



# INHIBICIÓ I ATRÒFIA SIMPÀTICA: NOU MECANISME IMPLICAT EN LA VASODILATACIÓ ESPLÀNCNICA ASSOCIADA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL

**Mar Coll Loperena**

Laboratori de Malalties Hepàtiques  
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

Febrer 2010



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

**INHIBICIÓ I ATRÒFIA SIMPÀTICA: NOU MECANISME  
IMPLICAT EN LA VASODILATACIÓ ESPLÀNCNICA  
ASSOCIADA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL**

Memòria presentada per **Mar Coll Loperena** per optar  
al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Directors de la tesi doctoral**

Dr. Joan Genescà    Dra. Maria Martell

Tesi Doctoral realitzada en el Laboratori de Malalties Hepàtiques  
de l'Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón  
sota la direcció dels doctors JOAN GENESCÀ i MARIA MARTELL  
i la tutoria del Doctor JOAQUÍN ARIÑO

# AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria donar les gràcies a la Maria Martell i al Joan Genescà per haver-me donat la oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral. M'ha fet una il·lusió especial haver participat en els inicis del vostre projecte i haver viscut com aquest grup anava creixent, amb cares noves i amb noves idees. Us dono molts ànims per continuar aquest camí perquè no tinc cap dubte que aconsegiu tot el que us proposeu. Agrair especialment a la Maria, per la seva dedicació total i absoluta a aquesta tesi (en definitiva, ésta es nuestra tesis...), per tota la intensitat, constància i paciència que ha invertit en ensenyar a una química el fantàstic món dels àcids nucleics i les proteïnes. Mirant enrere no crec que ens hagi costat Déu i ajuda arribar fins aquí, però el que està clar, és que aquesta tesi demostra que ens en sortim! També agrair al Joan, el seu positivisme essencial en els moments clau (a prova de bombes davant d'un rejejected), la seva capacitat didàctica i per guiar-nos en l'estudi d'una patologia tant complicada.

Una altra co-autora d'aquesta tesi és l'Imma (el meu regal de reis del 2008). Gràcies per tot el que m'has ensenyat, m'ha encantat compartir el dia a dia. Nahia, cuando llegaste, esta tesis ya estaba en la cresta de la ola, pero aún así has aportado mucho a este trabajo (los momentos forane han sido increíbles!).

Voldria donar les gràcies a la Tere Otero per ensenyar-me moltes de les tècniques de biologia molecular que es presenten en aquesta tesi. Gràcies també a la Sílvia i a l'Eulàlia.

Vull agrair al Josep Quer el seu suport incondicional, tant en el camp científic com en el personal. També el vull felicitar perquè el temps entre el favor demanat i l'obtingut sempre és de record, i això no és fàcil.

No m'oblido del meu entrenador personal a l'estabulari, el Marc Oria. Tot i que no va aconseguir fer-me una gran remera (el Balearia va arribar tard?) ha assolit una fita més complicada, fer-me gaudir del món de les ratetes. Merci per tot el temps que ens has dedicat vestit de pèsol.

També, recordar-me de tot els membres del laboratori de malalties hepàtiques. Hem arreglat el món fent cafès, hem escrit el manual del sucador, hem participat en una regata (olé als post-doc,

però quin timonel!), hem convertit el ràfting en esport olímpic, hem visitat Copengahen (JosEEp!!!!) i San Francisco amb bici, hem creat una bona col·lecció de fotos discotequeras, i qualsevol excusa ha estat bona per compartir croissants (si pot ser millor de crema, així no hem de córrer..). Als infectats vírics: a Mariacu, per ser la veterana, perquè me encanta tenerte al lado y comentartelo todo! al Damir, per les nostres xerrades, i a la Eva, nuestra doctora. Als encefalopatas: Jordi, per no deixar que quedi ni una engruna; Lluís, el millor post (podríem dir super-post?) i la Robo-Laia, per la ser la meva excel·ajuda.

Aprofito per agrair als companys de l'Hospital Clínic: Bàrbara, Ester i Marc, per haver-me ensenyat els models animals i la rata viva. Merci a tots!

A la Laura i la Clara, per aportar a aquesta tesi el seu toc de disseny.

Finalment, m'agradaria dedicar aquesta tesi als que sempre han estat al meu costat: als meus pares, a la meva família parisina (Marta, Nico i la petita Júlia), a la Màrius, a l'Eugeni, i com no, al Joan, per no perdre's res del què la vida em va portant (ni la presentació de Madrid), per tot el què ens queda per endavant...

Mar Coll, Barcelona, Febrer 2010

## ÍNDEX

<b>1 ABREVIACIONS</b>	<b>11</b>
<b>2 INTRODUCCIÓ</b>	<b>15</b>
2.1 Fisiopatologia de la hipertensió portal	16
2.2 Factors que influeixen en la hipertensió portal	16
2.3 Augment de la resistència vascular	17
2.4 Augment del flux sanguíni	18
2.5 Sistema nerviós a la hipertensió portal	24
2.6 Models animals en la hipertensió portal	26
<b>3 ESTUDI 1: INHIBICIÓ SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL</b>	<b>29</b>
3.1 Hipòtesi i objectius	30
3.2 Resum	30
3.3 Manuscrit original	33
<b>4 ESTUDI 2: ATRÒFIA SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL</b>	<b>43</b>
4.1 Hipòtesi i objecius	44
4.2 Resum	44
4.3 Manuscrit original	47
<b>5 ESTUDI 3: POSSIBLE INDICACIÓ DE LA DROXIDOPA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL</b>	<b>57</b>
5.1 Introducció	58
5.2 Disseny experimental	60
5.3 Resultats	60
<b>6 DISCUSSIÓ</b>	<b>65</b>
6.1 Inhibició simpàtica a la hipertensió portal	66
6.2 Atròfia simpàtica a la hipertensió portal	69
6.3 Possible indicació de la droxidopa en la hipertensió portal	74
6.4 Noves hipòtesis	76
<b>7 CONCLUSIONS</b>	<b>79</b>

<b>8 MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>81</b>
<b>8.1 Tècniques de biologia molecular</b>	<b>82</b>
<b>8.1.1 Tècniques relacionades amb l'estudi d'expressió gènica diferencial</b>	<b>82</b>
<b>8.1.1.1 Microarrays de DNA</b>	<b>82</b>
<b>8.1.1.2 RT-PCR a temps real</b>	<b>92</b>
<b>8.1.2 Tècniques relacionades amb l'estudi de proteïnes</b>	<b>94</b>
<b>8.1.2.1 Western blot</b>	<b>94</b>
<b>8.1.2.2 Immunohistoquímica</b>	<b>97</b>
<b>8.1.3 Tècniques relacionades amb la localització del RNA missatger</b>	<b>101</b>
<b>8.1.3.1 Hibridació in situ de RNA</b>	<b>101</b>
<b>8.1.3.2 RT-PCR a temps real</b>	<b>105</b>
<b>8.2 Tècniques d'experimentació animal</b>	<b>107</b>
<b>8.2.1 Models experimentals d'hipertensió portal</b>	<b>107</b>
<b>8.2.1.1 Model de la lligadura calibrada de la vena porta</b>	<b>107</b>
<b>8.2.1.2 Model de cirrosi per tetraclorur de carboni</b>	<b>107</b>
<b>8.2.1.3 Model de cirrosi per lligadura del conducte biliar</b>	<b>108</b>
<b>8.2.2 Mesura dels paràmetres hemodinàmics</b>	<b>108</b>
<b>8.2.3 Administració del fàrmac</b>	<b>109</b>
<b>8.3 Reactius i tampons</b>	<b>110</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>113</b>

## 1. ABREVIACIONES

**aaUTP**, 5-(3-aminoalil)-UTP  
**AEA**, anandamida  
**Akt**, proteïna kinasa B  
**AM**, adrenomedulina  
**AMPc**, adenosina monofosfat cíclica  
**AVP**, vasopressina  
**AII**, angiotensina II  
**BDL**, model experimental de lligadura del conducte biliar  
**BH<sub>4</sub>**, tetrahidrobiopterina  
**CCl<sub>4</sub>**, tetraclorur de carboni  
**CGRP**, pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina;  
**CO**, monòxid de carboni;  
**Ct**, cicle lliandar  
**Cy<sub>3/5</sub>**, cianina 3/5  
**DAG**, diacilglicerol  
**Dbh**, dopamina β hidroxilasa  
**ET**, endotelina  
**eNOS**, òxid nítric sintasa endotelial  
**F**, flux sanguini portal  
**GO**, gene ontology  
**HO**, hemo-oxigenasa  
**H<sub>2</sub>S**, sulfur d'hidrogen  
**iNOS**, òxid nítric sintasa induïble  
**IP<sub>3</sub>**, inositol-trifosfat  
**L-NAME**, N-ω-nitro-L-arginina metil ester  
**LT**, leucotrienes,  
**MAP**, pressió arterial mitja  
**MLC**, cadenes lleugeres de miosina  
**MRA**, artèries de resistència mesentèrica  
**NA**, noradrenalina  
**nNOS**, òxid nítric sintasa neuronal

**NO**, òxid nítric  
**NOS**, òxid nítric sintasa  
**NPY**, neuropèptid Y  
**PCR**, reacció en cadena de la polimerasa  
**PGI<sub>2</sub>**, prostaciclina  
**PKC**, proteïna kinasa C  
**PLC**, fosfolipasa C  
**PP**, pressió portal  
**PVL**, model experimental de lligadura calibrada de la vena porta  
**R**, resistència vascular portal  
**RAAS**, sistema renin-angiotensinà-aldosterona  
**RQ**, quantificació relativa  
**RT**, transcripció reversa  
**SMA**, artèria mesentèrica superior  
**SMABF**, flux mesentèric  
**SMAR**, resistència mesentèrica  
**SMG**, gangli mesentèric superior  
**Snap 25**, proteïna del sinaptosoma de 25 Kd  
**SNS**, sistema nerviós simpàtic  
**Th**, tirosina hidroxilasa  
**TNFα**, factor de necrosis tumoral α  
**TXA<sub>2</sub>**, tromboxà A<sub>2</sub>;  
**VEGF**, factor de creixement de l'endoteli vascular  
**VSM**, cèl·lules vasculares del muscle llis

## 2. INTRODUCCIÓ



## 2.1 FISIOPATOLOGIA DE LA HIPERTENSIÓ PORTAL

La hipertensió portal és un síndrome clínic caracteritzat per un augment patològic de la pressió del sistema venós portal per sobre del seu valor normal (inferior a 6mmHg). Qualsevol procés que interfereixi en el flux de la sang portal pot provocar hipertensió portal. Les causes de la hipertensió portal es classifiquen segons la localització de l'augment de la resistència al flux portal que es pot donar en un àmbit pre-hepàtic com el cas de la trombosis portal, intra-hepàtic com la cirrosi hepàtica o bé post-hepàtic com el síndrome de Budd-Chiari. La hipertensió portal intra-hepàtica pot produir-se per diferents afeccions del fetge, però la cirrosi és la responsable de més del 90% dels casos en el món occidental. Quan el gradient de pressió portal (diferència entre les pressions de les venes porta i venes supra-hepàtiques) augmenta a 10 mm Hg, poden aparèixer les complicacions de la hipertensió portal. La hipertensió portal promou la formació de vasos col·laterals, i a través d'aquests la sang portal es deriva a la circulació sistèmica sense passar pel fetge. Aquests col·laterals portosistèmics es formen per l'obertura i dilatació de conductes vasculars preexistents que connecten el sistema venós portal amb les venes caves superior i inferior. Aquests conductes, tancats en condicions normals, es dilaten a causa de l'augment de la pressió portal. El sistema anastomòtic més important, és el sistema col·lateral gastroesofàgic, ja que inclou les varius esofàgiques, responsables de la principal complicació de la hipertensió portal: l'hemorràgia digestiva per trencament de varius esofàgiques. Altres manifestacions del síndrome de la hipertensió portal són l'encefalopatia hepàtica, l'ascites i la insuficiència renal. A causa de la gravetat d'aquestes complicacions, la hipertensió portal representa la primera causa de mort i de transplantament hepàtic en pacients amb cirrosi (1).

## 2.2 FACTORS QUE INFLUEIXEN EN LA HIPERTENSIÓ PORTAL

Com en qualsevol sistema vascular, el gradient de pressió al llarg del sistema venós portal és el producte del flux sanguini portal per la resistència vascular que s'oposa a aquest. Segons la llei d'Ohm aquesta relació ve definida per

$$\Delta P = Q \times R$$

on  $\Delta P$  és el gradient del flux portal,  $Q$  és el flux sanguini en la totalitat del sistema venós portal (que inclou les col·laterals portosistèmiques) i  $R$  és la resistència del sistema venós portal (suma de les resistències de la vena porta, del fetge i de les venes col·laterals). Aquesta relació indica que la pressió portal pot augmentar a causa d'un augment del flux sanguini portal, de la resistència

vascular o d'ambdós alhora. De fet, en pacients cirròtics, l'augment de la resistència al flux de sang portal és el factor principal desencadenant de la fisiopatologia de la hipertensió portal (2, 3).

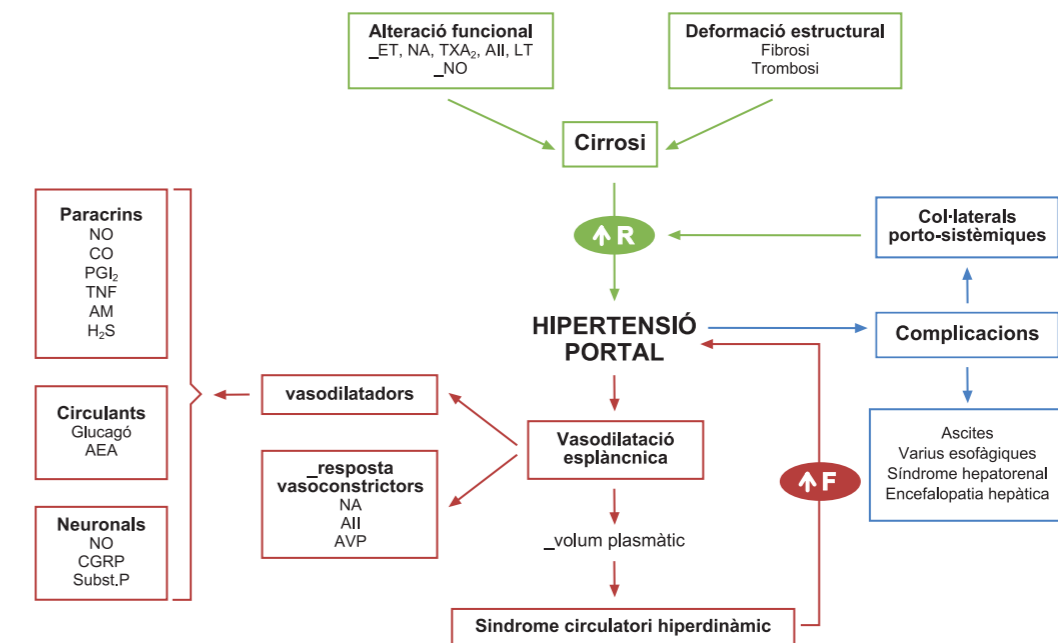


Figura 1. Mecanisme fisiopatològic de la hipertensió portal

NO, òxid nítric; CO, monòxid de carboni;  $PGI_2$ , prostaciclina;  $TNF\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; AM, adrenomedulina;  $H_2S$ , sulfur d'hidrogen; AEA, anandamida; CGRP, pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina; NA, noradrenalina; AII, angiotensina II; AVP, vasopressina; ET, endotelina;  $TXA_2$ , tromboxà  $A_2$ ; LT, leucotrienes, R, resistència vascular portal; F, flux sanguini portal.

## 2.3 AUGMENT DE LA RESISTÈNCIA VASCULAR

### • Resistència vascular intrahepàtica

En la cirrosi, la resistència vascular intrahepàtica està localitzada principalment en els sinusoides hepàtics, com a conseqüència de la deformació de la arquitectura vascular hepàtica per fibrosi, la cicatrització i la formació de nòduls (4). Encara que el canvi morfològic que es produeix al fetge és el factor més important que intervé en la resistència intrahepàtica, treballs com el de Bathal i Grozsmann (5) van evidenciar que existeix un component dinàmic d'aquesta resistència, modificable per agents vasoactius endògens o farmacològics, i que representa un 40% de la resistència vascular del fetge cirròtic. Així, l'augment del to vascular intrahepàtic és una

conseqüència d'un desequilibri produït per un increment a la resposta de vasoconstrictors, com l'endotelina, vasoconstrictors adrenèrgics, tromboxà, leucotrienes o angiotensina II (6-10) i per una deficiència tant en la producció com en la resposta, de vasodilatadors, principalment, d'òxid nítric (NO) (8, 11).

- **Resistència portocolateral**

En la hipertensió portal avançada, la circulació col·lateral pot transportar més del 90% de la sang que entra al sistema portal. En aquestes circumstàncies és obvi que la resistència d'aquests vasos pot influir notablement en la resistència global al flux sanguini portal i per tant sobre la pressió portal. Els elements que modulen la resistència col·lateral no són ben coneguts, tot i així agents vasoconstrictors (vasopressina i inhibidors no selectius de receptors  $\beta$  adrenèrgics), incrementen significativament la resistència portocolateral. Altres estudis han mostrat que la formació de vasos porto-sistèmics està relacionada amb processos angiogènics dependents del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), els quals poden ser atenuats si s'interfereix la via de senyalització de VEGF/VEGF receptor-2. (12, 13)

## 2.4 AUGMENT DEL FLUX SANGUÍNI

Un augment del flux d'entrada de la vena porta és una característica fonamental de la hipertensió portal (14). Aquest augment del flux sanguini que contribueix a perpetuar i a agreujar el síndrome de la hipertensió portal, és conseqüència d'una important vasodilatació arteriolar en els òrgans esplànquics que drenen la vena porta. Així doncs, en la hipertensió portal, la circulació esplànquica i també la sistèmica és hipercinètica, i implica un augment de l'índex cardíac així com un descens de la pressió arterial i de la resistència vascular perifèrica (sistèmica) (15). Aquests trastorns hemodinàmics associats a la hipertensió portal (vasodilatació arteriolar sistèmica, disminució de la resistència perifèrica, hipervolemia i augment del consum cardíac) és el que es coneix com síndrome de circulació hiperdinàmica i condueix a un augment del flux sanguini portal i a agreujar la hipertensió portal (16), encara que es desenvolupin col·laterals portosistèmiques per tal de descomprimir el sistema.

Els mecanismes descrits fins al moment, que contribueixen a la vasodilatació esplànquica de la hipertensió portal són per una banda, l'augment de la concentració de vasodilatadors circulants, l'increment de la producció endotelial de vasodilatadors locals i finalment, la reducció de la resposta vascular en front als vasoconstrictors. Aquest últim mecanisme, és probablement una conseqüència de l'augment del nivell de vasodilatadors (circulants i paracrins).

- **Vasodilatadors circulants**

Diferents estudis s'han centrat amb el paper potencial dels vasodilatadors circulants per promoure la circulació hiperdinàmica esplànquica observada en la hipertensió portal. S'ha observat un augment de la alliberació d'agents vasodilatadors endògens que podrien contribuir a la hiperèmia esplànquica per un doble mecanisme: provocant la relaxació del múscle llis vascular i disminuint la sensibilitat front els vasoconstrictors endògens com la noradrenalina, angiotensina II i vasopressina (17). El glucagó, un pèptid de 29 aminoàcids, és probablement el vasodilatador humoral pel que existeixen més evidències de que juga un paper significatiu en promoure la hiperèmia esplànquica en la hipertensió portal (18). Diversos estudis han determinat nivells elevats d'aquesta hormona en pacients cirròtics i en models experimentals d'hipertensió portal. A més, estudis en rates sanes, en els que s'ha augmentat el glucagó circulant a nivells similars als observats en la hipertensió portal, han mostrat un augment significatiu del flux sanguini esplànquic. Aquest conjunt d'evidències donen força a l'estratègia terapèutica per disminuir la hipertensió portal basada en inhibidors del glucagó (somatostatina i anàlegs).

Estudis recents indiquen que els endocannabinoids podrien jugar un paper important en la circulació hipercinètica associada a la hipertensió portal (19, 20). S'han determinat nivells elevats d'anandamida (cannabinoid endogen) en mostres de sang de pacients cirròtics així com en rates cirròtiques. A més a més, el bloqueig del receptor cannabinoid CB1 disminueix el flux sanguini portal i augmenta la pressió arterial en rates amb hipertensió portal. El mecanisme d'acció és encara incert, però s'ha proposat que un increment de la producció de NO, produït per l'activació dels receptors endotelials CB1, en podria ser la causa (21).

- **Vasodilatadors endotelials**

En el context de la patogènia de les anomalies circulatòries de la hipertensió portal, també s'han determinat substàncies vasoactives paracrines produïdes per l'endoteli vascular, com l'òxid nítric, el monòxid de carboni o la prostaciclina, que tenen un paper molt important. Es creu que el principal factor responsable del desenvolupament de la circulació hiperdinàmica és la hiperproducció de l'òxid nítric (22). Paradoxalment, la síntesi d'òxid nítric es troba reduïda en el fetge cirròtic comparat amb el fetge sa (23). Així doncs, l'òxid nítric estaria jugant un doble paper, per una banda, el deficiència de la alliberació del NO en la circulació intrahepàtica podria contribuir a l'augment de la resistència observada en la cirrosi i per altre banda, una excessiva quantitat d'òxid nítric podria ser la responsable de la vasodilatació esplànquica i sistèmica. Aquest excés de NO en la circulació esplànquica, s'evidencia en estudis experimentals on l'administració aguda d'antagonistes específics de l'òxid nítric, provoquen una vasoconstricció esplànquica i sistèmica, la qual atenua la circulació hiperdinàmica d'aquests animals (22). A més a més, la hiperproducció de NO s'ha demostrat in vitro en mostres d'artèria mesentèrica de rates amb hipertensió portal

(24). Finalment, la determinació de concentracions elevades de nitrits i nitrats (productes de l'oxidació del NO) en mostres de sèrum i orina en pacients cirròtics, consolida el paper rellevant de l'òxid nítric en les alteracions vasculars de la hipertensió portal (25).

La producció de NO és catalitzada per la òxid nítric sintasa (NOS), que transforma la L-arginina en L-citrulina amb la presència de cofactors com la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) i NADPH. Es coneixen tres tipus diferents de NOS: per una banda, la NOS d'origen endotelial (eNOS) i la neuronal (nNOS), ambdues constitutives i activades per  $Ca^{2+}$  en presència de calmodulina, i per altre banda, la iNOS, induïble per citoquines i endotoxines i independent de  $Ca^{2+}$  (26). Inicialment, s'havia proposat (Vallance i Moncada) que la isoforma induïble era la responsable de l'excés de NO a la circulació esplàncnica i sistèmica (27). Aquesta hipòtesi es basava en que l'endotoxèmia (present en la cirrosi), activava l'expressió de iNOS en les parets vasculars. Aquesta hipòtesi no va ser validada, perquè es va demostrar que la iNOS no es trobava sobreexpressada en la vasculatura esplàncnica de les rates cirròtiques, i que la dexametasona (inhibidor de iNOS), no prevenia el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica als animals (28, 29). Posteriorment, diversos laboratoris van demostrar que la forma endotelial de la NOS era la responsable de l'excés de NO descrit (28-31). Dels estímuls que promouen la sobre expressió de eNOS, un dels més importants és l'estrès per fregament, però la translocació bacteriana i el shunt porto-sistemic per se també tenen un paper important en la inducció de la vasodilatació depenent de NO (28, 29, 32-37). Tot i així, estudis seqüencials realitzats en el model de lligadura calibrada de la vena porta, han demostrat que l'activació de eNOS té lloc abans de l'aparició d'aquests tres factors (31, 38), de fet, s'observa una sobre-expressió d'aquest enzim a les 10 hores després d'haver practicat la lligadura (39). Això indica que l'activació de eNOS és un factor inicial en el desenvolupament de la vasodilatació i d'altre banda ens mostra que ha d'existir algun altre mecanisme dels mencionats anteriorment que intervingui a les fases inicials de la hipertensió portal. En aquesta direcció, s'ha proposat que la vasoconstricció mesentèrica reflex observada just després de la lligadura, podria ser la responsable de l'activació de l'enzim (39). Estudis a nivell molecular, mostren que en estats preliminars de la hipertensió portal, es detecta abans l'increment de l'activitat de eNOS que no pas l'augment de l'RNA missatger d'aquest enzim. La única resposta a aquesta paradoxa és una activació de eNOS a nivell post-translacional a través de la fosforilació d'Akt (38). Un altre mecanisme responsable de l'activació de eNOS proposat és la translocació bacteriana. L'endotoxèmia derivada de la translocació bacteriana, estimula la GTP cicloxigenasa, present en els vasos mesentèrics, augmentant la producció de la  $BH_4$ , cofactor essencial per la eNOS (40). Així, estudis amb animals, que utilitzen antibiòtics per la descontaminació intestinal, han demostrat que l'augment de la biodisponibilitat de  $BH_4$ , com a resultat de la translocació bacteriana contribueix en l'augment de l'activitat de eNOS (41). Un altre font de l'excessiva producció mesentèrica de NO és la nNOS, la qual s'expressa en les

neurones perivasculares nitrèrgiques. Utilitzant la perfusió de vasos mesentèrics, s'ha demostrat que l'alliberament de NO, per via de la nNOS, augmenta en resposta a l'estimulació elèctrica dels nervis perivasculares en rates amb hipertensió portal. En concordança amb aquests resultats, s'ha determinat una sobre-expressió de nNOS als nervis perivasculares de l'arteria mesentèrica superior en rates amb hipertensió portal pre-hepàtica (42, 43).

De la mateixa manera que el NO, el monòxid de carboni (CO), és una molècula de gas endògena capaç de regular el to vascular. El CO és un dels productes del procés de degradació del grup hemo, que consisteix en una sèrie de reaccions autocatalítiques portades a terme per l'enzim hemo-oxigenasa (OH). Diversos estudis suggereixen la implicació del CO en la vasodilatació arterial derivada de la cirrosi. Per una banda, s'ha determinat un augment tant de l'expressió com de l'activitat de la forma induïble de l'enzim hemo-oxigenasa (OH-1) en teixits d'origen esplàncnic en animals amb hipertensió portal, i per altre banda, la inhibició simultània del NO i HO ha demostrat que reverteix de forma completa la reducció de la resposta vasoconstrictora al clorur de potassi en el territori mesentèric (44).

Una altra substància amb funció vasodilatadora que podria jugar un paper important en la circulació hiperdinàmica és la prostaciclina ( $PGI_2$ ). La prostaciclina, produïda per les ciclooxigenases (COX1 i 2) i alliberada del endoteli, indueix una relaxació del múscle llis per l'estimulació de l'adenilat ciclase i la generació de l'adenosina monofosfat cíclica (AMPC). S'ha demostrat que pacients cirròtics presenten alts nivells sistèmics de prostaciclina circulant. A més, aquesta prostaglandina també es troba elevada tant a la vena porta com a l'artèria aorta de rates amb hipertensió portal (45, 46). En la mateixa línia, la inhibició de la biosíntesis de prostaglandines amb indometacina redueix la circulació hiperdinàmica i la pressió portal en pacients amb cirrosi i hipertensió portal (47).

Per altre banda, existeixen estudis que indiquen que el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produït per les cèl·lules mononuclears i activat per endotoxines bacterianes, es troba en nivells elevats en el context d'hipertensió portal, i es creu que podria ocupar una posició rellevant en la vasodilatació esplàncnica observada en la hipertensió portal. De fet, antagonistes del TNF- $\alpha$  (anticossos anti-TNF- $\alpha$  o inhibidors de la seva síntesis) inhibeixen el desenvolupament del síndrome circulatori hiperdinàmic en rates amb hipertensió portal pre-hepàtica o amb cirrosi biliar secundària (48, 49). El mecanisme d'acció del TNF- $\alpha$  en la hipertensió portal és encara desconegut, tot i que s'ha demostrat que estimula l'expressió gènica de l'enzim clau per la biosíntesis de  $BH_4$ , la GTP-cicloxigenasa, en les cèl·lules endotelials (50, 51). Així, augmentant la producció de  $BH_4$ , directament s'incrementaria la biodisponibilitat del NO derivada de la eNOS (50, 52).

Un altre candidat a tenir un paper important en la regulació de la circulació hiperdinàmica, és l'adrenomedulina, un pèptid i potent vasodilatador. Els pacients cirròtics, presenten un elevat nivell d'adrenomedulina circulant, el qual ha estat associat directament amb nivells plasmàtics

de nitrats i amb l'expansió del volum plasmàtic, i inversament correlacionat amb la resistència perifèrica (53). L'adrenomedulina, fosforila i activa l'enzim Akt i augmenta la producció de cGMP (indicador de NO) en l'artèria aorta de rata (54). Aquestes dades suggereixen que aquest pèptid podria estar implicat en l'activació d'Akt i de eNOS en artèries de la circulació esplàncnica i sistèmica en la hipertensió portal (55).

Recentment, un conjunt d'evidències, ha introduït una nova molècula en el focus d'estudi dels possibles agents vasodilatadors que participen en la circulació hiperdinàmica, el sulfur d'hidrogen (H<sub>2</sub>S). Aquest gas, és un potent vasodilatador endogen present a l'aorta (56, 57) i en les artèries mesentèriques (58). Una injecció intravenosa d'H<sub>2</sub>S implica una disminució transitòria de la pressió arterial de rates (de 20 a 12mmHg). El mecanisme de relaxació del teixit vascular d'aquest gas s'explica per l'estimulació dels canals ATP-sensitius de K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>), independent de l'activació de la via cGMP, com en el cas del NO o el CO (59). De totes maneres, el rol del H<sub>2</sub>S en el síndrome circulatori hiperdinàmic encara no s'ha explorat directament en el context de la cirrosi.

Tot i que probablement l'òxid nítric tingui un paper rellevant en aquesta alteració vascular, s'ha demostrat que la inhibició del NO atenua, però no normalitza, el síndrome hiperdinàmic de la hipertensió portal, la qual cosa suggereix que la regulació de la vasodilatació esplàncnica associada a la hipertensió portal té un origen multifactorial (60).

#### • Hipo-resposta a vasoconstrictors

La baixa pressió arterial i la hipovolèmia central desencadena l'activació de diversos sistemes de regulació vascular com el sistema renin-angiotensinà-aldosterona (RAAS), el sistema nerviós simpàtic i l'alliberació no osmòtica de la arginina vasopressina, en un intent de mantenir estable la pressió arterial mitjançant la vasoconstricció i la retenció de sodi i aigua. Tot i així, diversos estudis de perfusió de vasos aïllats procedents de diferents models animals d'hipertensió portal, suggereixen que existeix un component vascular de hiporesposta a vasoconstrictors. Aquesta hiporesposta de les parets vasculares esplàncniques als agents vasoconstrictors, explica perquè la circulació hiperdinàmica augmenta amb la progressió de la malaltia, tot i la activació d'aquests sistemes vasoconstrictors homeostàtics. A més a més, la persistent activació d'aquests sistemes sembla empitjorar el component dinàmic de la resistència intrahepàica i promou la vasoconstricció, la isquèmia i la subseqüent formació d'estrès oxidatiu en diferents òrgans (fetge o ronyó). La hiporesposta a vasoconstrictors intervé tant en l'augment de la vasodilatació en territoris esplàncnics, com en la vasoconstricció d'òrgans essencials i desencadena el trastorn multiorgànic de la cirrosi. Donat que tant l'afinitat com el nombre de receptors als vasoconstrictors endògens no es troben reduïts a la hipertensió portal (61, 62), ha d'existir una disfunció de la via de senyalització de la contracció a nivell de sub-receptor.

L'estat contràctil de les cèl·lules vasculares del muscle llis (VSM) depèn essencialment de l'estat de fosforilació de les cadenes lleugeres de miosina (MLC). Els agonistes contràctils tendeixen a augmentar la fosforilació de les MLC via l'activació de les MLC kinasa. La MLC fosforilada activa a la actina-miosina ATPasa, donant a lloc a la contracció del muscle llis. En condicions normals, no només els vasoconstrictors endògens, com les catecolamines o la angiotensina, sinó també la vasopressina i les leucotrienes, actuen via l'estimulació de receptors acoblats a la proteïna G. Aquests receptors, subseqüentment activen altres efectors com la fosfolipasa C β (PLCβ) i la GTPasa RhoA, donant a lloc a la fosforilació de MLC. L'activació de la PLCβ implica la hidrolització de l'inositol-bifosfat (IP<sub>2</sub>) a inositol-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG). L'alliberament del segon missatger IP<sub>3</sub> induueix l'alliberament de Ca<sup>2+</sup> des del reticle endoplasmàtic, mentre que el DAG interacciona amb la proteïna kinasa C (PKC), la qual modula un ampli assortiment de processos cel·lulars que desencadenen la regulació del to vascular. En canvi, l'activació de RhoA, i la subseqüent activació de la RhoA kinasa, inhibeix la MLC fosfatasa, afavorint l'estat fosforilat de MLC, i la contracció vascular. Aquestes vies de senyalització de la contractilitat vascular es troben alterades en la hipertensió portal donant lloc a una hipocontracció i vasodilatació arterial. De fet, en rates amb cirrosi biliar secundària (BDL), s'ha observat una disfunció de la via de senyalització de PLC, en reacció a l'angiotensina, que implica una reducció de l'activació PLC i una subseqüent disminució de la producció de IP<sub>3</sub> (63). Recents estudis, han revelat que en rates BDL, existeix una disminució de l'activitat de RhoA kinasa que dona lloc a una alteració a la contractilitat vascular en vasos extrahepàtics que podria contribuir a la vasodilatació esplàncnica i sistèmica (61, 64).

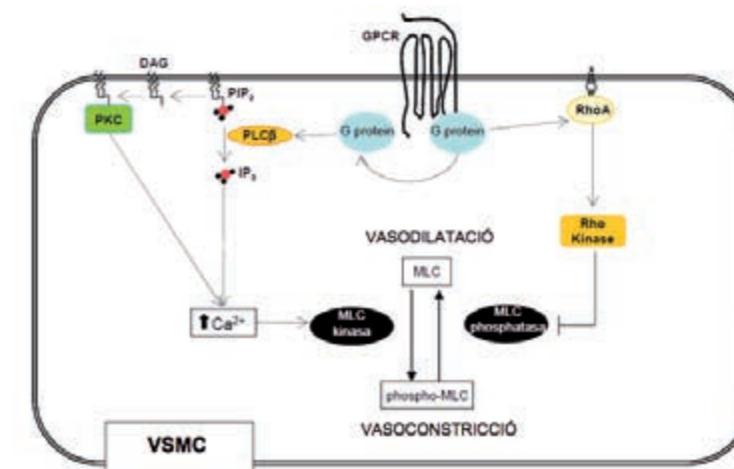


Figura 2. Vies de senyalització cel·lular associades a la vasodilatació esplàncnica

DAG, diacilglicerol; GPCR, receptors acoblats a la proteïna G; IP<sub>3</sub>, inositol-trifosfat; MLC, cadenes lleugeres de miosina; PIP<sub>2</sub>, inositol-bifosfat; PKC, proteïna kinasa C; PLCβ; fosfolipasa C β; VSMC, cèl·lula vascular del muscle llis.

## 2.5 SISTEMA NERVIÓS A LA HIPERTENSIÓ PORTAL

Estudis histològics han revelat que el múscle llis vascular està innervat per neurones que presenten immunoreactivitat per NOS (65), per la acetilcolina transferasa, o per la tirosina hidroxilasa. Aquestes neurones postganglionars eferents, identificades com nitrèrgiques, colinèrgiques i noradrenergiques, controlen la contractilitat de les cèl·lules vasculares dels vasos sanguinis. Funcionalment, s'ha demostrat que els nervis nitrèrgics, tindrien més rellevància en la regulació del to vascular que no pas els colinèrgics, la funció dels quals bàsicament es basa en modular la funció contràctil vasoconstrictora dels nervis adrenèrgics i vasodilatadora dels nitrèrgics (66).

