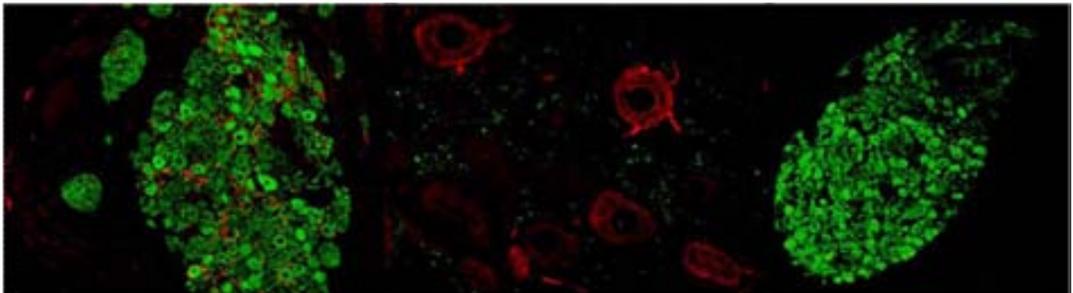


# CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO EN LA GÉNESIS Y MANTENIMIENTO DE LAS ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL



Nahia Ezkurdia Garmendia

Barcelona 2013



Laboratorio de Enfermedades Hepáticas  
Servicio de Medicina Interna- Hepatología, Hospital Universitario Vall d'Hebrón  
Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR)  
Universidad Autónoma de Barcelona









**Departamento de Medicina  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Barcelona**

**[Tesis Doctoral]**

**CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO EN LA  
GÉNESIS Y MANTENIMIENTO DE LAS ALTERACIONES  
HEMODINÁMICAS DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL**

**MEMORIA PARA OPTAR A GRADO DE DOCTOR DE**

**Nahia Ezkurdia Garmendia**

**Directores de la tesis**

**María Martell**

**Joan Genescà**

**Laboratorio de Enfermedades Hepáticas  
Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR)**

**Barcelona 2013**



# 1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	3
2	ABREVIATURAS .....	7
3	INTRODUCCIÓN.....	13
3.1	FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL.....	13
3.2	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL.....	14
3.3	SÍNDROME HIPERDINÁMICO.....	15
3.4	VASODILATACIÓN ESPLÁCNICA.....	16
3.5	MODELO ANIMAL DE LIGADURA DE LA VENA PORTA (PVL).....	17
3.6	SISTEMA NERVIOSO EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL.....	18
3.6.1	ATROFIA SIMPÁTICA EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL .....	20
3.7	VÍA NEURONAL QUE CONTROLA EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	24
3.8	NEURONAS AFERENTES SENSIBLES A LA CAPSAICINA.....	25
3.9	MODULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN NEURONAL.....	27
4	HIPÓTESIS .....	33
5	OBJETIVO .....	34
6	ESTUDIO 1.....	37
6.1	INTRODUCCIÓN .....	37
6.2	OBJETIVOS.....	37
6.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
6.4	RESULTADOS .....	38
7	ESTUDIO 2.....	43
7.1	INTRODUCCIÓN .....	43
7.2	OBJETIVOS.....	44
7.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	44
7.4	RESULTADOS .....	45
8	ANEXO I .....	53
9	ESTUDIO 3.....	69

9.1	INTRODUCCIÓN .....	69
9.2	OBJETIVOS.....	70
9.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	70
9.4	RESULTADOS .....	71
10	ESTUDIO 4.....	77
10.1	INTRODUCCIÓN .....	77
10.2	OBJETIVO .....	77
10.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	78
10.4	RESULTADOS .....	79
11	ANEXO II.....	85
12	DISCUSIÓN .....	111
13	RESUMEN.....	127
14	CONCLUSIONES.....	129
15	MATERIAL Y MÉTODOS.....	133
15.1	TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	133
15.2	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	137
15.3	REACTIVOS Y TAMPONES.....	153
16	BIBLIOGRAFÍA.....	159

# **ABREVIATURAS**



## 2 ABREVIATURAS

**AKT**, proteína quinasa B

**BDL**, modelo experimental de ligadura del conducto biliar

**Casp7**, caspasa 7

**CCl<sub>4</sub>**, tetracloruro de carbono

**CGRP**, péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**CO**, monóxido de carbono

**DNA**, ácido desoxirribonucleico

**eNOS**, óxido nítrico sintasa endotelial

**fosfo-AKT**, proteína quinasa B fosforilada

**fosfo-TrkA**, receptor tirosina quinasa neurotrófica de tipo 1 fosforilada

**MAPK/ERK**, quinasa regulada por señales extracelulares

**JNK**, quinasa c-jun N-terminal

**MAP**, presión arterial media

**MAPK**, proteína quinasa activada por mitógenos

**NA**, noradrenalina

**NGF**, factor de crecimiento neuronal

**nNOS**, óxido nítrico sintasa neuronal

**NO**, óxido nítrico

**NOS**, óxido nítrico sintasa

**NPY**, neuropéptido Y

**Nrp1**, neuropilina 1

**PARP**, poli (ADP-ribosa) polimerasa-1

**P75<sup>NTR</sup>**, receptor de neurotrofinas p75

**PP**, presión portal

**proNGF**, precursor del factor de crecimiento neuronal

**PVL**, modelo experimental de ligadura calibrada de la vena porta

**RNA**, ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>**, ácido ribonucleico mensajero

**ROCK**, proteína quinasa asociada a Rho

**Sema3A**, semaforina 3A

**SMA**, arteria mesentérica superior

**SMABF**, flujo de la arteria mesentérica superior

**SMAR**, resistencia de la arteria mesentérica superior

**SMG**, ganglio mesentérico superior

**SNS**, sistema nervioso simpático

**SON**, núcleo supraóptico

**Sort1**, sortilina 1

**Th**, tirosina hidroxilasa

**TrkA**, receptor tirosina kinasa neurotrófica de tipo 1

**VAcHT**, transportador vesicular de acetilcolina

**VEGF**, factor de crecimiento vascular

**Nota:** Los acrónimos están escritos en inglés porque los utilizamos así en el día a día.



# **INTRODUCCIÓN**



## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL

La hipertensión portal es un síndrome clínico caracterizado por un aumento patológico de la presión del sistema venoso portal por encima de su valor normal (inferior a 6mmHg). Cualquier proceso que interfiera en el flujo de la sangre portal puede provocar hipertensión portal. Las causas se clasifican según la localización del aumento de la resistencia al flujo portal, que se puede dar en un ámbito pre-hepático, como en el caso de la trombosis portal, intra-hepático como en la cirrosis hepática o post-hepático, como en el síndrome de Budd-Chiari. La hipertensión portal intra-hepática puede producirse por diferentes afecciones del hígado, pero la cirrosis es la responsable de más del 90% de los casos en el mundo occidental. Cuando el gradiente de presión portal (diferencia entre las presiones de la vena porta y de la vena supra-hepática) aumenta más de 10mmHg pueden aparecer las complicaciones.

La hipertensión portal promueve la formación de vasos colaterales, a través de los cuales, la sangre portal se deriva a la circulación sistémica sin pasar por el hígado. Estas colaterales portosistémicas se forman por la apertura y dilatación de conductos vasculares preexistentes que conectan el sistema venoso portal con la vena cava superior e inferior. En condiciones normales, estos conductos están cerrados pero se dilatan debido al aumento de la presión portal. El sistema anastomótico más importante es el sistema colateral gastroesofágico, ya que incluye las varices esofágicas que son responsables de la principal complicación de la hipertensión portal: la

hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas. Otras manifestaciones del síndrome de la hipertensión portal son la encefalopatía hepática, la ascitis y la insuficiencia renal. Debido a la gravedad de estas complicaciones, la hipertensión portal representa la primera causa de muerte y de trasplante hepático en pacientes con cirrosis (1).

