macromoléculas a través de los vasos sanguíneos, la disociación de las uniones interendoteliales es el fenómeno que, más probablemente, puede estar involucrado en la alteración de la permeabilidad vascular observada en la cirrosis experimental. VEGF-A media la regulación de la integridad de las uniones endoteliales a través de su interacción específica con el receptor VEGFR<sub>2</sub>. Ang-2, por su parte, es un antagonista de la acción de Ang-1. Ang-1 se comporta como estabilizador de la membrana endotelial e induce quiescencia del endotelio vascular. Por tanto, Ang-2 actúa en las células endoteliales permitiendo el remodelado vascular y la extravasación. En este contexto, Ang-1 induce maduración capilar e impide el efecto de VEGF-A si Ang-2 no es también secretado<sup>111</sup>. Por tanto, Ang-2 desplaza a Ang-1 del

receptor Tie-2 induciendo remodelado e hiperpermeabilidad vascular. Consecuentemente, en un escenario donde Ang-1 está activada como ocurre en hígado y mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis, la activación de la expresión de Ang-2 es un elemento crítico para el efecto de VEGF-A. Esto concuerda con los hallazgos del primer estudio mostrando que la sobreexpresión de Ang-1 y Ang-2 pero no de VEGF-A en el intestino de los animales cirróticos no suponía un aumento de la permeabilidad vascular en ese tejido. Por otro lado, tanto la expresión de VEGF-A como la de Ang-2 se encontraron aumentadas selectivamente en el parénquima hepático de las ratas cirróticas con ascitis, probablemente debido a la gran extensión de la hipoxia tisular.<sup>20</sup> Asimismo, la sobreexpresión en paralelo de VEGF-A y Ang-2 en el hígado y el mesenterio de dichos animales sugiere una relación cooperativa y dependiente en la regulación de la permeabilidad vascular. Además, el bloqueo agudo del receptor de VEGF-A, el VEGFR<sub>2</sub>, redujo la hiperpermeabilidad hepática y mesentérica prácticamente hasta niveles normales en las ratas cirróticas con ascitis. Todos estos resultados indican que ambos factores VEGF-A y Ang-2 están involucrados en las alteraciones de la permeabilidad vascular que dan lugar a la formación de ascitis en la cirrosis experimental. Además, estos resultados coinciden con investigaciones previas en modelos experimentales de angiogénesis patológica no cirrótica, en los que se observó que el bloqueo de la vía de señalización de VEGF-A es suficiente para disminuir el efecto sinérgico y cooperativo que poseen VEGF-A y Ang-2<sup>112,113</sup>.

El examen histológico del edema local usando CC confirmó que el hígado y el mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis son hiperpermeables a macromoléculas. En los hígados normales, el CC fue hallado solamente en el interior de los sinusoides, reflejando la integridad del tejido hepático. En cambio, en el hígado de los animales cirróticos el marcador se encontró en el interior y a lo largo de los septos fibrosos.

Estudios previos han demostrado que, precisamente esas áreas, contienen una densa y relativamente inmadura red vascular consecuencia del intenso y continuo proceso angiogénico que tiene lugar en los septos fibrosos<sup>20,114</sup>. Por tanto, este estudio demostró que la hiperpermeabilidad vascular en el hígado cirrótico es una consecuencia de la acción de los agentes proangiogénicos VEGF-A y Ang-2 sobre la red vascular inmadura que se desarrolla en el interior de los tractos fibrosos hepáticos. Estos dos factores, además de ser reconocidos agentes proangiogénicos, se encuentran relacionados con el proceso de fibrogénesis<sup>20</sup>. En este sentido, la acumulación de grandes cantidades de MEC en los septos fibrosos estaría realizando una función de molde o soporte a las nuevas estructuras vasculares en crecimiento.

Es muy probable que el aumento de permeabilidad mesentérica en las ratas cirróticas con ascitis se encuentre también asociado a la formación de nuevos vasos sanguíneos en ese lecho vascular. Este hecho sería coincidente con recientes investigaciones demostrando aumento de CD31 (marcador de célula endotelial) en el mesenterio de ratas con hipertensión portal en comparación con animales control<sup>115</sup>.

El síndrome hiperdinámico unido a los desórdenes que provoca la angiogénesis en la estabilidad de las uniones endoteliales estaría provocando, en mayor parte, la extravasación plasmática en la cirrosis experimental. Así que el enfoque terapéutico para la cirrosis con ascitis debería enfocarse hacia nuevas dianas terapéuticas que puedan corregir ambos fenómenos paralelamente. En este sentido, hace unos años se descubrió que el sistema de la apelina presentaba propiedades funcionales tanto relacionadas con la regulación cardiocirculatoria como con la angiogénesis. Por una parte, la apelina es un poderoso agente inotrópico cardíaco y una sustancia con reconocidos efectos vasodilatadores dependientes de NO. Además, la apelina es un factor proangiogénico independientemente de otros factores de crecimiento. Esto