En la circulació mesentèrica, tant de humans com de rosegadors, la vasoconstricció induïda pel sistema nerviós simpàtic (SNS) és principalment transmesa pels receptors post-sinàptics adrenèrgics  $\alpha_1$  (67). De fet, l'estimulació dels receptors adrenèrgics  $\alpha_1$ , representa el mecanisme més important pel qual el SNS regula la resistència vascular esplàncnica. S'ha descrit que la vasoconstricció com a resposta a l'estimulació dels nervis peri-vasculars de l'artèria mesentèrica es pot abolir mitjançant la tetrodotoxina (neurotòxic), la guanetidina (bloquejador de les neurones adrenèrgiques), el prazosin (antagonista del adrenoreceptor  $\alpha_1$ ) o la 6-hidroxidopamina (destructor de les neurones adrenèrgiques) (68, 69). Així doncs, és més que probable que la noradrenalina alliberada de les terminals nervioses adrenèrgiques, sigui la principal responsable de la regulació del to dels vasos sanguinis perifèrics. En un treball de Benoit i col·laboradors (70), es va determinar que la resposta al bloqueig de vasoconstrictors en animals amb hipertensió portal diferia dràsticament amb les rates control. En el cas de les rates control, la influència de la vasopressina i dels agents adrenèrgics  $\alpha$  en el manteniment de la resistència de la microvasculatura intestinal era més important que no pas la de l'angiotensina II. En canvi, el bloqueig adrenèrgic  $\alpha$ , en rates PVL, no produïa canvis en el diàmetre arteriolar de la microcirculació intestinal, mentre que el bloqueig de la vasopressina o l'angiotensina estava associat a una dilatació de les arterioles de la vasculatura intestinal. Aquest resultat, suggereix una pèrdua del to vascular adrenèrgic en el context de la hipertensió portal.

Conjuntament amb la NA, el neuropeptid Y (NPY), és un dels principals neurotransmissors del sistema nerviós simpàtic. El NPY i la NA s'emmagatzemen i s'alliberen de la mateixa vesícula pre-sinàptica ubicada en les terminals sinàptiques simpàtiques (71). L'efecte biològic del NPY està regulat per diferents receptors (Y1-Y6), dels quals el receptor Y1 de les cèl·lules vasculares del múscle llis, és el principal responsable dels efectes vasculares. L'estimulació del receptor Y1 (acoblat a la proteïna G) potencia la vasoconstricció a través de la noradrenalina. La sinèrgia entre NPY i NA és molt important en la regulació del to vascular. De fet, en rates amb hipertensió portal, però no en rates sham, el NPY a través del receptor Y1, augmenta la contractilitat vascular i corregeix la hiporesposta vascular (72).

Per tant, la rellevància del neurotransmissor NPY s'incrementa dins del context de la hipertensió portal, ja que optimitza la vasoconstricció adrenèrgica restaurant així l'eficàcia de les catecolamines endògenes en la circulació esplàncnica de la hipertensió portal.

Un gran nombre de evidències ha demostrat que existeix un augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic (SNS) en la fisiopatologia de la hipertensió portal (73). En pacients cirròtics, l'activitat del SNS es troba elevada en diferents parts del sistema hepato-esplàncnic, inclosos teixits o estructures vasculares drenats per les col·laterals porto-sistèmiques. Tanmateix, s'ha determinat una relació positiva entre la noradrenalina i la adrenalina circulant i la progressió de la malaltia (73). Així, pacients amb malaltia hepàtica avançada (Child C), amb una hipertensió portal pronunciada, una alta retenció de sodi i amb el síndrome hepatorenal establert, presenten alts nivells de NA en plasma. A més a més, s'ha demostrat que existeix una correlació entre els nivells de NA circulants i la supervivència del malalt (74). L'estimulació del SNS, mitjançant l'increment de noradrenalina en plasma, s'entén com un intent de compensar i contrarestar l'estat de vasodilatació arterial i la hiporeactivitat vascular. De totes maneres, tot i els elevats nivells de catecolamines endògenes circulants, la hipotensió arterial persisteix durant tot el desenvolupament de la malaltia. Tot i així, diverses evidències demostren que existeixen diferències regionals en la distribució de l'activació del sistema nerviós simpàtic en el context de la cirrosi (75, 76).

Per altre banda, la NOS, no només es produeix en les cèl·lules endotelials (eNOS), sinó que també es troba en nervis peri-vasculars (nNOS). Aquests nervis, la funció neurotransmissora dels quals, depèn de l'alliberació de NO, s'anomenen nitrèrgics, i produeixen vasorelaxació de les cèl·lules del múscle llis. Diferents estudis demostren que existeix una sobre-expressió de nNOS en els nervis peri-vasculars de les artèries mesentèriques de rates amb hipertensió portal (42). Aquest resultat, suggereix que la hiperproducció de NO dependent de nNOS podria jugar un paper important en la vasodilatació arterial de la hipertensió portal. Tanmateix, s'ha descrit que la inhibició no selectiva de NOS per L-NAME (N- $\omega$ -nitro-L-arginina metil ester) augmenta la vasoconstricció induïda per l'estimulació dels nervis peri-vasculars en artèries mesentèriques sense endoteli. A més, la inhibició selectiva de nNOS per L-VNIO (vinil-L-N-5-(1-imino-3-butenil)-L-ornitina), també augmenta la resposta adrenèrgica vasoconstrictora (77). Aquests resultats suggereixen que el NO pre-sinàptic podria inhibir l'alliberament de NA de les terminals nervioses adrenèrgiques.

La via neuronal que controla el sistema cardiovascular inclou la branca efectora composta per les fibres post ganglionars simpàtiques o parasimpàtiques, el nucli regulador del sistema cardiovascular situat en el sistema nerviós central, i la innervació aferent primària (neurones sensibles). Per una banda, aquestes neurones aferents, alliberen peptid vasodilatadors, com la substància P o el peptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP). Per altre banda, són sensibles a la capsaicina, un agonista del receptor vanilloid, que induïx l'alliberament de CGRP de

les neurones sensibles primàries, donant lloc a l'esgotament de cGRP en aquests nervis. De fet, s'ha descrit que l'estimulació dels nervis peri-vasculars de l'arteria mesentèrica en rata dona lloc a una vasodilatació d'origen neuronal la qual s'aboleix amb un pre-tractament amb capsaicina o amb un antagonista del receptor de CGRP (CGRP8-37) (78). Així, l'alliberament de CGRP, produeix una vasodilatació de l'artèria mesentèrica de rata. A més, hi ha estudis que suggereixen que els nervis CGRPèrgics inhibeixen la vasoconstricció adrenèrgica mitjançant l'alliberament de CGRP. Finalment, diversos treballs han demostrat que aquests vasodilatadors que s'alliberen de les terminals aferents dels nervis sensitius a la capsaicina, podrien jugar un paper important en promoure la vasodilatació esplàncnica en la hipertensió portal, ja que s'han trobat nivells elevats tant de substància P com de CGRP, en pacients amb cirrosi i insuficiència hepàtica (79, 80).

## 2.6 MODELS ANIMALS EN LA HIPERTENSIÓ PORTAL

La majoria del coneixement adquirit de la fisiopatologia de la hipertensió portal en les últimes dècades, s'ha extret dels models animals experimentals. La hipertensió portal no és només conseqüència d'un augment de la resistència al flux sanguini portal, sinó també d'un augment del mateix flux portal. Aquest concepte, que actualment és una evidència, no va ser establert fins al desenvolupament d'un model animal, que reproduïa fidelment les alteracions hemodinàmiques de la hipertensió portal. Els models experimentals disponibles difereixen en el curs i en la severitat de la hipertensió portal, així com en la insuficiència i la lesió hepàtica.

En un treball pioner realitzat per Chojkier and Grozsmann (81, 82) es va establir el model en rata per excel·lència de la hipertensió portal, el model de lligadura calibrada de la vena porta (PVL). Aquest model pre-hepàtic, consisteix en una lligadura al voltant d'una agulla de punta roma (20G) estirada sobre la vena porta. La subseqüent retirada de l'agulla condueix a una estenosis calibrada de la vena porta. El model de PVL reproduïx totes les alteracions hemodinàmiques que caracteritzen el síndrome circulatori hiperdinàmic que presenten els pacients amb hipertensió portal: augment de la pressió portal amb augment del flux portal, aparició de shunts porto-sistèmics, vasodilatació esplàncnica amb augment del flux esplàncnic, hipotensió arterial i augment de l'índex cardíac. De fet, al cap d'una setmana, els animals ja tenen establert de forma completa el síndrome circulatori hiperdinàmic i el percentatge dels shunts porto-sistèmics (quantitat de flux sanguini portal derivat a les col·laterals porto-sistèmiques) són propers al 100%. Tot i així, la principal limitació d'aquest model és que la hipertensió portal es desenvolupa de forma aguda. De fet, el grau màxim d'hipertensió portal s'assoleix a les 24 hores post-lligadura, i posteriorment decau gradualment a causa del desenvolupament de les col·laterals porto-sistèmiques. També a

les 24 hores, es detecta una vasoconstricció mesentèrica reflex, amb un subseqüent augment de la resistència esplàncnica. Aquests fets, contrasten clarament amb les manifestacions clíniques de la hipertensió portal. Un altre limitació del model és que no s'acompanya d'insuficiència hepàtica.

Per altre banda, també s'utilitzen models d'hipertensió portal intra-hepàtics sinusoidals, com el model de lligadura del conducte biliar (BDL) i el model de cirrosi per inducció de tetraclorur de carboni ( $\text{CCl}_4$ ) o per tioacetamida (83-85). El model BDL, és un model de cirrosi biliar secundària especialment apropiat per la rata, ja que aquesta espècie no posseeix vesícula biliar. La cirurgia consisteix en lligar i seccionar una porció de colèdoc. Aquest model desenvolupa cirrosi-fibrosi biliar entre les 4 i les 6 setmanes. A les 4 setmanes, l'animal ja presenta les manifestacions típiques del síndrome hiperdinàmic i un shunt porto-sistèmic del 30-50%. Aproximadament, un 60% d'aquests animals tenen ascites. Aquest model presenta algunes limitacions, com és el cas de l'alta mortalitat producte de l'agressivitat del seu curs. A més, els canvis de l'arquitectura hepàtica típica de la cirrosi són rarament observables, ja que la hipertensió portal és deguda a una congestió pre-sinudoidal mecànica. Un altre inconvenient d'aquest model es la formació d'un gran quiste biliar, que pot resultar en una compressió a la vena porta i un subseqüent augment de la pressió portal. Tot i així, aquest és l'únic model experimental en rata que reproduïx el síndrome hepatopulmonar (86). Per altre banda, l'administració de  $\text{CCl}_4$ , causa una lesió hepàtica amb la producció del radical  $\text{CCl}_3$ , via el citocrom P450. S'afegeix fenobarbital a l'aigua de beguda per tal d'agilitzar el metabolisme de  $\text{CCl}_4$  i la subseqüent síntesi de  $\text{CCl}_3$ . Les rutes d'administració d'aquest hepatotòxic són la inhalació, la via orogàstrica (gavage) o la via intraperitoneal. Entre 12 i 16 setmanes després de l'administració del  $\text{CCl}_4$ , les rates desenvolupen cirrosi micronodular, hipertensió portal, shunt porto-sistèmic (30 al 60%) i les manifestacions del síndrome circulatori hiperdinàmic. Si l'administració es manté entre 12 i 20 setmanes, la majoria dels animals desenvolupen ascites. La diferent susceptibilitat dels animals front al  $\text{CCl}_4$  és la principal limitació d'aquest model, ja que dona lloc a una diferència individual tant en la severitat de la cirrosi com en el temps en què es cursa el model (87). La tioacetamida afecta les àrees perivenulars i periportals. Aquesta toxina pot ser administrada en l'aigua de beguda o per una injecció peritoneal. Aquest model desenvolupa cirrosi macronodular en 12 setmanes. Tot i així, per establir el síndrome hiperdinàmic, es requereixen períodes més llargs d'administració (88).

### **3. ESTUDI 1:** **INHIBICIÓ SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL**

### 3.1 HIPÒTESI I OBJECTIUS

#### Hipòtesi:

L'òxid nítric no és l'únic responsable de les alteracions vasculars derivades de la hipertensió portal, sinó que han d'existir altres factors, els quals podrien modificar la seva expressió al llarg de la instauració del síndrome circulatori hiperdinàmic associat a aquesta fisiopatologia.

#### Objectius:

1. Determinar quines són les alteracions de l'expressió gènica que tenen lloc en l'arteria mesentèrica superior durant el desenvolupament del model d'hipertensió portal experimental en rata.
2. Descobrir quins mecanismes contribueixen al desenvolupament del trastorn arterial mesentèric des dels estadis més inicials fins a la instauració de la hipertensió portal experimental.
3. Corroborar el mecanisme proposat en un model d'hipertensió portal intra-hepàtic, com el de cirrosi per administració de tetraclorur de carboni.

### 3.2 RESUM

La vasodilatació arterial, regulada en part per l'òxid nítric (NO), col·labora en gran mesura en la fisiopatologia de l'alteració vascular del síndrome hiperdinàmic de la hipertensió portal en pacients amb cirrosi hepàtica. Tot i així, existeixen nombroses llacunes en els mecanismes de la producció d'òxid nítric, en el paper d'altres mediadors, en la importància de les alteracions vasculars en la microcirculació intestinal i finalment en la seqüència temporal de fenòmens biològics. Aquestes alteracions no són exclusives d'una activació del NO i per tant han de ser multifactorials i canviants al llarg del temps.

La hipòtesi d'aquest primer estudi es construeix en base a dues premisses: 1) el model crònic d'hipertensió portal experimental (14 dies post-ligadura calibrada de la vena porta) reproduïx totes les alteracions hemodinàmiques que trobem en els pacients amb hipertensió portal i 2) l'estudi d'expressió gènica diferencial per microarrays de DNA permet determinar un gran nombre de gens que es co-expressen en una patologia determinada. Així, la tecnologia de microarrays de DNA aplicada al model experimental en rata de la lligadura calibrada de la vena porta ens permet analitzar de forma conjunta la més que probable complexitat del procés que desencadena la vasodilatació arterial esplàncnica. L'objectiu que ens vam marcar en aquest primer estudi consisteix

en el descobriment d'alteracions d'expressió gènica implicades en el trastorn arterial esplàncnic, des de les fases més inicials fins la instauració de la hipertensió portal en un model experimental de lligadura parcial de la vena porta en rata.

Per tal d'assolir aquest propòsit, a 12 rates se'ls va practicar la lligadura calibrada de la vena porta (PVL) i a un altre grup de 12 rates, una operació fictícia (sham). A diferents punts en el temps: 1, 6, 24 hores i 3, 5 i 14 dies, després de realitzar la lligadura o cirurgia sham, es va extreure l'arteria mesentèrica superior (SMA) de cada animal. Les mostres seqüencials de RNA missatger obtingudes a diferents punts en el temps post-ligadura es van comparar amb mostres de rates sham amb el mateix esquema, utilitzant microarrays de DNA. L'anàlisi dels perfils d'expressió diferencial al llarg del temps, realitzat amb el programa maSigPro, va permetre la selecció de 418 gens amb perfils d'expressió ajustats a un model de regressió determinat (polinomi de 2n grau). Posteriorment, a aquests 418 gens, se'ls va aplicar els algorismes d'agrupament PAMSAM per tal de classificar-los en grups o clusters amb perfil d'expressió similar. Amb aquest agrupament, es van determinar principalment dos grans grups de gens (clusters) amb perfils de regulació similar. Per una banda, es va anomenar "cluster up", a un cluster que agrupava el 37% dels 418 gens, i que a la vegada es podia dividir en 4 subgrups (1-4), cadascun dels quals, malgrat diferències en l'expressió temporal, presentava una tendència a l'augment de l'expressió al llarg del model. Per altre banda, el "cluster down", que agrupava un 63% dels gens, presentava dos sub-grups (5 i 6). Els gens que englobava aquest darrer cluster es caracteritzaven per presentar una sobre-expressió a la primera hora post-ligadura, un descens de l'expressió al llarg del model i una infra-expressió accentuada als 14 dies (fase crònica). A més, l'anàlisi d'Ontologia de Gens (GO) va revelar que les categories funcionals associades als gens del "cluster down" (sub-grups 5 i 6) amb  $p < 0.01$ , corresponien a funcions del sistema nerviós, en particular amb la via de transmissió adrenèrgica (en 50% de les expressions). Arribats a aquest punt, es van seleccionar 67 gens amb funcions associades al sistema nerviós i amb una expressió als 14 dies post-ligadura de  $-2$  ( $\log_2$ ratio).

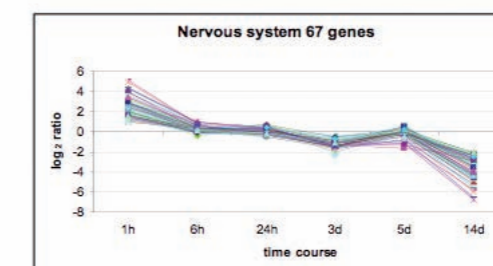


Figura 3. Perfil d'expressió de 67 gens al llarg del model PVL

Gens associats a funcions relacionades amb el sistema nerviós (cluster down) i amb valors d'expressió als 14 dies post-ligadura superior a  $-2$  ( $\log_2$ ratio).



La quantificació de 50 (dels 67) RNA missatgers per RT-PCR a temps real, en les mostres originals de rates PVL i sham, va validar els resultats dels microarrays en tots els casos. A més a més, es van confirmar els resultats, utilitzant un model de cirrosi (per inducció amb tetraclorur de carboni). En aquest cas, 42 dels 50 gens (84%) presentaven infra-expressió significativa en la SMA de rata cirròtica (n=6) respecte a les control (n=4). De la mateixa manera, aquests gens també es van quantificar en artèries hepàtiques de rates cirròtiques (n=4) i rates control (n=6). En aquestes artèries, pràcticament no es va determinar expressió dels gens quantificats en les rates cirròtiques i control, tampoc es va determinar expressió diferencial significativa entre aquests dos grups. Per altre banda, la translació d'aquesta infra-expressió gènica a nivell de proteïna es va comprovar en mostres de SMA i de jejú, utilitzant el model experimental de PVL i el de cirrosi. D'aquesta manera, es va determinar, per Western blot, la inhibició tant de les proteïnes responsables de la biosíntesi de noradrenalina, tirosina hidroxilasa (Th) i dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Dbh) com de la proteïna implicada en la excitació del mateix neurotransmissor, Snap 25, en mostres de SMA i de jejú en rates PVL i cirròtiques comparades amb les control. Així, la inhibició de Th va resultar de 65 i 71%, la de Dbh de 55 i 66% i la de Snap 25, de 60 i 55%, en rates PVL i cirròtiques, respectivament. Finalment, per immunohistoquímica, també es va detectar una inhibició de l'expressió de Th i de noradrenalina en els paquets nerviosos peri-SMA de rates PVL comparats amb les control.

En conclusió, la inhibició de la producció de RNA missatgers com de proteïnes, implicades amb la regulació de la neurotransmissió adrenèrgica, suggereix un trastorn del sistema simpàtic en l'arteria mesentèrica de rates amb hipertensió portal. Aquesta alteració observada en els nervis peri-vasculars autonòmics de l'arteria mesentèrica i no en l'arteria hepàtica de rates amb hipertensió portal, indica que la inhibició de la regulació adrenèrgica representaria una conseqüència local de la hipertensió portal i podria contribuir al desenvolupament de la vasodilatació esplàncnica associada a aquesta fisiopatologia.

### 3.3 MANUSCRIT ORIGINAL



Journal of Hepatology 49 (2008) 43–51

Journal of  
Hepatology

www.elsevier.com/locate/jhep

## Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension<sup>☆</sup>

Mar Coll<sup>1</sup>, Joan Genescà<sup>1,\*</sup>, Imma Raurell<sup>1</sup>, Aina Rodríguez-Vilarrupla<sup>2</sup>,  
Marc Mejías<sup>2</sup>, Teresa Otero<sup>1</sup>, Marc Oria<sup>1</sup>, Rafael Esteban<sup>1</sup>,  
Jaime Guardia<sup>1</sup>, Jaime Bosch<sup>2</sup>, María Martell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Liver Diseases Laboratory, Liver Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg. Vall d'Hebron 119-127, 08035 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, IMDIM, Hospital Clínic, Ciberehd and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Background/Aims:** Splanchnic vasodilation initiates the hyperdynamic syndrome in portal hypertension. We aimed to explore molecular mechanisms involved in the development of mesenteric vasodilation in portal hypertension.

**Methods:** Superior mesenteric artery (SMA) samples from portal vein ligated (PVL) and sham rats were compared in a time course experiment using DNA microarrays. Selected genes were quantified by qRT-PCR in PVL and cirrhotic rats. Immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (Th) and norepinephrine was assessed in SMA sections of PVL and sham rats. Western blot analysis of Th, dopamine  $\beta$ -hydroxylase (Dbh) and synaptosome-associated protein (Snap-25) was performed in SMA and jejunum samples from the animal models.

**Results:** Fifty differentially expressed genes implicated in neurotransmission, especially adrenergic, were detected in SMA samples from PVL rats. Sequential analysis showed a profound down-regulation at 14 days in PVL rats. These down-regulated genes were confirmed by RT-PCR in SMA from PVL and cirrhotic rats. Th and NE detection by immunohistochemistry was reduced in PVL compared to sham. Th, Dbh and Snap-25 expression was lower in SMA from 14-day PVL and cirrhotic rats compared to sham and control rats, respectively.

**Conclusions:** Genetic down-regulation of genes related to the adrenergic system might have a role in splanchnic vasodilation of portal hypertension.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Portal hypertension; Superior mesenteric artery; Portal vein ligation; Liver cirrhosis; Adrenergic system; Norepinephrine

Received 25 October 2007; received in revised form 29 February 2008; accepted 25 March 2008; available online 18 April 2008

Associate Editor: C. Merkel

\* The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding from industries or conflict of interest with respect to this manuscript.

Corresponding author. Tel.: +34 932746140; fax: +34 932746068.

E-mail address: jgenesca@vhebron.net (J. Genescà).

**Abbreviations:** SMA, superior mesenteric artery; PVL, portal vein ligation; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; NO, nitric oxide; RQ, relative quantification; Th, tyrosine hydroxylase; Dbh, dopamine beta hydroxylase; Snap-25, synaptosome-associated protein of 25 kDa; NE, norepinephrine; nNOS, neuronal nitric oxide synthase.

#### 1. Introduction

The hyperdynamic circulatory state of portal hypertension is characterized by splanchnic and peripheral vasodilation, increased plasma volume, and increased cardiac output [1]. Splanchnic vasodilation seems to be the initial hemodynamic event that follows an increased portal pressure and triggers the subsequent hemodynamic changes that define the hyperdynamic syndrome. An increased production or activation of vasodilatory mediators and systems is probably responsible for this

splanchnic vasodilation; nitric oxide (NO) has been the main vasodilator that was implicated [2].

The partial portal vein ligation (PVL) model has been an essential tool for research in portal hypertension, reproducing all systemic and hemodynamic abnormalities detected in the circulatory hyperdynamic state [3]. Its highly predictable chronobiology has permitted to elucidate the sequence of events leading to this alteration, providing a unique opportunity to sequentially evaluate molecular mechanisms involved in the generation of the hyperdynamic syndrome.

The present study was designed to combine the predictability of the PVL model with the high throughput of DNA microarray analysis in order to explore new mechanisms involved in the temporal development of splanchnic (mesenteric) vasodilation during portal hypertension. For this purpose, we compared mRNA expressions from mesenteric artery specimens from PVL and sham rats obtained at different time points after PVL, beginning at 1 h after ligation and ending at 14 days. The findings were confirmed in specimens from rats with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced cirrhosis.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animal models

#### 2.1.1. Partial PVL and sham operation

Twenty-four male Sprague Dawley rats (Harlan, Barcelona, Spain) weighing 275–325 g were used. A partial PVL was carried out in 12 rats as previously described [3]. In the 12 sham-operated rats, no ligation was placed. Superior mesenteric artery (SMA) samples were sequentially obtained from 2 rats from the PVL and sham groups at 1, 6, and 24 h, and 3, 5 and 14 days after PVL or sham procedure. Portal pressure was measured in the 14-day PVL rats before obtaining SMA samples (mean of 13 mm Hg in PVL and 6 mm Hg in sham). SMA samples were harvested at a length of 1.5 cm beginning at the aortic origin; a 3 cm portion of jejunum was also obtained. All tissues were immediately kept in RNA lysis solution (Ambion, Inc., Austin, TX) and then at –80 °C.

#### 2.1.2. Cirrhosis induction

Cirrhosis was induced in 6 male Sprague Dawley rats (initial weight 100–120 g) by oral administration of CCl<sub>4</sub>, as previously described [4]. Rats received 1.5 mmol/L of phenobarbital in drinking water (*ad libitum*) and 20 µL/kg/week of CCl<sub>4</sub> in water by gavage. Four control rats received only phenobarbital. SMA and hepatic artery samples, along with jejunum were harvested in cirrhotic rats, when ascites was present, and in control rats. The experiments were approved by the Animal Care Committee of the hospital and conducted in the animal facilities of the Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron and the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

### 2.2. Microarray analysis

#### 2.2.1. Total RNA extraction, amplification and labeling

Artery samples were homogenized in a FastPrep (Qiagen, Montreal, Canada) and total RNA was immediately isolated using RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). High quality RNAs (0.5 µg) were amplified by *in vitro* transcription using Amino Allyl MessageAmp aRNA amplification kit (Ambion). Five micrograms of all amplified aRNA samples (PVLs, shams) was labeled with both fluorescent Cy5 and Cy3.

#### 2.2.2. Microarray processing

Rat oligo microarrays containing 20,000 unique genes (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were used to generate gene expression profiles during the time course of the PVL model. Each PVL sample was paired with its corresponding sham sample using a dye-swap experiment design (6 time points × 2 dye swap). A total of 750 ng of each labeled aRNAs were mixed and fragmented for hybridization to microarrays using Agilent *in situ* hybridization kit plus. Microarrays were scanned using the GenePix 4100A Array Scanner (Axon Instruments Inc.) and data extracted from images with GenePix Pro 5.0.

#### 2.2.3. Data analysis

Microarray data were analyzed using the Bioconductor Limma package (<http://www.bioconductor.org/>). Normalization was performed within each array using the Lowess method [5] and then, a filtering step was performed to select only genes with mean values exceeding a threshold of 2-fold, at least in one time point.

A time course analysis using the maSigPro program [6] was carried out to select genes in which at least 4 points could be fitted into a polynomial regression model of degree 2 with a  $p < 0.05$  and a high regression coefficient ( $R^2 > 0.6$ ). This program analyzes “cross-sectional” time course experiments, in which time series of data are values from different time points that have not been obtained from the same individuals. Cluster analysis of selected genes was done using PAMSAM algorithms [5] in order to find potentially co-regulated genes. The Gene Ontology (GO) database was used to find annotations of gene function (<http://www.geneontology.org/>) and an enrichment analysis determined whether a particular GO was statistically over or under-represented (Bioconductor *GOstats* package) [5].

### 2.3. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis

Quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR) was carried out for the quantification of selected genes and endogenous control (ribosomal 18S) using 300 ng of total RNA from SMA samples from PVL and sham rats, and from SMA and hepatic artery samples from cirrhotic and control rats. Taqman gene expression assays in a custom designed microfluidic card format containing 50 genes and endogenous control in triplicates (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used to validate microarray data. The amount of target gene, normalized to ribosomal 18S ( $\Delta C_t$ ) and relative to a calibrator, was defined as Relative Quantitation (RQ). Student's *t* test comparisons (SigmaStat 3.0) were performed to compare individual  $\Delta C_t$  values from SMA samples from cirrhotic and control rats, considering significance at  $p < 0.05$ .

### 2.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemical detection of tyrosine hydroxylase (Th) and norepinephrine (NE) was carried out on paraffin-embedded and frozen OCT sections of SMA tissue, respectively. Nonspecific antibody binding was prevented by incubation with 1:20 dilution of goat serum. Sections were then incubated with primary antibodies against Th (diluted 1:250) and NE (diluted 1:500) (Abcam, Cambridge, UK) at 4 °C, overnight. Bound antibodies were incubated with EnVISION-HRP anti-rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) and visualized with the VIP substrate kit (Vector, Burlingame, CA, USA) that produces a purple precipitate. For the negative control, PBS was used instead of the primary antibody.

Quantitative analysis of stained areas for both antibodies in PVL and sham SMA samples was carried out with AnalySIS 3.1 program on 200× images captured with an optical microscope Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany).

### 2.5. Western blot analysis

SMA and jejunum samples from 14-day PVL ( $n = 3$ ) and sham ( $n = 3$ ) rats, and cirrhotic ( $n = 3$ ) and control ( $n = 3$ ) rats were analyzed by Western blot. Tissue samples were homogenized in 250 µl RIPA buffer and 15 µl of a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO, USA). Protein quantification in the supernatants was performed by BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein extracts (6–15 µg, depending on the analyzed protein) were separated on a 4–12% SDS-PAGE, blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and incubated with antibodies against tyrosine hydroxylase (Th), dopamine β-hydroxylase (Dhh) (Abcam, Cambridge, UK) and synaptosome-associated protein of 25 kDa (Snap-25) (Chemicon, Temecula, CA, USA). Bands were quantified by the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 2.6. Study design

The design of the present study consisted of the following steps: (1) microarray analysis in PVL rats was aimed at finding groups of regulated genes in SMA during the process of development of portal hypertension; (2) once a group of differentially expressed genes was identified, they were confirmed by qRT-PCR of mRNA in the same samples of PVL and sham rats used for the microarray analysis; because the main finding was a down-regulated group of genes in 14-day PVL rats (fully established hemodynamic circulatory syndrome), SMA samples from cirrhotic and control rats were also analyzed by qRT-PCR; (3) qRT-PCR analysis of hepatic artery samples from cirrhotic rats was used to show that the regulated genes were specific of SMA; (4) immunohistochemistry of SMA samples was carried out to identify adrenergic components in SMA; and (5) Western blot analysis was performed to show protein expression of three of the regulated genes both in SMA and in jejunum samples from both animal models: PVL and cirrhotic rats.

## 3. Results

### 3.1. Microarray gene expression analysis

Data pre-processing and filtering identified 1,059 differentially expressed genes, that is, genes over or under-represented 2-fold ( $\log_2$  ratio = 1), at least in one time point of the PVL model. In the subsequent step, a total of 418 genes showing significant profile differences during the time course experiment were selected by the maSigPro program.

Selected genes were clustered in order to find groups with similar regulatory patterns. The heat map of the gene expression clusters of the 418 differentially expressed genes is shown in Fig. 1A. PAMSAM algorithms grouped the genes into 2 main clusters: one up-regulated cluster and one down-regulated cluster throughout the time course, distributed in 6 sub-clusters according to their behavior (Fig. 1B).

To check if groups of genes in a cluster were functionally related, an enrichment analysis with the Gene Ontology was performed by investigating whether the GO categories in each cluster were over or under-represented compared to the categories represented in the array. Enriched categories with  $p$  values  $< 0.01$  in the up-regulated clusters were cell cycle, cell division, cell proliferation, cell growth and tissue regeneration (data not shown). Interestingly, all enriched categories with  $p < 0.01$  in the down-regulated clusters were related to neurotransmission and neuron differentiation (Table 1). Fig. 2 shows the gene expression profile of the 67 genes from the down-regulated clusters in which GO

annotations were related to nervous system functions and expression values at the end of the PVL model (14 days) exceeded a value of  $\log_2$  ratio = –2.

### 3.2. Quantitative real-time PCR

Fifty of the 67 down-regulated genes with associated nervous system functions were validated by qRT-PCR. Total RNA from the SMA PVL and sham samples used in the microarrays was compared, using the control samples as calibrators to obtain a RQ value for each gene. The resulting RQ values confirmed microarray results in all the cases (Fig. 3). In addition, we verified the results in SMA and hepatic artery samples from 6 cirrhotic and 4 control rats. qRT-PCR results for the 50 down-regulated genes comparing SMA samples from cirrhotic and control rats are shown in Table 2. All genes were under-expressed in the cirrhotic SMA, 42 of them showing significant differences with control SMA ( $p < 0.05$ ). Approximately, 50% of these genes were involved in adrenergic transmission, even specifically in some cases (Table 2). Hepatic artery samples from cirrhotic and control rats presented very low or null expression of the selected genes.

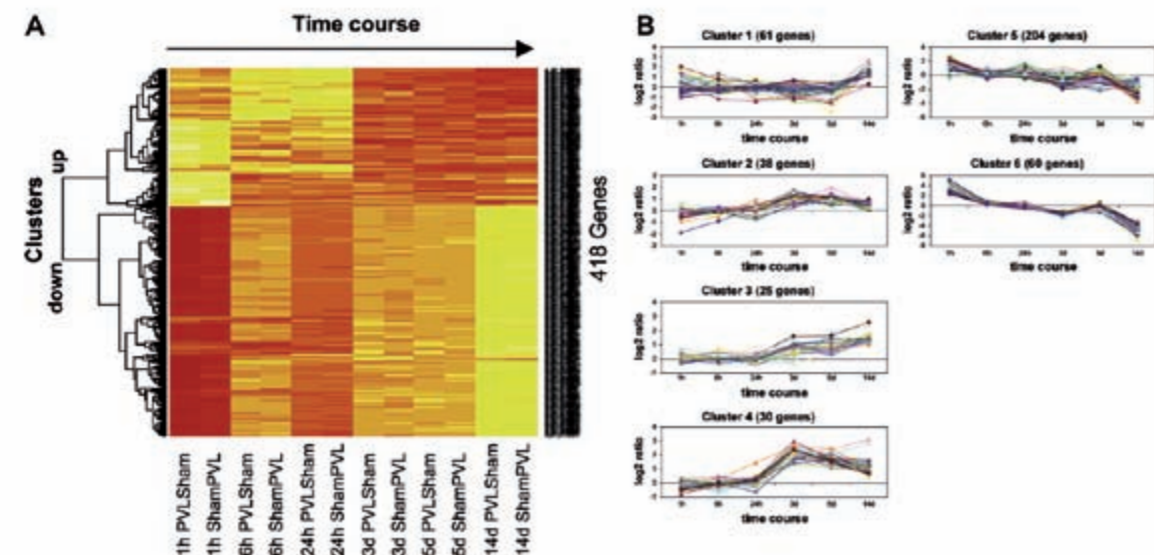
### 3.3. Nervous tissue identification and immunohistochemistry in SMA sections

Immunostaining of SMA sections from both PVL and sham rats showed the presence of nervous fibers running along the outer part of the arterial wall. Positive staining with both Th and NE (Fig. 4) demonstrates the adrenergic nature of this innervation. The quantitation of total immunostaining intensity in all nervous structures observed, revealed a more than 50% reduction in both Th and NE in PVL in comparison with sham samples (Fig. 4).

### 3.4. Th, Dhh and Snap-25 Western blot analysis

To verify the observed down-regulation at the protein level, three protein products of our down-regulated genes (Table 2), Th, Dhh and Snap-25, were quantified in SMA and jejunum samples from 14-day PVL and sham rats, and cirrhotic and control rats. While Th is the rate limiting enzyme of the norepinephrine synthesis, Dhh is the more specific enzyme for adrenergic neurons and Snap-25 is essential for releasing neurotransmitters from neurons. As shown in Fig. 5, band intensity of the three proteins is lower in SMA samples from PVL and cirrhotic rats with respect to sham and control rats. Th decrease was 65% and 71%, Dhh decrease was 55% and 66%, and Snap-25 decrease was 60% and 55% in PVL and cirrhotic rats, respectively. Jejunum samples from PVL and cirrhotic rats compared to sham and control rats also showed a decrease (greater than 50%) in Dhh and Snap-25 (data not shown).