### 3.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL

Como en cualquier sistema vascular, el gradiente de presión a lo largo del sistema venoso portal es el producto del flujo sanguíneo portal por la resistencia vascular que se opone al mismo. Según la ley de Ohm esta relación viene definida por:

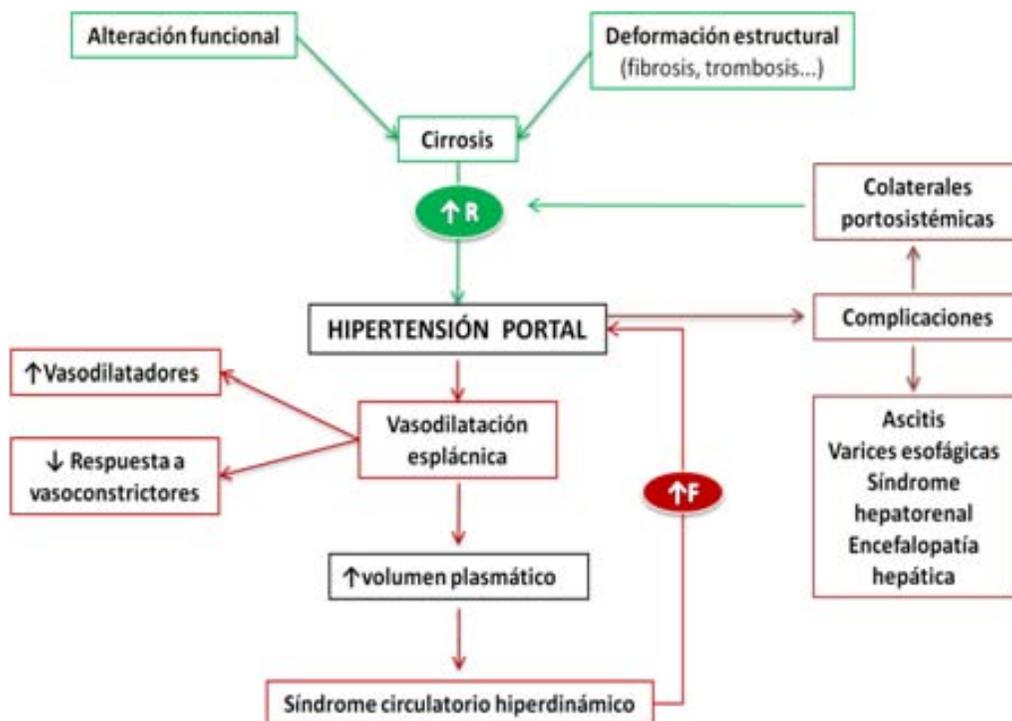
$$\Delta P = Q \times R$$

Donde  $\Delta P$  es el gradiente de presión portal,  $Q$  es el flujo sanguíneo en la totalidad del sistema venoso portal (que incluye las colaterales portosistémicas) y  $R$  es la resistencia del sistema venoso portal (suma de la resistencia del hígado, de la vena porta, y de las venas colaterales). Esta relación indica que la presión portal puede aumentar debido a un aumento del flujo sanguíneo portal, de la resistencia vascular o de ambos a la vez. De hecho, en pacientes cirróticos, el aumento de la resistencia al flujo sanguíneo portal es el factor principal desencadenante de la fisiopatología de la hipertensión portal (2;3).

### 3.3 SÍNDROME HIPERDINÁMICO

En estadios avanzados de la hipertensión portal se observa un aumento del flujo de entrada en la vena porta que es consecuencia de una importante vasodilatación arterial de los órganos espláncnicos que drenan la vena porta (4). Así, la circulación esplácnica y también la sistémica son hiperkinéticas, lo que implica un aumento del índice cardíaco así como un descenso de la presión arterial media y de la resistencia vascular periférica (5). Estos trastornos hemodinámicos asociados a la hipertensión portal (vasodilatación arterial sistémica, disminución de la resistencia periférica, hipervolemia y aumento del consumo cardíaco) es lo que se conoce como síndrome de circulación hiperdinámica y conduce a un aumento del flujo sanguíneo portal y a agravar la hipertensión (6), a pesar de que se desarrollen colaterales portosistémicas para descomprimir el sistema (Fig. 1).

El mecanismo fundamental del aumento del flujo sanguíneo esplácnico no se conoce por completo, pero se ha demostrado que está asociado a un aumento de la concentración de vasodilatadores circulantes, a una sobreproducción endotelial de vasodilatadores locales y a una reducción de la reactividad vascular frente a vasoconstrictores. Este último mecanismo, es probablemente una consecuencia del aumento del nivel de vasodilatadores (circulantes y paracrinos).



**Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos de la hipertensión portal**

F: flujo sanguíneo portal, R: resistencia vascular portal.

### 3.4 VASODILATACIÓN ESPLÁCNICA

Numerosos estudios apoyan la teoría que, durante la cirrosis, las colaterales portosistémicas permiten la entrada directa en el sistema circulatorio de sustancias humorales derivadas del intestino, como son el glucagón, los ácidos biliares y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (7;8). La formación de colaterales portosistémicas, además, tiene como consecuencia una endotoxemia derivada de los intestinos que estimula sustancias vasoactivas locales producidas por el endotelio vascular entre las cuales se encuentran las prostaglandinas, el óxido nítrico (NO) y el

monóxido de carbono (CO). El NO, es el factor que más se ha investigado y es, probablemente, el más importante que interviene en la vasodilatación durante la hipertensión portal (9-11). El exceso de NO es también responsable, en gran parte, de la insuficiente respuesta vascular a vasoconstrictores tanto en modelos *in vivo* e *in vitro* de ratas con ligadura de la porta o con cirrosis hepática, como en pacientes con cirrosis hepática (8;12). Sin embargo, a pesar de que probablemente, el NO tenga un papel relevante en esta alteración vascular, se ha demostrado que su inhibición atenúa, pero no normaliza, el síndrome hiperkinético de la hipertensión portal (13). Por ejemplo, la utilización del doble knockout de óxido nítrico sintasa endotelial y de óxido nítrico sintasa inducible (eNOS/iNOS) demostró que estos ratones desarrollaban circulación hiperdinámica después de provocarles la hipertensión portal (14). Ninguno de estos factores vasoactivos parece ser el único responsable de la vasodilatación arterial esplácnica durante la hipertensión portal, lo que sugiere que pueda tener un origen multifactorial.

### **3.5 MODELO ANIMAL DE LIGADURA DE LA VENA PORTA (PVL)**

La mayoría del conocimiento adquirido sobre la fisiopatología de la hipertensión portal en las últimas décadas, se ha extraído de los modelos animales experimentales. En un trabajo pionero realizado por Chojkier y Grozsmann (15;16) se estableció el modelo en rata de hipertensión portal por excelencia: el modelo de ligadura calibrada de la vena porta (PVL). Este modelo pre-hepático, consiste en una ligadura alrededor de una aguja de punta roma (20G) que se coloca paralela a la vena porta. La subsecuente

retirada de la aguja conduce a una estenosis calibrada de la vena porta. El modelo PVL reproduce todas las alteraciones hemodinámicas que caracterizan el síndrome circulatorio hiperdinámico que presentan los pacientes con hipertensión portal: aumento de la presión portal con aumento del flujo portal, aparición de colaterales porto-sistémicas, vasodilatación esplácnica con aumento del flujo esplácnico, hipotensión arterial y aumento del índice cardíaco. De hecho, el grado máximo de hipertensión portal se alcanza a las 24 horas post-ligadura donde se detecta una vasoconstricción mesentérica refleja con un subsecuente aumento de la resistencia esplácnica que contrasta claramente con las manifestaciones clínicas de la hipertensión portal. Posteriormente la hipertensión decae de manera global debido al desarrollo de las colaterales porto-sistémicas. Al cabo de una semana, los animales ya tienen establecido de forma completa el síndrome circulatorio hiperdinámico y el porcentaje de colaterales porto-sistémicas es cercano al 100%. La principal limitación de este modelo es que la hipertensión portal se desarrolla de forma aguda, y además no se acompaña de insuficiencia hepática.