convierte al sistema de la apelina en una interesante diana molecular para intentar regular las alteraciones hemodinámicas y vasculares que originan el edema y la ascitis en la cirrosis. Por este motivo, en el segundo estudio investigamos el efecto que tendría bloquear la angiogénesis sobre la producción de ascitis utilizando un antagonista del receptor de la apelina. Además evaluamos los efectos que podría ejercer ese bloqueo sobre la fibrosis, la función cardiovascular y renal en las ratas cirróticas con ascitis. De este modo se pretendía demostrar que el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos es responsable en gran parte de las alteraciones de la permeabilidad vascular en la cirrosis experimental y, este desorden, no está únicamente provocado por los factores VEGF-A y Ang-2. Además, en este estudio se seleccionó esa vía de señalización por estar implicada en angiogénesis y ser una vía distinta a la activación directa sobre la permeabilidad vascular que producen VEGF-A y las angiopoyetinas. En primer lugar, se cuantificaron los niveles circulantes de apelina en las ratas cirróticas con ascitis. En este sentido, se observó que la concentración sérica de apelina se encontraba marcadamente incrementada en los animales cirróticos en comparación con las ratas control. El significado fisiopatológico de este hallazgo se evaluó tanto estimulando el sistema de la apelina como bloqueándolo de manera sistémica en ratas con cirrosis. La administración intravenosa de apelina a animales control produjo una reducción pronunciada en las RPT y, ese efecto, no se vio asociado con cambios de PAM debido al marcado aumento del GC inducido por el péptido. De hecho, la apelina ha sido descrita como una de las sustancias endógenas con mayor potencia inotrópica positiva conocidas hasta hoy<sup>116</sup>. La administración de este péptido también deterioró la función excretora renal en los animales control. La disminución de la habilidad de excretar agua y sodio que se observó tras realizar una sobrecarga de agua fue probablemente debida a la disminución de las RPT o un efecto directo de la apelina

sobre el riñón de estos animales. En cambio, las ratas cirróticas con ascitis mostraron una marcada resistencia a los efectos cardíacos y renales de la apelina, puesto que este péptido no modificó las alteraciones hemodinámicas y de excreción renal de los animales cirróticos. Al contrario, el bloqueo del receptor de la apelina mejoró la hemodinámica sistémica y la función renal en las ratas cirróticas con ascitis. De hecho, la administración del antagonista del receptor de la apelina (F13A) redujo un 30% el CO y aumentó las RPT sin cambios evidentes en la PAM. F13A no produjo cambios significativos en los animales control.

Estudios que analizaron la distribución tisular de apelina y APJ en ratas adultas normales demostraron que la mayor expresión basal de ambos RNAm se encontraba sobretodo en el pulmón y, en menor abundancia, en el corazón. Sin embargo, la presencia de dichos transcritos en hígado de ratas control fue apenas apreciable<sup>117</sup>. Por tanto, en el estudio 2 se investigó el patrón de expresión de apelina y APJ en distintos tejidos de animales control y cirróticos con ascitis. Solamente el tejido hepático de las ratas cirróticas mostró un aumento significativo de ambos RNAm respecto a las ratas control. Esta diferencia fue especialmente importante en el caso de APJ en el hígado de las ratas cirróticas en comparación con los animales control. Los resultados de este estudio muestran que los niveles circulantes de apelina son consecuencia, principalmente, de un aumento de producción hepática de dicho péptido en lugar de una alteración en su excreción renal. Esto queda confirmado por el hecho que no existían diferencias en la concentración de creatinina sérica entre animales cirróticos y control. Los experimentos de inmunohistoquímica revelaron una potente señal positiva para apelina y APJ en el hígado de los animales cirróticos. En estos últimos, la tinción positiva para apelina se localizó principalmente en las CEHs mientras que APJ fue sobretodo localizado en los hepatocitos, aunque también se observó tinción en el

interior de los septos fibrosos. Estos resultados indican que más allá de sus efectos cardiotrópicos y vasodilatadores, la apelina puede también comportarse como una sustancia paracrina en el hígado cirrótico, siendo secretada por las CEHs activadas, interaccionando con las células parenquimales próximas, para a su vez estimular vías de señalización proinflamatorias y proangiogénicas. Por tanto, el remodelado hepático debería ser considerado como un proceso en que los nuevos vasos formados se rodean de un tejido cicatricial dinámico, en donde tiene lugar una compleja interacción entre diversos tipos celulares y sustancias solubles.

Puesto que la apelina y el APJ se inducen por acción del TNF $\alpha$ , se postuló que, tal vez, el sistema hepático de la apelina podría ser un importante mediador en la iniciación y el mantenimiento de los procesos proinflamatorios y profibrogénicos que tienen lugar en el hígado fibrótico. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un bloqueo crónico de APJ. El grado de fibrosis y angiogénesis hepática en las ratas cirróticas tratadas 9 días con el antagonista del receptor de la apelina (F13A) disminuyó un 25% y un 40%, respectivamente, en comparación con las ratas que recibieron vehículo. Además, estos animales también mostraron una mejora tanto en la función cardiovascular como en la función renal. La disminución de la formación de vasos sanguíneos en el hígado de los animales cirróticos tratados con F13A se tradujo en la desaparición de la ascitis en el 50% de los casos, observándose una disminución clara en el volumen de ascitis recogido en el otro 50% de animales tratados en comparación con las ratas con ascitis que recibieron vehículo.

En el segundo estudio de esta tesis doctoral también se trató de trasladar los hallazgos a la realidad clínica. Se analizó la concentración sérica de apelina en individuos sanos y pacientes cirróticos. El resultado fue paralelo a lo obtenido en el

modelo experimental, ya que los pacientes cirróticos también presentaban un marcado aumento en los niveles circulantes de este péptido.