46 M. Coll et al. / Journal of Hepatology 49 (2008) 43–51



**Fig. 1.** Clustering analysis of the 418 genes with significant profile differences. (A) Heat map representation of gene expression profiles. Each line across the map represents a single gene with up-regulation indicated in increasing red and down-regulation indicated in increasing yellow. Each column represents an individual array across the time course (from 1 h to 14 days). (B) Expression profiles for the genes in the corresponding 6 sub-clusters: 1, 2, 3 and 4 were named “up-regulated clusters” because despite moderate differences in their expression profiles, their general trend was a continuous increase in gene expression during the time. They contained 61, 38, 25 and 30 genes, respectively, representing 37% of the 418 genes. In contrast, clusters 5 and 6 were named “down-regulated clusters” because they showed a profile characterized by over-expression at 1 h, followed by a drop in expression during time and finally, an important under-expression at 14 days. Clusters 5 and 6 contained 204 and 60 genes, respectively, representing 63% of the 418 genes.

#### 4. Discussion

The most important finding of the current study is the demonstration that a group of genes implicated in neuronal functions, particularly in neurotransmission, is significantly co-regulated in SMA during the process

of development of the hemodynamic alterations of portal hypertension in the PVL model. Three important aspects of this genetic regulation are remarkable: The first is that an important percentage of these genes (40%) are implicated in monoamine and monoamine receptor synthesis, transport and exocytosis/release, that

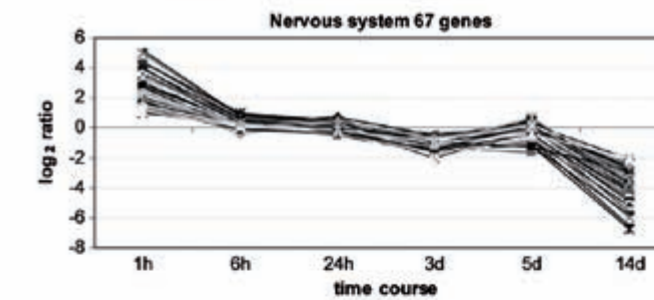
**Table 1**  
Gene ontology categories significantly associated ( $p < 0.01$ ) to down-regulated gene clusters compared to the whole array genes

GO ID	GO term	Down-regulated genes	Array genes	p Value
<i>Gene ontology: biological process</i>				
GO:0007268	Synaptic transmission	13	243	<0.001
GO:0007399	Neurogenesis	18	432	<0.001
GO:0019226	Transmission of nerve impulse	13	259	<0.001
GO:0006836	Neurotransmitter transport	5	42	0.001
GO:0045055	Regulated secretory pathway	5	49	0.001
GO:0030182	Neuron differentiation	5	50	0.002
GO:0045104	Intermediate filament cytoskeleton	2	4	0.002
GO:0048489	Synaptic vesicle transport	4	34	0.003
GO:0046903	Secretion	10	204	0.003
GO:0007611	Learning and/or memory	4	35	0.003
GO:0050877	Neurophysiological process	16	463	0.006
GO:0045045	Secretory pathway	8	158	0.006
GO:0006887	Exocytosis	5	69	0.007
GO:0045103	Intermediate filament-based process	2	8	0.008
GO:0001505	Regulation of neurotransmitter levels	5	74	0.009
GO:0007269	Neurotransmitter secretion	4	48	0.009

GO ID: identification number of a gene ontology term; regulated genes: differentially expressed genes associated to a given GO term; array genes: genes associated to that GO term present in the whole array.

M. Coll et al. / Journal of Hepatology 49 (2008) 43–51

47



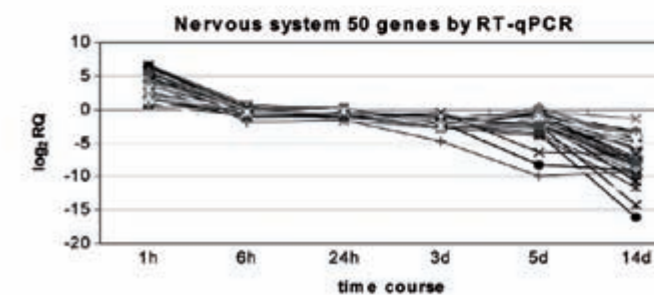
**Fig. 2.** Nervous system genes. Gene expression profile of 67 genes from the down-regulated clusters (37 from cluster 5 and 30 from cluster 6) related to biological processes associated to nervous system functions and expression values at the end of the PVL model (14 days) exceeding a value of  $\log_2$  ratio = -2. Their expression profiles followed the same pattern, but genes from cluster 6 exhibited more extreme values for both up-regulation at 1 h post-ligation and down-regulation at 14 days (mean  $\log_2$  ratio = 3.32 and -4.65, respectively).

is adrenergic or sympathetic neurotransmission. Second, the pattern of regulation of this group of genes is highly homogeneous: up-regulation at 1 h after ligation, return to baseline from 6 to 24 h post-ligation, and marked down-regulation at 14 days post-ligation. Finally, the findings in PVL rats were confirmed in rats with portal hypertension due to  $\text{CCl}_4$ -induced cirrhosis, demonstrating that the same group of genes involved in adrenergic neurotransmission is markedly down-regulated in cirrhosis.

The observation that many of the regulated genes are implicated in monoamine (norepinephrine) synthesis, transport and exocytosis/release suggests that the sympathetic nervous system is altered in these animals with portal hypertension. This is supported by the finding of sympathetic nerves running along the outer part of the arterial wall, as demonstrated by immunohistochemistry with tyrosine hydroxylase in the SMA samples obtained. Our data also indicate that compared to control (sham) rats, tyrosine hydroxylase expression is greatly reduced in these SMA nerves in portal hypertensive animals, indicating a possible dysfunction of the sympathetic nervous system.

An important question refers to the pathophysiological role of the observed gene regulation in the hemodynamic disturbances of portal hypertension. Several facts

suggest that the detected down-regulation of adrenergic transmission-related genes may contribute to the hemodynamic alterations of portal hypertension, rather than being a consequence of splanchnic vasodilation. Assuming that gene up or down-regulation translates into activation/inhibition of adrenergic neurotransmission in the mesenteric bed, it is possible that the initial up-regulation 1 h after partial portal vein ligation, may be responsible for the mesenteric vasoconstriction observed early (10–24 h) after PVL in the rat [7–9]. This “reflex” mesenteric vasoconstriction has been implicated in the initial activation of endothelial NO synthase in the PVL model [9]. Proteins synthesized in the neuronal soma are carried by axonal transport systems and take hours to reach the synaptic areas [10], explaining the delay between mRNA activation and vascular effects. After this initial up-regulation, mRNA expressions tend to return to baseline at 6 h, with little oscillations until day 5 post-ligation. Two weeks after ligation, when hemodynamic changes are fully established, the same group of mRNAs is profoundly down-regulated. mRNA levels of tyrosine hydroxylase, dopa decarboxylase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase, limiting steps for the synthesis of dopamine and norepinephrine, are more than 50 times lower in 14-day PVL and cirrhotic rats compared to controls. This marked mRNA down-regulation is accompanied by



**Fig. 3.** Validation by quantitative RT-PCR. Gene expression profile of 50 down-regulated genes related to nervous system functions obtained by RT-qPCR in SMA PVL and sham samples confirming microarray results (RQ = relative quantitation).

**Table 2**  
Classification of 50 selected genes in functional groups

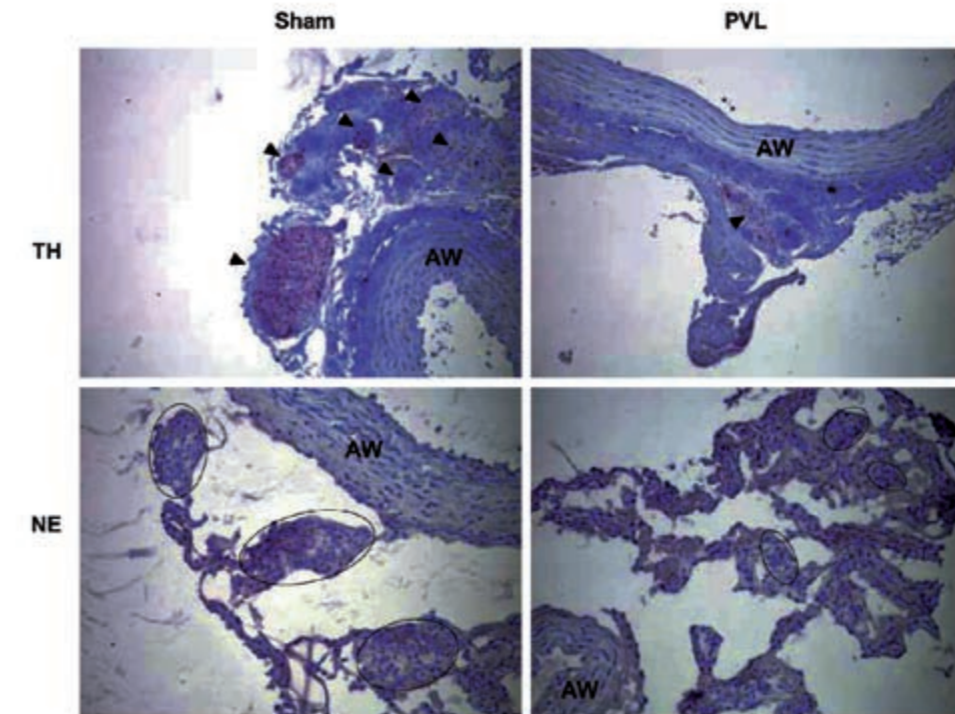
Gene name	Symbol	Function	Cirrhotic vs control	
			Log <sub>2</sub> RQ	p Value
Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	Chrna3	Nicotinic receptor	-3.36	0.05
Dopamine receptor 2*	Drd2	Dopamine receptor	-4.39	0.02
Purinergic receptor P2X**	P2rx2	ATP receptor	-3.32	0.045
Ret proto-oncogene	Ret	Heat-shock protein receptor	-1.09	ns
Tyrosine hydroxylase**	Th	Dopamine/noradrenaline synthesis	-4.05	0.013
Dopa decarboxylase**	Ddc	Dopamine/noradrenaline synthesis	-6.02	<0.001
Dopamine beta hydroxylase**	Dbh	Dopamine/noradrenaline synthesis	-5.90	0.026
Preproenkephalin**	Pnoc	Transport of dopamine	-2.72	ns
Neurotransmitter transporter, noradrenaline**	Net	Transport of noradrenaline	-3.54	0.021
Vesicular monoamine transporter**	Vmat2	Transport of monoamines	-2.55	0.047
Neurotransmitter: sodium transporter	Nnt173	Neutral aminoacid transporter	-2.86	0.033
Sodium-dependent dicarboxylate transporter	Nadc3	Transport of di- and tri-carboxylates	-0.35	ns
Synapsin II*	Syn2	Transport/release/exocytosis	-3.96	0.011
Synaptophysin*	Syp	Transport/release/exocytosis	-3.53	0.007
RAB3B, member RAS oncogene family**	Rab3b	Transport/release/exocytosis	-3.15	0.011
Ca <sup>2+</sup> -dependent secretion activator*	Cadps	Release/exocytosis (SNARE)	-2.37	0.049
Complexin 1*	Cplx1	Release/exocytosis (SNARE)	-2.68	0.031
Growth associated protein 43**	Gap43	Release/exocytosis	-2.34	0.014
Neurexin 1**	Nrxn1	Release/exocytosis	-2.96	0.039
Regulator of G-protein signaling 7**	Rgs7	Release/exocytosis	-2.60	0.016
Synaptosomal-associated protein 25*	Snap25	Release/exocytosis (SNARE)	-4.22	0.007
ZW10 interactor*	Zwint	Release/exocytosis (SNARE)	-1.71	0.046
Chromogranin B*	Chgb	Neuropeptide precursors	-4.07	0.008
Secretory granule neuroendocrine protein 1*	Sgne1	Neuropeptide precursors	-3.72	0.01
VGF nerve growth factor inducible	Vgf	Vesicle trafficking	-2.41	ns
Dynein, cytoplasmic, intermediate chain 1	Dncl1	Vesicle trafficking	-3.62	0.013
Brain acyl-CoA hydrolase	Bach	Vesicle trafficking	-1.25	ns
Amloride-sensitive cation channel 1, neuronal	Aecn1	Ion channel	-1.92	0.046
Potassium channel, subfamily K, member 2	Kcnk2	Ion channel	-1.75	<0.001
Potassium large conduct calcium-activated channel	Kcnmb4	Ion channel	-1.33	ns
Sodium channel, voltage-gated, type III, beta*	Scn3b	Ion channel	-2.88	0.012
FXRD domain-containing ion transport regulator 6	Fxyd6	Ion channel control	-1.66	0.011
Microtubule-associated protein tau	Mapt	Neuron cytoskeleton	-2.16	<0.001
Microtubule-associated protein 2	Mtap	Neuron cytoskeleton	-1.12	ns
Neurofilament 3, medium	Nef3	Neuron cytoskeleton	-3.05	0.034
Neurofilament, light polypeptide	Nfl	Neuron cytoskeleton	-3.71	0.022
Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	Ntrk1	Neuron cytoskeleton	-3.79	0.023
Peripherin 1	Prph1	Neuron cytoskeleton	-2.73	0.031
Statmin-like 2	Stmn2	Cytoskeletal regulation	-2.64	0.029
Aldolase C, fructose-biphosphate	Aldoc	Neurogenesis	-2.5	<0.001
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor	Serpini1	Neurite extension	-2.88	0.015
Matrix metalloproteinase 24	Mmp24	Neurogenesis	-3.80	0.024
Olfactomedin 1	Olfm1	Neurogenesis	-1.94	0.039
Plasticity related gene 1	Prg1	Axon growth/regenerative sprouting	-0.79	ns
Gamma-glutamyltransferase-like 3	Ggt3	Glutathione biosynthesis	-1.72	0.019
Metallothionein 3	Mt3	Growth inhibitory factor	-2.06	0.022
Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	Uchl1	Hydrolizes ubiquitin	-2.67	0.029
Neuroglobin	Ngb	O <sub>2</sub> transporter	-3.34	0.015
MIC2-like 1	Mic2l1	Respiratory (transmembrane)	-1.35	0.012
Sulfotransferase family 4A, member 1	Sult4a1	Neurotransmitter metabolism	-3.11	0.025

The associated log<sub>2</sub>RQ to each gene indicates the mean relative quantitation of its expression by qRT-PCR in the cirrhotic rat vs the control. RQ calculations were the result of comparing the average ΔC<sub>t</sub> from cirrhotic samples with the average ΔC<sub>t</sub> from controls (acting as calibrators). The p value indicates the significance of the comparison between the individual ΔC<sub>t</sub> values from 6 cirrhotic rats and 4 control rats. ns: statistically non-significant.

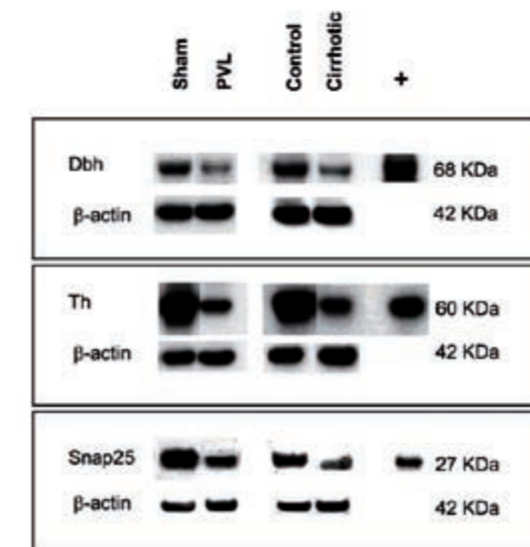
Th and Dbh were not present in the array; they were added to the qRT-PCR analysis.

\* Adrenergic transmission.

\*\* Adrenergic transmission specific.



**Fig. 4.** Immunohistological staining of TH and NE in SMA sections from sham and PVL samples. Areas from nervous tissue used for immunohistochemical quantification are indicated by arrowheads in Th and by circles in NE. A marked difference in these areas between sham and PVL sections is shown for both products. Note that tissue surrounding the arterial wall (AW) in NE staining has its structure altered after being frozen. Original magnification 20×.



**Fig. 5.** Western blot analysis. Representative Western Blot of proteins Th, Dbh and Snap25 in SMA samples from 14-day PVL and sham rats, and from cirrhotic and control rats. β-actin was used as an endogenous loading control and rat adrenal medulla as a positive control (+). Band intensities are lower in SMA samples from PVL and cirrhotic rats with respect to sham and control rats for all three proteins.

lower levels of various protein products implicated in catecholamine synthesis and neurotransmission, both in SMA and jejunum samples from rats with portal hypertension caused by PVL and cirrhosis induction. Thereby, it is plausible that such an inhibition of adrenergic neurotransmission in the SMA could contribute to mesenteric vasodilation characteristically observed in the PVL model, and in cirrhotic rats.

There is evidence that sympathetic nervous overactivity plays an important role in the cardiovascular, homeostatic and metabolic dysfunction present in advanced liver disease [11]. Stimulation of the sympathetic nervous system, presumably an adaptive response to arterial vasodilation, has been suggested by the finding of increased plasma levels of norepinephrine and adrenaline [11,12] and increased sympathetic nerve traffic, especially in muscles [13,14]. This may seem in conflict with our finding of an inhibition of adrenergic transmission at a mesenteric level. However, sympathetic hyperactivity has been shown to present a regional distribution; it is present in muscles and the upper limb, but absent in skin and the lower limb [14,15]. The inhibition of mesenteric adrenergic transmission could represent a local consequence to portal hypertension that will contribute to aggravate splanchnic vasodilation, which is responsible for a generalized sympathetic

overactivity, especially in muscles and kidneys. In this regard, the observations that alpha-adrenergic agonists, such as norepinephrine and midodrine, are effective for the treatment of hepatorenal syndrome [16,17], the ultimate consequence of arterial vasodilation in cirrhosis, suggests that, at least in some territories, the adrenergic activity rather than overactivated, might be suppressed. Finally, the recent observation that neuropeptide Y, a sympathetic neurotransmitter that facilitates norepinephrine-evoked vasoconstriction, restores adrenergic SMA hyporeactivity in PVL rats [18] would also point to a deficient local adrenergic tone in portal hypertension.

Splanchnic circulatory abnormalities in portal hypertension are multifactorial. NO undoubtedly plays a pivotal role in the development of splanchnic arterial vasodilation [2]. However, little attention has been paid to one of the major players in the regulation of vascular resistance: the autonomic efferent nerves. In fact, vascular tone is mainly regulated reciprocally by sympathetic vasoconstrictor and nitergic (parasympathetic) vasodilatory nerves [19,20]. Up-regulation of n(euronal)-NOS has been recently demonstrated in mesenteric arteries of PVL rats [21,22]. This nNOS activation seems to mediate an increased neural NO-mediated vasodilatation and might be an additional pathway for mesenteric smooth muscle relaxation in portal hypertension. The current findings suggest that, in addition, the mesenteric sympathetic vasoconstrictor tone might be inhibited. It is possible that both events in combination may contribute substantially to the splanchnic vasodilation of portal hypertension.

In summary, we have detected that a group of genes implicated in neurotransmission, especially in adrenergic transmission, is significantly regulated in mesenteric arteries of PVL and cirrhotic rats. The considerable down-regulation of these genes in cirrhotic rats and 2 weeks after ligation in PVL rats could partially contribute to chronic splanchnic vasodilation. In conclusion, we speculate that adrenergic transmission inhibition might be an important contributory factor to splanchnic vasodilation and its associated hemodynamic alterations in portal hypertension.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Josep Quer for his important contribution in different methodological aspects of this study and Dra. Cleofé Romagosa for valuable help in histological examination.

This work was supported in part by the Red Nacional de Investigación en Gastroenterología y Hepatología (C03/02) from the Instituto de Salud Carlos III and by Grant SAF2006-0314 from the Ministerio de Educación y Ciencia.

M.C. is a recipient of a fellowship grant from the Institut de Recerca Vall d'Hebron and is enrolled in

the postgraduate program of Universitat Autònoma of Barcelona.

#### References

- [1] Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121–S131.
- [2] Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478–491.
- [3] Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983;244:G52–G57.
- [4] Oria M, Raguier N, Chatauret N, Bartoli R, Odena G, Planas R, et al. Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2006;21:297–308.
- [5] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
- [6] Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talon M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* 2006;22:1096–1102.
- [7] Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1992;15:323–328.
- [8] Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985;248:G618–G625.
- [9] Tsai MH, Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 2003;125:1452–1461.
- [10] Hirokawa N, Takumaru R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:201–214.
- [11] Henriksen JH, Møller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol* 1998;29:328–341.
- [12] Nicholls KM, Shapiro MD, Van Patten VJ, Kluge R, Chung HM, Bichet DG, et al. Elevated plasma norepinephrine concentrations in decompensated cirrhosis. Association with increased secretion rates, normal clearance rates, and suppressibility by central blood volume expansion. *Circ Res* 1985;56:457–461.
- [13] Floras JS, Legault L, Morali GA, Hara K, Blendis LM. Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: direct evidence from intraneural recordings. *Ann Intern Med* 1991;114:373–380.
- [14] Pozzi M, Grassi G, Redaelli E, Dell'oro R, Ratti L, Redaelli A, et al. Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:1113–1118.
- [15] Henriksen JH, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Kidney, lower limb and whole-body uptake and release of catecholamines in alcoholic liver disease. *Clin Physiol* 1988;8:203–213.
- [16] Duvoux C, Zanditenas D, Hezode C, Chauvat A, Monin JL, Roudot-Thoraval F, et al. Effects of noradrenalin and albumin in patients with type I hepatorenal syndrome: a pilot study. *Hepatology* 2002;36:374–380.
- [17] Wong F, Pantea L, Sniderman K. Midodrine, octreotide, albumin, and TIPS in selected patients with cirrhosis and type I hepatorenal syndrome. *Hepatology* 2004;40:55–64.

- [18] Wiest R, Jurzik L, Herold T, Straub RH, Scholmerich J. Role of NPY for vasoregulation in the splanchnic circulation during portal hypertension. *Peptides* 2007;28:396–404.
- [19] Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003;55:271–324.
- [20] Gibbins IL, Jobling P, Morris JL. Functional organization of peripheral vasomotor pathways. *Acta Physiol Scand* 2003;177:237–245.

- [21] Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitric oxide vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005;43:258–265.
- [22] Kwon SY, Groszmann RJ, Iwakiri Y. Increased neuronal nitric oxide synthase interaction with soluble guanylate cyclase contributes to the splanchnic arterial vasodilation in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2007;37:58–67.

## **4. ESTUDI 2:** **ATRÒFIA SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL**

## 4.1 HIPÒTESI I OBJECTIUS

### Hipòtesi:

La infra-expressió dels RNA missatgers i proteïnes relacionades amb la neurotransmissió adrenèrgica observada en l'artèria mesentèrica de rates amb hipertensió portal s'acompanya d'un canvi estructural dels feixos nerviosos simpàtics que innerven la mateixa artèria.

### Objectius:

1. Localitzar en l'artèria mesentèrica superior, l'origen dels RNA missatgers relacionats amb la transmissió adrenèrgica i infra-expressats en rates amb hipertensió portal.
2. Determinar si la inhibició de la transmissió adrenèrgica observada en rates amb hipertensió portal s'acompanya de canvis estructurals dels feixos axonals simpàtics que innerven l'artèria mesentèrica superior d'aquests animals.
3. Comprovar que la inhibició de la transmissió simpàtica localitzada al tronc principal de l'artèria mesentèrica, també existeix en les artèries mesentèriques de resistència en rates amb hipertensió portal.
4. Corroborar la regressió simpàtica determinada en un altre model d'hipertensió portal intra-hepàtic, com el model de cirrosi biliar secundària per lligadura del colèdoc.
5. Confirmar que l'atròfia dels nervis post-ganglionars simpàtics associada a la hipertensió portal representa un fenomen localitzat a la vasculatura mesentèrica.

## 4.2 RESUM

El síndrome circulatori hiperdinàmic de la hipertensió portal en pacients amb cirrosi hepàtica contribueix de forma decisiva a moltes de les manifestacions clíniques de la malaltia. Aquesta alteració vascular es desencadena a causa d'una vasodilatació arteriolar sistèmica, especialment, en la circulació mesentèrica. Un excés en la producció d'òxid nítric es creu que és el principal mecanisme responsable d'aquesta vasodilatació arteriolar. Per altre banda, s'ha proposat que el sistema simpàtic podria participar en aquest procés. La hipertensió portal provoca una inhibició de la producció de RNA missatgers i proteïnes implicades en la neurotransmissió, fonamentalment adrenèrgica, en l'arteria mesentèrica superior (SMA) de rates amb lligadura de la vena porta (PVL) i rates amb cirrosi per tetraclorur de carboni (89). Aquesta inhibició del sistema adrenèrgic podria contribuir a la vasodilatació esplàncnica associada a la hipertensió portal.

En base als resultats obtinguts en el primer treball ens vam proposar els següents objectius: 1) localitzar l'origen dels RNAm dels gens relacionats amb la neurotransmissió adrenèrgica en mostres d'artèria mesentèrica superior, 2) determinar si la infra-expressió de la transmissió adrenèrgica no només juga un paper funcional sinó que també s'acompanya de canvis estructurals dels nervis simpàtics peri-SMA, i finalment 3) comprovar si també existeix inhibició de la transmissió simpàtica en mostres d'artèria mesentèrica de resistència de rates amb hipertensió portal.

Per tal de determinar la localització dels RNA missatgers dels gens relacionats amb la transmissió adrenèrgica es van realitzar dues aproximacions diferents. Per una banda, es va dividir la SMA de rates control (n=3) en dos parts iguals, secció proximal i distal a l'origen aòrtic, i es va realitzar RT PCR a temps real dels gens responsables de la síntesi de noradrenalina, tirosina hidroxilasa (Th) i dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Dbh), en les dues seccions. La quantificació relativa de l'expressió dels gens de la Th i la Dbh, va determinar la presència de transcrits d'aquests gens en ambdues seccions. Tot i així, la quantitat de RNAm dels dos enzims en la zona proximal era molt superior que en la distal (més de 500 vegades). Per altre banda, es va realitzar una hibridació in situ d'una sonda complementària a l'RNA missatger del gen de la Th marcada amb digoxigenina, en les mateixes seccions de SMA així com en el gangli simpàtic mesentèric. Aquesta tècnica, ens va permetre localitzar dels transcrits de Th tant en els somes neuronals que componen el gangli mesentèric com en l'interior dels feixos nerviosos peri-SMA de la secció proximal. Per contra, no es va detectar tinció positiva per Th en la secció distal de la SMA. En concordança amb la infra-expressió adrenèrgica descrita, no es va detectar l'RNA missatger de la Th en mostres proximals de SMA de rates PVL.

Per tal d'acomplir el segon objectiu i determinar possibles canvis estructurals en les fibres simpàtiques peri-SMA, es van comparar les imatges obtingudes de la immunohistoquímica de Th en seccions proximals de SMA de rates amb hipertensió portal per lligadura de la vena porta (PVL, n=7) i per lligadura del conducte biliar (BDL, n=6) amb les respectives control (n=7, n=7). L'anàlisi morfològic de les fibres simpàtiques de la SMA, va revelar que existia una disminució significativa tant del nombre total de les estructures nervioses (69%, PVL; 62% BDL), de l'àrea nerviosa total (70%, PVL; 52% BDL), així com de l'àrea nerviosa tenyida per Th (89%, PVL; 64% BDL) en rates amb hipertensió portal comparades amb les control. A més, es va detectar una correlació positiva entre la resistència mesentèrica i tots els paràmetres morfològics que descriuen els nervis post-ganglionars simpàtics.

Taula 1. Anàlisi dels paràmetres morfològics de les estructures nervioses peri-SMA

	Sham (n=7)	PVL (n=7)	p	Sham (n=7)	BDL (n=6)
nervous structures (units)	13 (6-33)	4 (3-15)	0.01	8 (5-20)	3 (3-5)
nervous structure area (10 <sup>3</sup> μm.)	941 (466-1621)	280 (75-1567)	0.03	71 (31-156)	34 (12-89)
Th staining area (10 <sup>3</sup> μm.)	132 (297-28)	15 (3-108)	0.02	28 (13-52)	10 (3-19)

PVL: model de lligadura calibrada de la vena porta; BDL, lligadura del conducte biliar; Th, tirosina hidroxilasa. Test estadístic: Mann Witney

Per tal d'avaluar la transmissió simpàtica en les artèries mesentèriques de resistència, es van quantificar, per Western Blot, 3 proteïnes adrenèrgiques rellevants en aquestes artèries en rates amb hipertensió portal i control. Es van determinar els nivells de Th i Dbh, així com de Snap 25, una proteïna clau per l'alliberament sinàptic de la noradrenalina. L'anàlisi de la intensitat de les bandes del immunoblot, va revelar una inhibició significativa de totes les proteïnes en les mostres d'artèries mesentèriques de resistència de rates amb hipertensió portal en el model PVL així com en BDL: Th (45%, PVL; 42% BDL), Dbh (57%, PVL; 48% BDL) i Snap25 (35%, PVL; 55% BDL).

Finalment, per tal de demostrar que la regressió simpàtica representa un efecte local de la vasculatura mesentèrica (tronc principal i ramificacions) de rates amb hipertensió portal, es va avaluar el sistema simpàtic de l'artèria renal en rates amb hipertensió portal. Amb aquesta finalitat, es va realitzar una quantificació del nivell de proteïnes adrenèrgiques així com un anàlisi morfològic dels nervis simpàtics que recobreixen l'artèria renal de rates PVL (n=5) i sham (n=5). No es van trobar diferències significatives en l'expressió de Th, Dbh o Snap 25 en mostres d'artèria renal esquerra de rates PVL i sham. En la mateixa línia, l'estudi morfològic dels nervis simpàtics de l'arteria renal dreta dels mateixos animals, tampoc va revelar diferències significatives per cap dels paràmetres analitzats.

Aquestes dades suggereixen per una banda, que les proteïnes implicades en la transmissió adrenèrgica es sintetitzen en el gangli mesentèric simpàtic, així com en la zona proximal dels paquets nerviosos de la SMA. Per altre banda, la hipertensió portal provoca una atrofia o regressió de la innervació simpàtica en la vasculatura arterial mesentèrica que podria contribuir en la vasodilatació esplàncnica associada a aquesta fisiopatologia. Finalment, aquesta atrofia simpàtica representa un efecte mesenteric local de la hipertensió portal.

## 3.3 MANUSCRIT ORIGINAL

Liver INTERNATIONAL  
OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER

Liver International ISSN 1478-3223

## BASIC STUDIES

## Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension

Mar Coll<sup>1</sup>, María Martell<sup>1</sup>, Imma Raurell<sup>1</sup>, Nahia Ezkurdia<sup>1</sup>, Sílvia Cuenca<sup>1</sup>, Javier Hernández-Losa<sup>2</sup>, Rafael Esteban<sup>1,3</sup>, Jaume Guardia<sup>1,3</sup>, Jaume Bosch<sup>3,4</sup> and Joan Genescà<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Liver Diseases Laboratory, Liver Unit, Department of Internal Medicine, Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, IMDIM, Hospital Clinic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Keywords

adrenergic neurotransmission portal hypertension sympathetic nerve atrophy

## Correspondence

María Martell, PhD, Liver Diseases Laboratory, Liver Unit, Department of Internal Medicine, Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-127, 08035 Barcelona, Spain  
Tel: +34 934894034  
Fax: +34 934894032  
e-mail: mmartell@ir.vhebron.net

Received 2 July 2009

Accepted 27 October 2009

DOI:10.1111/j.1478-3223.2009.02176.x

## Abstract

**Background and aims:** Portal hypertension is associated with downregulation of mRNA and proteins involved in adrenergic transmission in the superior mesenteric artery (SMA) in portal vein-ligated (PVL) and cirrhotic rats. We aimed to investigate whether SMA adrenergic dysfunction was accompanied by sympathetic nerve structural changes and whether it was extensive to resistance mesenteric arteries. We also attempted to localize the origin of mRNA of specific adrenergic genes. **Methods and results:** *In situ* hybridization showed tyrosine hydroxylase (Th) mRNA expression in neuronal bodies of superior mesenteric ganglia and inside axonal fibres surrounding proximal SMA sections. Comparison of SMA by Th immunohistochemistry, both in PVL and bile duct-ligated (BDL) rats, demonstrated a significant decrease in the number of nervous structures (69% PVL; 62% BDL), total nervous area (70% PVL; 52% BDL) and Th-stained nervous area (89% PVL; 64% BDL) compared with sham rats. A strong correlation was detected between the Th-stained nervous area and the haemodynamic parameters, mainly with SMA resistance ( $r = 0.9$ ,  $P < 0.001$  for PVL and  $r = 0.75$ ,  $P = 0.018$  for BDL). Western blot analysis of Th, dopamine  $\beta$ -hydroxylase and synaptosome-associated protein of 25kDa indicated a significant inhibition in protein expression (35–58%) in mesenteric resistance arteries from both portal hypertension models compared with sham. By contrast, nervous structure analysis and protein expression in renal arteries showed no differences between sham and PVL rats. **Conclusion:** Portal hypertension is associated with sympathetic nerve atrophy/regression in the mesenteric arterial vasculature that could contribute to the splanchnic vasodilation associated with portal hypertension.

Cirrhosis is characterized by portal hypertension that leads to systemic complications bearing a high morbidity and mortality. The hyperdynamic circulatory syndrome associated with decreased systemic and splanchnic vascular resistance, arterial hypotension and increased cardiac output is a common haemodynamic feature in patients with advanced cirrhosis and animal models of portal hypertension (1, 2). The initiating mechanism of these circulatory abnormalities is an arterial vasodilation, which is particularly prominent in the splanchnic circulation (3, 4).

Downregulation of a large number of genes related to neurotransmission, particularly to adrenergic neurotransmission, have been recently demonstrated in superior

mesenteric artery (SMA) samples from portal vein-ligated (PVL) rats and carbon tetrachloride-induced cirrhotic rats (5). mRNA downregulation was accompanied by reduced levels of proteins related to adrenergic transmission in SMA, including enzymes implicated in norepinephrine synthesis, suggesting that inhibition of mesenteric sympathetic transmission could represent an important contributory factor to splanchnic vasodilation in portal hypertension. This may seem in conflict with the generalized idea of sympathetic nervous overactivity playing an important role in the cardiovascular, homeostatic and metabolic dysfunction present in advanced liver disease (6). However, sympathetic hyperactivity has been shown to present a regional distribution (7, 8) and the



inhibition of mesenteric adrenergic transmission could represent a local consequence to portal hypertension.

The present study was designed to: (i) locate the mRNA of the specific adrenergic genes found to be downregulated in SMA samples from PVL rats; (ii) find out whether the adrenergic dysfunction was not only functional, but could be accompanied by structural changes (i.e. nerve atrophy or regression) in the sympathetic nerves surrounding the SMA; (iii) demonstrate that the same alterations observed in the main SMA were also occurring in the small mesenteric resistance arteries (MRA), which, in fact, are the main contributors to splanchnic arterial tone control.