### **3.6 SISTEMA NERVIOSO EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL**

Independientemente de los factores humorales implicados en la vasodilatación esplácnica, se ha prestado poca atención a los elementos nerviosos de esta alteración. Estudios histológicos han revelado que el músculo liso vascular está inervado por neuronas que presentan inmunoreactividad al óxido nítrico sintasa (NOS) (17), al transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), o a la tirosina hidroxilasa (Th). Estas

neuronas postganglionares eferentes, identificadas como nitrérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas, controlan la contractilidad de las células musculares de los vasos sanguíneos. Funcionalmente, se ha demostrado que los nervios nitrérgicos, tendrían más relevancia en la regulación del tono vascular que los colinérgicos, cuya función consiste, básicamente, en modular la función contráctil vasoconstrictora de los nervios adrenérgicos y vasodilatadora de los nitrérgicos (18). En la circulación mesentérica, tanto de humanos como de roedores, la vasoconstricción inducida por el sistema nervioso simpático (SNS) es principalmente transmitida por los receptores post-sinápticos adrenérgicos  $\alpha_1$  (19) y es más que probable, que la noradrenalina (NA) liberada de las terminales nerviosas adrenérgicas, sea la principal responsable de la regulación del tono de los vasos sanguíneos periféricos. Por otra parte, diferentes investigaciones han demostrado que otros agentes como el neuropéptido Y (NPY) y la adenosina trifosfato también se liberan en el sistema nervioso simpático, actuando como co-transmisores de la NA y potenciando su función (20).

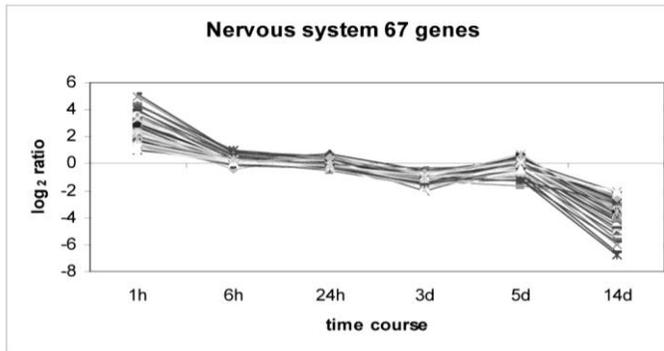
Un gran número de evidencias ha revelado que existe un aumento de la actividad del SNS en la fisiopatología de la hipertensión portal. En pacientes cirróticos, la actividad del SNS se encuentra elevada en diferentes partes del sistema hepato-esplácnico, incluidos tejidos o estructuras vasculares drenados por las colaterales porto-sistémicas. Asimismo, se ha determinado una relación positiva entre la noradrenalina y la adrenalina circulante y la progresión de la enfermedad (21). De hecho, pacientes con una hipertensión portal pronunciada, una alta retención de sodio y con el síndrome hepatorenal establecido, presentan altos niveles de NA en plasma. Además, se ha demostrado que existe una correlación entre los

niveles de NA circulantes y la supervivencia del enfermo (22). La estimulación del SNS, mediante el incremento de NA en plasma, se entiende como un intento de compensar y contrarrestar el estado de vasodilatación arterial y de hiporeactividad vascular. De todos modos, a pesar de los elevados niveles de catecolaminas endógenas circulantes, la hipotensión arterial persiste durante todo el desarrollo de la enfermedad. Además, varias evidencias demuestran que existen diferencias regionales en la distribución de la activación del sistema nervioso simpático en el contexto de la cirrosis (23;24). Por otro lado, la NOS no sólo se produce en las células endoteliales (eNOS), sino que también se encuentra en nervios peri-vasculares (nNOS). Estos nervios nitrérgicos producen vasorelajación de las células del músculo liso. Diferentes estudios han sugerido que existe una sobreexpresión de nNOS en los nervios peri-vasculares de las arterias mesentéricas de ratas con hipertensión portal (25), de manera que el NO dependiente de nNOS podría jugar un papel importante en la vasodilatación arterial de la hipertensión portal. Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición selectiva de nNOS, aumenta la respuesta adrenérgica vasoconstrictora (26) lo que sugiere que el NO pre-sináptico podría inhibir la liberación de NA de las terminales nerviosas adrenérgicas.

### **3.6.1 ATROFIA SIMPÁTICA EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL**

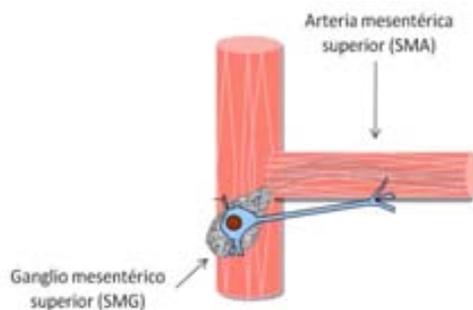
Nuestro grupo fue el primero en plantear una participación del sistema nervioso simpático en la fisiopatología de la vasodilatación arterial mesentérica. Se demostró que en muestras de arteria mesentérica superior (SMA) de ratas PVL existe un incremento inicial (1 hora post-PVL) en la producción de RNA mensajeros de más de 50 genes relacionados con

neurogénesis y neurotransmisión, especialmente adrenérgica, seguido de una intensa inhibición a los 14 días post-PVL (27) (Fig. 2).



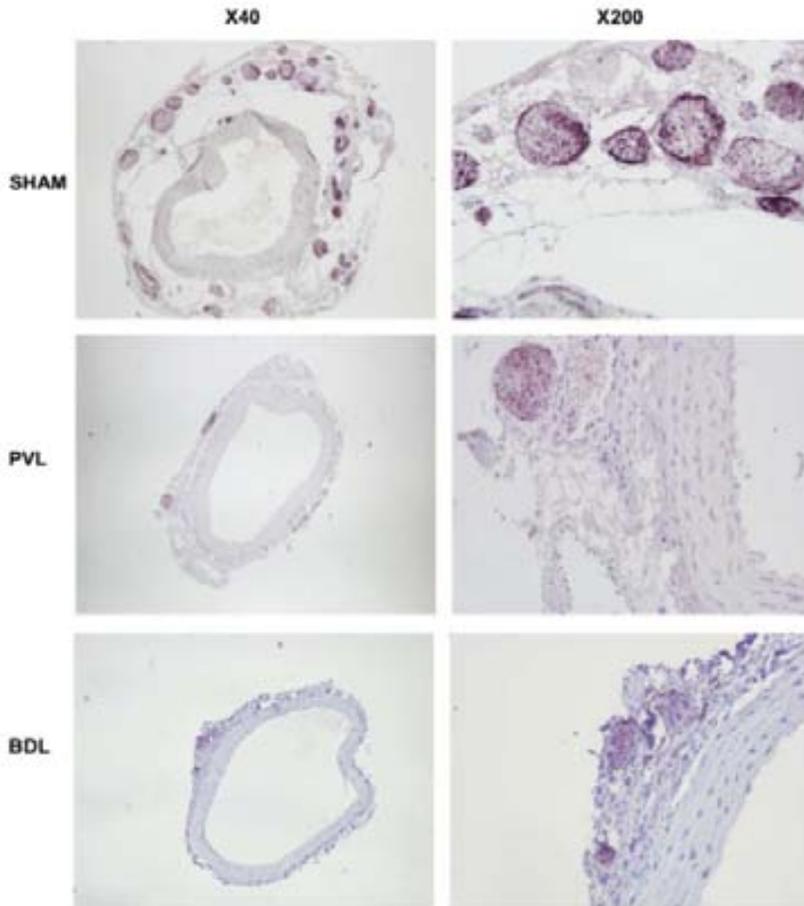
**Figura 2. Perfil de expresión de 67 genes del sistema nervioso a lo largo del modelo PVL.** Gráfica que representa la infra-regulación de genes asociados a funciones relacionadas con el sistema nervioso durante los 14 días post-ligadura.