El tercer estudio de la presente tesis doctoral se diseñó para intentar averiguar que estímulos son los que inducen la expresión de la apelina en las CEHs y para investigar como ese péptido podría estar involucrado en los procesos fibroangiogénicos que tienen lugar en el hígado cirrótico. En este estudio se demostró que, en concordancia con el aumento de los niveles circulantes de apelina, este péptido se encontraba selectivamente sobreexpresado en las CEHs de los pacientes cirróticos. Esto además concordaba con los hallazgos obtenidos al analizar la expresión y localización de apelina en hígado ratas cirróticas con ascitis del estudio 2.

La hipoxia y el  $TNF\alpha$  son factores que han sido descritos como posibles reguladores de la expresión de apelina en diversos tipos celulares. Sin embargo, ninguno de los dos estímulos consiguió inducir la expresión de apelina en las CEHs LX-2. De hecho, los factores proinflamatorios  $TNF\alpha$  y LPS redujeron significativamente la expresión de apelina en las células LX-2, indicando que la inducción de apelina en el hígado cirrótico sigue vías alternativas a las descritas en otros modelos celulares y animales.

De entre todos los agentes con que se incubaron las células LX-2, solamente la AII y la ET-1 indujeron significativamente la expresión génica y la síntesis proteica de apelina en las células LX-2. Puesto que ambas sustancias son reconocidas inductoras de fibrogénesis, especulamos que tal vez la apelina podría comportarse como un mediador de dicha inducción. De hecho, en el tercer estudio se demuestra como la apelina estimula marcadamente la expresión de colágeno I y de  $PDGFR\beta$  (receptor implicado en proliferación, quimotaxis y liberación de citoquinas) en las células LX-2. Para averiguar si la acción de la apelina mediaba efectos de AII o ET-1, se bloqueó la acción



de la apelina con F13A tras estimular su expresión con AII y ET-1. El resultado de ese experimento fue que la inhibición de la vía de señalización del APJ redujo la inducción de colágeno I y PDGFR $\beta$  provocada por AII y ET-1 en las células LX-2. Estos resultados indican que la apelina es un mediador de vías de señalización de AII y ET-1 que promueven la síntesis de colágeno I y PDGFR $\beta$  en las CEHs humanas. Posteriormente, y para tratar de trasladar esos resultados del modelo *in vitro* a un modelo *in vivo*, se realizó un bloqueo selectivo de la inducción de apelina en ratas fibróticas utilizando un antagonista específico del receptor de la AII (AT1) de CEH y un antagonista de los receptores de ET-1. A continuación, se analizó la expresión génica y proteica de apelina, colágeno I y PDGFR $\beta$  en el hígado de las ratas tratadas en comparación a los animales que recibieron vehículo. En ambos casos, la inactivación de la actividad de ambos péptidos normalizó la expresión hepática de apelina en las ratas fibróticas. Dicho fenómeno se vio asociado a una marcada reducción de la expresión de colágeno I y PDGFR $\beta$  en el hígado de los animales tratados frente a los que recibieron vehículo. Por tanto, los resultados *in vitro* se vieron reflejados en los hallazgos obtenidos en el modelo animal.

La base racional para usar inhibidores del RAS en la cirrosis humana es que atenúan la fibrosis hepática. Sin embargo, las evidencias clínicas apuntan a que esta posibilidad se encuentra muy limitada puesto que pueden causar hipotensión arterial y disfunción renal en pacientes con cirrosis. El tercer estudio de la presente tesis doctoral demuestra que la AII y la ET-1 llevan a cabo algunos de sus efectos profibrogénicos en la cirrosis a través de la activación de la vía de señalización de la apelina. Este hecho y que el bloqueo del receptor de la apelina además mejora la hemodinámica sistémica, la función cardíaca y renal, y especialmente la formación de ascitis en las ratas cirróticas, sugieren que la investigación de nuevos fármacos que interfieran con la vía de

señalización de la apelina puede ser potencialmente interesante para reducir el conjunto de alteraciones que promueven la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica.

# **Conclusiones**



A partir de los resultados obtenidos en los 3 estudios que conforman esta tesis doctoral se puede concluir que:

1. La hiperpermeabilidad vascular que promueve la formación de ascitis en la cavidad peritoneal tiene lugar en la red vascular del interior de los septos fibrosos en el hígado cirrótico y en el plexo vascular mesentérico de las ratas cirróticas con ascitis.
2. El aumento de la permeabilidad vascular hepática y mesentérica en los animales cirróticos con ascitis se asocia con un incremento de la expresión de los factores proangiogénicos VEGF-A y Ang-2 en dichos tejidos y es promovido por el incremento en el flujo sanguíneo que los irriga.
3. El bloqueo agudo del VEGFR<sub>2</sub> es suficiente para reducir drásticamente la permeabilidad vascular en el hígado y el mesenterio de las ratas cirróticas con ascitis.
4. La expresión de la Apelina se encuentra hiperactivada en las CEHs de los pacientes y las ratas con cirrosis lo que se traduce en un aumento de los niveles circulantes en dichos sujetos.
5. El bloqueo crónico del receptor de la Apelina disminuye la angiogénesis y la fibrosis hepática y mejora la función cardíaca y renal en las ratas cirróticas con ascitis.
6. La drástica reducción de la angiogénesis hepática al bloquear el receptor de la Apelina se asocia a la reducción o la desaparición total de la ascitis en las ratas con cirrosis descompensada.
7. La AII y la ET-1 inducen la expresión de Apelina en las CEHs humanas.
8. La Apelina es un agente profibrógeno interactuando directamente sobre las CEHs y promoviendo la síntesis de colágeno I y PDGFR $\beta$ .
9. La Apelina media la inducción que la AII y la ET-1 poseen sobre la síntesis de colágeno I y PDGFR $\beta$  en las CEHs humanas.