## Material and methods

### Experimental models of portal hypertension

Prehepatic portal hypertension was induced by partial PVL as described previously (2). Briefly, animals were anaesthetized with inhaled isoflurane and the portal vein was freed from the surrounding tissue after a midline abdominal incision. A ligature (silk gut 3-0) was placed around a 20 G blunt-tipped needle lying along the portal vein. Subsequent removal of the needle yielded a calibrated stenosis of the portal vein.

Intrahepatic portal hypertension caused by secondary biliary cirrhosis was induced by common bile duct ligation (BDL) as described in Colombato *et al.* (9). Briefly, animals were anaesthetized with inhaled isoflurane and the common bile duct was occluded by double ligature with a 5-0 silk thread. The bile duct was then resected between the two ligatures. In sham-operated rats, the portal vein and common bile duct were isolated, but not ligated.

Haemodynamic studies and sample extraction were performed 14 and 28 days after portal ligation and common BDL respectively. Studies were performed in male Sprague-Dawley rats (Charles River, Barcelona, Spain) weighing 250–300 g. The experiments were approved by the Animal Care Committee of our hospital and were conducted in the animal facilities of the Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron.

### Sample extraction

Superior mesenteric artery samples harvested from the aortic origin to the initiation of ramifications (main trunk) were immediately kept in 4% formalin for approximately 20 h and changed to a 50% ethanol solution before paraffin treatment. Superior mesenteric ganglia (SMG) were dissected free of surrounding tissue, removed and placed in formalin. MRA samples were isolated, as described previously by Briones *et al.* (10). Briefly, the animal was first decapitated, the mesenteric arcade was removed and placed in a physiological salt solution (NaCl 11.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM and glucose 11.1 mM), maintaining the temperature at 4 °C. Third-, fourth- and fifth-order mesenteric branches

(MRA) were dissected free of fat and connective tissue, placed in liquid nitrogen and kept at –80 °C until processed. Renal artery samples were extracted from the aortic origin to the initiation of ramifications. Both the left and the right renal arteries were used and kept, respectively, at –80 °C or placed in 4% formalin.

### Haemodynamic measurements

Before haemodynamic measurements, animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg of body weight intraperitoneally) plus midazolam (5 mg/kg). One polyethylene PE-catheter (PE50) was introduced into the femoral artery and another into the ileocolic vein and both were connected to highly sensitive pressure transducers (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) for continuous measurement of mean arterial pressure (MAP, mmHg) and portal pressure (PP, mmHg). Also, through a midline abdominal incision, the SMA was isolated from connective tissue and a perivascular ultrasonic transit-time flowprobe (1 mm diameter, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) was placed around the artery to continuously measure the superior mesenteric artery blood flow (SMABF, ml/min 100 g). Superior mesenteric artery resistance (SMAR, mmHg/ml min 100 g) was calculated as (MAP – PP)/SMABF (11). Rectal temperature was maintained at 37 °C throughout this study.

### Quantitative real-time polymerase chain reaction

Superior mesenteric artery samples (main trunk) were divided into two equal sections: proximal and distal to the aortic origin. Total RNA was extracted from the two sections using the RNeasy fibrous tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using Taqman gene expression assays for tyrosine hydroxylase (Th) and dopamine β-hydroxylase (Dbh) genes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The amount of target gene was normalized to ribosomal 18S.

### In situ hybridization of tyrosine hydroxylase mRNA

#### Probe construction

Extraction of total RNA was carried out from rat adrenal gland using the RNeasy fibrous tissue kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with a Th-specific primer containing T7 RNA polymerase promoter (reverse ThT71480: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGTGCAGCTCATC-3') and MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). The subsequent cDNA was amplified by PCR using Th-specific primers (forward Th1255: 5'-CAGACACAGCAGCTGTGCAGCC-3' and the same reverse ThT71480) obtaining a 226 bp fragment. Copy RNA (cRNA) was directly synthesized from

the PCR fragment by *in vitro* transcription and simultaneously labelled with digoxigenin (DIG)-UTP using the DIG RNA labelling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Labelling efficiency was monitored by a spot test with a DIG-labelled RNA control.

### In situ hybridization

Hybridization was carried out on paraffin-embedded sections of SMA (proximal and distal portions) and SMG. Sections were incubated overnight at 55 °C with 500 ng of a single-strand DIG-labelled RNA probe specific for Th mRNA. Nonspecific antibody binding was prevented by incubation with 50% formamide in SSC 1 × solution. After stringency washes, the sections were subjected to immunological detection using antidigoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (Roche Diagnostics). Colorimetric detection was performed by an NBT/BCIP reaction overnight at 4 °C. Finally, a nuclear counterstaining was performed with either fast red or methyl green solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For the negative control an overnight incubation in the absence of a cRNA-labelled probe was carried out in parallel.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical detection of Th was carried out on paraffin-embedded sections of SMA (main trunk) and renal artery tissues. All transversal SMA and renal artery sections were performed at the same level, proximal to the aortic origin. Nonspecific antibody binding was prevented by incubation with a 1:20 dilution of goat serum. Sections were then incubated with primary antibody against Th (diluted 1:250) (Abcam, Cambridge, UK) at 4 °C, overnight. Bound antibody was incubated with EnVISION-HRP anti-rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) and visualized with the VIP substrate kit (Vector, Burlingame, CA, USA) that produces a purple precipitate. For the negative control, phosphate-buffered saline was used instead of the primary antibody. Images were captured at × 200 magnification with an optical microscope Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany), and quantitative analysis was carried out with the aid of ANALYSIS 3.1 program. Briefly, RGB colour images were converted successively into greyscale and then to binary images, where the highest intensity corresponded to Th-stained purple areas in the original. Then, a signal intensity threshold was determined to calculate the percentage of staining inside the regions of interest corresponding to the nervous structures. The number of axonal fibres and area occupied by nervous structures were also measured by the program.

### Western blot analysis

Protein expressions in MRA samples from 14-day-old PVL (*n* = 8) and sham (*n* = 6) rats, 28-day-old BDL

(*n* = 6) and sham (*n* = 7) rats and in renal artery samples from 14-day-old PVL (*n* = 5) and sham (*n* = 5) rats were analysed by Western blot. Tissue samples were homogenized in 250 µl RIPA buffer and 15 µl of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein quantification in the supernatants was performed by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein extracts (6–15 µg, depending on the analysed protein) were separated on a 4–12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and incubated with antibodies against Th (Abcam), Dbh (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and synaptosome-associated protein of 25 kDa (Snap-25) (Chemicon, Temecula, CA, USA). Bands were quantified by the QUANTITY ONE software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### Statistical analysis

Normally distributed values were compared using Student's *t*-test and expressed as mean ± SEM. Nonparametric data were compared using the Mann-Whitney test and expressed as median and range. Spearman's correlation test was used to analyse correlations between haemodynamic parameters and morphological nervous data (SIGMA STAT 3.0). Statistical significance was established at *P* < 0.05.

## Results

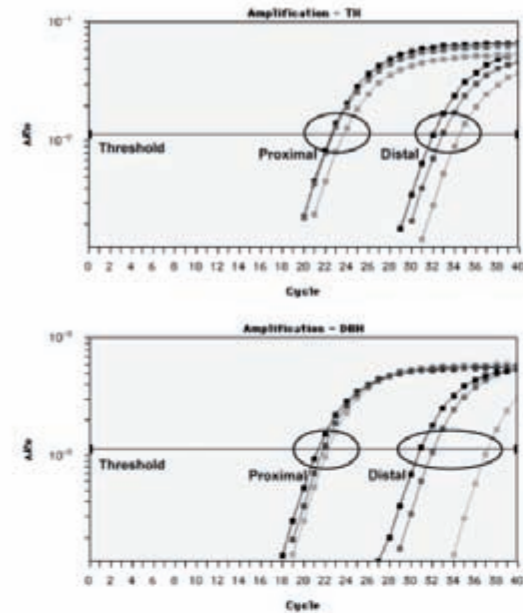
### mRNA origin of specific sympathetic genes

The relative quantification of Th and Dbh mRNA was performed by qRT-PCR in two equal sections of the main trunk of the SMA, the proximal and distal to the aortic origin, from the same control SMA (*n* = 3). The resulting cycle threshold (*C<sub>t</sub>*) values shown in Figure 1 revealed that both Th and Dbh mRNA were present in proximal and distal sections. However, the amount of mRNA was much higher (over 500-fold on average) in the proximal compared with the distal sections. Th mRNA *in situ* hybridization was used to identify the specific location of mRNAs implicated in sympathetic downregulation (Fig. 2). A strong hybridization signal was detected in neuron cells of SMG from sham and PVL rats, specifically within the cytoplasmic portion of the neuronal soma. In sham-operated rats, Th mRNA-positive staining was also observed inside axonal fibres surrounding the proximal SMA section, but no traces of hybridization were found in the distal part. On the contrary, SMA samples obtained from PVL rats showed very little or no detection of Th mRNA both in proximal and in distal sections.

### Sympathetic atrophy in superior mesenteric artery

Immunohistochemical detection of Th was carried out in SMA sections (main trunk) from rats with prehepatic portal hypertension (PVL, *n* = 7; sham, *n* = 7) and with secondary biliary cirrhosis (BDL, *n* = 6; sham,

## Sympathetic atrophy in portal hypertension



**Fig. 1.** Quantitative reverse transcriptase real time polymerase chain reaction performed in two sections of the superior mesenteric artery (SMA). The graph of the increment of the fluorescence reporter signal ( $\Delta Rn$ ) vs cycle number during polymerase chain reaction shows the amplification of tyrosine hydroxylase (Th) and dopamine  $\beta$ -hydroxylase (Dbh) mRNA ( $n = 3$ ). Cycle threshold values, surrounded by circles, are smaller for the proximal compared with the distal sections of SMA samples, indicating a much higher presence of Th and Dbh in the proximal sections, near the aortic origin.

$n = 7$ ) (Fig. 3). Table 1 summarizes the haemodynamic data and the analysis of nervous structures around SMA. Haemodynamic measures indicated that the hyperdynamic syndrome associated with portal hypertension was well established in both models, showing a significant decrease in the MAP and SMAR, along with a significant increase in PP and SMABE, in portal hypertensive animals compared with their respective sham. The identification of the axonal fibres surrounding the arterial wall indicated that the number of individual nervous structures was significantly lower in PVL rats compared with that in sham (69% reduction;  $P = 0.01$ ) (Table 1B), suggesting a decrease in post-ganglionic innervation. Quantitative analysis of the nervous structure area of each preparation confirmed a significant decrease in the total nervous fibre area in PVL rats (70% reduction;  $P = 0.03$ ). In addition, quantification of Th staining within nervous structures surrounding SMA samples revealed a significant reduction in the Th-stained area in PVL rats compared with sham (89% reduction;  $P = 0.02$ ). Sympathetic post-ganglionic innervation was also reduced in BDL rats, showing a substantial decrease in the

Coll et al.

nervous structures (62% decrease;  $P = 0.002$ ), in the nervous structure area (52% decrease;  $P = 0.05$ ) and in the Th staining area (64% decrease;  $P = 0.01$ ) (Table 1B). In addition, as shown in Table 2, strong correlations were found between nervous area data and haemodynamic parameters, for the two different experimental models of portal hypertension. The most intense correlation was detected between the Th-stained area and SMAR in both models.

## Sympathetic protein analysis in small superior mesenteric artery branches

Western blot analysis in MRA samples from partial PVL (PVL,  $n = 8$ ; sham,  $n = 6$ ) and secondary biliary cirrhosis (BDL,  $n = 6$ ; sham,  $n = 7$ ) rats were carried out for two proteins implicated in norepinephrine synthesis: Th and Dbh, and one essential protein for releasing neurotransmitters from synapses, Snap 25. As shown in Figure 4, the band intensity of all proteins was lower in resistance artery samples from PVL with respect to sham rats. The protein inhibition in PVL rats expressed as a percentage of decrease relative to sham showed reductions of 45% for Th, 57% for Dbh and 35% for Snap 25. Consistent with these data, these protein reductions were also reproduced in the BDL model, showing a marked decrease of Th (42%), Dbh (48%) and Snap 25 (55%) with respect to sham rats (Fig. 4).

## Renal artery analysis

Nonsignificant differences were found in the protein expression of Th, Dbh and Snap 25 in the left renal arteries from PVL ( $n = 5$ ) and sham ( $n = 5$ ) rats (Fig. 5). Nervous structure analysis in the right renal arteries from the same rats did not show significant differences in any of the morphological parameters analysed (Table 3).

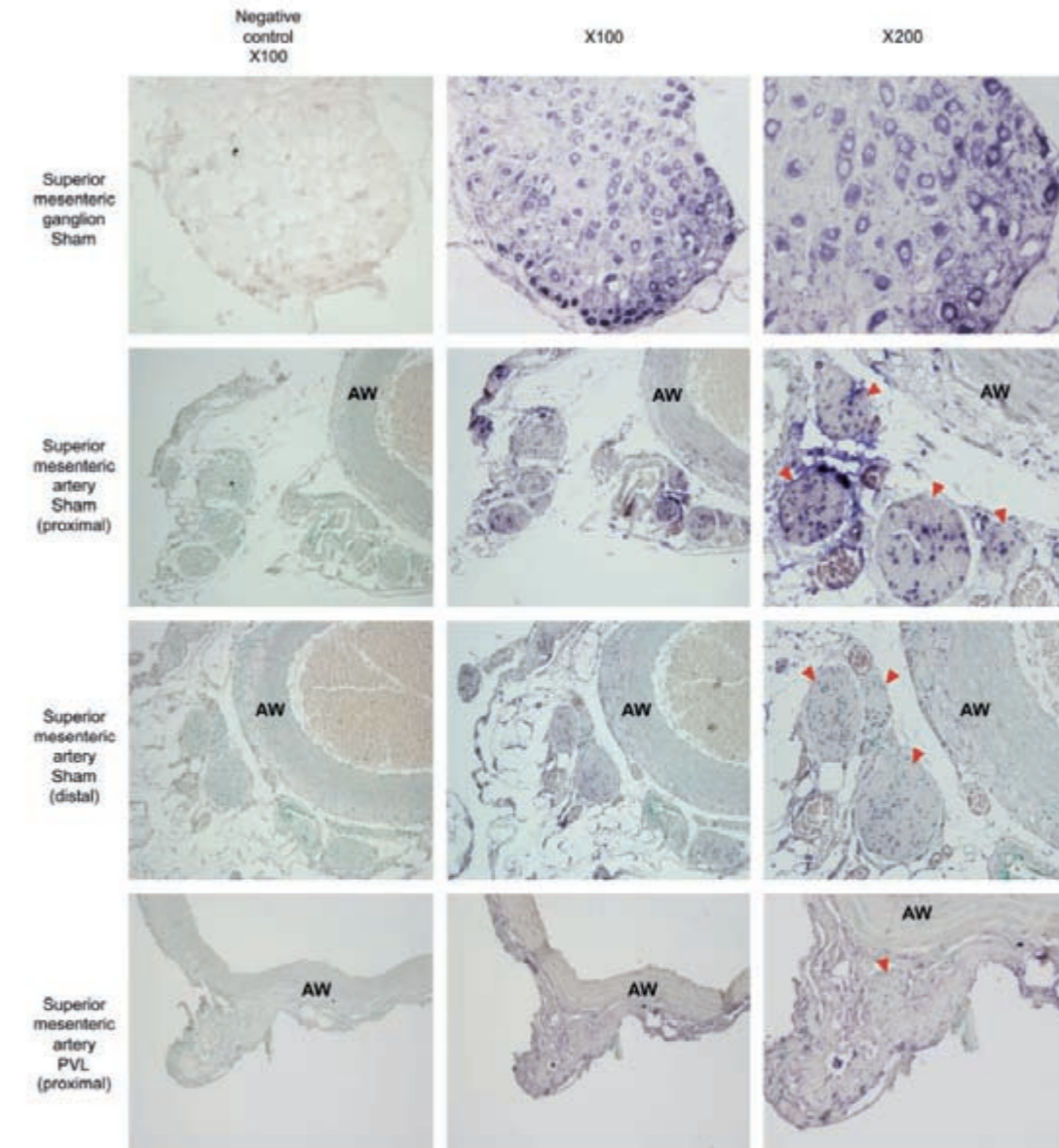
## Discussion

In the present study, we have shown that in portal-hypertensive (prehepatic and cirrhotic) animals, there is a remarkable regression of the sympathetic innervation in the whole vascular bed of the SMA. This finding extends previous results demonstrating a significant downregulation, both at the transcriptional and at the translational level, of many proteins implicated in adrenergic neurotransmission in PVL and cirrhotic rats (5). In addition to this, we have also clearly proved that mRNA transcripts of these sympathetic proteins are located in the axonal fibres surrounding the main trunk of the SMA, explaining why we were able to easily detect these mRNA expressions by microarray and PCR analysis in the prior work.

The cell body of neurons has classically been considered the exclusive site of protein synthesis, with transport of newly synthesized proteins from there to distant cellular locations (axons, synapses). Because evident cell bodies were not found in our SMA samples containing

Coll et al.

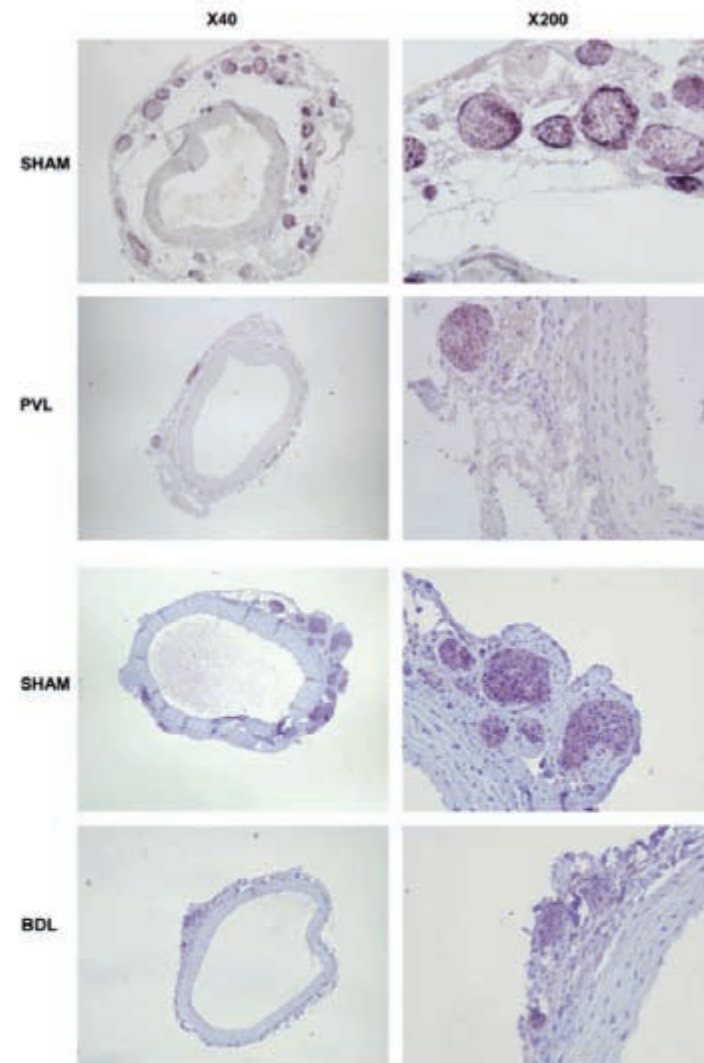
## Sympathetic atrophy in portal hypertension



**Fig. 2.** *In situ* hybridization of tyrosine hydroxylase (Th) mRNA. Positive Th mRNA staining is observed in the cytoplasmic portion of neurons of the superior mesenteric ganglia from sham rats. The same results were obtained from portal vein-ligated (PVL) rats (data not shown). A strong hybridization signal is present inside axonal fibres (indicated by red arrowheads in the  $\times 200$  magnification) surrounding proximal sections of the superior mesenteric artery (SMA) from sham rats. No traces of hybridization are visualized either in the distal SMA sections from sham rats or in the proximal and distal (not shown) sections of SMA from PVL rats. AW, arterial wall.

numerous mRNA expressions related to neurotransmission, we used Th mRNA *in situ* hybridization to locate them. The RT-PCR data indicated that mRNA transcripts were mainly situated in the proximal part of the vessel.

In accordance with this finding, an abundant Th hybridization signal was detected in the cytoplasm of the SMG sympathetic neurons (Fig. 2), but also in the proximal part of the main trunk of the SMA (sham rats),



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of tyrosine hydroxylase (Th) in the superior mesenteric artery (SMA) (main trunk). Magnification at  $\times 40$  shows the complete arterial wall (transversal sections, proximal to the aortic origin) surrounded by different numbers of nervous structures. Detail at  $\times 200$  magnification demonstrates Th staining inside axonal fibres. Note that nervous structures and Th staining are significantly decreased in SMA from portal vein ligated (PVL) ( $n = 7$ ) or bile duct ligated ( $n = 6$ ) compared with their respective sham ( $n = 7 + 7$ ) rats.

specifically inside the packages of axonal fibres running along the outer part of the artery. Therefore, mRNAs synthesized in the neuronal nucleus are being transported to the axons, where they may be translated into proteins implicated in sympathetic neurotransmission. Recent evidences have challenged the doctrinal view that mRNA translation only takes place in neuronal bodies, demonstrating that dendrites harbour local mRNA translation (12) and that axonal protein synthesis is essential

for axonal development, growth and regeneration (13). Our findings may indicate that the presence of the translational machinery in mature axons of the sympathetic system might be more frequent than previously thought.

The most interesting and striking finding of the present study is the marked regression of the sympathetic nerves around the SMA found in portal-hypertensive rats from two different experimental models of portal

**Table 1.** Analysis of haemodynamic measures\* and nerve fibres surrounding superior mesenteric artery samples

	Sham ( $n = 5$ )	PVL ( $n = 5$ )	<i>P</i>	Sham ( $n = 7$ )	BDL ( $n = 6$ )	<i>P</i>
<b>(A)</b>						
PP (mmHg)	8.44 $\pm$ 0.26	15.19 $\pm$ 0.8	< 0.001	9.56 $\pm$ 0.58	15.7 $\pm$ 1.75	< 0.001
MAP (mmHg)	123.4 $\pm$ 8.39	102.4 $\pm$ 3.83	0.05	136.4 $\pm$ 3.43	100.1 $\pm$ 4	< 0.001
SMA3F (ml/min 100g)	3.39 $\pm$ 0.20	5.33 $\pm$ 0.22	< 0.001	3.59 $\pm$ 0.61	4.44 $\pm$ 0.39	0.04
SMAR (mmHg/ml min 100g)	34.56 $\pm$ 3.82	16.41 $\pm$ 0.55	0.002	33.47 $\pm$ 2.66	18.76 $\pm$ 0.39	0.002
<b>(B)</b>						
Nervous structures (units)	13 (6–33)	4 (3–15)	0.01	8 (5–20)	3 (3–5)	0.002
Nervous structure area ( $10^3 \mu\text{m}^2$ )	941 (466–1621)	280 (75–1567)	0.03	71 (31–156)	34 (12–89)	0.05
Th staining area ( $10^3 \mu\text{m}^2$ )	132 (28–2979)	15 (3–108)	0.02	28 (13–52)	10 (3–19)	0.01

(A) Haemodynamic measures and (B) nervous structure parameters of PVL, BDL and sham rats. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM for (A) and median (range) for (B).

\**t*-test.

†Mann–Whitney test.

BDL, bile duct ligated; MAP, mean arterial pressure; *n*, number of rats; PP, portal pressure; PVL, portal vein ligated; SMA3F, superior mesenteric artery blood flow; SMAR, superior mesenteric artery resistance; Th, tyrosine hydroxylase.

**Table 2.** Correlations (Spearman's test) between haemodynamic parameters and morphologic nervous structure data in superior mesenteric arteries

	Nervous structures (units)	Nervous structure area ( $\mu\text{m}^2$ )	Th staining area ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>(A) PVL model</b>			
PP (mmHg)	$r = -0.38$ ; $P = 0.26$	$r = -0.64$ ; $P = 0.31$	$r = -0.58$ ; $P = 0.07$
MAP (mmHg)	$r = 0.45$ ; $P = 0.17$	$r = 0.81$ ; $P < 0.01$	$r = 0.67$ ; $P = 0.03$
SMA3F (ml/min 100g)	$r = -0.61$ ; $P = 0.05$	$r = -0.5$ ; $P = 0.14$	$r = -0.72$ ; $P = 0.02$
SMAR (mmHg/ml min 100g)	$r = 0.79$ ; $P < 0.01$	$r = 0.79$ ; $P < 0.01$	$r = 0.9$ ; $P < 0.001$
<b>(B) BDL model</b>			
PP (mmHg)	$r = -0.70$ ; $P = 0.01$	$r = -0.43$ ; $P = 0.13$	$r = -0.63$ ; $P = 0.02$
MAP (mmHg)	$r = 0.79$ ; $P < 0.01$	$r = 0.53$ ; $P = 0.07$	$r = 0.56$ ; $P = 0.05$
SMA3F (ml/min 100g)	$r = -0.59$ ; $P = 0.07$	$r = -0.64$ ; $P = 0.04$	$r = -0.72$ ; $P = 0.02$
SMAR (mmHg/ml min 100g)	$r = 0.69$ ; $P = 0.02$	$r = 0.66$ ; $P = 0.03$	$r = 0.75$ ; $P = 0.01$

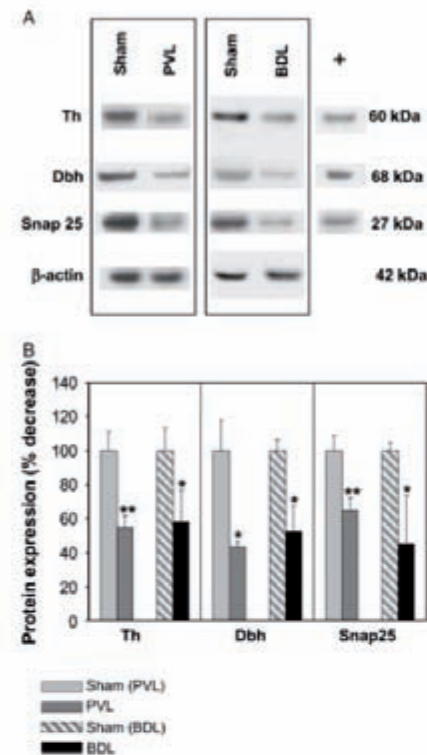
(A) PVL ( $n = 5$ ) and sham rats ( $n = 5$ ) and (B) BDL ( $n = 6$ ) and sham ( $n = 7$ ) rats.

BDL, bile duct ligated; MAP, mean arterial pressure; PP, portal pressure; PVL, portal vein ligated; SMA3F, superior mesenteric artery blood flow; SMAR, superior mesenteric artery resistance; Th, tyrosine hydroxylase.

hypertension, PVL and biliary cirrhosis, observed by Th immunostaining. Compared with sham animals, portal-hypertensive animals showed significantly lower number of nervous fibres, mean total nervous areas and Th-stained areas. This sympathetic innervation atrophy confers an organic substrate to the genetic and protein downregulation of adrenergic neurotransmission observed previously (5). The strong correlations detected between haemodynamic parameters, especially SMAR, and the morphological nervous data, mainly the Th-stained nervous area, suggest that this sympathetic regression might at least collaborate in the maintenance of the splanchnic vasodilation. The present data, in addition to the results of the prior time-course experiments (adrenergic downregulation occurring beyond day 5 after PVL) (5), suggest that sympathetic atrophy is not a triggering phenomenon of splanchnic vasodilation and does not participate in the initial phases, but rather it represents a late phenomenon in the development of

portal hypertension. Additional data of the present study also point to a generalized adrenergic dysfunction in the mesenteric vasculature. SMAs of PVL rats showed absence of Th mRNA by *in situ* hybridization, indicating lower levels of this transcript. Also, Western blot analysis of three different proteins directly implicated in the adrenergic system, in samples of MRA from PVL and BDL rats, again confirmed inhibition of the adrenergic protein production. As is already known, resistance arteries are greatly responsible for the total resistance of any arterial bed and these arteries are markedly altered in portal hypertension (14, 15).

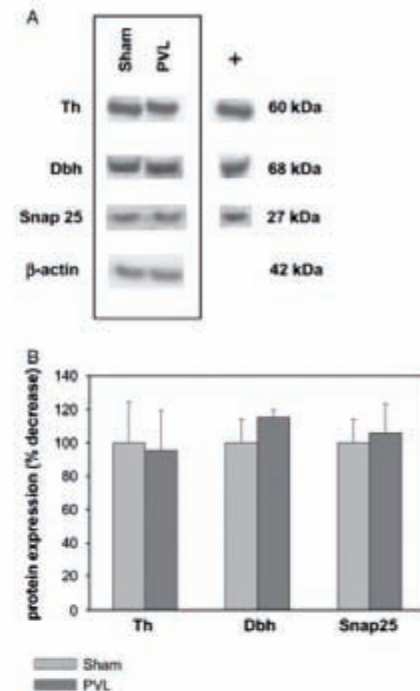
Our results raise an apparent contradiction with the current knowledge of a sympathetic nervous overactivity in cirrhosis and portal hypertension (6). The results of the analysis of renal arteries, showing no significant differences in protein expression or in any of the sympathetic nervous parameters analysed (number of nervous fibres, sympathetic nervous area or Th staining area)



**Fig. 4.** Western blot analysis in mesenteric resistance arteries. Representative Western blot of tyrosine hydroxylase (Th), dopamine  $\beta$ -hydroxylase (Dbh) and synaptosome-associated protein (Snap 25) in mesenteric resistance arteries from prehepatic portal-hypertensive [portal vein-ligated (PVL),  $n=8$ ; sham,  $n=6$ ] and secondary biliary cirrhotic rats [bile duct ligated (BDL),  $n=6$ ; sham,  $n=7$ ]. (A) Protein expressions showed an important inhibition in arteries from both models compared with sham.  $\beta$ -actin was used as an endogenous loading control and rat adrenal medulla as a positive control (+). (B) The bar diagram shows the protein expression decrease in both PVL and BDL rats, expressed as percentages of decrease relative to sham rats (sham protein expression is given a value of 100%). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ .

between PVL and sham rats, suggest that sympathetic regression is a specific phenomenon of the mesenteric region, representing a local consequence to portal hypertension that could contribute to aggravate splanchnic vasodilation. Simultaneously, the sympathetic fibres located in other territories (renal arteries), unaffected by nervous atrophy, could contribute to establish the known sympathetic hyperactivity of cirrhotic patients.

Evidences of sympathetic atrophy/regression in other clinical situations or diseases are limited. Post-ganglionic sympathetic dysfunction has been reported previously, in pure autonomic failure, a rare degenerative disease that mainly entails loss of post-ganglionic sympathetic neurons and nerves (16), leading to a disorder in norepi-



**Fig. 5.** Western blot analysis in renal arteries. Representative Western blot of tyrosine hydroxylase (Th), dopamine  $\beta$ -hydroxylase (Dbh) and synaptosome-associated protein (Snap 25) in renal arteries from portal vein-ligated (PVL,  $n=5$ ) and sham rats ( $n=5$ ). (A) Protein expressions showed no differences between PVL and sham rats.  $\beta$ -actin was used as an endogenous loading control and rat adrenal medulla as a positive control (+). (B) Bar diagram showing protein levels expressed as percentages of decrease relative to sham rats (sham protein expression is given a value of 100%). Differences are nonsignificant.

nephric neurotransmission and subsequent orthostatic hypotension symptoms. There are other acquired diseases in which sympathetic dysfunction and atrophy are part of a more generalized neurodegenerative process; among them, diabetes mellitus is the most common cause of autonomic dysfunction. In this case, loss of sympathetic neurons and nerves is mainly caused by a metabolic/ischaemic insult (17). The mechanisms responsible for the sympathetic regression in rats with portal hypertension are unknown. Sympathetic neuron survival and maintenance seems to be regulated by neurotrophins, such as nerve growth factor and neurotrophin-3 (18, 19). There is evidence that both neurotrophins may act together to promote the survival of sympathetic neurons. One possible explanation for the sympathetic atrophy observed in portal-hypertensive rats could be a local downregulation of these neurotrophins secondary to the activation of preganglionic neuronal signals or vascular mediators triggered by portal

**Table 3.** Analysis of nerve fibres surrounding right renal artery samples

	Sham ( $n=5$ )	PVL ( $n=5$ )	$P$
Nervous structures (units)	1.7 (1–3)	2.6 (2–4)	0.29
Nervous structure area ( $10^3 \mu\text{m}^2$ )	5.75 (0.87–15.01)	6.83 (2.10–12.51)	0.73
Th staining area ( $10^3 \mu\text{m}^2$ )	2.79 (0.65–6.59)	5.74 (1.78–11.33)	0.29

Mann-Whitney test.

Values are expressed as median (range).

$n$ , number of rats; PVL, portal vein ligated; Th, tyrosine hydroxylase.

hypertension. Indeed, review of the differential expression gene data from our prior study performed by microarray analysis in SMA of PVL and sham rats (5), nerve growth factor-inducible gene (VGF) and neurotrophin receptor (Ntrk1-2, P75NTR, NgfR) expressions showed a marked inhibition in PVL compared with sham rats. Because VGF gene expression is induced by nerve growth factor and also regulated by neurotrophin-3 (20), and nerve growth factor receptors play a crucial role in neurotrophin activation, inhibition of these genes suggests a profound neurotrophin signalling dysregulation in the sympathetic system of portal-hypertensive rats, which could lead to an alteration of the axonal integrity. Indeed, the above-mentioned microarray analysis also revealed a marked downregulation ( $\log_2 < -2$ ) of a large proportion of genes involved in neuron differentiation, neurogenesis and in axonal growth processes, in portal-hypertensive rats compared with controls. Thereby, it is plausible that this inhibition of neuron survival-related genes could indicate that sympathetic nerve growth mechanisms in portal-hypertensive rats are impaired.

The neural pathway controlling the cardiovascular system includes the primary afferent innervation (sensory neurons), the brain stem medullary cardiovascular nuclei and the effector arm composed of sympathetic and parasympathetic efferent nerves (21, 22). Considering this scheme, the signal responsible for the post-ganglionic sympathetic nerve regression probably originates in preganglionic neurons or other neurons with a synaptic connection to post-ganglionic neurons. The afferent stimulus that originated from pressure increases in portal or mesenteric vessels or microvasculature (23, 24) would reach the central nuclei through the afferent nerves and from there to the sympathetic ganglia. In this sense, it is important to mention that several studies suggest that pharmacological elimination of the primary afferent nerves, by capsaicin administration, prevents the development of haemodynamic alterations, as well as ascite formation, in PVL and cirrhotic rats (25–28).

In summary, this study demonstrates the ganglionic and axonal origin of mRNAs related to adrenergic neurotransmission that are profoundly downregulated in the SMA of portal-hypertensive rats. We have also observed a structural atrophy of the sympathetic innervation of the mesenteric arterial tree accompanying the genetic and protein inhibition. Sympathetic regression is probably responsible for the observed low levels of

norepinephrine in SMA samples and reduced vasoconstrictive-adrenergic tone. In addition, nitergic (parasympathetic) vasodilatory nerve activity may be increased in portal hypertension, because upregulation of neuronal-nitric oxide synthase (n-NOS) has been reported in mesenteric arteries of portal-hypertensive rats (29, 30). This nNOS activation and increased neural NO-mediated vasodilation might be an additional pathway for mesenteric smooth muscle relaxation in portal hypertension. The simultaneous inhibition and activation of both vascular tone regulatory systems could be crucial to explain mesenteric vascular alterations in portal hypertension. In conclusion, our data suggest that portal hypertension is associated with sympathetic nerve atrophy/regression in the mesenteric arterial vasculature that could contribute to the splanchnic vasodilation commonly found in portal hypertension.