Esta inhibición se acompañó de una reducción en la expresión de proteínas relacionadas con neurotransmisión adrenérgica y con la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico en muestras de SMA y de arterias de resistencia en el modelo PVL, en el modelo de ligadura del conducto biliar (BDL) y en el modelo de inducción de cirrosis por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (27;28). Se verificó que el RNAm previo de estas proteínas se produce en el ganglio mesentérico superior (SMG) (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema de la arteria mesentérica superior y del ganglio mesentérico superior.**

Además, el trastorno hemodinámico de la hipertensión portal también se correlacionó, de forma muy significativa, con una alteración morfológica de los nervios que rodean la SMA, demostrada por una disminución en el número de paquetes axonales, en el área total de paquetes nerviosos y en el área que expresa la encima Th. (Fig. 4). Esta atrofia de la inervación simpática en la SMA podría estar contribuyendo a la vasodilatación esplácnica asociada a la hipertensión portal.



**Figura 4. Inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa en la arteria mesentérica superior**

El aumento a 40x muestra la pared arterial rodeada de paquetes nerviosos. El aumento a 200x revela la tinción de Th dentro de las fibras axonales. El número de paquetes, el área total de las estructuras nerviosas y el área teñida por Th se encuentran significativamente disminuidas en la SMA de ratas PVL y BDL comparando con ratas sham.

Este hallazgo contradice en parte, el concepto tradicional sobre el sistema adrenérgico en la cirrosis hepática que siempre se ha considerado activado o hiperestimulado en esta patología (29). Sin embargo, nunca se ha demostrado una activación en los vasos mesentéricos y probablemente, exista una inhibición adrenérgica local (mesentérica), dentro de un contexto de activación adrenérgica más global (sobre todo en riñón, músculo esquelético y otros órganos). De acuerdo con esta hipótesis, nuestro grupo ha demostrado recientemente (30), que tanto la administración aguda de droxidopa (un precursor sintético oral de noradrenalina) en el modelo de PVL y BDL, como la terapia crónica con droxidopa en ratas BDL y CCl<sub>4</sub>, mejora las alteraciones hemodinámicas, sin afectar la presión portal (PP) ni el flujo renal, y causando un aumento del 50% en la diuresis.

### **3.7 VÍA NEURONAL QUE CONTROLA EL SISTEMA CARDIOVASCULAR**

El sistema cardiovascular está controlado por los núcleos de regulación cardiovascular del sistema nervioso central y los nervios periféricos aferentes y eferentes. Lee y colaboradores demostraron que el bloqueo de los nervios sensitivos aferentes, mediante la neurotoxina capsaicina, previene las alteraciones hemodinámicas típicas de la hipertensión portal (31) a pesar de que un estudio posterior utilizando la capsaicina en ratas neonatales, no evidenció diferencias significativas en las alteraciones hemodinámicas de ratas PVL (32). En un siguiente estudio, los mismos autores encontraron que el bloqueo de la señal aferente inhibe el característico aumento de la expresión de cFos (producto del gen de expresión temprana c-fos) en los núcleos de regulación cardiovascular del

cerebro de ratas con hipertensión portal (33). Estos resultados sugieren que tanto los nervios sensitivos aferentes como la activación de los núcleos de regulación cardiovascular son esenciales para el desarrollo de la circulación hiperdinámica durante la hipertensión portal. Por otro lado, el bloqueo de la activación de los núcleos de regulación cardiovascular inhibió el síndrome hiperdinámico en ratas PVL (34) y se demostró que las señales aferentes que se transmiten a áreas de regulación del sistema nervioso central lo hacen vía el nervio vago (33). Además, el tratamiento con capsaicina en ratas BDL también evidenció que la retención de sodio y la formación de ascitis son dependientes de la inervación aferente (35).

### **3.8 NEURONAS AFERENTES SENSIBLES A LA CAPSAICINA**

El efecto estimulador y neurotóxico de la capsaicina conduce a cambios morfológicos severos en algunas neuronas sensitivas mielinizadas de pequeño calibre (fibras A- $\delta$ ) y, predominantemente, en neuronas aferentes primarias amielínicas (fibras C) (36). A esta subpoblación de neuronas sensitivas primarias se les denomina sensibles a la capsaicina y estudios previos de inmunocitoquímica las han asociado con el sistema cardiovascular (37). La función sensitiva de estas neuronas está mayormente relacionada con la transmisión de impulsos nociceptivos. No obstante, una vez activadas por estímulos periféricos, también son capaces de liberar su contenido de transmisores, sustancia P y CGRP, a partir de las terminales periféricas en el tejido inervado. Por consiguiente se utiliza el término “neuronas motoras-sensoriales” para apuntar la actividad dual aferente (sensorial) y eferente (motora) de esta población neuronal (38) (Fig. 5). La

capsaicina actúa como agonista de los receptores vaniloides del subtipo 1, TRPV1, que son canales de cationes ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. Su unión provoca la despolarización y la liberación masiva de sustancia P y CGRP, seguida de una inactivación más o menos permanente de estos nervios. En ratas neonatales, el soma y los axones de las neuronas aferentes primarias (función sensitiva) son considerablemente más susceptibles a la acción de la neurotoxina que en las adultas, mientras que la destrucción de las terminales de los axones en la periferia (función motora) en el adulto pueden ser tan extensas como en el modelo neonatal (39;40).

Varios trabajos han sugerido que los vasodilatadores CGRP y sustancia P liberados por los nervios sensitivos a la capsaicina, podrían jugar un papel importante en promover la vasodilatación esplácnica en la hipertensión portal, ya que se han encontrado niveles elevados tanto de sustancia P como de CGRP en pacientes con cirrosis e insuficiencia hepática (26).



**Figura 5. Neurona sensitiva sensible a la capsaicina**

Las neuronas sensibles a la capsaicina presentan una capacidad dual; por un lado envían señales aferentes al sistema nervioso central vía el nervio vago, y por otro lado poseen una función motora local en el tejido inervado.