Globalmente y según los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se puede concluir que el intenso proceso de angiogénesis hepática y mesentérica contribuye de manera significativa al desarrollo de la ascitis en la cirrosis hepática. Por tanto, estos datos apoyan la hipótesis de que el bloqueo de dianas terapéuticas implicadas en angiogénesis puede constituir un importante avance en el tratamiento de las alteraciones de la permeabilidad vascular que dan lugar a la formación de ascitis en esta enfermedad.

# **ANEXO:**

## **Otras publicaciones**





- Inactivation of extrahepatic vascular Akt improves systemic hemodynamics and renal function in cirrhotic rats. Fernández-Varo G, Melgar-Lesmes P, Casals G, Pauta M, Arroyo V, Morales-Ruiz M, Ros J, Jiménez W. *Journal of Hepatology* 2010; In press.
- Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. Newell P, Toffanin S, Villanueva A, Chiang DY, Minguez B, Cabellos L, Savic R, Hoshida Y, Lim KH, Melgar-Lesmes P, Yea S, Peix J, Deniz k, Fiel MI, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Mazzaferro V, Bruix J, Roavaie S, Schwartz M, Friedman SL, Llovet JM. *Journal of Hepatology* 2009;51: 725-33.
- Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. Morales-Ruiz M, Tugues S, Cejudo-Martin P, Ros J, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Llama P, Arroyo V, Rodes J, Jimenez W. *Journal of Hepatology* 2005;43: 85-91.



# **Agradecimientos**



Como es de bien nacido ser agradecido, y bien nacido da fe mi madre que lo soy un rato, esta sección intenta buscar ese punto desenfadado de la realidad de las relaciones sociales, laborales o de amistad que un becario acaba por desarrollar en los años en los que se ha estado trabajando o investigando para su tesis. Muchas horas juntos provocan muchos tipos de reacciones, pero como esta sección se titula agradecimientos, lo que queda claro, es que pretenderé sacar lo positivo o irónico-positivo-divertido de cada una de las personas con las que he interactuado estos años. Quien conoce mi carácter pesimista pensará que esta sección me va a costar más que cualquier otra de esta tesis, pero nada más lejos de la realidad. Solamente es dejarlo fluir. Empezando por el principio, los primeros son mis padres. Les agradezco haberme aguantado tantos años y ayudado en mi crecimiento como persona. Aunque solamente tuvieron que soportar mis penas en el primer año de mis estudios de tesis doctoral siempre han estado ahí cuando los necesitaba. Sin duda mi madre ha sido y será siempre un ejemplo para mí de lucha y superación así como de coraje en la vida. Por eso, que mínimo que dedicarle esta tesis a ella en especial. “Un grano no hace granero pero ayuda al compañero”. Tanta sabiduría de la buena, de la vida, no de la que muchos presumen o intentan plasmar en novelas, sino la del día a día superando dificultades y creciendo en medio de una España desolada en medio de la posguerra. Tantas historias tristes vividas por una persona que jamás pierde la sonrisa y el buen humor. Sí mamá, lo intento, pero es difícil estar de buenas siempre cuando te dan por todos lados... Gracias por tu afecto, tu ayuda y tu empuje por siempre jamás. Gracias también a mis hermanos, cuñadas y sobrina (Ángel, Lolo, Floren, Yolanda y Vanessa) por apoyarme todo este tiempo. Al pesado del Ángel en concreto por el apoyo logístico, contable e informático con tocada de narices diaria incluida en el mismo pack. No sé a quien me recuerdas de mi trabajo...

Me gustaría dar las gracias al Dr. Wladimiro Jiménez, jefe del servicio de Bioquímica y Genética Molecular y director de mi tesis doctoral, por haberse esforzado y buscado tiempo para pulir y moldear mi mente buscando sacar un “científico de provecho”, a veces a base de cincel, y otras, a base de cañonazos. Pero, en definitiva, se ha de reconocer que he aprendido mucho de él y que prefiero mil veces un lenguaje directo al de otros que susurran por las esquinas. Gracias por todo.

Quería también agradecer al Profesor Juan Rodés, catedrático de Medicina de la Universidad de Barcelona su ayuda para conseguir el fármaco sunitinib de Pfizer, y al Profesor Vicente Arroyo, catedrático de Medicina de la Universidad de Barcelona y Director del Instituto de Enfermedades Digestivas y Metabólicas del Hospital Clínic, por su gestión liderando el grupo de investigación dedicado al estudio de la fisiopatología y tratamiento de la ascitis en la cirrosis, del cual me han permitido formar parte durante el transcurso de mi tesis doctoral.