#### Acknowledgements

We would like to thank Dr Aina Rodriguez-Vilarrupla and Dr Mercedes Fernandez for valuable teaching and advice in animal models. We also acknowledge Teresa Moliné for technical help.

**Grant support:** This work was supported by grants SAF2006-0314 and SAF2009-08354 from the Ministerio de Ciencia e Innovación. The CIBERhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.

M. C. and N. E. are recipients of fellowship grants from the Institut de Recerca Vall d'Hebron and are enrolled in the postgraduate programme of Universitat Autònoma de Barcelona.

#### References

- Laleman W, Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int* 2005; **25**: 1079–90.
- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983; **244**: G52–7.
- Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilation, plasma volume

- expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1992; **15**: 323–8.
4. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, et al. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; **8**: 1151–7.
  5. Coll M, Genesca J, Raurell I, et al. Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *J Hepatol* 2008; **49**: 43–51.
  6. Henriksen JH, Moller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol* 1998; **29**: 328–41.
  7. Pozzi M, Grassi G, Redaelli E, et al. Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis. *Hepatology* 2001; **34**: 1113–8.
  8. Henriksen JH, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Kidney, lower limb and whole-body uptake and release of catecholamines in alcoholic liver disease. *Clin Physiol* 1988; **8**: 203–13.
  9. Colombato LA, Robin M, Pomier-Layrargues G, Huet P. Animal models of portal hypertension. In: Holstege A, Hahn EG, Scholmerich J, eds. *Portal Hypertension – Proceedings of the 79th Falk Symposium*. Germany: Kluwer Academic Publishers, 1995; 3–14.
  10. Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, et al. Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2005; **146**: 679–91.
  11. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, et al. Acute and chronic cyclooxygenase blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1529–35.
  12. Bramham CR, Wells DG. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 776–89.
  13. Piper M, Holt C. RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 505–23.
  14. Scotland RS, Chauhan S, Davis C, et al. Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* 2004; **95**: 1027–34.
  15. Sogni P, Sabry S, Moreau R, et al. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996; **24**: 487–90.
  16. Young TM, Asahina M, Nicotra A, Mathias CJ. Skin vasomotor reflex responses in two contrasting groups of autonomic failure: multiple system atrophy and pure autonomic failure. *J Neurol* 2006; **253**: 846–50.
  17. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2003; **26**: 1553–79.
  18. Bierl MA, Isaacson LG. Increased NGF proforms in aged sympathetic neurons and their targets. *Neurobiol Aging* 2007; **28**: 122–34.
  19. Tafreshi AP, Zhou XF, Rush RA. Endogenous nerve growth factor and neurotrophin-3 act simultaneously to ensure the survival of postnatal sympathetic neurons in vivo. *Neuroscience* 1998; **83**: 373–80.
  20. Levi A, Ferri GL, Watson E, Possenti R, Salton SR. Processing, distribution, and function of VGE, a neuronal and endocrine peptide precursor. *Cell Mol Neurobiol* 2004; **24**: 517–33.
  21. Gibbins IL, Jobling P, Morris JL. Functional organization of peripheral vasomotor pathways. *Acta Physiol Scand* 2003; **177**: 237–45.
  22. Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; **121**: 49–146.
  23. Keef KD, Kreulen DL. Venous mechanoreceptor input to neurones in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *J Physiol* 1986; **377**: 49–59.
  24. Stein RD, Genovesi S, Demarest KT, Weaver LC. Capsaicin treatment attenuates the reflex excitation of sympathetic activity caused by chemical stimulation of intestinal afferent nerves. *Brain Res* 1986; **397**: 145–51.
  25. Lee SS, Sharkey KA. Capsaicin treatment blocks development of hyperkinetic circulation in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1993; **264**: G868–73.
  26. Li Y, Song D, Zhang Y, Lee SS. Effect of neonatal capsaicin treatment on haemodynamics and renal function in cirrhotic rats. *Gut* 2003; **52**: 293–9.
  27. Song D, Sharkey KA, Breitman DR, Zhang Y, Lee SS. Disordered central cardiovascular regulation in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **280**: G420–30.
  28. Song D, Liu H, Sharkey KA, Lee SS. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rats is dependent on central c-fos gene expression. *Hepatology* 2002; **35**: 159–66.
  29. Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitrenergic vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005; **43**: 258–65.
  30. Kwon SY, Groszmann RJ, Iwakiri Y. Increased neuronal nitric oxide synthase interaction with soluble guanylate cyclase contributes to the splanchnic arterial vasodilation in portal hypertensive rats. *Hepatol Res* 2007; **37**: 58–67.

## 5. ESTUDI 3: POSSIBLE INDICACIÓ DE LA DROXIDOPA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL

## 5.1 INTRODUCCIÓ

L-threo-3,4-dihidroxifenilserina (L-Dops, droxidopa) és un aminoàcid sintètic que amb la presència de la L-aromàtic aminoàcid descarboxilasa (LAAAD), es converteix en el neurotransmissor simpàtic noradrenalina (NA). La síntesi de NA a partir de la levodopa es du a terme en dues reaccions consecutives. La primera, consisteix en la descarboxilació de la levodopa a dopamina per l'enzim L-aromàtic aminoàcid descarboxilasa. En la segona, considerada etapa limitant, té lloc la hidroxilació de la dopamina a la NA, i és regulada per la dopamina beta-hidroxilasa. Degut a que aquesta reacció produeix un efecte de coll d'ampolla, l'administració de levodopa exògena, no resulta en un augment significatiu de noradrenalina. En canvi, la droxidopa, que també és un aminoàcid artificial, és capaç d'augmentar els nivells de noradrenalina amb una sola reacció evitant l'etapa limitant de la seva biosíntesi. La threo-3,4-dihidroxifenilserina té quatre estereoisòmers, tot i així, només la isoforma L produeix la conversió a la forma biològicament activa del neurotransmissor L-Noradrenalina. A més, l'enantiòmer D, pot inhibir de manera competitiva la descarboxilació de l'isòmer L a L-noradrenalina. Es coneixen tres mecanismes diferents pels quals L-Dops pot exercir el seu efecte. Per una banda, pot actuar com un neurotransmissor simpàtic perifèric, és a dir, pot ser capturada per les neurones postganglionars simpàtiques i transformar-se en NA, la qual serà alliberada quan el sistema simpàtic estigui activat. Per altre banda, també pot comportar-se com una hormona circulant. Donat que l'enzim LAAAD es troba àmpliament expressat en diferents cèl·lules del cos, com a l'estomac, al fetge o al ronyó, la droxidopa podria convertir-se en NA, en qualsevol d'aquestes cèl·lules i alliberar-se directament al torrent sanguini. Finalment, també es podria considerar un estimulador central de l'activitat simpàtica, com que té la característica de creuar la barrera hematoencefàlica, al transformar-se a adrenalina, podria activar les neurones simpàtiques preganglionars de la medulla espinal.

Existeixen estudis pilots que demostren que l'administració per via oral de L-Dops augmenta la pressió sanguínia ortostàtica en pacients amb hipotensió ortostàtica producte de trastorns autonòmics com la insuficiència autonòmica pura (PAF) o l'atròfia sistèmica múltiple (MSA) (90). Donat que la patologia de PAF suposa una pèrdua de nervis post-ganglionars simpàtics, s'ha postulat que l'efecte pressor de L-Dops depèn principalment de la producció de NA en les cèl·lules no neuronals, a diferència de MSA, on es creu que la conversió a NA té lloc a les terminals simpàtiques, ja que la malaltia no implica atrofia simpàtica. Un treball realitzat per Kaufman i col·laboradors (91), mostra que el increment màxim de la pressió arterial mitja es dona al cap de 3.5 hores després de l'administració del fàrmac (a dosis dependents del grau d'alteració simpàtica, de 200 a 2000 mg). Per altre banda, estudis en referència a la farmacocinètica de L-Dops, indiquen que al cap de 3 hores després de l'administració oral del fàrmac, a una dosi de 400 mg, s'observa un pic de L-Dops en plasma, amb una vida mitja d'entre 2 a 3 hores. Tanmateix, el pic del nivell

plasmàtic de NA apareix pràcticament simultani al pic que correspon als nivells de fàrmac en sang, aquest fet s'explica per una ràpida conversió de L-Dops a NA, així com per un ràpid alliberament del neurotransmissor al fluid extracel·lular.

El síndrome circulatori hiperdinàmic de la hipertensió portal en pacients amb cirrosi hepàtica contribueix de forma decisiva a moltes de les manifestacions clíniques de la malaltia, com és el cas de l'hemorràgia digestiva per varius esofàgiques, d'ascites o la insuficiència renal. Aquest síndrome s'associa a una disminució de les resistències vasculars sistèmiques i esplànquiques, hipotensió arterial, expansió del volum plasmàtic i un augment de l'índex cardíac. Des d'un punt de vista clínic, el tractament d'aquesta vasodilatació esplànquica, ha estat una diana terapèutica en els pacients amb cirrosi, dirigida a aconseguir un efecte de disminució de la pressió portal i una millora de les complicacions clíniques associades. El tractament crònic amb  $\beta$  bloquejants adrenèrgics (propranolol, nadolol), que produeix vasoconstricció esplànquica, s'utilitza des de fa més de 20 anys per disminuir la pressió portal i el risc d'hemorràgia per varius. Pel què fa al tractament agut de les hemorràgies per varius, s'utilitzen tant la somatostatina com la terlipresina per via endovenosa, que tot i per mecanismes diferents, produeixen vasoconstricció esplànquica. Finalment, en el síndrome hepatorenal, s'aconsegueix un augment en la funció renal, mitjançant infusió d'agonistes adrenèrgics (noradrenalina o midrodina) que produeixen vasoconstricció mesentèrica i una subseqüent millora en la perfusió renal. La **hipòtesi** del present estudi es basa en la possible aplicació de la droxidopa en el tractament de la vasodilatació esplànquica derivada de la hipertensió portal. En el primer estudi de la present tesi, (Coll, et al; JHepatoI 08) (89), es mostra que existeix una infraexpressió dels gens relacionats amb el sistema adrenèrgic, així com una inhibició de les proteïnes relacionades amb la biosíntesi de NA, en les artèries mesentèriques de rates amb hipertensió portal, factor que podria contribuir a la vasodilatació esplànquica. Així doncs, tal i com s'ha demostrat en pacients amb MSA, el qual implica una desregulació de la transmissió adrenèrgica, la droxidopa (convertida en noradrenalina) podria revertir en part aquest dèficit adrenèrgic localitzat en la vasculatura mesentèrica. Per altre banda, la droxidopa és beneficiosa, augmentant la pressió arterial mitja, en malalts amb PAF, malaltia que implica pèrdua de neurones simpàtiques, ja que la conversió de L-Dops a NA pot efectuar-se en cèl·lules no neuronals (92). Aquest fet, evidencia, que la L-Dops podria suposar un bon tractament per corregir la vasodilatació arterial esplànquica tot i l'atrofia nerviosa simpàtica descrita en la vasculatura mesenterica de rates amb hipertensió portal (Coll, et al; Liver Int.) (93). Un darrer fonament de la indicació de la droxidopa en el tractament la vasodilatació esplànquica derivada de la hipertensió portal es basa en l'evidència de la millora de l'alteració hemodinàmica i funció renal del síndrome hepatorenal, amb l'administració endovenosa de noradrenalina a pacients cirròtics (94).

El producte de la síntesi orgànica simple de la droxidopa dona lloc a la mescla racèmica de D,L-Dops que inclou en proporcions del 50% cadascun dels enantiòmers. La comercialització de

L-Dops pel tractament de la hipotensió ortostàtica va començar l'any 1989 a Japó, a càrrec de Sumitono Pharmaceuticals Co. Actualment, *Chelsea Therapeutics International Ltd*, està portant a terme l'estudi clínic fase III. Donat que la forma enantiòmicament pura d'aquesta molècula (L-Dops) no està comercialment disponible, creiem que la utilització de la mescla racèmica pot oferir resultats beneficiosos al tractament de la vasodilatació arterial, o almenys pot resultar una bona aproximació i un avenç en el desenvolupament de L-Dops com a nova diana terapèutica per la hipertensió portal.

L'objectiu d'aquest estudi és avaluar l'efecte de l'administració endovenosa de la mescla racèmica D,L-threo-3,4-dihidroxifenilserina en els paràmetres hemodinàmics de rates amb hipertensió portal pre-hepàtica.

## 5.2 DISSENY EXPERIMENTAL

Es va realitzar un model d'hipertensió portal pre-hepàtica en rata mitjançant una lligadura calibrada de la vena porta. Al cap de 14 dies, es va administrar als animals una dosi de 10mg/Kg de D,L-threo-3,4-dihidroxifenilserina per via intravenosa i es va dur a terme un registre continu i simultani de la pressió arterial mitja, la pressió portal així com del flux mesentèric, durant 30 minuts.

## 5.3 RESULTATS

### • Efecte de D,L-Dops en la pressió arterial

L'administració endovenosa de D,L-Dops produeix un augment de la pressió arterial mitja (MAP) en rates amb hipotensió arterial derivada de la hipertensió portal exercida. L'efecte pressor de D,L-Dops comença al cap de 30 segons després de l'administració del fàrmac, amb un increment significatiu de la MAP del 7.1% respecte el valor basal, just abans de l'administració de la mescla racèmica. El pic màxim de la MAP, que representa un augment significatiu del 15%, apareix als 10 minuts.

Taula 2. Efecte de D,L-Dops en la pressió arterial mitja (MAP)

time after drug (min)	MAP (mm Hg)	p
0	106,2 ± 4,78	
0,5	113,63 ± 5,05	<0,001
1	114,32 ± 4,80	<0,001
2	114,43 ± 4,48	<0,001
3	116,45 ± 4,77	<0,001
5	117,51 ± 4,94	<0,001
10	121,89 ± 4,38	<0,001
15	118,29 ± 3,81	<0,001
20	115,83 ± 3,52	<0,001
30	114,99 ± 4,80	<0,001

Valors representats per MAP ± s.e; n=9.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method)

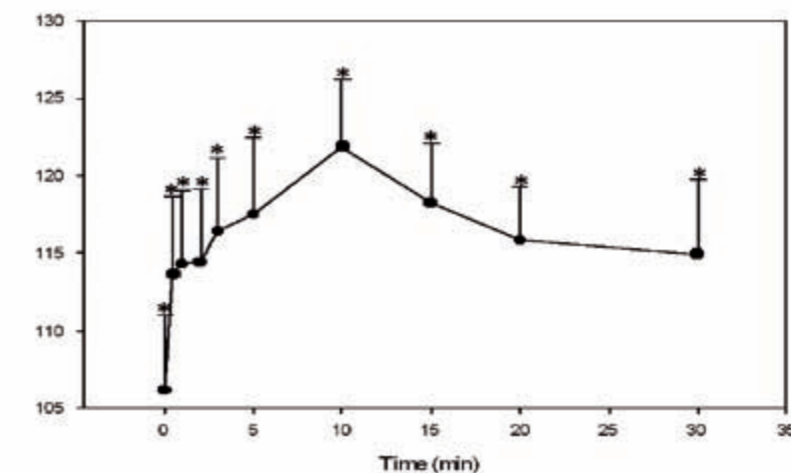


Figura 4. Efecte de D,L-DOPS en la pressió arterial mitja (MAP)

Cada punt representa la mitja ± s.e. dels valors de 9 rates PVL tractades amb D,L-DOPS a una dosi de 10mg/kg-1. Significativament diferent del control (valor de MAP just abans de l'administració de la droga), \* = p < 0,001.

### • Efecte de D,L-Dops en la pressió portal

L'administració endovenosa de D,L-Dops implica una disminució significativa de la pressió portal en rates PVL. Després de 20 minuts de l'administració del fàrmac, es produeix una disminució significativa del 3.6% de la pressió portal comparada amb el valor basal. Als 30 minuts, aquesta disminució s'accentua i augmenta fins el 7%.

Taula 3. Efecte de D,L-Dops en la pressió portal (PP)

time after drug (min)	PP (mm Hg)	p
0	15,30 ± 0,74	
0,5	15,57 ± 0,94	0,326
1	15,64 ± 0,96	0,216
2	15,48 ± 0,95	0,524
3	15,51 ± 0,93	0,455
5	15,65 ± 1,02	0,207
10	15,65 ± 0,94	0,201
15	15,11 ± 0,94	0,474
20	14,74 ± 0,91	0,043
30	14,22 ± 0,83	<0,001

Valors representats per PP±s.e; n=7.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method)

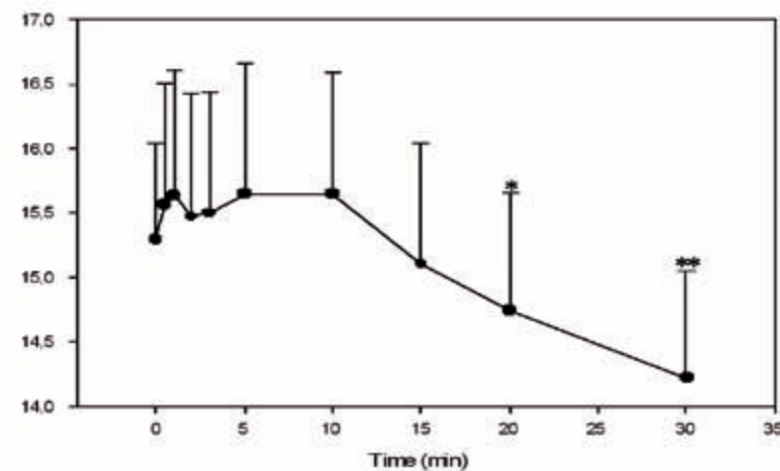


Figura 5. Efecte de D,L- DOPS en la pressió portal (PP)

Cada punt representa la mitja ± s.e. dels valors de 7 rates PVL tractades amb D,L-DOPS a una dosi de 10mgkg<sup>-1</sup>. Significativament diferent del control (valor de PP just abans de l'administració de la droga), \*=p<0.05, \*\*=p<0.001.

### • Efecte de D,L-Dops en el flux mesentèric

L'administració de D,L-Dops per via endovenosa no produeix una disminució del flux mesentèric en rates PVL. Al cap de 30 segons de l'administració del fàrmac, com a conseqüència de la incorporació de la dilució de la mescla racèmica al torrent sanguí, es produeix un augment significatiu del flux mesentèric.

Taula 4. Efecte de D,L-Dops en el flux mesentèric (SMABF)

time after drug (min)	SMABF (mL/min100g)	p
0	6,16 ± 0,31	
0,5	6,89 ± 0,36	0,009
1	6,75 ± 0,34	0,033
2	6,58 ± 0,35	0,125
3	6,52 ± 0,32	0,18
5	5,99 ± 0,54	0,522
10	6,38 ± 0,36	0,423
15	6,14 ± 0,34	0,93
20	6,05 ± 0,32	0,667
30	6,28 ± 0,30	0,673

Valors representats per SMABF±s.e; n=6

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method)

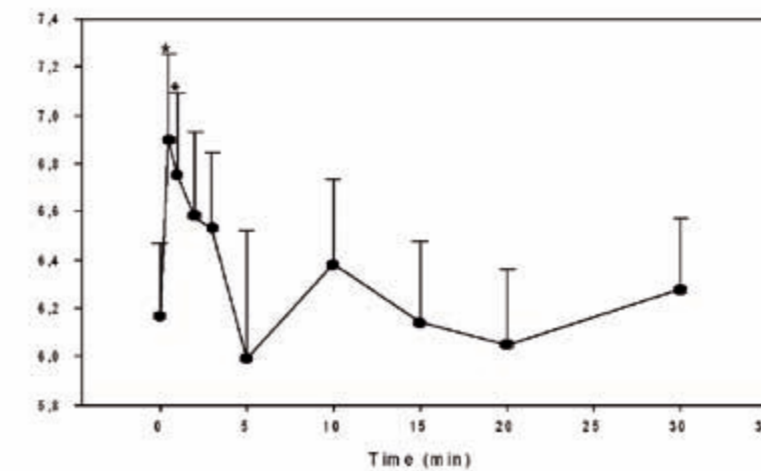


Figura 6. Efecte de D,L- DOPS en el flux mesentèric (SMABF)

Cada punt representa la mitja ± s.e. dels valors de 6 rates PVL tractades amb D,L-DOPS a una dosi de 10mgkg<sup>-1</sup>. Significativament diferent del control (valor de SMABF just abans de l'administració de la droga), \*=p<0.05.



- Efecte de D,L-Dops en la resistència mesentèrica

D,L-Dops produeix un augment no significatiu del 14% en la resistència mesentèrica de rates amb hipertensió portal al cap de 5 minuts de la infusió endovenosa del fàrmac.

Taula 5. Efecte de D,L-Dops en la resistència mesentèrica (SMAR)

time after drug (min)	SMAR (mmHg/mLmin100g)	p
0	17,12 ± 1,69	
0,5	16,11 ± 1,51	0,05
1	16,48 ± 1,43	0,18
2	16,95 ± 1,48	0,57
3	17,18 ± 1,42	0,86
5	19,50 ± 1,91	0,28
10	18,62 ± 1,11	0,13
15	18,46 ± 0,99	0,30
20	17,90 ± 0,92	0,50
30	17,38 ± 1,27	0,85

Valors representats per SMABF±s.e; n=6

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method)

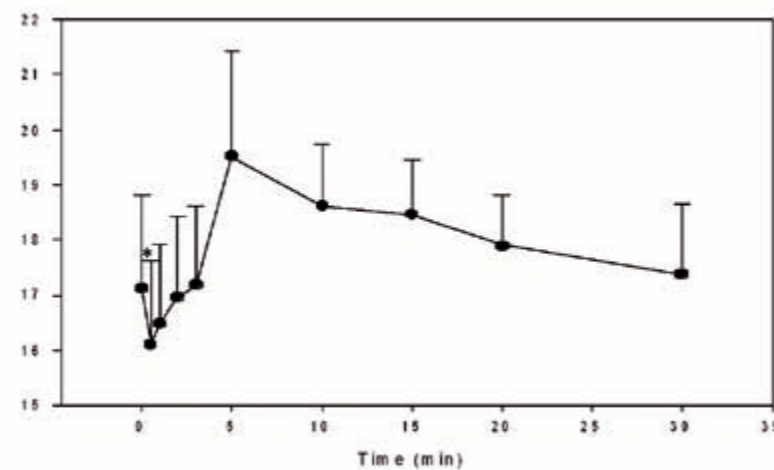


Figura 7. Efecte de D,L- DOPS en la resistència mesentèrica (SMAR)

Cada punt representa la mitja ± s.e. dels valors de 6 rates PVL tractades amb D,L-DOPS a una dosi de 10mgkg<sup>-1</sup>. Significativament diferent del control (valor de SMAR just abans de l'administració de la droga), \* = p < 0.05.

## 6. DISCUSSIÓ

### 6.1 INHIBICIÓ SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL

La cirrosi hepàtica és una causa important de mortalitat i morbiditat tant en el nostre país com a nivell mundial. Una de les complicacions d'aquesta malaltia és la hipertensió portal que pot donar lloc a episodis greus d'hemorràgia digestiva i desenvolupament d'ascites en col·laboració amb una retenció hidrosalina excessiva. El síndrome circulatori hiperdinàmic de la hipertensió portal en pacients amb cirrosi hepàtica contribueix de manera decisiva en moltes de les manifestacions clíniques de la malaltia. Aquest síndrome s'associa a una disminució de les resistències, especialment esplànquiques, hipotensió arterial, expansió del volum plasmàtic i elevat índex cardíac. El mecanisme inicial d'aquestes alteracions hemodinàmiques sembla ser la vasodilatació arteriolar sistèmica, especialment en la circulació esplàncnica. En la fisiopatologia d'aquesta alteració vascular, l'òxid nítric sembla tenir un paper fonamental. Tot i així, existeixen nombroses llacunes en els mecanismes d'activació de la producció de NO i del possible paper d'altres mediadors.

La tecnologia dels microxips de DNA va permetre analitzar de forma conjunta l'expressió d'un gran nombre de gens potencialment implicats en el desenvolupament de la hipertensió portal en l'artèria mesentèrica de rata. El resultat més rellevant d'aquest primer estudi, és la determinació d'un conjunt de gens relacionats amb la neurotransmissió que comparteix un perfil d'expressió similar al llarg del desenvolupament de les alteracions hemodinàmiques associades a la hipertensió portal. Hi ha dos aspectes claus que s'extreuen d'aquesta regulació genètica. Per una banda, d'aquest conjunt de gens implicats en funcions neuronals, aproximadament un 40% està directament implicat en la neurotransmissió simpàtica o adrenèrgica, ja que les seves funcions biològiques estan relacionades en la síntesi, transport, alliberament i recepció de les catecolamines. Per altre banda, el perfil d'expressió que presenten aquests gens al llarg del model d'hipertensió portal és molt homogeni. Aquest perfil d'expressió es caracteritza per una sobre-expressió inicial (1 hora post-lligadura), seguit d'un retorn a la línia basal, on els gens no es troben regulats (de 6 a 24 hores) i finalment, després d'una petita oscil·lació (3 a 5 dies), es mostra una dràstica infra-expressió als 14 dies post-lligadura. Aquesta inhibició tant accentuada als 14 dies es reproduïx també en el model de cirrosi hepàtica experimental amb l'administració de tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>), demostrant així, que aquest mateix grup de gens implicat amb la neurotransmissió adrenèrgica reprimeix també la seva expressió en un context de cirrosi hepàtica. Donat que la noradrenalina és un neurotransmissor específic del sistema simpàtic, la quantificació de l'expressió dels enzims implicats en la seva síntesi, tirosina hidroxilasa (Th) i dopamina β-hidroxilasa (Dbh), suposa una clara indicació de l'estat de la transmissió adrenèrgica en el context de la innervació arterial mesentèrica. De fet, als 14 dies post-lligadura, les SMA de rates PVL i cirròtiques presenten nivells de RNA missatger, dels gens clau per la biosíntesi de noradrenalina (Th i Dbh), 50 vegades més

petits que les rates sham. A més, aquesta infra-expressió tant marcada, s'acompanya de la inhibició a nivell de proteïna de Th, Dbh, així com de Snap25, proteïna responsable de l'alliberament de NA, en mostres de SMA i jejú (òrgan diana), en rates amb hipertensió portal originada per una PVL o una cirrosi. El fet d'observar una disminució tant de la producció de RNA missatgers com de proteïnes, implicades amb la regulació de la neurotransmissió adrenèrgica, suggereix un trastorn del sistema simpàtic en l'arteria mesentèrica de rates amb hipertensió portal. Aquesta alteració de la neurotransmissió adrenèrgica es podria localitzar a nivell pre-sinàptic, és a dir en els nervis peri-vasculars autonòmics de l'arteria mesentèrica. De fet, el resultat de la immunodetecció de Th i noradrenalina, demostra l'origen simpàtic dels nervis peri-vasculars presents en les SMA obtingudes.

Una qüestió important en referència al rol fisiopatològic de la inhibició de la regulació adrenèrgica en rates amb hipertensió portal, és si contribueix a les alteracions hemodinàmiques de la hipertensió portal o bé, es tracta d'una conseqüència de la vasodilatació esplàncnica. Assumint que la hiper o hipo-regulació genètica es tradueix a una activació o inhibició funcional, és possible que la sobre-expressió de gens adrenèrgics en la primera hora després de la lligadura coincideixi amb una activació de la transmissió adrenèrgica donant lloc a una vasoconstricció vascular de l'arteria mesentèrica. Aquesta vasoconstricció reflex, descrita en les fases inicials del model PVL (3, 39, 95), podria estar implicada en l'increment de l'activitat de eNOS, secundari a un increment de la fosforilació d'aquest enzim per Akt (proteïna quinasa B). Per altre banda, un mecanisme originat a causa d'una patologia, hauria de tenir una funció compensatòria, així, un mecanisme compensatori a la vasodilatació esplàncnica, correspondria a un augment en la producció de catecolamines, en lloc d'una disminució de la síntesi d'aquest neurotransmissor. Aquests fets, suggereixen que la inhibició de la regulació adrenèrgica representa una conseqüència local de la hipertensió portal que podria contribuir al desenvolupament de la vasodilatació esplàncnica.

Existeixen nombroses evidències que demostren que la hiperactivitat del sistema nerviós simpàtic té un paper important en el trastorn cardiovascular, homeostàtic i metabòlic present en estadis avançats de la cirrosi (39, 96). Diversos estudis han demostrat la presència d'alts nivells de noradrenalina i adrenalina en plasma de pacients cirròtics. De fet, la concentració de noradrenalina en plasma es considera un factor pronòstic independent de la cirrosi hepàtica (74). Aquesta estimulació del sistema nerviós simpàtic, s'entén com una resposta adaptativa a la vasodilatació arterial. Aquesta hiper-producció de catecolamines sembla que entri en conflicte amb la inhibició adrenèrgica a nivell d'arteria mesentèrica que hem observat en rates PVL i cirròtiques. Tot i així, l'origen de la hiper-activitat del SNS en malalts cirròtics no és homogeni, ja que s'han determinat òrgans i teixits en els quals no es detecten nivells elevats de noradrenalina. Un dels òrgans que presenta una major concentració de noradrenalina és el ronyó (75). El múscul també es considera una regió d'alta producció de noradrenalina, així, diferents estudis demostren un augment del

tràfic nerviós simpàtic en músculs de pacients cirròtics (76). Per altre banda, en les extremitats superiors es localitza una sobre producció de NA, fet que no passa en les extremitats inferiors (75), i de la mateixa manera, el SNS es troba elevat en músculs però no a la pell (76). Aquestes evidències, revelen que existeixen diferències regionals en la distribució de l'activació del sistema nerviós simpàtic en el context de la cirrosi. La inhibició de la transmissió adrenèrgica observada en el present estudi podria representar un fenomen local com a conseqüència de la hipertensió portal que contribuiria a agreujar la vasodilatació simpàtica, la qual seria la responsable de la hiperactivitat generalitzada del sistema nerviós simpàtic, especialment en múscul i ronyó. A més a més, l'administració d'agonistes adrenèrgics  $\alpha$ , com la midodrina i la noradrenalina, milloren la funció renal del síndrome hepatorenal, el qual representa una conseqüència de la hipertensió portal avançada. Aquesta evidència, suggereix que en alguns territoris la transmissió adrenèrgica no es troba accentuada sinó reprimida.

Altres autors, han fet referència al possible dèficit local de la transmissió adrenèrgica en la hipertensió portal. Així, Joh i col·laboradors (70), han demostrat que en rates PVL, el bloqueig adrenèrgic  $\alpha$ , no produeix canvis en el diàmetre arteriolar de la microcirculació intestinal, mentre que el bloqueig de la vasopressina o l'angiotensina esta associat a una dilatació de les arterioles de la vasculatura intestinal. Aquest resultat, suggereix una pèrdua del to vascular adrenèrgic en el context de la hipertensió portal. De la mateixa manera, s'ha demostrat que el NPY, que potencia la vasoconstricció adrenèrgica via els receptors Y1, té un efecte més pronunciat en rates PVL que en les control, on és capaç de millorar la contractilitat vascular, revertint la hipo-resposta adrenèrgica vascular esplàncnica (72). Aquest resultat també apuntaria la deficient regulació adrenèrgica en la vasculatura mesentèrica en la hipertensió portal.

De la multitud de mediadors vasculars estudiats com a possible responsables de l'alteració hemodinàmica de la hipertensió portal, l'òxid nítric és el més ferm candidat. Nombrosos estudis han demostrat que la inhibició del NO millora el síndrome circulatori hiperdinàmic crònic tant en les rates PVL, com en rates i pacients amb cirrosi hepàtica. A part del NO, altres vasodilatadors, humorals i paracrins, han estat subjecte d'estudi. El paper que juga cadascun d'aquests no està plenament definit. Tot i així, és possible que puguin tenir una importància en l'inici de l'activació del NO, que col·laborin amb el NO a la vasodilatació o que empitjorin la vasodilatació en moments puntuals o en fases més avançades de la hipertensió portal. Aquests mediadors, han adquirit més rellevància al demostrar-se que els ratolins deficients de eNOS desenvolupen el síndrome circulatori hiperdinàmic. Tot i l'esforç per determinar nous mecanismes de la vasodilatació arterial, és cert que s'ha prestat molt poca atenció a un dels principals mediadors de la resistència vascular: els nervis autonòmics eferents. Principalment, el to vascular es troba regulat pels nervis vasoconstrictors adrenèrgics així com els nervis vasodilatadors nitrèrgics, els quals alliberen neurotransmissors en resposta a la informació elèctrica que reben des del sistema nerviós

central. S'ha demostrat, que existeix una sobre-expressió de la NOS d'origen neuronal (nNOS) en les arteries mesentèriques de rates amb hipertensió portal (97, 98). Aquesta activació de nNOS implica un augment de NO, el qual indueix una relaxació de les cèl·lules del múscle llis de l'arteria mesentèrica. Aquesta via de vasodilatació neuronal depenent de nNOs, té un paper important en el síndrome circulatori hiperdinàmic. Per tant, és possible, que la combinació dels dos fenòmens, la inhibició de la transmissió adrenèrgica i l'activació de la vasodilatació nitrèrgica, contribueixi substancialment al desenvolupament de la vasodilatació esplàncnica. De fet, existeixen estudis que indiquen la interacció entre els neurotransmissors autonòmics NA i NO en la regulació del to vascular. Per una banda, s'ha suggerit que el NO pre-sinàptic endogen inhibeix l'alliberament neuronal de NA de les terminals nervioses adrenèrgiques (77). Aquesta hipòtesi es basa en el fet que inhibidors selectius de nNOS (L-VNIO) augmenten la resposta vasoconstrictora en resposta de l'estimulació elèctrica dels nervis peri-vasculars de l'arteria mesentèrica. Per altre banda, es creu que la noradrenalina redueix l'alliberament de NO de les terminals eferents nitrèrgiques, via l'activació del adrenoreceptor pre-sinàptic  $\alpha_2$  (99).

En resum, en aquest primer treball, s'ha detectat un grup de gens implicats en la neurotransmissió, especialment adrenèrgica, que presenta una co-regulació en les artèries mesentèriques de rates PVL i cirròtiques. Aquesta infra-expressió adrenèrgica, suggereix una alteració del sistema autonòmic simpàtic en les arteries mesentèriques de rates amb hipertensió portal. Finalment, la inhibició de la transmissió simpàtica podria contribuir al desenvolupament de la vasodilatació esplàncnica associada a la fisiopatologia de la hipertensió portal.

## 6.2 ATRÒFIA SIMPÀTICA A LA HIPERTENSIÓ PORTAL

Un dels objectius d'aquest segon treball es basa en la localització cel·lular dels RNAm dels gens relacionats amb la transmissió adrenèrgica detectats tant per la tècnica dels microxips de DNA com per la PCR a temps real en les mostres de SMA. Tot i no tractar-se d'un objectiu que impliqui un avenç directe en la fisiopatologia de la hipertensió portal considerem que la localització d'aquests transcrits resulta una aportació beneficiosa per la interpretació dels resultats. Clàssicament, el cos neuronal de les cèl·lules s'ha considerat la regió exclusiva de síntesi de proteïnes amb el posterior transport d'aquestes noves proteïnes a través dels axons fins a la zona d'acció sinàptica. Donat que en el primer treball no es van determinar cossos neuronals en les mostres d'artèria mesentèrica, la procedència dels transcrits detectats va esdevenir un enigma. La quantificació relativa de l'expressió dels gens de la Th i la Dbh, en les seccions proximals i distals a l'origen aòrtic de la SMA, revela que els transcrits d'aquests gens es localitzen principalment en la part proximal del vas. En concordança amb aquest resultat, la hibridació in situ del RNA missatger del gen de la Th en

mostres de SMA, demostra la presència d'aquests transcrits tant en les neurones que componen el gangli mesentèric, com dins dels nervis perivasculars de la SMA. A més, la detecció de Th és més evident en els talls proximals a l'origen aòrtic, on es localitza el gangli mesentèric, que no pas en les seccions distals, on la detecció resulta pràcticament nul·la. Aquest resultat demostra que els RNA missatgers implicats en la transmissió adrenèrgica es sintetitzen en els somes neuronals del gangli mesentèric superior i una proporció d'aquests, són transportats a través dels axons, on s'aniran traduïnt a proteïna. Diverses evidències, han posat en dubte la via canònica de la traducció dels RNAm únicament als somes neuronals. De fet, el descobriment de poliribosomes en les dendrites i la subseqüent identificació de diferents espècies de RNA missatgers en aquestes projeccions neuronals indica que la síntesi de proteïnes es pot donar en els mateixos axons, inclús a distàncies remotes del cos neuronal (100). La traducció local als axons ha estat essencialment integrada amb aspectes relacionats amb la síntesi de proteïnes destinades al desenvolupament, creixement i regeneració neuronal (101). Així, la determinació de components moleculars de la maquinària traduccional en els axons del sistema simpàtic, és un fet més freqüent del que fins ara s'havia descrit.