### 3.9 MODULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN NEURONAL

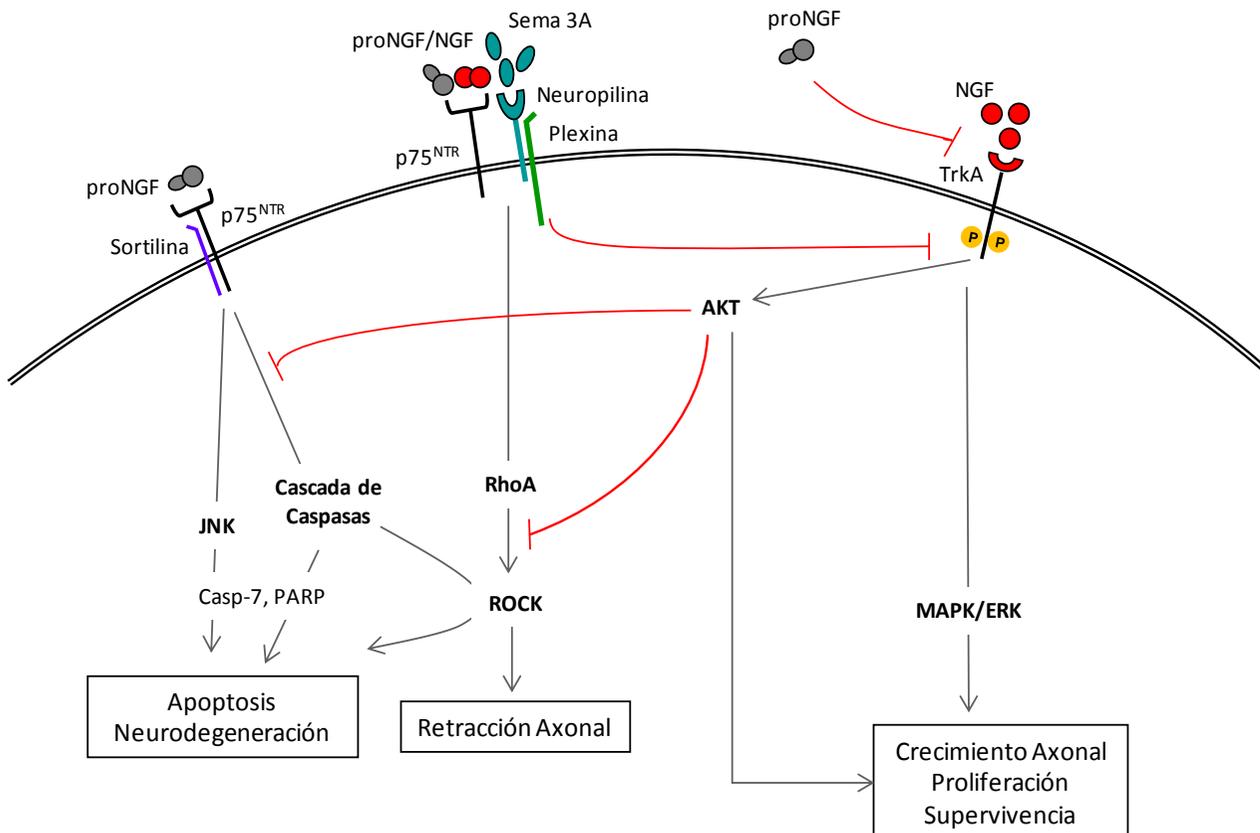
Las neuronas simpáticas, al igual que otras neuronas, regulan su actividad mediante neurotrofinas y moduladores que controlan el crecimiento/regresión axonal o la supervivencia/muerte neuronal (41). El factor de crecimiento nervioso (NGF) es responsable de la supervivencia y del crecimiento neuronal mediante la unión al receptor tirosina quinasa neurotrófica de tipo 1 (TrkA) (42), donde el receptor de neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>) modula la afinidad y selectividad de la activación de TrkA (43). Sin embargo, su precursor proNGF puede inducir la regresión o muerte neuronal a través de la unión simultánea al receptor p75<sup>NTR</sup> y al receptor sortilina 1 (Sort1) (44;45) o de forma indirecta inhibiendo la actividad de NGF dependiente de TrkA (46) (Fig. 6). Por el contrario, se ha sugerido que cuando el receptor TrkA está activo promueve la supervivencia neuronal silenciando la señal apoptótica continua derivada de p75<sup>NTR</sup> (47).

El NGF y la proteína quimiorepelente semaforina3A (Sema3A) actúan como moléculas guía regulando la movilidad y el crecimiento del cono axonal para formar la red neuronal durante la neuroembriogénesis (48). Ambas proteínas se regulan entre sí, NGF modula la actividad de repulsión que ejerce Sema3A al interactuar con el complejo de receptores neuropilina 1 (Nrp1) y PlexinaA1 (49) mientras que, en situaciones de sobreexpresión de NGF, Sema3A inhibe el crecimiento axonal dependiente de NGF, inactivando su receptor TrkA (50). La expresión de Sema3A se mantiene en el adulto, donde además de estar implicada en la plasticidad y en la regeneración neuronal tras una lesión (51), también induce la inhibición del crecimiento neuronal dependiente de NGF (50), la apoptosis (52;53) (Fig. 6) y el colapso y la retracción axonal (48;54;55). En condiciones normales, la proteína

quinasa asociada a Rho (ROCK) regula la dinámica de la actina, pero su estimulación por Sema3A conduce a la activación de las vías de señalización implicadas en retracción y colapso axonal. Para que esto ocurra, es necesaria la señalización por p75<sup>NTR</sup> y su unión a las neurotrofinas (54;56). Además, el aumento de expresión de ROCK participa en la inhibición de vías de supervivencia mediante la inhibición de la actividad de la proteína quinasa B (PKB) o AKT y mediante la estimulación de la apoptosis (57).

Las vías de señalización de AKT y de las familias de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) juegan un papel muy importante en la regulación de diversos programas celulares como la proliferación, diferenciación, desarrollo y apoptosis. La estimulación de AKT favorece mayormente la proliferación y la supervivencia neuronal y además regula negativamente la vía apoptótica y la retracción axonal (58;59). Dentro de las familias de las MAPK, implicadas en la transducción y amplificación de señales extracelulares (factores de crecimiento, estrés, citoquinas), la quinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK) y la quinasa c-jun N-terminal (JNK) son de las familias MAPK mejor caracterizadas. Una vez activadas y translocadas al núcleo, promueven múltiples procesos fisiológicos mediante la transcripción de genes en el núcleo. La vía de señalización de MAPK/ERK promueve el crecimiento, la diferenciación o la proliferación (60) y la vía de JNK la proliferación, diferenciación y apoptosis (43;61). La estimulación de JNK a través del receptor p75<sup>NTR</sup> (62) da lugar a la activación de la cascada de las caspasas. Dentro de la numerosa familia de las caspasas, la caspasa 7 (Casp7) se ha identificado como una de las caspasas efectoras claves en la ejecución de la apoptosis. Su activación, mayormente por otras caspasas, depende de una escisión proteolítica (63).

Experimentos *in vivo* han demostrado que la Casp7 activa provoca la proteólisis de proteínas esenciales en la maquinaria de la célula incluyendo la poli (ADP-ribosa) Polimerasa-1 (PARP), implicada en la reparación de ácido desoxirribonucleico (DNA) en respuesta al estrés ambiental (64).



### Figura 6. Vías de señalización neuronal

Representación esquemática de las moléculas neuromoduladoras (ProNGF/NGF, Sema 3A y sus receptores p75<sup>NTR</sup>, sortilina, TrkA, neuropilina) que activan las vías de señalización conduciendo a crecimiento, proliferación y supervivencia neuronal (AKT, MAPK) o bien a retracción axonal, apoptosis o degeneración neuronal (ROCK, JNK, Caspasas, PARP).

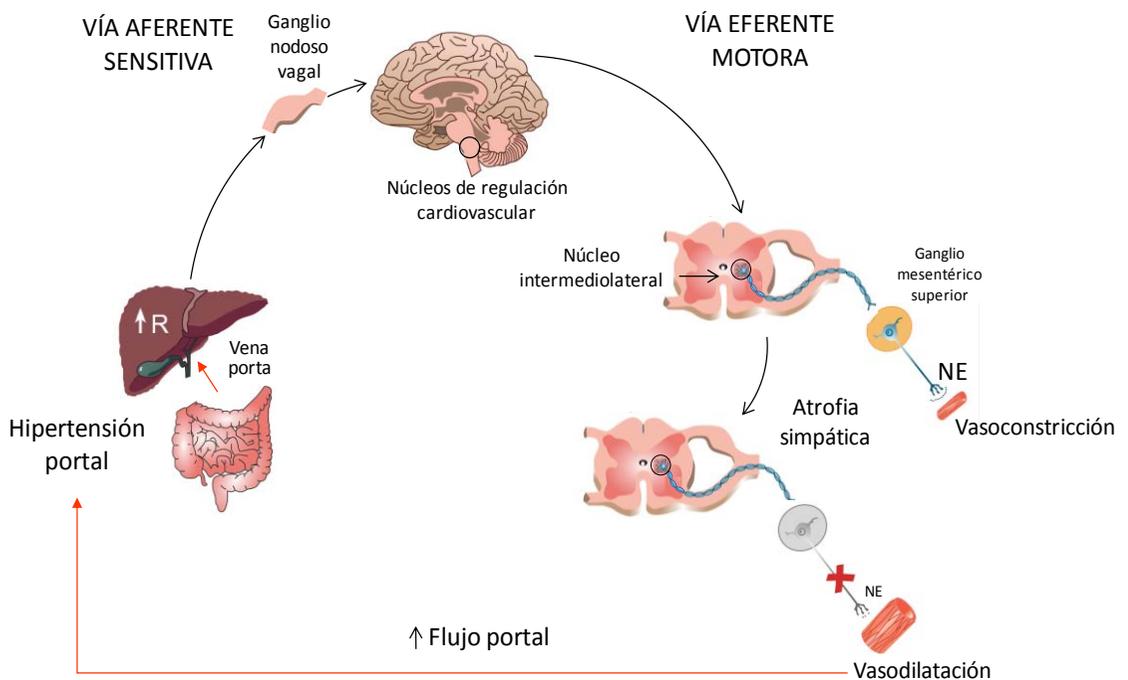


# **HIPÓTESIS Y OBJETIVO**



## 4 HIPÓTESIS

El estímulo aferente de la hipertensión portal generado por el aumento de la presión portal de la vasculatura mesentérica o de la microvasculatura, alcanza los núcleos reguladores cardiovasculares del cerebro a través de los nervios aferentes vía el nervio vago. De ahí, la señal se transmite de los núcleos espinales simpáticos a los ganglios simpáticos esplácnicos provocando alteraciones en la neuromodulación que conducen al desarrollo de la atrofia simpática post-ganglionar, ocasionando la inhibición de la neurotransmisión y al deterioro de la vasoconstricción mediada por la noradrenalina (NA).