Agradecer también al Dr. Josep Maria Llovet y al Dr. Scott Friedman por haberme permitido realizar una estancia de 3 meses en su laboratorio de Nueva York y poder participar durante ese período en sus siempre excelentes proyectos de investigación. También gracias a los integrantes del grupo que me acogieron con los brazos abiertos.: Laia, Bea, Sara, Augusto y Pippa

Especial mención de agradecimiento para aquel que denominé mi “jefito” durante los últimos 2 años y medio, el Dr. Manuel Morales Ruiz (Manué). No tengo palabras para expresar no solamente mi agradecimiento por tu ayuda en todo momento tanto en lo personal, cuando estaba chafado, como en lo laboral aportando ideas o soluciones, pero ha sido incalculable. Con tu permiso, más que un compañero o un jefito, me gustaría pensar que me llevo un amigo. Por descontado también, gracias por encajar tan bien y por participar activamente en las bautizadas por ti “Horas Warner”

que nos hacían abstraernos un rato los viernes por la tarde tras una semana siempre dura. Gracias tiu.

Gracias también al Dr. Ramon Bataller por su incansable chorro de ideas, su gran aportación a nuestras investigaciones y su constante afán porque disfrutemos con lo que hacemos.

Del Servicio de Bioquímica y Genética Molecular agradezco muy mucho la ayuda de Pepa Ros (Pepita). Una doctora de los pies a la cabeza mezcla entre McGyver y Fénix del equipo A. Un nervio hecho mujer que le permite una velocidad organizativa tal que cuando tu empiezas a coger nieve carbónica ella ya ha sacado todas las muestras, extraído el RNA, hecho la RT y está montando la PCR. Del valle de Irati, agradecer a Leire y Guillermo su optimismo que arrasa con todo y la ayuda con los animalitos, claro. Agradezco a Cristina Diez su buen humor y saber seguirme el juego con lo pesado que puedo llegar a ser; a Carmen Cano por las horas ociosas; a Nuri Pons, Cristina Ferran y Eulalia Calvo por su apoyo en mis inicios en vasoactivas; a Vedrana (Vedrussy) rubiales, agradecer su humor mordiente y sus cómplices miradas  $\neg$ , Arigatto; al que llegó hace poco, Natxo felicidades por hacer tan buen gazpacho, un tío con gran potencial, la verdad; a las secres, Tati (GUAPA!), Merce (Mercès), Espe (la reina de la mirra), María Jesús, Pili, Montse, Rosa, Leo, Abel, Roser, y toda la sección de genética, bioquímica y farmacología (Montse Guillen, Vanessa, Marina, Lluisa, Marga, Carme Escofet, Miriam, Josep Oriola, etc) por su ayuda en muchos casos y por las charlas divertidas en otros; a los colegas de renal (Mari, Elisenda, Dani etc) por su ayuda material y su apoyo; a Gregori (Greg House), no por sus brazos peludos, sino por su voluntad de ayudar y de ofrecerse en todo momento. Un médico con vocación bioquímica con imperturbable sentido del humor. Sobre todo por lo de imperturbable. Buen tío el Greg. Especial agradecimiento también para “JM Augé” por socorrerme en

mis diversos aferes sanguíneos propios y ajenos; a la señora Ana, y las Rosas de la limpieza por tantos momentos divertidos.

Mi agradecimiento también para todo el personal del estabulario de la facultad de Medicina, las risas con Loli y Carmen, el humor irónico de Blanca, y tantos otros que han ido pasando por allí.

Un abrazo también especial para mis compis del cuarto de westerns, Marce, Marc, Isa y Ana. Tantos ratos compartidos y carreras a contrarreloj. Muchas gracias Marce por tu frescura de ideas y tu gran ayuda en muchos sentidos que siento no haber podido corresponder como merece. ¡No olvides que el western sale mejor si le echas un poco de óxido por encima eh!

Y bueno, para el final dejo la guinda del pastel, aquellos que me han soportado más horas seguidas: la Veva, la gentecilla del IDIBAPS, amigos de fuera y amigos de más allá. Más allá no por haberla espichado sino por andar perdidos en las Italias o en las Américas. Gracias Ale por apoyarme en todo, en lo laboral, personal, familiar y aunque estés por ahí perdido ya sabes que aquí tienes un amigo de verdad. Contigo no me hacen falta palabras Príncipe de Beckelar. A Rob el escocés loco de New York lo dejaremos en un “cheers”. Gracias por hacerme sentir como en casa en mi estancia allí. A mi compi de Farmacia, de Bioquímica y del Basket, Jorge, “Jorgito el optimista”, gracias por ayudarme a despejar mi mente en la cancha, eres un base y un amigo de los que no se encuentran fácilmente; al Javi (Friki) por su compañía y elocuencia explicando frikadas diarias a la hora de comer, por su curioso humor, refrescante, y un largo etc; a mis amigos/as de la facultad, Laia Llorens, Eli eli, Don Joan, Jordi Paranoias, y a mis amigos Toni y Jaime Clapés así como a Bea de la Farmacia Clapés donde estuve genial todo el tiempo que trabajé; grandes personas; también dar las gracias a Rosalind, Eli González y Sasha por su ayuda con el inglés; y por supuesto a mi



buen profe y amigo Sito (Canga) por su ayuda con mi madre y su eterno buen humor, ¡tú si que eres un monstruo!