El resultat més destacat d'aquest treball és la marcada regressió dels nervis peri-vasculars simpàtics en les SMA de rates amb hipertensió portal procedents de dos models experimentals diferents, el model PVL i el model BDL. L'anàlisi morfològic de les fibres simpàtiques de la SMA es realitza en base als resultats de la immunohistoquímica de Th en aquestes artèries. Comparat amb els animals control, les rates amb hipertensió portal presenten una disminució significativa del nombre i de l'àrea total dels nervis simpàtics, així com de l'àrea amb immunodetecció positiva per Th. Aquest retrocés del sistema nerviós simpàtic en les artèries mesentèriques proporciona una base racional que explicaria la inhibició de la transmissió adrenèrgica observada en les SMA de rates amb hipertensió portal. D'aquesta manera, la infra-expressió genètica i proteica de la transmissió adrenèrgica localitzada en la SMA de rates amb hipertensió portal s'acompanya d'una regressió del sistema autònom simpàtic en aquesta artèria. Per altre banda, s'han determinat correlacions entre les dades morfològiques de les fibres simpàtiques i els paràmetres hemodinàmics dels animals. Principalment, existeix una forta correlació positiva entre la resistència mesentèrica i tots els paràmetres morfològics de les estructures nervioses, tant en el model de PVL com en BDL. Aquesta sincronia entre la hemodinàmica i la morfologia dels nervis simpàtics, suggereix que la regressió de la innervació simpàtica podria col·laborar en el desenvolupament de les alteracions hemodinàmiques associades a la hipertensió portal. Així, una inhibició dràstica del sistema nerviós simpàtic en les SMA de les rates PVL, implicaria un descens pronunciat de la resistència mesentèrica. Tanmateix, la disminució consistent de proteïnes involucrades en la síntesi i alliberament de noradrenalina en mostres d'arteries de resistència de rates amb hipertensió portal respecte les sham, apunta que el trastorn adrenèrgic associat a la hipertensió portal s'establiria de forma generalitzada a

la vasculatura mesentèrica. De fet, diversos estudis indiquen que les artèries de resistència, que controlen la major part de la resistència vascular al flux sanguini, es troben alterades en la hipertensió portal (102). Per tant, resulta lògic que la regressió simpàtica localitzada en el tronc principal de l'arteria mesentèrica, s'extengui a les artèries mesentèriques de resistència, on es produeix, en gran mesura, els canvis estructurals com a resposta de l'augment del flux sanguini.

Diversos estudis evidencien que la vasodilatació arterial esplàncnica associada a la hipertensió portal és un fenomen d'origen multifactorial. A part dels mecanismes descrits fins ara, com la hiper-producció de vasodilatadors (especialment l'òxid nítric) i l'alteració de la resposta als vasoconstrictors, l'atròfia simpàtica podria representar un nou factor present en els estats avançats de la hipertensió portal. Resulta evident, que l'atròfia mesentèrica simpàtica implicaria una reducció generalitzada del to de la vasculatura mesentèrica, donant lloc a un increment de l'activitat dels factors vasodilatadors, tant d'origen humoral com nerviós. En base als resultats obtinguts en l'estudi d'expressió diferencial de rates PVL en diferents punts en el temps, la disminució genètica de la transmissió adrenèrgica es dona als 14 dies post-lligadura, quan el procés d'alteració hemodinàmica ja és molt avançat. De fet, al cinquè dia post-lligadura, quan els animals ja presenten vasodilatació esplàncnica i síndrome circulatori hiperdinàmic, encara no s'observa infra-expressió dels gens relacionats amb la transmissió adrenèrgica. Aquests resultats indiquen que l'atròfia de la innervació simpàtica no seria el desencadenant de la vasodilatació arterial, ja que no participaria en les fases inicials d'aquest trastorn vascular, però en canvi, representaria un fenomen implicat en les fases avançades del síndrome hiperdinàmic associat a la hipertensió portal.

Arribat a aquest punt, podríem establir la següent hipòtesi: La inhibició de la transmissió adrenèrgica representa un fenomen localitzat a la vasculatura mesentèrica com a conseqüència de la hipertensió portal i contribueix a empitjorar la vasodilatació esplàncnica. Per tal d'emmarcar aquesta hipòtesis en un context d'hiperactivitat simpàtica generalitzada, s'han explorat altres territoris no mesentèrics. Els resultats de l'anàlisi dels nervis simpàtics que innerven les artèries renals, donen força al concepte de la inhibició local mesentèrica. Per una banda, s'ha determinat que no existeixen diferències entre els paràmetres morfològics dels nervis simpàtics (nombre de nervis, àrea simpàtica total i àrea tenyida per Th) entre les artèries renals de rates PVL i sham. Per altre banda, tampoc apareixen diferències significatives al quantificar el nivell de proteïnes adrenèrgiques en les artèries renals dels dos grups. Així, la hipertensió portal desencadenaria una atrofia dels nervis simpàtics de les artèries mesentèriques, inhibint l'alliberament de neurotransmissors i potenciant la vasodilatació d'aquests vasos. De manera simultània, les fibres simpàtiques d'altres territoris (arteria renal), que no estarien afectades per l'atrofia nerviosa mencionada, contribuirien a augmentar l'activitat simpàtica descrita en pacients cirròtics.

Les evidències d'altres situacions clíniques que presenten atrofia simpàtica són limitades. Les malalties derivades d'un trastorn del sistema autònom produeixen una hipotensió ortostàtica

com a conseqüència de la manca de vasoconstricció secundària a la deficient alliberació de noradrenalina de les terminals post-ganglionars simpàtiques. Dins d'aquest grup de malalties, es troba l'atrofia sistèmica múltiple així com la insuficiència autonòmica pura la qual no només implica una alteració en la transmissió adrenèrgica sinó també una pèrdua de neurones post-ganglionars simpàtiques (103). També existeixen altres trastorns on l'alteració del sistema autonòmic forma part d'un procés de neurodegeneració generalitzat, entre aquestes, la diabetes mellitus és la causa més freqüent de disfunció autonòmica (104). En aquest cas, la pèrdua de neurones simpàtiques es desencadena bàsicament com a conseqüència d'un trastorn metabòlic i isquèmic.

Els mecanismes responsables de la regressió simpàtica en rates amb hipertensió portal són encara desconeguts. Les neurotrofines són una família de factors de creixement que promouen la supervivència de les neurones tant en el sistema nerviós central com en el perifèric (105, 106). Segons la teoria neurotròfica, les neurones han de competir per aquests factors secretats pel teixit diana, de tal manera que les neurones que aconseguen la concentració adequada viuran, mentre que les que no ho aconseguen entraran en el procés de mort cel·lular programada. Les neurotrofines inclouen, per ordre de descobriment, el factor neurotròfic de creixement (NGF), el factor neurotròfic derivat de cervell (BDNF), i les neurotrofines 3 i 4 (NT3 i NT4). Els efectes de les neurotrofines estan mediatos per la interacció i activació dels receptors específics de la família TrK, que pertanyen a la superfamília de receptors amb activitat tirosina kinasa. Una vegada activats, desencadenen la fosforilació de tirosines de proteïnes cel·lulars, que a la vegada propaguen els efectes de les neurotrofines de les cèl·lules. TrK A, B i C són els receptors específics per NGF, BDNF i NT3, respectivament, encara que TrKB també té capacitat d'interaccionar amb NT3. A més, les neurotrofines poden interaccionar amb menys afinitat amb un receptor comú denominat p75<sup>NTR</sup>. Diversos estudis demostren, que la integritat de les neurones simpàtiques és dependent de NGF i NT3. De fet, ratolins deficientes de NGF o del seu receptor TrKA, perden el 80% de les neurones simpàtiques abans de la segona setmana post-natal (107). Per altre banda, la reducció considerable (50%) de les neurones simpàtiques que s'observa en mutants per NT3, indica que aquesta neurotrofina també és essencial en la supervivència de les neurones simpàtiques (108). Un possible mecanisme, pel qual es podria donar l'atrofia de la innervació simpàtica observada en rates amb hipertensió portal, podria ser una infra-expressió local d'aquestes neurotrofines, secundària a l'activació de senyals neuronals pre-ganglionars o bé de mediadors vasculars, derivada de la hipertensió portal. De fet, l'anàlisi de l'estudi d'expressió gènica diferencial realitzat per microarrays a l'estudi anterior (89) va demostrar que existia una inhibició de l'expressió dels receptors de les neurotrofines d'alta (TRK A i B) i baixa afinitat (p75<sup>NTR</sup>) en la SMA de rates PVL comparada amb les control. A més, el gen induïble per NGF (VGF), i regulat per BDNF i NT3, que juga un paper important en la sinaptogènesi (109), també presentava una forta infra-expressió

en rates PVL. La inhibició tant marcada d'aquests gens, suggereix que la via de senyalització de les neurotrofines, es troba alterada en les SMA de rates amb hipertensió portal. En la mateixa línia, l'estudi de microarrays mencionat, va revelar una marcada infra-expressió ( $\log_2 < -2$ ) d'un gran nombre de gens relacionats amb la diferenciació neuronal, la neurogènesi així com en processos de creixement axonal en les SMA de rates amb hipertensió portal. Així doncs, és possible, que la inhibició d'aquests gens relacionats amb la supervivència neuronal indiqui una disfunció dels mecanismes de creixement de les neurones simpàtiques, que podria desencadenar una regressió de la innervació post-ganglionar simpàtica en la hipertensió portal.

La via neuronal que controla el sistema cardiovascular inclou el component aferent sensorial del sistema autonòmic, els centres reguladors cardiovasculars situats en el sistema nerviós central, i finalment, la branca efectora composta pels nervis post-ganglionars simpàtics i parasimpàtics. Considerant aquest esquema, la senyal responsable de la regressió simpàtica es podria originar en neurones pre-ganglionars o en altres neurones que posseeixin connexió sinàptica amb neurones post-ganglionars simpàtiques. Així, l'augment patològic de pressió originat per la hipertensió portal en la vasculatura mesentèrica, desencadenaria un senyal que arribaria al sistema nerviós central via els nervis autonòmics aferents. Com a resposta de la senyal efectuada pel sistema nerviós central, la via de senyalització de les neurotrofines i altres mecanismes de creixement cel·lular es veuria alterada, donant lloc a una atrofia simpàtica localitzada en la vasculatura mesentèrica. En aquest sentit, és important mencionar que tot i existir controvèrsies (110), existeixen estudis que suggereixen que l'eliminació dels nervis aferents primaris, per l'administració de capcaïna, inhibeix el desenvolupament del síndrome circulatori hiperdinàmic, així com la presència d'ascites en rates PVL i cirròtiques (111-113)

En resum, aquest segon treball, ha demostrat l'origen ganglionar i axonal dels RNA missatgers relacionats amb la neurotransmissió adrenèrgica i que presenten una marcada infra-expressió en les mostres de SMA de rates amb hipertensió portal (89). A més, la inhibició de la transmissió adrenèrgica, que no només es localitza en l'arteria mesentèrica superior de rates amb hipertensió portal sinó que també s'estén a les artèries mesentèriques de resistència, esta acompanyada d'una atrofia dels feixos axonals simpàtics que innerven aquesta vasculatura. Aquesta regressió simpàtica, podria ser la responsable dels nivells reduïts de noradrenalina determinats en les SMA de rates PVL (89), així com de la pèrdua del to vascular adrenèrgic observat en la microcirculació intestinal de rates amb hipertensió portal (18). Finalment, els resultats d'aquest treball, suggereixen que la hipertensió portal esta associada amb una regressió de la innervació simpàtica de la vasculatura mesentèrica, la qual podria contribuir a la vasodilatació esplàncica característica de la hipertensió portal.

### 6.3 POSSIBLE INDICACIÓ DE LA DROXIDOPA EN LA HIPERTENSIÓ PORTAL

L'efecte pressor de la forma enantiomèricament pura de la droxidopa (L-Dops) està descrita en rates i en humans. En rates anestesiades, l'administració de L-Dops per via oral i intravenosa, produeix un augment significatiu de la pressió arterial mitja però no implica canvis significatius en l'índex cardíac de l'animal. A més, la reducció de l'efecte pressor de L-Dops com a resposta de la inhibició de l'enzim L-aromàtic aminoàcid descarboxilasa (LAAAD) així com pel bloqueig dels receptors adrenèrgics  $\alpha$ , constata que l'augment de la MAP és el resultat de la conversió gradual de L-Dops a noradrenalina, regulada per LAAAD (114). Tanmateix, existeixen estudis que evidencien l'efecte clínic de L-Dops en trastorns relacionats amb la hipotensió arterial. L'atròfia múltiple sistèmica (MSA) i la insuficiència autonòmica pura (PFA) confereixen dos exemples de processos patològics que impliquen una insuficiència autonòmica crònica. Per una banda MSA, comporta un trastorn de la neurotransmissió adrenèrgica degut a una reducció de les proteïnes que regulen el tràfic adrenèrgic, mentre que una pèrdua de neurones simpàtiques post-ganglionars seria la responsable de la deficiència simpàtica en malalts amb PAF (115). En aquests dos grups de pacients, l'administració oral de L-Dops resulta amb una millora dels símptomes de la hipotensió ortostàtica (incapacitat de mantenir la bipedestació, inestabilitat i caigudes) com a resultat d'un increment dels nivells de noradrenalina en plasma.

Tot i que en estudis inicials, es va utilitzar la mescla racèmica de D-threo-Dops i de L-threo-Dops, de seguida es va constatar que la formulació òptima del tractament era L-Dops. L'explicació d'aquest fet es racionalitza en base a la possible inhibició competitiva de D-threo-Dops per la descarboxilació de L-threo-Dops regulada per LAAAD. De fet, només la forma enantiomèricament pura L-threo-Dops dona lloc a la conversió de la forma biològicament activa de la noradrenalina, L-NA.

El resultat de la síntesi orgànica simple de la droxidopa és la mescla dels enantiòmers D-threo-Dops i L-threo-Dops, en proporcions iguals. A més, la síntesi enantioespecífica de L-threo-dops, que requereix una purificació enantiomèrica per mètodes químics o enzimàtics és molt costosa i complicada (116). Així doncs, el fet que només trobéssim comercialment disponible la mescla racèmica d'aquest compost i malgrat la premissa de que l'efecte pressor exercit per aquesta mescla és inferior que el produït per la forma enantiomèricament pura, ens vam proposar determinar l'efecte de la mescla racèmica D,L Dops en els paràmetres hemodinàmics de rates amb hipertensió portal. A més, el fet que l'administració endovenosa de noradrenalina en pacients amb cirrosi hepàtica, millori la funció renal del síndrome hepato-renal, dona força al tractament de les alteracions hemodinàmiques associades a la hipertensió portal basat amb fàrmacs pro-adrenèrgics. El resultat més destacat d'aquest darrer estudi és l'augment de la MAP, secundari a l'administració endovenosa de D,L-Dops, en rates PVL amb hipotensió arterial. De fet, l'efecte pressor de L-Dops

ja és evident als 30 segons després de l'administració de la mescla i assoleix l'increment de pressió màxim (15% respecte el basal) als 10 minuts. En aquest moment, el valor de la MAP de l'animal (122 mm Hg) és pràcticament el valor que correspondria a una rata sham. Aquest resultat demostra que l'administració endovenosa de la mescla racèmica D,L-Dops normalitza els nivells de la MAP en rates amb hipertensió portal pre-hepàtica. Tot i que d'una manera més atenuada, la pressió portal (PP) també es corregeix significativament amb l'administració endovenosa d'aquest compost. L'efecte del fàrmac amb la reducció significativa de la pressió portal és evident als 20 minuts després de la seva administració. Als 30 minuts apareix la reducció màxima (7% respecte el nivell basal). Finalment, no s'han determinat canvis significatius en el flux ni en la resistència mesentèrica.

El mecanisme pel qual la mescla racèmica produeix un efecte beneficiós, especialment en la MAP, de les rates amb hipertensió portal, s'explicaria per l'increment del to simpàtic produït per la conversió de L-Dops a L-noradrenalina. Donat que la droxidopa és un aminoàcid neutre, pot ser capturat per totes les cèl·lules que posseeixin un transportador per aquest tipus d'aminoàcid, com és el cas dels nervis simpàtics així com de diverses cèl·lules no neuronals. Aquestes cèl·lules no neuronals (del fetge o del ronyó), que a més, continguin l'enzim LAAAD, són susceptibles a produir la conversió de L-Dops a L-Noradrenalina (92). A causa de l'alteració de la innervació simpàtica en les SMA de rates amb hipertensió portal, una via important de l'augment dels nivells de noradrenalina en les rates PVL seria la conversió de L-Dops a NA en cèl·lules no neuronals i el subseqüent alliberament al torrent sanguini d'aquest neurotransmissor adrenèrgic. A més, l'alliberament de noradrenalina en les terminals simpàtiques no alterades també contribuiria a revertir el dèficit simpàtic.

Els resultats d'aquest treball revelen canvis en els paràmetres hemodinàmics en rates amb hipertensió portal com a resposta de l'augment del to simpàtic. Donat que l'efecte de L-Dops (de la mescla racèmica) no ha estat molt evident en el flux o en la resistència mesentèrica, posa en dubte la millora hemodinàmica esplàncnica en aquests animals. Tot i així, la reducció de la pressió portal i l'increment, encara que no significatiu, de la resistència mesentèrica, apunten que la millora de l'estat hiperkinètic de la circulació esplàncnica podria ser més evident, amb la utilització de la forma enantiomèricament pura, L-Dops. De totes maneres, l'administració de la mescla, D,L-Dops, implica una clara millora en l'hemodinàmica sistèmica de rates amb hipertensió portal.

Un altre aspecte important que s'extreu d'aquest treball és l'efecte pressor de la mescla racèmica que resulta ser més important del que s'havia descrit. De fet, en un estudi realitzat en rates control (117), l'administració de la forma pura L-Dops, implica un increment màxim de 18 mm Hg. En el present treball, tot i l'administració de la mescla dels dos enantiòmers, l'augment de pressió màxima és 16 mm Hg. El fet que la diferencia en l'efecte pressor de la forma L-Dops i el de la

mescla racèmica sigui mínima, pot ser degut a les condicions en què s'ha realitzat l'experiment. Per una banda, la concentració de la mescla és 5 vegades superior a l'utilitzada en l'estudi mencionat. Aquest augment implicaria un increment en la biodisponibilitat de la forma activa, L-Dops. Per altre banda, donat que les rates utilitzades, presenten hipertensió portal, la pressió arterial basal (abans de l'administració del fàrmac) dels animals en el present estudi és més baixa.

En resum, el resultat d'aquest treball realitzat amb la mescla racèmica, evidencia l'efecte potencial de L-Dops en el tractament de les alteracions hemodinàmiques derivades de la hipertensió portal. L'augment marcat de la MAP, així com una notable disminució de la PP secundària a l'administració de la mescla racèmica en rates amb hipertensió portal, suggereix la importància d'un estudi basat en l'efecte pro adrenèrgic de L-Dops en la resposta hemodinàmica, sistèmica i esplàncnica, de rates amb hipertensió portal.

#### 6.4 NOVES HIPÒTESIS

Independentment dels factors humerals implicats en la vasodilatació esplàncnica, aquesta tesi també planteja la participació del sistema simpàtic en la fisiopatologia de la vasodilatació mesentèrica. Una possible especulació del mecanisme pel qual es donaria la regressió simpàtica en la vasculatura mesentèrica, seria la següent: l'estímul produït pel mateix augment de la pressió portal, o bé per l'increment de la pressió en la vasculatura mesentèrica o en la microvasculatura intestinal, originaria una senyal que seria transmesa per les fibres aferents primàries fins al nucli cardiovascular regulador del sistema nerviós central. En resposta a aquest estímul, les neurones post-gangliòniques simpàtiques entrarien en un procés d'atròfia, possiblement desencadenat per l'absència dels factors que regulen la supervivència i el manteniment d'aquestes neurones (neurotrofines). Finalment, el dèficit del to simpàtic amb la subseqüent reducció de nivells de noradrenalina en la vasculatura mesentèrica, contribuiria en l'empitjorament de la vasodilatació esplàncnica associada a la hipertensió portal (figura 8).

La determinació d'una alteració simpàtica en la fisiopatologia de la hipertensió portal, genera una sèrie d'interrogants, com les possibilitats terapèutiques que es deriven d'aquest trastorn. L'estudi de l'efecte de l'administració de la mescla de D i L-threo-Dops, en la hemodinàmica de rates amb hipertensió portal, és una bona aproximació al tractament pro-adrenèrgic dirigit a revertir el dèficit simpàtic de la hipertensió portal. L'efecte significatiu de la mescla racèmica en rates amb hipertensió portal (augment de la MAP i reducció de la PP) obra una via de recerca al voltant de la possible indicació de L-threo-Dops en el tractament de la hipertensió portal.

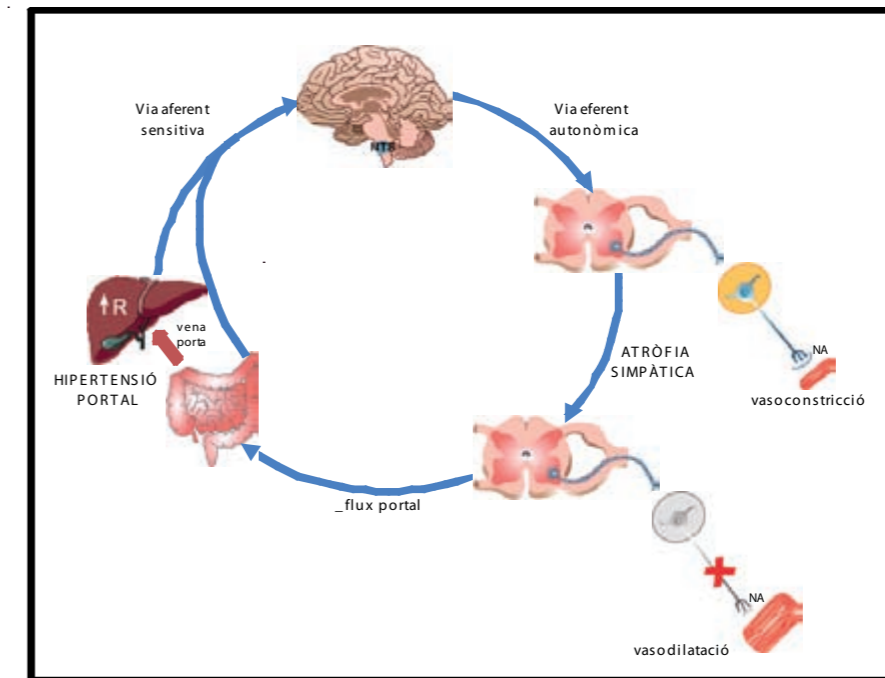


Figura 8. Contribució de l'atròfia post-ganglionar simpàtica a la vasodilatació mesentèrica  
NA: Noradrenalina; R: Resistència vascular portal; NTS: nucleus tractum solitarius

## 7. CONCLUSIONS



1. La detecció d'un grup de gens relacionats amb la neurotransmissió, especialment adrenèrgica, que presenta una infra-expressió en les artèries mesentèriques de rates amb hipertensió portal, suggereix una disfunció del sistema autonòmic simpàtic que podria contribuir a la vasodilatació esplàncnica associada a la hipertensió portal.
2. Els RNA missatgers implicats en la transmissió adrenèrgica es sintetitzen en els somes neuronals del gangli mesentèric superior i part d'aquests, són transportats a través dels axons, on té lloc la traducció a proteïna.
3. La infra-expressió genètica i proteica de la transmissió adrenèrgica localitzada en l'artèria mesentèrica superior de rates amb hipertensió portal s'acompanya d'una atròfia del sistema autonòmic simpàtic en aquesta artèria.
4. Existeix una correlació positiva entre la resistència mesentèrica i el desenvolupament de l'atròfia dels nervis post-ganglionars simpàtics de l'artèria mesentèrica de rates amb hipertensió portal.
5. La regressió de la innervació simpàtica localitzada en el tronc principal de l'arteria mesentèrica de rates amb hipertensió portal, s'extén a tot el territori mesentèric, específicament, a les arteries mesentèriques de resistència.
6. La inhibició de la transmissió adrenèrgica representa un fenomen localitzat a la vasculatura mesentèrica com a conseqüència de la hipertensió portal i contribueix a empitjorar la vasodilatació esplàncnica
7. L'efecte significatiu de la mescla racèmica D,L-threo-Dops en rates amb hipertensió portal obra una via de recerca al voltant de la possible indicació del fàrmac pro-adrenèrgic, L-threo-Dops, en el tractament de la hipertensió portal.

## 8. MATERIAL I MÈTODES

## 8.1 TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 8.1.1 Tècniques relacionades amb l'estudi d'expressió gènica diferencial

#### 8.1.1.1 Microarrays de DNA

##### Extracció i conservació de la mostra

Obtenim mostres d'artèria mesentèrica superior (la màxima quantitat d'artèria possible, des de l'inici aòrtic fins les primeres ramificacions) per duplicat (2 rates per punt), i en 6 punts en el temps: 1 hora, 6 hores, 24 hores, 3 dies, 5 dies i 14 dies post-ligadura o cirurgia sham. La mostra es submergeix immediatament en una solució de conservació de RNA, RNAlater (Ambion, Inc., Austin, TX) i es guarda a 4°C fins al processament de la mateixa.

##### Extracció del RNA

Per tal d'homogeneitzar la mostra utilitzem l'homogeneitzador Fast Prep (Qbiogene, Montreal, Canada), instrument dotat d'un rotor que es mou a alta velocitat i en múltiples direccions, capaç d'homogeneitzar mostres en un període de temps molt curt. Dipositem la mostra en tampó de lisis, 6µL de Beta-mercaptoetanol (14.3M) i 600µL de buffer RLT (que conté tiocianat de guanidini), en un tub específic pel Fast Prep que conté unes boles de ceràmica.

Per realitzar l'extracció, s'utilitzen columnes de Qiagen (Valencia, CA, USA), *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit*, específiques per teixit fibrós abundant en proteïnes contràctils, teixiu connectiu i col·lagen.

- Transferim l'homogeneïtzat a un tub eppendorf i afegim 492µL d'H<sub>2</sub>O (lliure de RNases) i 8µL de Proteïnasa K.
- Incubem a 55°C durant 10 minuts.
- Centrifuguem 3 min a 14.000 rpm.
- Pipetegem el sobrenedant a un nou tub.
- Afegim 350µL d'etanol.
- Pipetegem la mostra a una columna que conté un tub col·lector. Centrifuguem 15 segons a 10.000 rpm.
- Afegim 350µL del buffer RW1 (tampó de rentat que conte alcohol i tiocianat de guanidini) a la columna. Centrifuguem 15 segons a 10.000 rpm.
- Per eliminar la possible contaminació de DNA, apliquem 80µL de solució de DNAsa (10 µL DNAsa, 27.3 unitats + 70µL buffer RDD) directament al centre de la membrana de la columna, deixem actuar l'enzim durant 15 min.
- Pipetegem 350µL del tampó de rentat a la columna. Centrifuguem 15 segons a 10.000 rpm.

- Transferim la columna a un nou tub col·lector de 2mL.
- Pipetegem 500µL del segon tampó de rentat (RPE) a la columna. Centrifuguem 15 segons a 10.000 rpm.
- Transferim la columna a un nou tub col·lector de 2mL.
- Pipetegem 500µL del segon tampó de rentat (RPE) a la columna. Centrifuguem 2 minuts a 10.000 rpm.
- Afegim 500µL d'etanol al 80% per tal d'assecar la membrana. Centrifuguem 2 minuts a 10.000 rpm.
- Per eluir l'RNA transferim la columna a un tub eppendorf de 1.5mL. Pipetegem 50µL d'aigua lliure de RNases directament al centre de la membrana i centrifuguem a la màxima velocitat (14.000 rpm). Repetim amb 50µL més d'aigua.

##### Precipitació del RNA

Als 100µL obtinguts de l'elució de RNA, s'afegeix:

- 1µL Poliacrilamida Lineal (carrier).
- 10µL d'acetat de Na (3M, pH 5.5).
- 250µL d'etanol (100% v/v).
- Ho deixem tota la nit a -20°C. L'endemà, centrifuguem durant 20 minuts, a 14000 rpm i a 4°C.
- Resuspenem el pellet amb 13 µL d'aigua lliure de RNases.

##### Control del RNA

Quantifiquem l'RNA obtingut amb l'espectrofotòmetre Nanodrop (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA). A més a més, realitzem un control de la integritat d'aquest RNA mitjançant l'equip 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), on les diferents mostres de RNA són separades i monitoritzades (detecció fluorescent amb làser). El software del *Bioanalyzer* genera un gel virtual, una nota de l'1 al 10 d'integritat de l'RNA (RIN), i un coeficient entre els dos pics ribosomals (18s i 28s), que fa possible determinar el grau de degradació de la mostra. Considerem que la mostra de RNA és un material de partida vàlid pel subseqüent estudi d'expressió gènica diferencial si el RIN és igual o superior a 7, i si el coeficient dels pics ribosomals està entre 2,5 i 3.

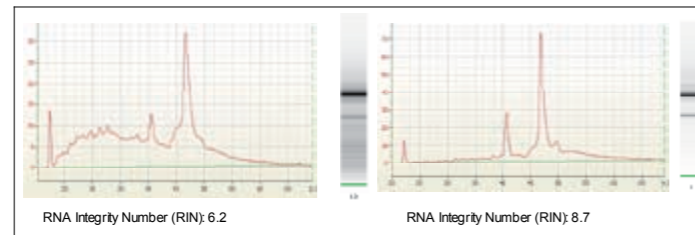


Figura 9. Perfils de RNA total

### Amplificació per transcripció in vitro

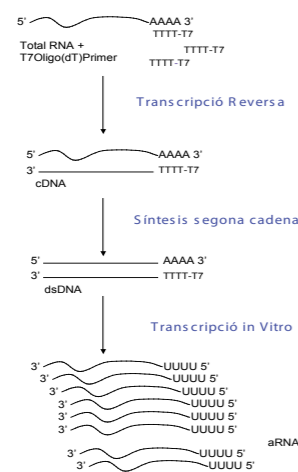


Figura 10. Amplificació in vitro

Amb l'objectiu d'amplificar linealment cadascun dels RNAs missatgers presents en les mostres d'artèria mesentèrica i obtenir les seqüències anti sentit de les mateixes (aRNA), realitzem una amplificació per transcripció in vitro seguint el protocol del kit *Amino Allyl MessageAmp aRNA amplification kit* (Ambion). Breument, l'amplificació consisteix en tres reaccions enzimàtiques consecutives (figura 10), inicialment es sintetitza la primera cadena de cDNA, la qual conté la seqüència del promotor de la T7 polimerasa a l'extrem 5' mitjançant un primer que consta d'un oligo dT seguit del promotor de la T7 polimerasa. Seguidament, té lloc la síntesi de la segona cadena de cDNA, que donarà a lloc al DNA motlle per la transcripció in vitro. L'objectiu d'aquesta última reacció es generar múltiples còpies de RNA on part dels nucleòtids UTP són reemplaçats per 5-(3-aminoalil)-UTP(aaUTP), el qual disposa d'una amina primària que posteriorment, durant el marcatge, s'enllaçarà de manera covalent al grup ester dels fluorocroms cianines (NHS esters).

### • Transcripció reversa

Per tal de sintetitzar la primera cadena de cDNA que contingui la seqüència del promotor de la T7 a l'extrem 5', es dur a terme una transcripció reversa utilitzant un encebador que conté un oligo (dT) seguit del promotor de la T7. D'aquesta manera, aconseguim seleccionar els RNAs missatgers, ja que aquests contenen una cua d'As.

- Mesclm 750ng de RNA total amb 1µL del primer T7Oligo (dT), i ajustem el volum a 12µL.
- Incubem les mostres 10 min a 70°C en un termociclador (en un bany oscil·laria massa la temperatura).
- Afegim 8µL a cada mostra de la barreja de reacció:

Reactius	Volum (µL)
tampó 1ra cadena 10X	2
barreja dNTPs	4
inhibidor de RNases	1
transcriptasa reversa	1

- Incubem 2 hores a 42°C en un termociclador.

### • Síntesi de la segona cadena de cDNA

Aquesta reacció pretén convertir la primera cadena de DNA (híbrid DNA-RNA) en una doble cadena de DNA, la qual representarà el motlle per la subseqüent transcripció. És necessari l'acció de dos enzims, la RNasa, per degradar el RNA, i la DNA polimerasa, per tal de sintetitzar la segona cadena del cDNA.

- Afegim 80µL a cada mostra de la barreja de reacció:

Reactius	Volum (µL)
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	63
buffer 2na cadena 10X	10
barreja de dNTPs	4
DNA polimerasa	2
RNAsa H	1

- Incubem 2 hores a 16°C en un termociclador deixant la tapa (que es troba a 100°C) oberta.

#### • Purificació del cDNA

La purificació de la doble cadena de cDNA és necessària per tal d'eliminar RNA, encebadors, enzims i sals que podrien inhibir la transcripció in vitro. Utilitzem unes columnes presents al kit.

- Afegim 250µL de Buffer específic pel cDNA a cada mostra
- Fem passar la barreja a través de la columna centrifugant 1 minut a 10.000g.
- Apliquem sobre la membrana de la columna 500µL de buffer de rentat. Centrifuguem 1 minut a 10.000g.
- Finalment, eluïm l'RNA amb 9µL d'H<sub>2</sub>O lliure de RNases i prèviament escalfada a 55°C. Abans de centrifugar deixarem en contacte l'H<sub>2</sub>O i l'RNA a temperatura ambient durant 2 minuts. Centrifuguem 2 minuts. Realitzem l'elució per duplicat de manera que el volum final sigui aproximadament de 16µL.

#### • Transcripció In Vitro

La síntesis del RNA antisentit per transcripció in vitro, genera múltiples còpies de RNA on part dels nucleòtids UTP son reemplaçats per 5-(3-aminoalil)-UTP (aaUTP), el qual disposa d'una amina primària que posteriorment, durant el marcatge, s'unirà químicament al grup ester del fluorocrom Cy5 o Cy3 (NHS ester).

El substrat d'aquesta reacció és la doble cadena de DNA que a la vegada actua com a motlle per a la T7 RNA polimerasa. D'aquesta manera, aconseguim una amplificació lineal de cadascun dels RNA missatgers presents en la mostra original.

- Afegim 26µL de la barreja de reacció a cada mostra:

Reactius	Volum (µL)
aaUTP (50mM)	2
barreja de ATP,CTP,GTP (25mM)	12
solució UTP (50mM)	4
buffer de transcripció 10X	4
solució de la T7 RNA polimerasa	4

- Incubem 14 hores a 37°C a l'estufa.
- Per parar la reacció afegim 60µL d'H<sub>2</sub>O lliure de RNases, assolint un volum final de 100µL.