## 5 OBJETIVO

Avanzar en el conocimiento de los mecanismos de génesis y mantenimiento del trastorno adrenérgico local y averiguar si bloqueando o alterando las vías aferentes y eferentes, se puede evitar la atrofia adrenérgica en la arteria mesentérica superior y evitar o mejorar el trastorno hemodinámico.

# **ESTUDIO 1**



## 6 ESTUDIO 1

### EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE cFOS Y LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS EN EL MODELO ADULTO

#### 6.1 INTRODUCCIÓN

La hipertensión portal produce vasodilatación arterial y atrofia simpática en la zona esplácnica. La señal responsable de provocar estas alteraciones podría iniciarse en los nervios sensitivos que detectan los cambios de presión a nivel portal (65;66). Dicha señal promovería un aumento en la expresión de cFos en los núcleos de regulación cardiovascular del cerebro. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la señal aferente, mediante la neurotoxina capsaicina, inhibe la expresión de cFos y previene las alteraciones hemodinámicas en ratas con hipertensión portal (33;34). No obstante, la efectividad de la neurotoxina sobre la abolición de la inervación aferente primaria, especialmente en ratas adultas, es heterogénea (67). En base a esto, el primer estudio consistió en ratificar la inhibición de la señal aferente, a partir del análisis de expresión de cFos en el cerebro y las correspondientes medidas hemodinámicas en ratas tratadas con capsaicina.

#### 6.2 OBJETIVOS

- Correlacionar la inhibición de la señal aferente en ratas PVL tratadas con capsaicina, mediante el análisis de expresión de cFos en el núcleo supraóptico (SON) del cerebro y las correspondientes medidas hemodinámicas.

- Establecer un punto de corte, basado en valores de presión arterial media (MAP) y flujo de la arteria mesentérica superior (SMABF), que permita clasificar los animales según la efectividad obtenida del bloqueo aferente.

### **6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El estudio 1 incluye la detección del marcador neuronal cFos en el SON hipotalámico mediante inmunofluorescencia, y las determinaciones de los parámetros hemodinámicos en un grupo de ratas tratadas con capsaicina o vehículo en edad adulta. Se utilizaron 20 animales: 12 ratas PVL (capsaicina n=8; vehículo n=4) y 8 animales con cirugía ficticia sham (capsaicina n=4; vehículo n=4).

### **6.4 RESULTADOS**

#### **6.4.1 La inhibición de la expresión de cFos en el núcleo supraóptico del cerebro indica el bloqueo efectivo de la señal aferente en ratas con hipertensión portal.**

Como se observa en la figura 1 (Anexo I), los animales PVL vehículo, presentaron células inmunoreactivas a cFos densamente distribuidas en el SON, comparando con la escasa tinción de los controles sham. Asimismo, los animales sham tratados con capsaicina tampoco mostraron expresión de cFos. Sin embargo, dentro del grupo de las 8 PVL tratadas con capsaicina, 4

(50%) obtuvieron bajos niveles de cFos, similares al grupo de las sham. En estos animales el bloqueo de los nervios aferentes tras el tratamiento con capsaicina se consideró efectivo (PVL capsaicina con bloqueo), acompañándose, además, de valores de MAP ( $123.9 \pm 1.1$  mmHg) y de SMABF ( $3.5 \pm 0.25$  ml/min.100g) semejantes a los de las ratas sham (MAP= $128.9 \pm 4.32$  mmHg, SMABF= $4.42 \pm 0.29$  ml/min.100g) (Anexo I, Tabla 1). Por otro lado, las 4 ratas PVL tratadas con capsaicina, cuyos valores de expresión de cFos fueron semejantes al de las ratas PVL vehículo, conservaron valores de MAP ( $104.9 \pm 7$  mmHg) y de SMABF ( $6.5 \pm 0.3$  ml/min.100g) similares a las ratas PVL vehículo (MAP= $103.31 \pm 2.03$  mmHg, SMABF=  $6.86 \pm 0.5$  ml/min.100g); en este caso, el bloqueo de la vía sensitiva aferente no se estimó efectivo (PVL capsaicina sin bloqueo).

En base a estos resultados, se determinó el criterio hemodinámico (calculado a partir de las medias de los valores obtenidos de las 8 ratas PVL tratadas con capsaicina) para definir la correcta abolición de los nervios aferentes en los animales utilizados posteriormente. El punto de corte se estableció en:

MAP $\geq$ 115mmHg y SMABF $\leq$ 5ml/min.100g
--



# **ESTUDIO 2**



## 7 ESTUDIO 2

### EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y LA ATROFIA SIMPÁTICA EN EL MODELO ADULTO Y NEONATAL

#### 7.1 INTRODUCCIÓN

Una vez determinado el criterio hemodinámico que define la correcta abolición de la señal aferente sensitiva, nos propusimos explorar si, mediante el bloqueo de la vía aferente con capsaicina, se prevenían, simultáneamente, las alteraciones hemodinámicas y la atrofia simpática. Para ello, se utilizó un grupo de ratas adultas (modelo adulto) y otro de ratas neonatales (modelo neonatal).

Por otro lado, así como la administración de capsaicina produce un efecto heterogéneo sobre la función aferente sensitiva (estudio 1), varios estudios han probado que la actividad eferente motora queda abolida de manera completa tras el tratamiento, reflejada por la incapacidad de las neuronas para liberar los neuropéptidos CGRP y substancia P directamente en el tejido inervado (67-69). Se ha especulado que las mismas terminaciones CGRPérgicas de los nervios sensibles a la capsaicina también contienen óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (26). Ambas proteínas, tanto el vasodilatador CGRP (70;71) como la enzima nNOS (25;72), se han asociado con la generación o mantenimiento de la vasodilatación arterial esplácnica en la hipertensión portal. Nos planteamos, por lo tanto, examinar el impacto de la capsaicina sobre la función eferente motora.

Finalmente, considerando nuestra hipótesis de que la atrofia simpática es consecuencia de una señal nerviosa que proviene de los núcleos cerebrales, nos propusimos estudiar cambios en la expresión de moduladores neuronales, dentro del SMG, que contiene los somas neuronales, que pudieran estar relacionados con la atrofia simpática mesentérica de la hipertensión portal.

## 7.2 OBJETIVOS

- Averiguar si el bloqueo aferente previene el trastorno hemodinámico y la atrofia simpática, simultáneamente, en el modelo adulto y en el modelo neonatal.
- Estudiar el efecto de la capsaicina sobre la función motora de los nervios sensibles a la capsaicina, mediante el análisis de expresión de CGRP y averiguar si los nervios CGRPérgicos contienen nNOS.
- Examinar marcadores implicados en la modulación neuronal (Sema3A, NGF y proNGF, TrkA, p75<sup>NTR</sup>) que pudieran estar participando en la atrofia simpática, en muestras de SMA y de SMG.