A la gente del IDIBAPS, gracias por tantos momentos especiales: Del 502: a Jordi, único e irrepetible, (y que Dios nos libre...☺). A la Montse (Mongeta), una chica con mucha chispa que necesita creerse más que es mejor de lo que piensa y que lo hace muy “maeru”, mientras no se deje influenciar por nadie, claro. Tira para adelante como los de Alicante y busca tu propia esencia científica chica ¡¡Que la inspiración no sólo se coge en el lavabo como tu dices!! Un abrazo de tu “Pedrito Grillo” y gracias por escucharme y soportarme estos años con tan buen humor, payasita... A Marcos el imperturbable irónico (mira quien habla, ¿no?); a la Evis, la pelirroja fuego, como ella misma, hiperactiva y bipolar; tía relaja, quítale hierro a este trabajo, no te estreses que no vale la pena y tú puedes con todo; a la Anita mi compi de promo, fina como ella misma; a la Sonia el nervio del lab; a la Rachel, mucha suerte en tu búsqueda de empresa; a la Ester Titos y Marta López, dos cracks de personas y en ciencia; a Cristina (Clarias), buena suerte; a las chicas Cardio o ex de Cardio, Montserrat Batlle y Ester, gracias por todo; a los del lab de Ramon Bataller (Pau, Elena, Cristina, Oriol y Montse mi compi de promo a quien aprecio un montón, un encanto de niña); a los del lab del Víctor Peinado, a Elisabet (encantadora), Marta Díez (sonrisa adorable, así que sonrío más chica), a Melina (Felicidades por tu recién nacida hermosa como tú), a Belén (espero te vaya muy bien, se te echa en falta, que no la llamen Belén Belén..), a la Blanqui y la Ana Martínez por tantos momentos geniales; a la sangre nueva de los Victors (Raquel y compañía) y al mismo Víctor, gracias por estar siempre disponible, escuchar y ayudar en lo posible, fue un placer compartir este tiempo con vosotros.

Por Dios, se me ha alargado más de la cuenta esto. Pues mira, aprovechando el mencionarlo, gracias a Dios también por darme salud, a rachas, para poder acabar la

tesis vivo. ¡Uf!, yo que siempre dije que quería una versión reducida y resumida de agradecimientos... Pero no he podido evitar reducirlo mucho más. Ha sido mucho tiempo y muchas personas a mi alrededor en esta larga andadura. Aún así queda alguien más...

A Veva que decir, le dedico un párrafo sólo para ella aunque ella sabe que le dedico un libro entero. Gracias por ser mi ilusión, ya lo sabes. Para que malgastar palabras si el inicio de los estudios de doctorado coincidió con el inicio de mi ilusión contigo. Gracias por estar siempre ahí y recuerda siempre lo que te digo joer, ¡¡¡¡CARPE DIEM!!!! Terminó mis agradecimientos contigo porque como bien sabes el final no es más que un comienzo.

# **Bibliografía**



1. Anthony PP, Isaac KG, Kayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobón LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull. World Health Organ* 1977; 55: 521-540.
  
2. Ministerio de Sanidad y Consumo. Resolución de 30 de marzo de 2006, del Instituto de Salud Carlos III. Anexo I: Enfermedades hepáticas y digestivas. Número de Boe: 83/2006. Fecha de publicación: 7/4/2006.
  
3. Conn HO, Atterbury CE. Cirrhosis. In *Diseases of the liver*, Schiff L and Schiff ER, eds. Philadelphia: Lippincott, 1987; 725-864.
  
4. Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003; 327: 143-147.
  
5. Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12(4): 825-852, Review.
  
6. Marra F, Bertolani C.. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009; 50(3) 957-969.
  
7. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3); 397-416.
  
8. Bataller R, Ginés P, Nicolás JM, Görbig MN, García-Ramallo E, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118(6): 1149-56.

9. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(9): 1383-94.
10. Leivas A, Jiménez W, Bruix J, Boix L, Bosch J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Gene expresión of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res.* 1998; 35(3): 186-93.
11. Pinzani M, Milani S, De Franco R et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts múltiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110(2): 534-48.
12. Poo JL, Jiménez W, María Muñoz R, Bosch-Marcé M, Bordas N, Morales-Ruiz M, Pérez M, Deulofeu R, Solé M, Arroyo V, Rodés J. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: *Gastroenterology* 1999; 116(1):161-7.
13. Morales-Ruiz M, Jiménez W: Neovascularization, Angiogenesis, and Vascular Remodeling in Portal Hypertension. *Portal Hypertension. Patogénesis. Evaluation and Treatment.* 1st ed, Edited by AJ Sanyal, VH Shah, Humana Press, 2005, pp 99-112.
14. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6(4): 389-395.

15. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314(1): 107-117.
16. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653-660.
17. 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.
18. Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol.* 1998; 33: 295-302.
19. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol. Chem* 2000; 275: 2247-2250.
20. Tugues S, Fernández-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, Friedman SL, Carmeliet P, Jiménez W, Morales-Ruiz M.. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1919-1926.
21. Abraldes JG, Bosch J. Novel approaches to treat portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 17 Suppl 3: S232-41.
22. Bosch J, García-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol.* 2000; 32 (Suppl 1): 141-56. Review.

23. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernández-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodés J, Sessa WC, Jiménez W. *Gastroenterology* 2003; 125(2): 522-31.
24. Arroyo V, Jiménez W. Renal function in liver disease. In: Greenberg A, Coffman TM, eds. *Primer on Kidney Diseases*, 3 edn. San Diego, CA: Academic Press, 2001; 188–94.
25. Endothelin and Systemic, Renal, and Hepatic hemodynamic disturbances in cirrhosis. W.Jiménez, J.L.Poo and A.Leivas. En: *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment*. V.Arroyo, P.Ginés, J.Rodés, R.W.Schrier eds. Blackwell Science Inc. Malden, Massachussets, USA. 1998, pp 291-303.
26. Arroyo V, Gines P, Jimenez W, Rodes J. Ascites, renal failure, and electrolyte disorders in cirrhosis. Pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Mc-Intyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodés J, eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford: Oxford University Press, 1991:427-470.
27. Jordan S, Pober and W. Sessa. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev.* 2007;7:803-815.
28. Morales-Ruiz M, Tugues S, Cejudo-Martín P, Ros J, Melgar-Lesmes P, Fernández-Llama P, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway *J Hepatol* 2005; 43: 85-91.



- 
29. Laffi G, Foschi M, Masini E, Simoni A, Mugnai L, La Villa G, Barletta G, Mannaloni PF, Gentilini P. Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1995;22:1666-1673.
30. Pérez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Ros J, Navasa M, Fernández-Varo G, Fuster J, Rivera F, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999; 29: 1057-1063.
31. Levy M, Wexler MJ. Renal sodium retention and ascites formation in dogs with experimental cirrhosis but without portal hypertension or increased splanchnic vascular capacity. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 520-536.
32. Weis S M, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF-A induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437:497-504.
33. Sarelius IH, Kuebel JM, Wang J and Huxley VH. Macromolecule permeability of in situ and excised rodent skeletal muscle arterioles and venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H474-H480, 2006.
34. Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, Sloussat TM, Dvorak HF. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability and ascites fluid accumulation. *Cancer Res* 1995; 55: 360-368.

35. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens J, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380; 435-439.
36. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B and Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA- *Mol. Endocrinol.* 1991; 5: 1806-1814.
37. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 4368-4380.
38. Zachary I and Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res* 2001; 49: 568-581.
39. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I and Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49: 1015-1026.
40. Behzadian MA, Windsor LI, Ghaly N, Llou G, Tsai NT, Caldwell RB. VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptors. *FASEB J.* 2003; 17: 752-754.

41. Olsson AK, Dimberg A, Krenger J and Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006; 7: 359-371.
42. Shalaby, F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66.
43. Roberts WG and Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2369-2379.
44. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin, Jain RK. Regulation of transport pathways in tumour vessels: role of tumour type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 95: 4607-4612.
45. Monsky, WL Fukumura D, Gohongi T, Ancukiewicz M, Weich HA, Torchilin VP, Yuan F, Jain RK. Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 1999; 59: 4129-4135.
46. Pedram A, Razandi M and Levin ER. Deciphering vascular endothelial cell growth factor / vascular permeability factor signaling to vascular permeability inhibition by atrial natriuretic peptide. *J Biol. Chem.* 2002; 277: 44385-44398.

47. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E and Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998; 111: 1853-1865.

48. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E.. Vascular endothelial cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 9815-9820.

49. Stockton RA, Schaefer and Schwarts MA. p-21 activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. *J. Biol. Chem* 2004; 279; 46621-46630.

50. Langille BL, Morphologic responses of endothelium to shear stress: reorganization of the adherens junction. *Microcirculation* 2001; 8: 195-206.

51. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shyy JY. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosin kinases, integrins and shc. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 18393-18400.

52. Wu MH, Guo M, Yuan S, Y and Granger HJ. Focal adhesión kinase mediates porcine venular hyperpermeability elicited by vascular endothelial growth factor. *J. Physiol.* 2003; 552: 691-699.

53. Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon YS, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo D, Cheres D. Src

blockade stabilizes a flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2004; 113: 885-894.

54. Weis S, Cui J, Barnes L and Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell. Biol.* 2004; 167: 223-229.

55. Rakic JM, Lambert V, Devy L, Lutun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noel A and Munaut C. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44: 3186-3193.

56. Bach, Uddin FJ and Burke D. Angiopoietins in malignancy. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2007; 33: 7-15.

57. Eklund L and Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodelling. *Exp. Cell. Res.* 2006; 312: 630-641.

58. Maisonpierre PC, Suri, Jones PF, Bartunikova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.

59. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ and Yancopoulos GD.

Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell.* 2002; 3: 411-423.

60. Ward NL and Dumont DJ. The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin. Cell. Dev.* 2002; 13: 19-27.

61. Mandriota SJ and Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ. Res.* 1998; 83: 852-859.

62. Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, O'Brien-Jenkins A, Randall TC, Rubin SC and Coukos G. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 3403-3412,

63. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, Shen J, Dong A, Alter RS, Duh E, Hackett SF, Okoye G, Ishibashi K, Handa J, Melia M, Wiegand S, Yancopoulos G, Zack DJ and Campochiaro PA. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive *FASEB J.* 2005; 19: 963-965.

64. Jones PF. Not just angiogenesis-wider roles for the angiopoietins. *J. Pathol.* 2003; 201: 515-527.

65. Fiedler and Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 2006; 27: 552-558.

66. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom HC, Bergstrom G, Dejana E, Ostman A, Lindahl P and Betsholtz C. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* 2003;17: 1835-1840-
67. Cascone I, Andero E, Girando E, Napione L, Maniero F, Philips MR, Collard JG, Serini G and Bussolino F. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 2003; 102: 2482-2490.
68. Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel RS and Dumont DJ. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J.* 2001; 20: 5919-5928.
69. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ and Stewart DJ. Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 2003; 162: 1927-1936.
70. Hughes DP, Marron MB and Brindle NP. The anti-inflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ. Res.* 2003; 92: 630-636.
71. Stoeltzing O, Almad SA, Lin W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD and Ellis LM. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* 2003; 63: 3370-3377.

72. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhon H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM and Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* 2000; 6: 460-463.

73. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD and Nishikawa S. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin. Invest.* 2002; 110: 1619-1628.

74. Brindle NP, Saharinen P and Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ. Res.* 2006; 98: 1014-1023.

75. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept.* 2001 Jun 15;99(2-3):87-92.

76. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004, 101: 10464-10469.

77. Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, Kawashima K. The endogenous immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J. Neuroimmunol* 2003; 144: 46-52.



78. Scott IC, Masri B, D'Amico LA, Jin SW, Jungblut B, Wehman AM et al. The G protein-coupled receptor agr11b regulates early development of myocardial progenitors. *Dev Cell* 2007; 12: 409-413.

79. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M, Cani PD, Attané C, Guigné C, Carpené C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2008; 8: 437-445.

80. Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Tapan S. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2008; 116: 289-292.

81. Wei L, Hou X, Tatemoto K. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept.* 2005;132(1-3):27-32.

82. Kralisch S, Lossner U, Bluher M, Paschke R, Stumvoll M, Fasshauer M. Growth hormone induces apelin mRNA expression and secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept.* 2007;139(1-3): 84-9.

83. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpené C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I. TNF $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J.* 2006 20(9):1528-30.

84. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol.* 2006; 296: 177-189.

85. Han S, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH Jr. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008; 295: G1068-1078.

86. Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashely EA, Tsao PS, Dalman RJ, Quertemous T. Apelin prevents aortic aneurism formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296: H1329-35.

87. Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2001, 24(4):230-7.

88. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem.* 2000, 275 (28):21061-7.

89. De Mota N, Reaux-Le Gonzigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004; 101:10464-10469.

90. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type I receptor in blood pressure in vivo. *J Biol. Chem.* 2004; 279: 26274-26279.

91. D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, Guardiola O, Liguoro AM, Liguoro GL, Autiero M, Carmeliet P, Minchiotti G. G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase p70S6 kinase signalling pathway. *Circ. Res.* 2009; 105: 231-238.

92. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, et al. Apelin , the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434-440.

93. Masri B, Lablou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290 : 539-545.

94. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, Woo YJ. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004; 110: II187-II193.

95. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem.* 2004, 4;279(25):26274-9.
96. Szokodi, I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J, Rysa J, Toth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 2002, 91: 434-440.
97. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, Woo YJ. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation.* 2004, 110(11 Suppl 1):II187-93.
98. Foldes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mayranpaa M, Sarman B, Seres L, Skoumal R, Lako Z-Futo, deChatel R, Ruskoaho H, Toth M, *Biochem. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 480.
99. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates P70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1909-1911.
100. Angeli P, Fernandez-Varo G, Dalla Libera V, Fasolato S, Galioto A, Arroyo V, Sticca A, Guarda S, Gatta A, Jimenez W. The role of nitric oxide in the pathogenesis of systemic and splanchnic vasodilation in cirrhotic rats before and after the onset of ascites.

---

Liver Int. 2005 Apr;25(2):429-37

101. Manuel Morales-Ruiz, Wladimiro Jiménez, Dolores Perez-Sala, Josefa Ros, Albert Leivas, Santiago Lamas, Francisca Rivera y Vicente Arroyo. Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Arterial Vessels of Cirrhotic Rats With Ascites. *Hepatology* 1996 Vol. 24, No. 6; 1481-1486

102. Fernandez-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Arroyo V, Sole M, Rivera F, Rodes J, Jimenez W. Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol.* 2003 Jun;162(6):1985-93.

103. Arroyo V, Jiménez W. Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis. Lights and shadows in an important clinical problem. *Journal Hepatology*, 2000; 32(Supl 1): 157-170.

104. Levy M, Wexler MJ. Renal sodium retention and ascites formation in dogs with experimental cirrosis but without portal hipertensión or increased splanchnic vascular capacity. *J. Lab. Clin. Med.* 1978; 91: 520-536.

105. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-5.

106. Roviezzo F, Tsiqkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G, Papapetropoulos A. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 314: 738-44.

107. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, Shen J, Dong A, Apte RS, Duh E, Hackett SF, Okoye G, Ishibashi K, Handa J, Melia M, Wiegand S, Yancopoulos G, Zack DJ and Campochiaro PA. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds in the eye: new vessels are most sensitive. *FASEB J.* 2005; 19: 963-5.

108. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 139: 329-36.

109. Tugues S, Fernández-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, Friedman SL, Carmeliet P, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1919-26.

110. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Path* 1999; 15: 1065-1073.

111. Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Cluman BE, Smith LL, Karsan A. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8813-22.

112. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441: 437-43.

113. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, Shen J, Dong A, Apte RS, Duh E, Hackett SF, Okoye G, Ishibashi K, Handa J, Melia M, Wiegand S, Yancopoulos G, Zack DJ, Campochiaro PA. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB J* 2005; 19(8): 963-5.

114. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM and Phillips MJ. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Vinchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 402: 107-37.

115. Fernández M, Mejías M, Angermayr B, García-Pagan JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splachnic circulation and portal-systemic colateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005; 42: 98-103.

116. Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H.. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434-40.

117. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem*. 2000; 275; 21061-67.