#### • Purificació del aRNA

La purificació del RNA sintetitzat és necessària si es vol eliminar els nucleòtids no incorporats,

així com les sals, enzims o fosfats inorgànics que podrien estar presents. Així, aconseguim una millor estabilitat del RNA i assegurem una òptima reacció d'acoblament entre els grups amino al·lil i els fluorocroms.

- Afegim 350µL de buffer específic pel aRNA i 250µL d'etanol al 100%, a cada mostra
- Fem passar la mostra a través de la columna, centrifugant durant 1 minut a 10.000g.
- Apliquem 650µL de buffer de rentat al filtre. Centrifuguem 1 minut a 10.000g.
- Eluïm l'aRNA amb 100µL d'H<sub>2</sub>O lliure de RNases i escalfada a 60°C. Després de deixar que l'H<sub>2</sub>O i el RNA estiguin en contacte durant 2 minuts, centrifuguem 1.5 minuts.

#### Control de l'RNA antisentit

Quantifiquem per espectrofotometria (Nanodrop) l'RNA antisentit generat per cadascuna de les mostres. Partint de 750ng de RNA total per la transcripció reversa s'obté una mitja de 35µg per pool d'artèries. Amb l'objectiu de comprovar que les dues mostres que s'hibridaran conjuntament a l'array, és a dir mostres sham i PVL corresponents al mateix punt en el temps, presenten tamanys de transcrits semblants, comparem les corbes d'amplificació obtingudes a partir de la separació espectrofotomètrica mitjançant el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Per aconseguir una hibridació òptima, les corbes per a cadascuna de les mostres, han de presentar el màxim grau de solapament i el punt màxim d'aquestes ha d'estar al voltant de 1000 nucleòtids.

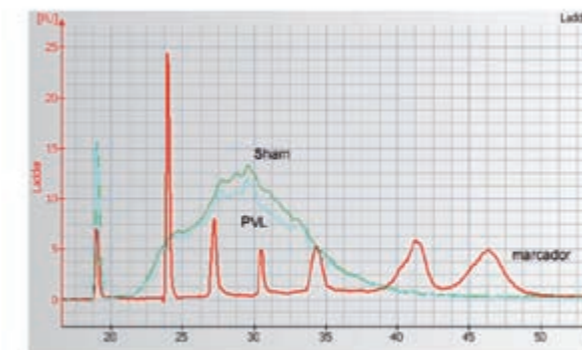


Figura 11. Perfils d'amplificació de aRNA

#### Marcatge de l'RNA antisentit

Es marquen amb fluorocroms (Cy3 o Cy5) 5µg de cada mostra, seguint el protocol del kit. El marcatge fluorescent de l'RNA antisentit es basa en la reacció química covalent d'acoblament entre el aminoalil del nucleòtid modificat UTP (aaUTP) i l'amina reactiva dels fluorocroms NHS ester, Cy3 i Cy5. Per cada punt en el temps, es marquen amb Cy5 les mostres de RNA de rates PVL i amb Cy3 les mostres de les rates sham, la cohibridació d'aquestes dona lloc al

xip directe. Per compensar les diferències de marcatge s'hibrida un segon xip on les mostres de RNA es marquen amb el fluorocrom contrari, xip dye swap. Així doncs, cada punt en el temps dona a lloc 4 reaccions de marcatge. Finalment, per tal de determinar la proporció de fluoròfor incorporat i la concentració final de RNA, es mesura amb el Nanodrop l'absorbància del RNA a 260nm i dels fluorocroms Cy3 i Cy5 a 550 i 650 nm, respectivament. Es considera una incorporació òptima, de 30 a 60 molècules de fluoròfor per cada 1000 nucleòtids.

- Liofilitzem (speedVac) 2 mostres control i 2 problema (5µg cadascuna).
- Resuspenem les mostres amb un buffer d'acoblament subministrat pel kit.
- Resuspenem un vial de Cy3 amb 22µL de DMSO, fem el mateix amb un vial de Cy5.
- Afegim 11µL de la solució de fluorocrom a cada tub.
- Deixem les mostres a la foscor i a temperatura ambient durant 30 minuts perquè la reacció de marcatge tingui lloc.
- Parem la reacció amb un excés de grups amino (4.5µL d'hidroxilamina per tub), bloquejant els Cys no incorporats.
- Portem el volum final a 30µL amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases.

#### Hibridació del RNA

Seguint el protocol del kit d'hibridació d'*Agilent Technologies* el qual subministra les solucions d'hibridació, la solució de RNA control, així com també la solució de fragmentació. Els microarrays que es van utilitzar, *Rat Oligo Microarray* (Agilent Technologies) contenen més de 20.000 sondes de 60 oligonucleòtids, dipositats en un suport de vidre, i representen aproximadament uns 18.000 gens.

Cada mostra de PVL es va hibridar amb la seva sham corresponent, la del mateix punt en el temps. Cada parella va generar dos experiments (xip directe i dye swap). En total es van utilitzar 12 arrays.

- Preparem les solucions d'hibridació del RNA diana:

xip directe	xip dye swap
750 ng RNA sham Cy3	750 ng RNA sham Cy5
750 ng RNA PVL Cy5	750 ng RNA PVL Cy3
500 ng RNA control 10x	500 ng RNA control 10x

- Portem les solucions a 240µL amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases.
- Afegim 10µL de tampó de fragmentació a cadascun dels tubs i incubem a 60°C durant 30 minuts. Fragmentant els transcrits evitem la formació d'estructures secundàries que podrien inhibir la posterior hibridació.
- Afegim 250µL de solució de hibridació 2x.

- Apliquem 490µL de la solució final amb molta cura sobre l'array corresponent, intentant que no quedin bombolles. Introduïm el xip dins la càmera d'hibridació i aquesta al forn que esta programat a la temperatura de 60° i amb moviment orbital de 4 rpm durant 17 hores.

#### Rentat dels arrays

El rentat dels arrays té com a finalitat l'eliminació, tant de la mostra marcada que no s'ha hibridat com de la hibridació inespecífica. Abans que la incubació finalitzés es preparem 2 solucions de rentat (SR1 i SR2) i les fem passar per un filtre de 0.2µm. Realitzem consecutivament 3 rentats diferents:

- Desmuntem les càmeres de hibridació, recuperant l'array, en una cubeta amb 250mL de la SR1.
- Col·loquem els arrays a un graella, situada dins d'una cubeta, submergida amb SR1. Rentem durant 10 minuts i en moviment (agitador magnètic).
- Utilitzem la mateixa graella del rentat anterior, que contenia els arrays, i la col·loquem en una nova cubeta, que a la vegada es troba dins d'un contenidor, amb SR2. L'espai que queda entre la cubeta i el contenidor, s'omple amb gel picat, mantenint així la temperatura de rentat a 4°C. També es realitza en moviment.
- Després de finalitzar l'últim rentat es assequem els arrays, utilitzant una pistola de N<sub>2</sub> que disposa gas a pressió i permet assecar el xip d'una manera ràpida i uniforme.

#### Lectura dels arrays

Realitzem un escaneig amb un lector de microarrays (GenePix 4100A, Axon Instruments Inc.) per tal de quantificar la fluorescència de cada gen. El lector, que consta de dos làsers diferents, escaneja l'array a dos longituds d'ona, 532nm i 635, excitant els fluoròfors Cy3 i Cy5, respectivament. Un fotomultiplicador converteix els fotons d'emissió en una senyal elèctrica, la qual és transformada a una imatge digital de bits/pixels mitjançant un convertidor. Per tal de digerir i extreure la informació que contenen les imatges adquirides utilitzem un programa d'anàlisi cru de les dades, GenePix Pro 5.0, el qual genera un fitxer GPR (Gene Pix Results) amb tota la informació necessària per realitzar l'anàlisi estadístic de les dades. Aquest programa també ens és útil per controlar la qualitat de l'array mitjançant una visualització de les dades i així, poder anul·lar punts o gens que creiem inadequats o vam donar bons aquells que el programa havia assignat com a nuls.

#### Anàlisi de les dades

Analitzem les dades obtingudes utilitzant el *Bioconductor Limma Package* <http://www.bioconductor.org/>.

- **Control de qualitat de l'array**

Es tracta d'un control general de la integritat de l'array. Es basa en comprovar que les correlacions entre els dos arrays, directe i dye swap, siguin bones, en calcular el percentatge de punts que han estat assignats com a nuls en comparació amb tots els presents al array, i finalment, en determinar quina fluorescència tenen els punts controls (positius, negatius i d'intensitat coneguda).

- **Correcció del soroll de fons**

Consisteix en eliminar aquells punts o gens que no superen determinats nivells d'intensitat (fluorescències inferiors a 250) o per al contrari, aquells amb intensitats tant elevades que superen la capacitat de detecció del sistema, aquests els anomenem saturats i presenten intensitats superiors a 65.000. El mètode que utilitzem s'anomena Edwards (118), i es caracteritza per evitar que una vegada el soroll de fons s'ha eliminat, els punts presentin nivells d'expressió negatius.

- **Normalització**

Una normalització és necessària per eliminar les components no biològiques que podrien afectar a les mesures de nivell d'expressió gènica, així doncs, la normalització permet corregir les diferències existents entre el xip directe i el dye swap, equilibrant les intensitats dels dos canals. Les fonts de variacions no biològiques entre les dues repliques tècniques poden ser degudes a diferències en la incorporació del fluorocrom a cada mostra, en la sonda dipositada a cada spot, en l'eficiència del marcatge, la pèrdua d'intensitat d'un dels fluorocroms (normalment Cy5) o a una variació en la potencia dels dos làser. La normalització que s'efectua s'anomena Loess (119) i es basa en dues premisses:

- La majoria dels gens de l'array no canvien substancialment la seva expressió en resposta a una situació determinada, així que la mitjana aritmètica dels valors relatius de l'expressió d'un gen en la mostra problema respecte la control ha de ser 1.  $Mitjana(F532/F635)=1$ .
- Considera que els arrays contenen una distribució a l'atzar d'un nombre elevat de gens, així, aleatòriament tindrem el mateix nombre de gens sobre-expressats que reprimits per ambdues mostres (problema i control) i per tant, la suma de les intensitats de la hibridació de tots els gens de l'array serà igual per a cada mostra.  $Mitjana[\text{Log}_2(\Sigma R/\Sigma G)]=0$ , on R és el canal vermell (Cy5) i G, el canal verd (Cy3).

- **Filtre de gens per nivell d'expressió**

Es realitza un filtre dels resultats obtinguts per així analitzar només aquells gens que tenen una

certa probabilitat d'estar regulats. Ens quedem amb aquells que presenten un valor d'expressió relatiu (*Mean fold change*) superior a 2, al menys en un dels 6 punts estudiats.

- **Anàlisi Temporal**

Utilitzem el programa maSigPro (120) per dur a terme un anàlisi de la tendència d'expressió gènica al llarg del temps, des de l'inici de la lligadura portal fins al cap de 14 dies. Aquest programa selecciona aquells gens amb perfil d'expressió tal que s'ajusta a un polinomi de segon grau amb coeficient de regressió ( $R^2$ ) major a 0.6. D'aquesta manera, seleccionem gens amb un perfil d'expressió diferencial estadísticament significatiu.

- **Agrupació en clústers**

Per tal de descobrir patrons d'expressió rellevants i determinar grups de gens que s'expressen (es regulen) de la mateixa manera al llarg de tot el procés, utilitzem l'algoritme PAMSAM (119) (clustering analysis algorithm), sota la premissa que aquells gens que comparteixen perfils d'expressió, son gens que estan co-expressant-se, i per tant les seves funcions biològiques podrien estar relacionades. Aquest algoritme agrupa els gens en grups o clústers amb perfil d'expressió similar.

- **Anàlisi funcional dels clústers**

Després d'haver agrupat els gens que tenien un patró d'expressió temporal comú, hauríem de determinar si algun cluster (conjunt de gens amb expressió similar) esta associat a algun fenomen biològic, o està associat a alguna funció molecular determinada. Realitzem un anàlisi d'ontologia gènica (Gene Ontology analysis). GO és una base de dades (<http://www.geneontology.org>) que conté anotacions genèriques que descriuen funcions moleculars, processos biològics i components cel·lulars associats a cadascun dels gens. Les anotacions assignades a cada gen estan organitzades de forma jeràrquica, així que termes de baix nivell seran més específics (ex: fotosíntesis) que no els situats en un alt nivell, els quals no distingeixen diferents espècies. Per determinar si una anotació GO, per exemple apoptosis, es troba significativament sobre o infra-representada en un cluster determinat, es compara el numero de gens presents al cluster vinculats a aquesta anotació amb tots els gens de l'array associats a aquest mateix GO.

- **Anàlisi de les relacions moleculars**

Per tal de determinar les potencials relacions moleculars existents entre els gens que finalment quedaven seleccionats, utilitzem el programa Pathway Architect® (Stratagene). Aquest programa crea una xarxa d'interaccions moleculars directes entre els gens d'interès

on cada unió, que representa una relació molecular determinada, esta justificada per cites bibliogràfiques disponibles al PubMed.

### 8.1.1.2 RT-PCR a temps real

Validem per PCR a temps real l'expressió diferencial, prèviament determinada amb l'experiment dels microarrays, de 50 gens, realitzant una quantificació relativa, a cada punt del temps estudiat, amb les mostres de RNA originals de les rates PVL i sham. A més a més, també ens abastem d'aquesta tècnica per estudiar l'expressió diferencial, dels 50 gens seleccionats, en mostres d'artèria hepàtica i artèria mesentèrica de rates cirròtiques comparada amb rates controls.

#### Extracció de l'RNA

L'extracció de l'RNA de les mostres de les artèries hepàtiques i mesentèriques de les rates cirròtiques i controls, es realitza amb les columnes d'extracció de Qiagen, utilitzant el kit RNeasy Fibrous Tissue Mini kit. Protocol explicat a l'apartat 1.1.1.1.

#### Transcripció Reversa

Utilitzem el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) que conté reactius per dur a terme la transcripció reversa (RT) de RNA total a cDNA. Partim de 300ng de RNA de la mostra i ho portem a un volum final de 50µL amb H<sub>2</sub>O lliure de RNases.

- Afegim a cada mostra 50 µL de la barreja de reacció:

Reactius	Volum (µL)
Tampó de RT 10X	10
solució de dNTPs 25X	4
random Primers 10X	10
transcriptasa Reversa, 50U/µL	5
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	18.5
inhibidor de RNases	2.5

- Utilitzem el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied biosystems), seguint les següents condicions:

	hibridació	extensió
temperatura (°C)	25	37
temps (min)	10	120

### PCR a Temps Real

Utilitzem unes targetes microfluídiques dissenyades per nosaltres i produïdes pel fabricant (Applied Biosystems) que disposen de 384 pous, on té lloc la reacció de PCR a temps real específica i determinada per la naturalesa de la sonda i dels *primers* que contenen. Cada placa conté 8 ports, lloc on es disposa la mostra, i aquests la reparteixen a 48 pous. En una placa hi passem 4 mostres (dos per port), que se sotmetran a un anàlisi d'expressió de 62 gens (inclòs el control endogen, 18s). Per cada mostra realitzem tres rèpliques tècniques. La quantificació relativa de cada gen respecte a la seva mostra control (PVL respecte sham a cada punt en el temps) es realitza mitjançant el mètode comparatiu Ct (*threshold cycle*). Definim la mostra la mostra sham corresponent en cada cas com la mostra calibradora. El resultat previ dels arrays ens van permetre escollir un gen endogen (gen que s'expressa de la mateixa manera tant en la mostra problema com en la calibradora) amb una certa fiabilitat, el gen que codifica el la proteïna ribosomal del 18s. Per determinar l'increment o disminució de l'expressió d'un gen determinat (RQ, *relative quantification*) de la mostra problema (PVL) respecte la control (sham), realitzem dues normalitzacions, la primera és la diferència entre el Ct del gen específic i el de l'endogen i la segona és la diferència entre aquest primer resultat i el Ct de la mostra calibradora, finalment la quantitat relativa (RQ) del gen es calcula com:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$

$$\frac{-C_t \text{ mostra} = C_t \text{ gen} - C_t \text{ control endògen}}{-C_t = -C_t \text{ mostra} - C_t \text{ mostra calibradora}}$$

Per determinar l'RQ de les mostres d'artèria mesentèrica i artèria hepàtica obtingudes pel model de tertaclorur de carboni, es calcula una mitja dels  $\Delta CT$ s de les mostres cirròtiques i de les mostres control, així el  $\Delta\Delta CT$  correspon a una diferència entre dues mitjanes.

- En un tub eppendorf, es mesclen 25 µL del producte de la RT, 25 µL d' H<sub>2</sub>O lliure de RNases i 25µL de la solució Taqman Universal Master PCR Master Mix (Applied biosystem), subministrada pel kit i que conté la DNA polimerasa (AmpliTag Gold), nucleòtids i tampons específics per aquesta reacció.
- Carreguem cada pou amb aquests 100µL.
- Centrifuguem cada placa durant 3 minuts a 12.000 rpm.
- Utilitzem el termociclador 7900HT (Applied Biosystems) amb les següents condicions:

	activació de la AmpliTag Gold	40 cicles	
		desnaturalització	hibridació/extensió
temperatura (°C)	94.5	97	59.7
temps (min)	10	0.5	1

## 8.1.2 Tècniques relacionades amb l'estudi de proteïnes

### 8.1.2.1 Western Blot

Per tal de determinar nivells d'expressió de proteïnes relacionades amb el sistema adrenèrgic, com la Th, Dbh o Snap 25, utilitzem la tècnica del Western blot, en mostres d'artèria mesentèrica superior, artèria renal, artèries de resistència i jejú.

#### Extracció i conservació de la mostra

Extraïem tant l'artèria mesentèrica superior com l'artèria renal esquerra, des del respectiu inici aòrtic fins a les primeres ramificacions, immediatament després, submergim les mostres en N<sub>2</sub> líquid, i finalment les conservem a -80°C fins el seu processament. A les mostres de jejú (uns 3 cm) se'ls hi efectua un rentat de l'interior (intentem conservar la mucosa intestinal) amb sèrum fisiològic abans de submergir-les en N<sub>2</sub> líquid, també es guarden a -80°C. Pel que fa a la glàndula adrenal, després d'aïllar-la del teixit connectiu que la rodeja, es congela en N<sub>2</sub> líquid i finalment s'emmagatzema a -80°C.

Pel que fa a l'extracció de les artèries mesentèriques de resistència, seguim el protocol descrit per Briones et al. (121). Després de l'exsanguinació de l'animal per decapitació, extreiem l'arc mesentèric i l'expandim sobre una superfície de silicó on queda submergit per una solució salina, solució de Krebs. Aquesta solució, s'ha de mantenir a 4°C. Amb l'ajuda del microscopi, les artèries de resistència de tercer, quart i cinquè ordre, es separen de la seva corresponent vena (component rígid) i del teixit gras i connectiu que les rodeja. Durant l'operació d'aïllament, la solució salina freda es renova cada 10 minuts. Finalment, aquests vasos es submergeixen en N<sub>2</sub> líquid i es guarden a -80°C.

#### Extracció de proteïnes

- Les mostres de teixit amb 250µL de tampó de lisis (10 mg deoxicolat sodi / ml RIPA) i 5 µL de solució d'inhibidors de proteases (Sigma-Aldrich) s'introdueixen dins dels tubs específics del Fast Prep (contenen unes boletes de ceràmica) i s'homogeneïtzen. El temps i la intensitat de la homogeneïtzació amb el *Fast Prep* varia segons la naturalesa del teixit.
- Durant 15 min es realitzen cicles de 10 segons vortex/gel (pel trencament de les parets cel·lulars).
- Deixem les mostres 60 minuts a -80°C.
- A continuació, la mostra es centrifuga a 13000 rpm durant 30 minuts, a 4°C.
- Finalment, es quantifica el sobrenadant mitjançant la detecció colorimètrica a 652 nm de l'assaig BCA (Pierce Biotechnology, IL, USA).

El rendiment de l'extracció de proteïnes varia en funció del teixit processat (taula).

	concentració (mg/mL)
SMA	2,6
Jejú	14,8
MRA	2
artèria renal	1
glàndula adrenal	12,4

#### Electroforesi SDS-PAGE (Mètode Laemmli)

Per l'electroforesi mono dimensional en gels de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS PAGE) utilitzem el sistema XCell SureLock™ d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) amb gels d'1mm de gruix amb un percentatge d'acrilamida del 12%, pel gel concentrador i del 4% pel gel separador. Com a control positiu per totes les proteïnes utilitzem un extracte de proteïna de glàndula adrenal d'una rata control.

- Posem el gel al mòdul i l'omplim amb *Running Buffer upper*, omplim la part exterior amb *Running Buffer Lower* fins al mateix nivell que l'*Upper*.
- Prepararem el gel de l'electroforesi, netejant-lo amb H<sub>2</sub>O destil·lada i omplint els pous amb l'ajut d'una xeringa amb *Running lower*.
- Preparam les mostres i el pes molecular (SeeBlue® prestained standard 1x), afegint tampó de carrega i un agent reductor.

reactiu	volum (µl)
extracte proteïna	7.8
NuPage LDS sample buffer 4x	3
NuPage LDS Reducing agent	1.2

reactiu	volum (µl)
pes molecular	3.6
NuPage LDS sample buffer 4x	3
NuPage LDS Reducing agent	1.2
H <sub>2</sub> O	4.2

- Seguidament, bullim les mostres a 95°C durant 10 minuts
- Carreguem 11µl de cada mostra i pes molecular
- Els gels es corren a voltatge constant de 120v durant aproximadament dues hores



### Electrotransferència

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es transfereixen a una membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) utilitzant el sistema Western Breeze (Invitrogen).

- En un vas de precipitats, col·loquem les esponges (Blotting Pads) en remull amb el tampó de transferència, per treure les bombolles d'aigua que podrien bloquejar la transferència.
- Hidratem les membranes (30 segons en metanol, 1 minut en H<sub>2</sub>O, 5 minuts en tampó de transferència).
- Mullem els papers de filtre amb el tampó de transferència i muntem el *sandwich* al Blot Module (Invitrogen), col·locant per ordre: 2 esponges, 1 paper de filtre, gel, membrana, 1 paper de filtre i 2 esponges més, procurant que no quedi cap bombolla entre cap de les capes que formen el *sandwich*.
- Omplim l'interior del mòdul (fins que el *sandwich* quedi cobert) i l'interior de la cubeta amb tampó de transferència
- La transferència es realitza durant una hora a una diferència de potencial de 30v.

Una vegada finalitzada la transferència, es comprova la presència de les proteïnes, tenyint la membrana, durant dos minuts, amb vermell de Ponceau (Sigma-Aldrich). Es renta amb H<sub>2</sub>O per eliminar l'excés de colorant.

### Immunodetecció

La detecció de les proteïnes d'interès es du a terme mitjançant la hibridació seqüencial de la membrana amb un anticòs primari per la proteïna (taula) i posteriorment amb un anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa de rave. El control de càrrega es realitza amb la immunodetecció de la  $\beta$  actina.

**Taula 6.** Llista dels anticossos primaris utilitzats

	organisme hoste	dilucions	fabricant
Th	conill	1/200	Abcam
Dbh	ratolí	1/250	Santa Cruz
Snap 25	ratolí	1/500	Chemicon
$\beta$ actina	ratolí	1/5000	Sigma

Th, tirosina hidroxilasa; Dbh, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa; Snap 25, proteïna associada al sinaptosoma de 25Kd.

- La membrana es bloqueja amb 5% de llet desnatada en pols en TBS-T durant 1 hora a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C, sempre amb agitació.
- A continuació, s'incuba la membrana amb la dilució adequada de l'anticòs primari (taula) en TBS-T durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació

- Es realitzen tres rentats de 10 minuts amb TBS-T per eliminar l'excés d'anticòs primari
- La membrana s'incuba amb l'anticòs secundari, anti IgG, diluït en TBS-T(1/30000), durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació
- Per eliminar l'excés d'anticòs secundari, es renta la membrana per triplicat amb TBS-T durant 10 minuts
- Les bandes electroforètiques obtingudes es detecten mitjançant un sistema quimiluminiscent, ECL Plus kit (Amersham). Durant un minut les membranes s'incuben amb el tampó de detecció que conté el substrat de la peroxidasa (500 $\mu$ l tampó A i 500 $\mu$ l tampó B). Amb paper de filtre absorbim l'excés d'aquest tampó.
- Revelem les membranes amb pel·lícules fotogràfiques, Amersham Hyperfilm ECL (Amersham). El temps d'exposició de la pel·lícula sobre la membrana depèn de l'anticòs primari utilitzat.

Per re-incubar la membrana amb diferents anticossos primaris, la submergim amb stripping buffer (*ThermoScientific*) durant 30 minuts a 55°C amb agitació. Posteriorment, la membrana es bloqueja i es segueix el protocol d'immunodetecció descrit.

### Anàlisi

La densitometria de les bandes es quantifica mitjançant el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Posteriorment, la intensitat de les bandes és corregida (eliminant el soroll de fons) i normalitzada (per la  $\beta$  actina). Finalment, es comparen les intensitats de les bandes que provenen de diferents mostres i que han estat detectades amb un mateix anticòs, amb un test t, utilitzant el programa Sigma Stat 3.0.

### 8.1.2.2 Immunohistoquímica

Realitzem la tècnica d'immunohistoquímica per tal de detectar l'enzim tirosina hidroxilasa (Th) i el neurotransmissor noradrenalina en els paquets nerviosos de mostres d'artèria mesentèrica superior així com d'artèria renal dreta de rates amb hipertensió portal i rates control. La immunodetecció de Th s'efectua en teixit parafinat, en canvi per la noradrenalina, en teixit congelat.

### Extracció i conservació de la mostra

La SMA de cada animal s'extreu des de l'origen aòrtic fins les primeres ramificacions. Les artèries destinades a la immunodetecció de Th, es fixen amb paraformaldehid tamponat al 4% durant 20 hores i es conserven a 4°C amb etanol al 50% fins al seu processament. Per altre banda, les SMA destinades a la immunodetecció de noradrenalina, un cop aïllades de l'animal, es congelen amb N<sub>2</sub> líquid, i finalment s'emmagatzemen a -80°C.

### Inclusió amb parafina o OCT

El mètode d'inclusió en parafina (taula) consisteix en un primer pas de deshidratació, on el teixit, dins d'un casset, es submergeix amb alcohols creixents per eliminar l'H<sub>2</sub>O, a continuació es submergeix amb xilol (miscible en alcohol i parafina) que omple l'espai que ocupava l'H<sub>2</sub>O en el teixit i finalment té lloc la impregnació amb parafina.

solució	temps (min)
etanol 70%	45
etanol 96% I	30
etanol 96% II	30
etanol 100% I	15
etanol 100% II	45
xilol I	15
xilol II	15
parafina I	60
parafina II	60

Per altre banda, les mostres de SMA congelades, s' inclouen en un bloc d' OCT(Tissue-Tek®) a -20°C. Durant la inclusió, tant en parafina com en OCT, la mostra s' orienta tal que la zona d'interès, la part més proximal a l'origen aòrtic, quedi el més a prop possible de la superfície de tall.

### Talls histològics

Es realitzen talls de 3µm de gruix dels blocs de parafina amb el microtom, i es van dipositant en successius porta-objectes. En canvi, per les SMA congelades, es construeix un bloc de OCT al voltant d'aquestes, i mitjançant un criostat (Leica CM3050S) es realitzen talls de 10 µm, que també es van dipositant sobre preparacions, les qual s'emmagatzemen a -20°C.

### Pre- tractament de la mostra parafinada

- Les mostres es desparafinen a 60°C durant 60min.
- A continuació es porta a terme el procés de deshidratació, dins de cubetes, sense agitació i a temperatura ambient.

solució	temps (min)
citrosol	20
etanol 100%	5
etanol 95%	5
etanol 70%	5
H <sub>2</sub> O d	5

- Els portes s'introdueixen en tampó citrat, durant 20 minuts a 95°C, després, es deixen refredar dins del mateix tampó durant 25 minuts.
- Es realitzen tres rentats de 5 minuts amb PBS 1x, mantenint la cubeta amb agitació.

### Pre- tractament de la mostra congelada

- Es deixa descongelar les preparacions durant 30 minuts a temperatura ambient.
- A continuació, es fixen les mostres amb paraformaldehid al 4% (v/v) durant 10 minuts.
- Es realitza un rentat ràpid seguit de tres rentats de 5 minuts en PBS 1x, en agitació i a temperatura ambient.

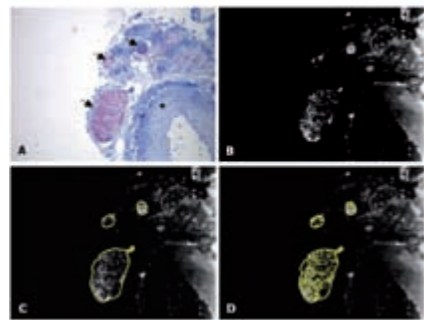
### Immunodetecció

- Es bloqueja la peroxidasa endògena amb una solució de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% v/v) durant 10 minuts amb agitació.
- Es realitzen dos rentats de 5 minuts, el primer amb H<sub>2</sub>O destil·lada i el segon amb PBS 1x.
- A continuació, es bloquegen les mostres amb una solució de sèrum de cabra i PBS 1x (5% p/v). S'apliquen 50µL de solució de bloqueig sobre cada mostra i es deixa incubar dins d'una càmera humida durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Després d'escórrer la solució de bloqueig, sense rentar, s'apliquen 50µl de dilució d'anticòs primari anti-Th (Abcam, Cambridge, UK) o anti-noradrenalina (Abcam) sobre cada mostra i es deixa incubar en una càmera humida tota la nit a 4°C. La dilució de l'anticòs primari (1/250 v/v per Th i 1/500 v/v, per noradrenalina) es realitza amb *Antibody diluent* (Dako, Glostrup, Dinamarca). Pel control negatiu, en comptes de la solució de l'anticòs primari, les mostres s'incuben amb PBS 1x.
- Per tal d'eliminar l'excés d'anticòs primari, es realitzen tres rentats de 5 minuts amb PBS 1x.
- L'anticòs secundari EnVISION anti-rabbit (Dako) s'aplica sobre cada mostra i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Per tal d'eliminar l'excés d'anticòs secundari, es renten les preparacions per triplicat amb PBS 1x, durant 5 minuts.
- Per detectar la proteïna, s'utilitza la solució de revelat per l'enzim peroxidasa del kit de revelat *VIP substrate kit* (Vector, Burlingame, CA, USA) que produeix un precipitat violeta. Es deixa incubar sota el microscopi fins que el marcatge apareix, aproximadament 5 minuts. La reacció de marcatge es para amb H<sub>2</sub>O destil·lada, i finalment amb aigua corrent.
- La contrateixió es realitza submergint les preparacions uns segons amb hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich), per l'immunodetecció de Th, o de Harris (Sigma-Aldrich) en el cas de la noradrenalina. Seguidament, se n'elimina l'excés rentant amb abundant aigua corrent.

- Després de deixar les mostres amb H<sub>2</sub>O destil·lada durant 5 minuts, es deshidraten submergeint els portes 10 vegades en alcohols creixents (etanol al 70, 95 i 100% v/v), finalment es deixen 5 minuts en xilol.
- El muntatge es du a terme amb una gota de DPX (Fluka) que posteriorment cobrim amb un cobre-objectes.

#### Quantificació i anàlisi

Per tal de dur a terme l'anàlisi dels resultats obtinguts per l'immunohistoquímica de Th, es realitzen fotografies digitals a un augment 200X dels paquets nerviosos que rodegen l'artèria mesentèrica superior o l'artèria renal utilitzant una càmera digital acoblada a un microscopi Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Alemanya). Mitjançant el programa d'anàlisi d'imatge AnalySIS® es determina el nombre de feixos nerviosos presents en cada mostra, l'àrea de cadascuna de les estructures nervioses i l'àrea d'aquestes estructures en què s'hi detecta immunomarcatge. En primer lloc, s'efectua una separació de colors de tipus RGB, a continuació, es realitza una subtracció de colors fins a obtenir una imatge representada per una escala de grisos, on les zones més intenses corresponen al color violeta de l'imatge original. Posteriorment, es dibuixa manualment les regions d'interès (ROI), que corresponen a l'àrea que ocupen els feixos nerviosos presents en cadascuna de les imatges. Finalment, el programa ens proporciona el número de ROIs (paquets nerviosos), l'àrea ROI (àrea dels paquets nerviosos), així com l'àrea marcada per Th dins d'aquesta regió (àrea nerviosa tenyida).



**Figura 12.** Anàlisi de les imatges de immunohistoquímica per Th

A) Identificació dels paquets nerviosos perifèrics a SMA. B) Transformació de d'imatge a escala de grisos. C) Selecció de la regió d'interès (ROI). D) Determinació del marcatge immunohistoquímic dins de l'àrea ROI.

Els paràmetres morfològics relatius a les estructures nervioses es comparen amb un test de Man Withney (no paramètric) utilitzant el programa Sigma Stat 3.0. Establim la significança estadística a  $p < 0.05$ .

### 8.1.3 Tècniques relacionades amb la localització del RNA missatger

#### 8.1.3.1 Hibridació in situ de RNA

La tècnica de hibridació in situ ens permet localitzar l'RNA missatger del gen de la tirosina hidroxilasa en talls transversals d'artèria mesentèrica superior, específicament, en regions proximals i distals a l'origen aòrtic. El gangli mesentèric s'utilitza com a control positiu. Construcció de la sonda

##### • Extracció RNA

Inicialment, realitzem una extracció d'RNA total de la glàndula adrenal amb el kit *RNeasy Fibrous kit* (Quiagen), seguint el protocol del fabricant. Obtenim 900µg/µl d'RNA en un volum final de 50µl.

##### • Retrotranscripció

Realitzem la retrotranscripció utilitzant el kit de *high capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems). Partim d'1µg d'RNA total i utilitzem un primer que conté el promotor de la T7 polimerasa (ThT71480: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGTGCAGCTCATC-3').

Reactius	Volum (µL)
Tampó de RT 10X	2
solució de dNTPs 25X	0.8
Primer Th1480 (-) (20pmol/µl)	1
transcriptasa Reversa, 50U/µL	1
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	4.2
inhibidor de RNases	1

La reacció té lloc en un termociclador GeneAmp®PCR System 2700 i amb les següents condicions:

	hibridació	extensió	desnaturalització
temperatura (°C)	25	37	85
temps (min)	10	120	5 segons

#### • PCR

2µl del cDNA obtingut s'amplifiquen per PCR utilitzant primers específics per l'RNAm de Th: *primer forward* (Th1255: 5'-CAGACACAGCAGCTGTGCAGCC-3') i *primer reverse* (utilitzat prèviament per la retro-transcripció, ThT71480), obtenint un fragment de 226 pb.

Reactius	Volum (µL)
Buffer 10x Pfu (MgCl <sub>2</sub> )	10
solució de dNTPs (10mM)	1
Primer Th1255 (+) (20pmol/µl)	1
Primer Th1480 (-) (20pmol/µl)	1
Pfu (2.5 U/µl)	1
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	84

L'amplificació es du a terme amb un termociclador GeneAmp®PCR System 2700 (Applied Biosystems).

#### • Transcripció in vitro

Partint del fragment de cDNA amplifcat per PCR, sintetitzem l'RNA antisentit per transcripció in vitro amb el *kit DIG RNA labelled kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya). Durant aquest procés de transcripció, també es marca l'RNA amb digoxigenina (digoxigenina-UTP). Afegim a 1µg de cDNA els següents reactius, i ho portem a un volum final de 20µl.