## 7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio incluye el análisis de las medidas hemodinámicas, el análisis de la expresión de la enzima Th para evaluar la atrofia simpática de las fibras nerviosas que rodean la SMA y las arterias mesentéricas de resistencia, y el análisis de marcadores neuronales (CGRP, nNOS, NGF, proNGF, Sema3A, y VAcHT. TrkA y p75<sup>NTR</sup>) en muestras de SMA y SMG. Se estudió, por un lado,

un grupo de adultos de los cuales 25 eran ratas PVL (capsaicina n=15, vehículo n=10) y 15 ratas sham (capsaicina n=6, vehículo n=9); y un grupo neonatal de los cuales 23 eran PVL (capsaicina n=12, vehículo n=11) y 5 sham (capsaicina n=5).

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1 El bloqueo aferente previene las alteraciones de los parámetros hemodinámicos y de inervación simpática en el modelo adulto

En un primer análisis, los resultados hemodinámicos se valoraron incluyendo todos los individuos PVL tratados con capsaicina, sin considerar la efectividad del bloqueo aferente. Los datos obtenidos revelaron valores hemodinámicos característicos de animales con hipertensión portal tanto en el grupo de ratas PVL vehículo como en el de ratas PVL capsaicina (Anexo I, Tabla1). Sin embargo, al clasificar los animales PVL capsaicina según el criterio hemodinámico definido en el estudio 1, 7 animales de 15 (47%) se seleccionaron como ratas con bloqueo efectivo, presentando valores que, con excepción de la PP, eran similares a los de las ratas sham (MAP =120.4±5.4mmHg, SMABF=4.1 ± 0.1ml/min.100 g y resistencia de la arteria mesentérica superior (SMAR)=26.0±1.1mmHg/ml.min.100g) y significativamente diferentes de las ratas PVL vehículo.

Para valorar los cambios estructurales de las fibras nerviosas que inervan la SMA, se analizó el área nerviosa total que rodea la parte externa de la pared de la SMA y el área de tinción de Th dentro de las estructuras nerviosas. Tal

y como se había demostrado en estudios anteriores (73), ambos parámetros presentaron una disminución significativa en ratas PVL vehículo respecto a sham (Anexo I, Fig. 2A y B). Sin embargo, las PVL capsaicina con bloqueo efectivo mostraron valores muy diferentes de las ratas PVL vehículo, siendo muy similares a las sham en ambos parámetros. Además, el análisis de expresión de Th mediante Western blot en las arterias mesentéricas de resistencia también resultó ser muy similar entre ratas PVL con bloqueo efectivo y ratas sham, exhibiendo un aumento significativo en la expresión de Th (41% de aumento) respecto a PVL vehículo (Anexo I, Fig. 2C).

Por el contrario, el grupo de PVL capsaicina sin bloqueo efectivo (el 53%), se comportó como las PVL vehículo en todos los parámetros hemodinámicos y de inervación simpática (Anexo I, Fig. 2A, 2B, 2C). El tratamiento con capsaicina también se llevó a cabo en ratas sham, para descartar el posible efecto directo de la capsaicina sobre las medidas analizadas; en este grupo, ni los valores hemodinámicos ni los parámetros de inervación simpática se diferenciaron de las ratas sham vehículo (Anexo I, Tabla 1, Fig. 2).

#### **7.4.2 El bloqueo aferente previene las alteraciones de los parámetros hemodinámicos y de inervación simpática en el modelo neonatal**

El análisis de este estudio confirmó los resultados obtenidos en el modelo adulto. Como se observa en la tabla 1 (Anexo I), las ratas PVL capsaicina neonatales se diferenciaron significativamente de las PVL vehículo en todos los parámetros hemodinámicos, excepto en la PP, mostrando un marcado aumento en la MAP ( $106.5 \pm 1.8$  vs  $120.5 \pm 4.7$  mmHg) y en la SMAR ( $14.4 \pm 1.2$  vs.  $21.5 \pm 3$  mmHg/ml.min.100g) y una reducción significativa del SMABF

( $4.9 \pm 0.2$  vs.  $6.3 \pm 0.4$  ml/min.100g). Los valores hemodinámicos fueron muy similares a los de las ratas sham. A pesar de que en este modelo la efectividad del bloqueo aferente se obtuvo en un 70% de los animales, el grupo se analizó en conjunto.

El efecto de la capsaicina sobre los parámetros de inervación simpática de la SMA en el modelo neonatal fue algo más marcado que en el adulto. Así, tanto el área nerviosa total como el área de tinción de Th (Anexo I, Fig. 2A y B) fueron significativamente incrementadas en ratas PVL capsaicina respecto a PVL vehículo, siendo muy similares a las sham. La expresión de Th en las arterias de resistencia de ratas PVL capsaicina también exhibió un aumento importante del 63% ( $p < 0.001$ ) respecto a PVL vehículo (Anexo I, Fig. 2C). Al igual que en el adulto, las ratas sham neonatales tratadas con capsaicina no mostraron alteraciones en los valores hemodinámicos ni en los parámetros de estructura nerviosa comparando con ratas sham vehículo (Anexo I, Tabla 1, Fig. 2).

#### **7.4.3 La administración de capsaicina afecta al contenido de CGRP en la arteria mesentérica superior y en el ganglio mesentérico superior, pero no al de nNOS**

Para estudiar el efecto de la capsaicina sobre la función motora, se examinó el contenido de CGRP y nNOS tanto en las fibras nerviosas que rodean la SMA como en las fibras localizadas dentro del SMG.

La señal inmunofluorescente de CGRP desapareció en todos los animales tratados con capsaicina en las muestras de SMA y de SMG (Anexo I, Fig. 3),

independientemente de si el bloqueo aferente había resultado efectivo o no (Anexo I, Supplementary Fig. 1). Sin embargo, el contenido de nNOS en las fibras nerviosas no se vio afectado por el tratamiento, presentando una intensa señal inmunofluorescente en la SMA y el SMG tanto en ratas PVL capsaicina como en PVL vehículo. La inmunofluorescencia simultánea de CGRP y nNOS demostró claramente que ambos tipos de fibras no colocalizan en los mismos axones, sino que son independientes (Anexo I, Fig. 3).

#### **7.4.4 La expresión de Sema3A se encuentra aumentada en el ganglio mesentérico superior de ratas con hipertensión portal**

El análisis por inmunofluorescencia de la proteína quimiorrepelente Sema3A, en muestras de SMA de ratas PVL y sham reveló una señal muy tenue, tanto en la pared arterial como en las fibras nerviosas que la rodean (Anexo I, Supplementary Fig. 2), aunque parecía estar ligeramente más marcada en ratas PVL. Esta tendencia se confirmó al cuantificar la señal inmunofluorescente de Sema3A en muestras de SMG (Anexo I, Fig. 4A). El análisis cuantitativo del contenido medio de Sema3A en SMG mostró un incremento significativo en la expresión de PVL respecto a sham ( $962 \pm 160$  vs.  $250 \pm 65$  en intensidad de la densidad;  $p=0.003$ ). Sin embargo, las ratas PVL capsaicina con bloqueo efectivo resultaron ser significativamente diferentes de las PVL vehículo ( $399 \pm 76$  vs.  $962 \pm 160$ ;  $p=0.009$ ) y casi idénticas a las ratas sham (Anexo I, Fig. 4B).

#### **7.4.5 Sema3A colocaliza con VAcHt en las fibras nerviosas del ganglio mesentérico superior**

Con el fin de localizar la procedencia de la sobreexpresión de Sema3A observada en el SMG de ratas PVL, se llevaron a cabo una serie de experimentos de inmunofluorescencia simultánea (Anexo I, Supplementary Fig. 3 y Fig. 5A). Mientras que Th se localiza dentro del soma de las neuronas adrenérgicas del SMG, Sema3A se encontró rodeando el contorno de estas neuronas en el espacio interneuronal, pero nunca colocalizando con los axones adrenérgicos. A pesar de que Sema3A presentaba una distribución semejante al de las fibras nitrérgicas que contienen nNOS, la microscopía confocal demostró que no existía colocalización de estas dos señales (Fig. 5B). Las fibras aferentes positivas a CGRP también mostraron una distribución distinta a las fibras marcadas con Sema3A en el SMG (Fig. 5C). Sin embargo, la doble tinción de Sema3A y de VAcHt (marcador de fibras colinérgicas) evidenció que podrían estar, al menos en parte, colocalizando (Anexo I, Fig. 5D). Este resultado sugiere que Sema3A podría tener su origen en las fibras colinérgicas simpáticas preganglionares.