Reactius	Volum (µL)
10x NTP mix (amb UTP-Dig)	2
10x transcription buffer	2
RNasa inhibitor	1
RNA Pol T7	2

La transcripció té lloc a 37°C, durant 2 hores. Parem la reacció amb 2µl de EDTA (0.2M, pH8).

- Precipitem el transcrit marcat afegint 2.5µl de LiCl (14M) i 75µl d'etanol 100%(v/v).
- Deixem la mescla 30 minuts a -80°C i centrifuguem a 14000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
- Rentem el pellet amb etanol gelat al 70% i centrifuguem a 14000 rpm, 5 minuts a 4°C.
- Finalment, resuspenem el pellet en 50µl d'H<sub>2</sub>O destil·lada.

#### • Control de marcatge

Seguint les instruccions del kit, realitzem un control de l'eficiència del marcatge amb un RNA control marcat amb digoxigenina.

- Preparem una dilució (R1) de la sonda marcada de 10ng/µl amb RNA Dilution buffer. Fem la mateixa dilució per un RNA control (marcat amb digoxigenina) que subministra el kit.
- Partint de R1, realitzem les següents dilucions seriades: 1/10, 1/1000, 1/3300, 1/10<sup>4</sup>, 1/3,3.10<sup>4</sup>
- Apliquem 1µl de cada dilució, de sonda i d'RNA control, a una membrana de nylon carregada positivament (3x5 cm, aproximadament).
- Fixem els àcids nucleics a la membrana amb exposició UV.
- Rentem la membrana amb agitació i durant 2 minuts amb tampó de rentat.
- Bloquegem la membrana durant 30 minuts amb solució de bloqueig.
- Incubem la membrana amb una dilució 1/5000 d'anticòs (anti-Digoxigenina conjugat a la fosfatasa alcalina).
- Realitzem dos rentats amb tampó de rentat durant 15 minuts en agitació.
- Equilibrem la membrana amb tampó de detecció durant 5 minuts.
- Apliquem 1mL de la solució de substrat quimiluminiscent (CSPD) i deixem incubar 5 minuts a temperatura ambient.
- Eliminem l'excés de substrat i col·loquem la membrana dins d'una bossa d'hibridació que posteriorment segellem.
- Incubem la membrana a 37°C, durant 10 minuts.
- Finalment, exposem la membrana sobre una pel·lícula fotogràfica durant dos minuts.

#### Extracció i conservació de la mostra

Aïllem la SMA de l'animal des de l'origen aòrtic, fins les primeres ramificacions. Per tal de facilitar la posterior orientació de la mostra en el bloc de parafina, en aquest moment, realitzem un nus a la part distal de l'artèria. També extraïem el gangli mesentèric superior (SMG) situat entre la base de la SMA i l'artèria aorta. Tant la SMA com el SMG immediatament es fixen amb paraformaldehid tamponat al 4% durant 20 hores i es conserven amb etanol al 50% a 4°C. A més a més, la glàndula adrenal de l'animal, s'aïlla del teixit connectiu que l'envolta i ràpidament, es submergeix en *RNA later* (Ambion), on es conserva a 4°C fins al seu processament.

#### Inclusió amb parafina

Abans d'incloure la SMA en el bloc de parafina, es divideix en dues parts, secció proximal i distal a l'aorta. La inclusió es realitza tal i com s'explica a l'apartat d'immunohistoquímica 1.1.2.2

### Talls histològics

Es realitzen talls de 3 µm amb el microtom de cadascuna de les mostres, i s'inclouen en preparacions successives.

### Pre- tractament de la mostra

- Les mostres es desparafinen a 60°C durant 60min.
- A continuació, es realitza el procés de deshidratació, dins de cubetes, sense agitació i a temperatura ambient:

solució	temps (min)
xilol	5 x 2
etanol 100%	3 x 2
etanol 95%	2 x 2
H <sub>2</sub> O d	5

- S'apliquen 10µl de proteïnasa K (10µg/mL), i s'incuba a l'hibridador (Dako) a 37°C durant 2 hores
- Aquest pre-tractament de proteòlisis es para amb etanol absolut durant 10 segons i 30 segons més en H<sub>2</sub>O. Deixem assecar les preparacions.

### Imunodetecció

- Per tal d'evitar estructures secundàries, escalfem la sonda a 55°C durant 5 minuts.
- Sobre cada mostra, apliquem 30µL de la solució de la sonda, 500ng de sonda en tampó d'hibridació (reactiu del *kit In situ hybridization Kit Plus*, Agilent Technologies). En el cas del control negatiu, s'aplica aquesta solució en absència de sonda.
- La hibridació de la sonda amb l'RNAm de la Th, es porta a terme en un hibridador (Dako), amb un primer pas de desnaturalització, 1 minut a 94°C, i un segon, d'hibridació, tota la nit (aproximadament 17 hores) a 55°C.
- Les preparacions es renten amb SSC 2x durant tot el matí.
- Es realitza un rentat amb H<sub>2</sub>O destil·lada.
- Per prevenir la hibridació inespecífica, les mostres s'incuben amb formamida desionitzada al 50% (v/v) en SSC 2x a 50°C durant 10 minuts.
- A continuació, s'efectuen 3 rentats de 10 minuts de SSC 1x.
- Les preparacions s'incuben amb tampó de bloqueig 1x durant 10 minuts en agitació.
- Després d'assecar els portes, s'aplica sobre cada mostra 15µl de solució d'anticòs anti-

digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina (dilució 1/250), i es deixa incubar a temperatura ambient durant 1 hora.

- Per tal d'eliminar l'excés de l'anticòs es realitzen dos rentats de 5 minuts amb una solució de 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) i 150mM de NaCl, i un darrer rentat amb H<sub>2</sub>O destil·lada.
- A continuació, les preparacions s'incuben amb 20ml de la solució de substrat (CBIP/NBT) a 4°C durant tota la nit.
- S'elimina l'excés de substrat amb abundant aigua corrent, durant 2 minuts.
- Per la contratació dels nuclis, les mostres es cobreixen durant 15 minuts a temperatura ambient amb *metyl green* (Sigma-Aldrich) al 1% o bé amb *fast red* (Sigma-Aldrich).
- Per eliminar l'excés de tinció, les preparacions es van rentar amb H<sub>2</sub>O corrent.
- Deshidratem les mostres submergint els portes 10 vegades en alcohols creixents (etanol al 70, 95 i 100% v/v), finalment es deixen 5 minuts en xilol.
- El muntatge es realitza amb una gota de DPX (Dako) que posteriorment cobrim amb un cobre-objectes.

### 8.1.3.2 RT-PCR a temps real

#### Extracció i conservació de la mostra

La SMA de l'animal s'aïlla des de la base de la aorta fins les primeres ramificacions. Immediatament després de l'extracció, l'artèria es va dividir en dos parts iguals, secció proximal i secció distal a l'origen aòrtic, i es submergeixen en RNAlater (Ambion). Les mostres es conserven en aquesta solució a 4°C fins al seu processament.

#### Extracció del RNA

L'RNA total de cadascuna de les seccions (proximals i distals) s'extreu utilitzant columnes d'extracció del *kit Rneasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen).

#### • Transcripció reversa

Partint de 100ng de RNA total, realitzem la retro-transcripció amb el *kit High capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems). A 10µl de la solució de RNA afegim:

Reactius	Volum (µL)
Tampó de RT 10X	2
solució de dNTPs 25X	0.8
random Primers 10X	2
transcriptasa Reversa, 50U/µL	1
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	3.2
inhibidor de RNases	1

Aquesta reacció té lloc al termociclador *GeneAmp® PCRSystem 2700* (Applied Biosystems) i sota les condicions són les següents:

	hibridació	extensió
temperatura (°C)	25	37
temps (min)	10	120

#### • PCR

La PCR es du a terme amb Taqman gene expression assays (Applied Biosystems) específics per Th, Dbh i 18s (control endògen). A 10µL de cDNA obtingut, afegim:

Reactius	Volum (µL)
Taqman gene expression assay	1.25
Taqman Master Mix	12.5
H <sub>2</sub> O lliure de RNases	1.25

Utilitzem el termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), seguint les següents condicions:

	activació de la AmpliTaQ Gold	40 cicles	
		desnaturalització	hibridació /extensió
temperatura (°C)	94.5	97	59.7
temps (min)	10	0.5	1

#### Anàlisi

La quantificació relativa dels gens Th i Dbh es realitza mitjançant el mètode comparatiu Ct (*threshold cycle*). Inicialment, els Cts corresponents als gens Th i Dbh, es normalitzen pel Ct del gen endògen (18s). Finalment, i definint la mostra de la secció distal com a mostra calibradora, es calcula la quantitat relativa (RQ) de Th i Dbh en la secció proximal comparada amb la distal, mitjançant el càlcul  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$

## 8.2 TÈCNiques D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

### 8.2.1 Models experimentals d'hipertensió portal

#### 8.2.1.1 Model de la lligadura calibrada de la vena porta

Induïm una hipertensió pre-hepàtica per estenosis calibrada de la vena porta a rates mascles de la soca Sprague-Dawley (Charles River, Barcelona, Espanya), que pesen entre 250 i 300 grams tal i com prèviament havia descrit Vorobioff et al (14). Amb una incisió abdominal i sota condicions d'anestèsia amb isofluorà (5% inducció i 2% manteniment) s'aïlla la vena porta del teixit gras mitjançant una lligadura, posteriorment, es col·loca una agulla de 20G (0.889mm) de punta roma entre la lligadura i la vena, i finalment, després de tancar amb força el nus, es retira l'agulla. A les rates control (sham) se les sotmet a una operació fictícia, realitzant exactament la mateixa operació amb la diferència que després de l'aïllament de la vena porta no es procedeix a la lligadura. Després de la intervenció, els animals tornen al seu allotjament, on hi resten 14 dies amb lliure accés a aigua i menjar.

#### 8.2.1.2 Model de cirrosi per tetraclorur de carboni

Induïm una cirrosi hepàtica a rates Sprague-Dawley (Charles River) amb pes inicial entre 100 i 120g mitjançant una ingesta forçada de tetraclorur de carboni (CCl<sub>4</sub>), tal i com es descriu en Oria et al (122). Amb l'administració de CCl<sub>4</sub> produïm una hepatitis aguda, i amb la seva administració continuada generem una lesió hepàtica crònica que condueix al desenvolupament de la cirrosi. Per tal d'accelerar el model, administrem fenobarbital a l'aigua (0.3 g/l) una setmana abans de començar amb l'exposició al hepatotòxic. Administrem CCl<sub>4</sub> per via orogastrica una vegada a la setmana sense anestèsia i utilitzant una sonda de metall. El volum de la primera dosi és de 20µL per cada animal. La dosi es modifica segons la variació del pes de l'animal a les 48 hores després de la última administració de CCl<sub>4</sub>, tal i com està descrit en el protocol de Proctor et al (123). A les rates control, que també se'ls hi afegeix fenobarbital a la beguda, en lloc de l'hepatotòxic els hi administrem H<sub>2</sub>O.

Taula 7. Dosificació del tetraclorur de carboni

Canvi de pes a les 48h després de la dosi	< 6 setmanes de tractament	> 6 setmanes de tractament
estable o augmentat	augment de 60µL	augment de 80µL
pèrdua de 2% -5.9%	augment de 40µL	augment de 60µL
pèrdua de 6% -10%	augment de 20µL	augment de 40µL
pèrdua de .1% -15%	mateixa dosi	mateixa dosi
pèrdua de > 15%	disminució de 40µL	disminució de 40µL

Considerem que l'animal ha desenvolupat cirrosi quan aquest presenta líquid ascític, i ho comprovem aixecant la rata per la cua i observant si hi ha deformacions abdominals. Per tal de descartar una possible infecció, s'analitza el líquid ascític de cada rata cirròtica i es compten les cèl·lules polimorfonuclears amb una càmera de comptatge cel·lular (càmera Neubauer) al microscopi. Les rates desenvolupen cirrosi, entre 8 i 15 setmanes després de la primera dosi de  $CCL_4$ .

### 8.2.1.3 Model de cirrosi per lligadura del conducte biliar

Induïm una cirrosi biliar secundària mitjançant la lligadura del conducte biliar a rates mascles de la soca Sprague-Dawley (Charles River), que pesen entre 250 i 300 grams tal i com es descriu en Lee et al, (124). Sota condicions d'anestèsia amb isofluorà (5% inducció i 2% manteniment), dissequem el colèdoc del greix subjacent, cranial a la sortida dels conductes pancreàtics. A continuació, realitzem una doble lligadura amb seda de 5-0 i per evitar-ne la repermeabilització, efectuem una resecció d'un porció del colèdoc entre les dues lligadures. Una vegada finalitzada la cirurgia, administrem un tractament antibiòtic profilàctic (ampicil·lina 10mg/Kg) per via subcutània. Setmanalment, per evitar hemorràgies, administrem a l'animal vitamina k per via intramuscular (8 mg/kg). A les 4 setmanes després de la cirurgia, considerem que l'animal ha desenvolupat fibrosi i cirrosi biliar (figura 13). Pel que fa a les rates control, després de dissecar el conducte biliar no practiquem les lligadures. A aquests animals els hi administrem tant el tractament antibiòtic com el de la vitamina k.

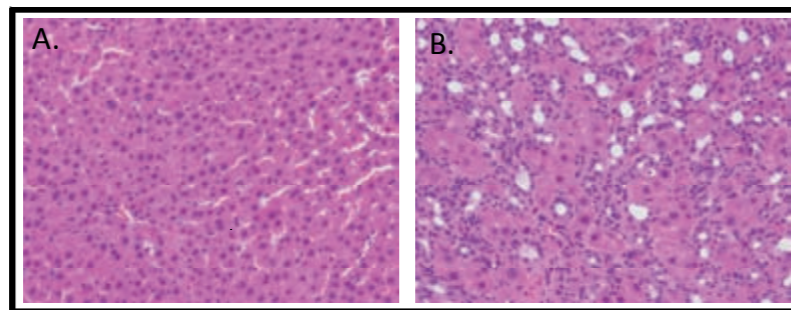


Figura 13. Tinció d'hematoxilina i eosina de seccions de fetge sham i BDL  
A) Fetge sham B) Fetge cirròtic. Magnificació a 200X

### 8.2.2 Mesura dels paràmetres hemodinàmics

Realitzem els estudis hemodinàmics al cap de 14 o 28 dies, després d'haver practicat la lligadura de la vena porta (rates PVL) o del conducte biliar (rates BDL), respectivament. Les mesures dels paràmetres hemodinàmics es realitzen sota condicions d'anestèsia amb ketamina (100mg/kg) i midazolam (5mg/kg), per via intraperitoneal. Durant el registre, controlem que

la temperatura rectal de l'animal es mantingui a 37°C. Les mesures s'enregistren mitjançant la unitat d'adquisició de dades *PowerLab* (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), que consta del software *Chart 5.0*.

#### • Mesura de la pressió arterial mitja

Mesurem la pressió arterial mitja (MAP) mitjançant la canul·lació intravascular de l'artèria femoral dreta amb un catèter de polietilè PE 50, que va connectat a un transductor de pressió d'alta sensibilitat (Harvard Apparatus). Inicialment, fem una incisió a l'engonal dreta de l'animal, i ens obrim pas, trencant el múscul, fins que localitzem el paquet compost per l'arteria, la vena i el nervi femoral. Un cop dissecada l'artèria, li realitzem una incisió amb una agulla de 23G, i introduïm la cànula. Amb dos nusos (seda de 3-0), immobilitzem el catèter dins l'artèria.

#### • Mesura de la pressió portal

Mesurem la pressió portal (PP) mitjançant la canul·lació intravascular de la vena ileocòlica amb un catèter de polietilè PE 50, que va connectat a un transductor de pressió d'alta sensibilitat (Harvard Apparatus). Després d'una incisió abdominal, extraïem i expandim els intestins sobre una gasa mullada amb sèrum fisiològic. Una vegada localitzada la vena ileocòlica, introduïm el catèter directament per una ramificació d'aquesta. Amb *Loctite* immobilitzem el catèter dins de la vena.

#### • Mesura del flux mesentèric

Mesurem el flux de l'artèria mesentèrica superior (SMABF) mitjançant una sonda perivascular ultrasònica (Doppler) d'1mm de diàmetre (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA). Després de la incisió abdominal, aïllem l'artèria mesentèrica superior del teixit connectiu i gras que l'envolta. Posteriorment, apliquem un gel de transmissió d'ultrasons a la sonda per facilitar la transmissió del senyal i finalment pincem l'artèria dissecada amb la sonda.

#### • Mesura de la resistència mesentèrica

La resistència mesentèrica es determina mitjançant el següent càlcul:  $(MAP-PP)/SMABF$

### 8.2.3 Administració del fàrmac

Inicialment, anestesiem l'animal amb una mescla de ketamina (100mg/kg) i midazolam (5mg/kg) per via intraperitoneal. A continuació, rasurem la pota dreta de l'animal i després de desinfectar la zona amb alcohol (70%), canul·lem la vena safena amb un catèter intravenós (Abbot de 26G). Si a l'introduir el catèter, apareix sang a l'aspirar, indica que la col·locació

de l'agulla és l'adequada. Posteriorment, realitzem les operacions necessàries (descrites a l'apartat anterior) per tal d'obtenir un registre continu de la pressió arterial mitja, la pressió portal i el flux mesentèric. Quan l'animal està estabilitzat, és a dir, quan presenta una freqüència cardíaca entre 350 i 400 bpm i la temperatura rectal és 37°C, registrem els paràmetres hemodinàmics basals. Al cap de 15 minuts, administrem el fàrmac, D,L-Threo-DOPS (Sigma-Aldrich) dissolt en sèrum salí (10mg/mL) a una dosi de 10mg/kg, per via intravenosa. La mostra ha de fluir sense dificultat al torrent sanguini. Es realitza un registre continu i simultani dels paràmetres hemodinàmics durant 30 minuts.

### 8.3 REACTIUS I TAMPONS

#### • MICROARRAYS DE DNA

##### Solució de rentat 1

6x SSC  
0,005% (v/v) Triton X-102

##### Solució de rentat 2

0.1x SSC  
0.005% (v/v) Triton X-102

#### • WESTERN BLOT

##### Solució de Krebs

4.7 mM KCl  
2.5 mM CaCl<sub>2</sub>  
1.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.2 mM MgSO<sub>4</sub>  
25 mM NAHCO<sub>3</sub>  
11.1 mM glucosa

##### Tampó de lisi per l'extracció de proteïnes

10%(p/v) Deoxicolat sòdic (Sigma-Aldrich)  
6% cocktail d'Inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)  
en tampó RIPA (Sigma-Aldrich)

##### Running Buffer Lower (espai exterior)

1x NuPAGE MES SDS Running Buffer

##### Running Buffer Upper (espai intragels)

200 mL 1x NuPAGE MES SDS Running Buffer  
500µl Antioxidant

##### TBS 10x (1L)

160 g NaCl  
4 g KCl  
150 g Tris-HCl  
pH:8 amb HCl

##### TBS-T 1x

0,1% (p/v) Tween 20 (Sigma Aldrich)  
en TBS 1x

##### Tampó de transferència (1L)

50 mL NuPAGE Transfer Buffer 20x  
1 mL NuPAGE Antioxidant  
100 mL MeOH\*  
849 mL H<sub>2</sub>O mQ  
\*per transferir dos gels (200 mL)

#### • IMUNOHISTOQUÍMICA

##### Tampó citrat

10mM tri-sodium citrate  
pH 6

##### Tampó d'àcid Maleic

0.1M àcid Maleic  
0.15M NaCl, pH7.5

#### • HIBRIDACIÓ IN SITU

##### Solució de Bloqueig 10x

10% (p/v) de blokng solution (Roche Diagnostics) en Tampó d'àcid maleic

##### Tampó de bloqueig

0.1mL Tritó X-100



2mL albúmina de sèrum boví  
97.9mL solució de bloqueig 1x

**Solució d'anti-digoxigenina**

0.5µl anti-digoxigenina (Roche Diagnostics)  
124.5µl tampó de bloqueig

**Tampó de detecció**

0.1M TrisHCl  
0.1M NaCl  
pH 9.5

**Solució de substrat cromogènic (CBIP/NBT)**

200µl substrat cromogènic (Roche Diagnostics)  
10mL Tampó de detecció

**Solució de substrat quimiluminiscent (CSPD)**

10µl CSPD (Roche Diagnostics)  
990 µl Tampó de detecció

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):141-156.
2. Kroeger RJ, Groszmann RJ. Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology* 1985 Jan;5(1):97-101.
3. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985 Jun;248(6 Pt 1):G618-G625.
4. Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* 1985 Jul;5(4):643-648.
5. Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;1(4):325-337.
6. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):387-393.
7. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abrales JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003 Jan;37(1):172-181.
8. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998 Oct;28(4):926-931.
9. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Apr;284(4):G567-G574.
10. Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996 Jul;24(1):233-240.
11. Dudenhofer AA, Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Gupta T, Groszmann RJ.

- Bioactivation of nitroglycerin and vasomotor response to nitric oxide are impaired in cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2002 Aug;36(2):381-385.
12. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004 Mar;126(3):886-894.
13. Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005 Jul;43(1):98-103.
14. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983 Jan;244(1):G52-G57.
15. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994 Nov;20(5):1359-1363.
16. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992 Mar;21(1):1-14.
17. Pizcueta MP, Casamitjana R, Bosch J, Rodes J. Decreased systemic vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats: role of hyperglucagonism. *Am J Physiol* 1990 Feb;258(2 Pt 1):G191-G195.
18. Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kviety PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984 Nov;247(5 Pt 1):G486-G493.
19. Domenicali M, Ros J, Fernandez-Varo G, Cejudo-Martin P, Crespo M, Morales-Ruiz M, et al. Increased anandamide induced relaxation in mesenteric arteries of cirrhotic rats: role of cannabinoid and vanilloid receptors. *Gut* 2005 Apr;54(4):522-527.
20. Moezi L, Gaskari SA, Liu H, Baik SK, Dehpour AR, Lee SS. Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via CB(1) and VR(1) receptors. *Br J Pharmacol* 2006 Dec;149(7):898-908.
21. Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, et al. Endocannabinoids

- acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001 Jul;7(7):827-832.
22. Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M, Bosch J, Rodes J, Whittle BJ, et al. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992 Dec;103(6):1909-1915.
  23. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Apr;284(4):G567-G574.
  24. Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998 Dec;28(6):1467-1473.
  25. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993 Nov;18(5):1139-1143.
  26. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):109-142.
  27. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991 Mar 30;337(8744):776-778.
  28. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piera C, Whittle BJ, et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995 May;108(5):1487-1495.
  29. Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, St JJ, et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996 Mar;270(3 Pt 2):F494-F499.
  30. Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996 Sep;25(3):370-378.
  31. Wiest R, Shah V, Sessa WC, Groszmann RJ. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999 Apr;276(4 Pt 1):G1043-G1051.

32. Garcia-Pagan JC, Fernandez M, Bernadich C, Pizcueta P, Pique JM, Bosch J, et al. Effects of continued NO inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. *Am J Physiol* 1994 Dec;267(6 Pt 1):G984-G990.
33. Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998 Dec;28(6):1467-1473.
34. Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Nov;283(5):G1074-G1081.
35. Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. N omega-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1993 Jan;17(1):84-90.
36. Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992 Jul;103(1):235-239.
37. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999 Nov;104(9):1223-1233.
38. Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, et al. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Jun;282(6):H2084-H2090.
39. Tsai MH, Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 2003 Nov;125(5):1452-1461.
40. Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003 Dec;38(6):1508-1515.

41. Tazi KA, Moreau R, Herve P, Dauvergne A, Cazals-Hatem D, Bert F, et al. Norfloxacin reduces aortic NO synthases and proinflammatory cytokine up-regulation in cirrhotic rats: role of Akt signaling. *Gastroenterology* 2005 Jul;129(1):303-314.
42. Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitrenergic vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005 Aug;43(2):258-265.
43. Sieber CC, Sumanovski LT, Moll-Kaufmann C, Stalder GA. Hyposensitivity to nerve stimulation in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Eur J Clin Invest* 1997 Nov;27(11):902-907.
44. Fernandez M, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase activity in splanchnic organs from portal hypertensive rats: role in modulating mesenteric vascular reactivity. *J Hepatol* 2001 Jun;34(6):812-817.
45. Hamilton G, Phing RC, Hutton RA, Dandona P, Hobbs KE. The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. *Hepatology* 1982 Mar;2(2):236-242.
46. Potenza MA, Botrugno OA, De Salvia MA, Lerro G, Nacci C, Marasciulo FL, et al. Endothelial COX-1 and -2 differentially affect reactivity of MVB in portal hypertensive rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Sep;283(3):G587-G594.
47. Bruix J, Bosch J, Kravetz D, Mastai R, Rodes J. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1985 Feb;88(2):430-435.
48. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995 Mar;108(3):761-767.
49. Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996 Jun;23(6):1616-1621.
50. Katusic ZS, Stelter A, Milstien S. Cytokines stimulate GTP cyclohydrolase I gene

- expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Jan;18(1):27-32.
51. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 1994 May;93(5):2236-2243.
52. Wever RM, van DT, van Rijn HJ, de GF, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Aug 18;237(2):340-344.
53. Genesca J, Gonzalez A, Catalan R, Segura R, Martinez M, Esteban R, et al. Adrenomedullin, a vasodilator peptide implicated in hemodynamic alterations of liver cirrhosis: relationship to nitric oxide. *Dig Dis Sci* 1999 Feb;44(2):372-376.
54. Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Satoh H, Nakashima T, Minamino N, et al. Adrenomedullin contributes to vascular hyporeactivity in cirrhotic rats with ascites via a release of nitric oxide. *Scand J Gastroenterol* 2004 Jul;39(7):686-693.
55. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, et al. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res* 2001 Jul 6;89(1):63-70.
56. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Aug 28;237(3):527-531.
57. Zhao W, Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Aug;283(2):H474-H480.
58. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 Nov;287(5):H2316-H2323.

59. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001 Nov 1;20(21):6008-6016.
60. Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1993 Nov;105(5):1464-1470.
61. Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J. Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology* 2007 Feb;45(2):495-506.
62. Murray BM, Paller MS. Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats. Evidence for a post-receptor defect in angiotensin action. *Circ Res* 1985 Sep;57(3):424-431.
63. Lin HC, Yang YY, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Lee FY, et al. Vascular contractile response and signal transduction in endothelium-denuded aorta from cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2005 Apr 21;11(15):2306-2312.
64. Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, et al. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006 Mar;130(3):838-854.
65. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990 Oct 25;347(6295):768-770.
66. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003 Jun;55(2):271-324.
67. Piascik MT, Soltis EE, Piascik MM, Macmillan LB. Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacol Ther* 1996;72(3):215-241.
68. Kawasaki H, Takasaki K. Vasoconstrictor response induced by 5-hydroxytryptamine released from vascular adrenergic nerves by periarterial nerve stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1984 Jun;229(3):816-822.
69. Kawasaki H, Urabe M, Takasaki K. Enhanced 5-hydroxytryptamine release from vascular adrenergic nerves in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987 Sep;10(3):321-327.

70. Joh T, Granger DN, Benoit JN. Endogenous vasoconstrictor tone in intestine of normal and portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993 Jan;264(1 Pt 2):H171-H177.
71. Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Lacroix JS, Pernow J. Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 1990;611:166-174.
72. Wiest R, Jurzik L, Moleda L, Froh M, Schnabl B, von Horsten S, et al. Enhanced Y1-receptor-mediated vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension. *J Hepatol* 2006 Mar;44(3):512-519.
73. Burghardt W, Wernze H, Schaffrath I. Changes of circulating noradrenaline and adrenaline in hepatic cirrhosis-relation to stage of disease, liver and renal function. *Acta Endocrinol* 1982;99 (Suppl 246):100-101.
74. Tage-Jensen U, Henriksen JH, Christensen E, Widding A, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Plasma catecholamine level and portal venous pressure as guides to prognosis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1988 Jun; 6(3):350-358.
75. Henriksen JH, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Kidney, lower limb and whole-body uptake and release of catecholamines in alcoholic liver disease. *Clin Physiol* 1988 Jun;8(3):203-213.
76. Pozzi M, Grassi G, Redaelli E, Dell'oro R, Ratti L, Redaelli A, et al. Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis. *Hepatology* 2001 Dec;34(6):1113-1118.
77. Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, Akiyama S, Nawa H, Kobayashi Y, et al. Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Feb; 316(2):490-497.
78. Moll-Kaufmann C, Sumanovski LT, Sieber CC. Neurally-mediated vasodilatation in normal and portal hypertensive rats: role of nitric oxide and calcitonin gene-related peptide. *J Hepatol* 1998 Jun;28(6):1031-1036.
79. Bendtsen F, Schifter S, Henriksen JH. Increased circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cirrhosis. *J Hepatol* 1991 Jan;12(1):118-123.

80. Fernandez-Rodriguez CM, Prieto J, Quiroga J, Zozoya JM, Andrade A, Nunez M, et al. Plasma levels of substance P in liver cirrhosis: relationship to the activation of vasopressor systems and urinary sodium excretion. *Hepatology* 1995 Jan;21(1):35-40.
81. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981 May;240(5):G371-G375.
82. Groszmann RJ, Vorobioff J, Riley E. Splanchnic hemodynamics in portal-hypertensive rats: measurement with gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1982 Feb;242(2):G156-G160.
83. Abraldes JG, Pasarin M, Garcia-Pagan JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006 Nov 7;12(41):6577-6584.
84. Bosch J, Enriquez R, Groszmann RJ, Storer EH. Chronic bile duct ligation in the dog: hemodynamic characterization of a portal hypertensive model. *Hepatology* 1983 Nov;3(6):1002-1007.
85. Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 2002 Apr;36(4):488-493.
86. Chang SW, Ohara N. Pulmonary circulatory dysfunction in rats with biliary cirrhosis. An animal model of the hepatopulmonary syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992 Apr;145(4 Pt 1):798-805.
87. Wiest R. Splanchnic and systemic vasodilation: the experimental models. *J Clin Gastroenterol* 2007 Nov;41 Suppl 3:S272-S287.
88. Laleman W, Vander E, I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest* 2006 Apr;36(4):242-249.
89. Coll M, Genesca J, Raurell I, Rodriguez-Vilarrupla A, Mejias M, Otero T, et al. Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *J Hepatol* 2008 Jul;49(1):43-51.
90. Kaufmann H, Saadia D, Voustantiyouk A, Goldstein DS, Holmes C, Yahr MD, et

- al. Norepinephrine precursor therapy in neurogenic orthostatic hypotension. *Circulation* 2003 Aug 12;108(6):724-728.
91. Kaufmann H. L-dihydroxyphenylserine (Droxidopa): a new therapy for neurogenic orthostatic hypotension: the US experience. *Clin Auton Res* 2008 Mar;18 Suppl 1:19-24.
92. Goldstein DS. L-Dihydroxyphenylserine (L-DOPS): a norepinephrine prodrug. *Cardiovasc Drug Rev* 2006;24(3-4):189-203.
93. Coll M, Martell M, Raurell I, Ezkurdia N, Cuenca S, Hernandez-Losa J, et al. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver International* 2009.
94. Alessandria C, Ottobrelli A, Bernardi-Venon W, Todros L, Cerenzia MT, Martini S, et al. Noradrenalin vs terlipressin in patients with hepatorenal syndrome: a prospective, randomized, unblinded, pilot study. *J Hepatol* 2007 Oct;47(4):499-505.
95. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1992 Feb;15(2):323-328.
96. Henriksen JH, Moller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol* 1998 Aug;29(2):328-341.
97. Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitrenergic vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005 Aug;43(2):258-265.
98. Kwon SY, Groszmann RJ, Iwakiri Y. Increased neuronal nitric oxide synthase interaction with soluble guanylate cyclase contributes to the splanchnic arterial vasodilation in portal hypertensive rats. *Hepatol Res* 2007 Jan;37(1):58-67.
99. Toda N, Herman AG. Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves. *Pharmacol Rev* 2005 Sep;57(3):315-338.
100. Bramham CR, Wells DG. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 2007 Oct;8(10):776-789.
101. Piper M, Holt C. RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:505-523.

102. Sogni P, Sabry S, Moreau R, Gadano A, Lebrec D, nh-Xuan AT. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996 Apr;24(4):487-490.
103. Young TM, Asahina M, Nicotra A, Mathias CJ. Skin vasomotor reflex responses in two contrasting groups of autonomic failure: multiple system atrophy and pure autonomic failure. *J Neurol* 2006 Jul;253(7):846-850.
104. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2003 May;26(5):1553-1579.
105. Bierl MA, Isaacson LG. Increased NGF proforms in aged sympathetic neurons and their targets. *Neurobiol Aging* 2007 Jan;28(1):122-134.
106. Tafreshi AP, Zhou XF, Rush RA. Endogenous nerve growth factor and neurotrophin-3 act simultaneously to ensure the survival of postnatal sympathetic neurons in vivo. *Neuroscience* 1998 Mar;83(2):373-380.
107. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994 Mar 25;76(6):1001-1011.
108. Farinas I, Yoshida CK, Backus C, Reichardt LF. Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 1996 Dec;17(6):1065-1078.
109. Levi A, Ferri GL, Watson E, Possenti R, Salton SR. Processing, distribution, and function of VGF, a neuronal and endocrine peptide precursor. *Cell Mol Neurobiol* 2004 Aug;24(4):517-533.
110. Fernandez M, Casadevall M, Schuligoi R, Pizcueta P, Panes J, Barrachina MD, et al. Neonatal capsaicin treatment does not prevent splanchnic vasodilatation in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1994 Dec;20(6):1609-1614.
111. Lee SS, Sharkey KA. Capsaicin treatment blocks development of hyperkinetic circulation in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1993 May;264(5 Pt 1):G868-G873.
112. Li Y, Song D, Zhang Y, Lee SS. Effect of neonatal capsaicin treatment

- on haemodynamics and renal function in cirrhotic rats. *Gut* 2003 Feb; 52(2):293-299.
113. Song D, Sharkey KA, Breitman DR, Zhang Y, Lee SS. Disordered central cardiovascular regulation in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Mar;280(3):G420-G430.
114. Araki H, Tanaka C, Fujiwara H, Nakamura M, Ohmura I. Pressor effect of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in rats. *J Pharm Pharmacol* 1981 Dec;33(12):772-777.
115. Goldstein DS, Holmes C, Kaufmann H, Freeman R. Clinical pharmacokinetics of the norepinephrine precursor L-threo-DOPS in primary chronic autonomic failure. *Clin Auton Res* 2004 Dec;14(6):363-368.
116. Baik SH, Yoshioka H. Enhanced synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine by high-density whole-cell biocatalyst of recombinant L-threonine aldolase from *Streptomyces avelmitilis*. *Biotechnol Lett* 2009 Mar;31(3):443-448.
117. Araki H, Tanaka C, Fujiwara H, Nakamura M, Ohmura I. Pressor effect of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in rats. *J Pharm Pharmacol* 1981 Dec;33(12):772-777.
118. Edwards D. Non-linear normalization and background correction in one-channel cDNA microarray studies. *Bioinformatics* 2003 May 1;19(7):825-833.
119. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5(10):R80.
120. Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talon M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* 2006 May 1;22(9):1096-1102.
121. Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzalez JM, McGrath JC, et al. Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2005 Nov;146(5):679-691.
122. Oria M, Raguer N, Chatauret N, Bartoli R, Odena G, Planas R, et al. Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis

and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2006 Dec;21(4):297-308.

123. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1983 Jun;64(3):320-330.
124. Colombato LA, Robin M, Pomier-Layrargues G, Huet P. Animal models of portal hypertension. In: Holstege A, Hahn EG, Scholmerich J, eds. *Portal Hypertension- Proceedings of the 79th Falk Symposium*. Germany: Kluwer Academic Publishers, 1995. 3-14.