#### **7.4.6 La expresión de las neurotrofinas NGF y proNGF se encuentra aumentada en el ganglio mesentérico superior de ratas PVL**

También se evaluaron los niveles de expresión del factor de crecimiento (NGF) y de su precursor (proNGF) en muestras de SMG. Como se observa en la Figura 4C (Anexo I), la intensidad de las bandas correspondientes tanto al NGF maduro (14kDa), como al proNGF (30-32kDa), revelaron un aumento de 270% y 132%, respectivamente, en PVL vehículo comparando con sham.

Una vez más, las ratas PVL capsaicina con bloqueo efectivo mostraron un descenso significativo de la expresión de ambas proteínas proNGF y NGF respecto a PVL vehículo, disminuyendo casi a valores normales de ratas sham.

Finalmente se evaluó el nivel de expresión de los receptores de neurotrofinas donde la expresión del receptor  $p75^{\text{NTR}}$ , a través del cual NGF y proNGF pueden conducir a muerte neuronal, manifestó un claro aumento del 48% en PVL comparado con sham ( $p=0.007$ ) (Anexo I, Fig. 6). La disposición de ambos receptores en ratas sham y PVL se valoró por medio del cálculo del ratio de expresión de  $p75^{\text{NTR}}/\text{TrkA}$ , que reveló un aumento del 125% en ratas PVL ( $p=0.029$ ) (Anexo I, Fig. 6), apuntando hacia la activación de la apoptosis y regresión axonal a través de  $p75^{\text{NTR}}$ .

# **ANEXO I**



## 8 ANEXO I

## BASIC STUDIES

## Blockage of the afferent sensitive pathway prevents sympathetic atrophy and hemodynamic alterations in rat portal hypertension

Nahia Ezkurdia<sup>1</sup>, Mar Coll<sup>1</sup>, Imma Raurell<sup>1</sup>, Sarai Rodriguez<sup>1</sup>, Silvia Cuenca<sup>1</sup>, Antonio González<sup>1</sup>, Jaime Guardia<sup>1,2</sup>, Rafael Esteban<sup>1,2</sup>, Joan Genescà<sup>1,2</sup> and Maria Martell<sup>1</sup>

1 Liver Unit-Department of Internal Medicine, Hepatic Disease Laboratory, Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

2 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

### Keywords

afferent sensitive signal – capsaicin – cirrhosis  
– portal hypertension – sympathetic atrophy

### Abbreviations

BW, body weight; CGRP, calcitonin gene-related peptide; MAP, Mean portal pressure; NGF, nerve growth factor; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; p75<sup>NTR</sup>, p75 neurotrophic receptor; PP, portal pressure; proNGF, nerve growth factor proform; PVL, portal vein ligated; Semaphorin-3A, semaphorin-3A; SMA, superior mesenteric artery; SMG, superior mesenteric ganglion; SON, supraoptic nucleus; TrkA, tyrosine kinase receptor A; VACHT, vesicular acetylcholine transporter.

### Correspondence

Joan Genescà, Department of Internal Medicine, Liver Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-127, 08035 Barcelona, Spain  
Tel: +34 932746140  
Fax: +34 932746068  
e-mail: jgenesca@vhebron.net

Received 7 September 2011

Accepted 6 January 2012

DOI:10.1111/j.1478-3231.2012.02762.x

Portal hypertension is the most important complication of cirrhosis. In the physiopathology of the circulatory hemodynamic alteration of portal hypertension, splanchnic vasodilation initiates the hemodynamic process. Factors responsible for arterial vasodilation in cirrhosis are excessive activity or levels of vasodilators, such as nitric oxide, and a decrease in vascular reactivity to vasoconstrictors (1–3). We have demonstrated an important down-regulation of proteins implicated in adrenergic neurotransmission in the superior mesenteric artery (SMA) from portal hypertensive and cirrhotic rats, accompanied by a marked atrophy of the sympathetic innervation in the mesenteric arteries

### Abstract

**Background and Aims:** Portal hypertension causes arterial vasodilation and sympathetic atrophy in the splanchnic area. We aimed to demonstrate a relationship between hemodynamic alterations and sympathetic atrophy by investigating a pathway from sensitive afferent signals to mesenteric sympathetic ganglia. **Methods:** Experiments were conducted in sham and portal vein ligated (PVL) adult and neonatal rats treated with vehicle or capsaicin. Hemodynamic parameters, and immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blot of different tissues were analysed. **Results:** cFos expression in the brain supraoptic nuclei was used to confirm abrogation of the afferent signal in capsaicin-treated PVL rats (effectively afferent blocked). Neonatal and adult PVL afferent blocked rats showed simultaneous prevention of hemodynamic alterations and sympathetic atrophy (measured by tyrosine hydroxylase expression in nerve structures of splanchnic vasculature). Not effectively afferent blocked rats showed none of these effects, behaving as PVL vehicle. All capsaicin treated animals presented loss of calcitonin gene-related peptide in superior mesenteric artery and ganglia, whereas neuronal nitric oxide synthase remained unaffected. Neuronal markers semaphorin-3A, nerve growth factor, its precursor and p75 neurotrophic receptor, were significantly over-expressed in the PVL sympathetic ganglia compared with sham, but not in effectively afferent blocked rats. Semaphorin-3A staining in mesenteric ganglia co-localized with vesicular acetylcholine transporter, but not with adrenergic, nitroergic and sensory axons, suggesting that semaphorin-3A might originate in preganglionic neurons. **Conclusion:** These results indicate that the nervous system has a central role in the genesis of the circulatory abnormalities of portal hypertension, and support that mesenteric sympathetic atrophy contributes to splanchnic arterial vasodilation.

(4, 5). These data suggested that a local splanchnic adrenergic inhibition, in a context of generalized adrenergic over activity, might contribute to arterial splanchnic vasodilation.

The neural pathway controlling the cardiovascular system includes the primary afferent innervation (sensory neurons), the brain cardiovascular-regulatory nuclei and the effector arm composed by sympathetic and parasympathetic efferent nerves (6, 7). The afferent stimulus originated from pressure increases during portal hypertension in portal or mesenteric vessels (8, 9) should reach the central nuclei through the afferent nerves, and from there, an efferent response might

connect to sympathetic ganglia. The signal responsible for the post-ganglionic sympathetic nerve regression suggested by our studies could come from preganglionic neurons with a synaptic connection to post-ganglionic neurons.

Capsaicin is a neurotoxin causing selective defunctionalization of unmyelinated primary afferent sensory neurons, and its administration in large doses causes more or less permanent ablation of these nerves (10). These neurons are responsible for sensing changes in the environment and transmitting impulses from the periphery to the brain stem. In addition, they have a local effector function by releasing a variety of neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P, from their peripheral terminals in the innervated tissue in response to local stimuli (11, 12). Several studies have suggested that the development of hyperdynamic circulation in portal hypertension depends on the activation of central cardiovascular-regulatory nuclei, through a vagal afferent capsaicin-sensitive pathway (13, 14). The aim of this study was to explore whether, by blocking the afferent pathway with capsaicin in adult and neonatal rats, sympathetic atrophy and hemodynamic alterations could be simultaneously avoided in portal hypertensive animals. We investigated the nervous routing of the peripheral to central signal by analysing the central activation of cFos, a marker of neuronal activation, in the cardiovascular-regulatory supraoptic nucleus (SON). Finally, we have assessed changes in protein expression of markers of neuronal survival/regression in the sympathetic superior mesenteric ganglion (SMG) containing the post-ganglionic neurons that could be involved in the sympathetic nerve atrophy observed in portal hypertension.

## Materials and methods

### Protocol 1

Protocol 1 included hemodynamic determinations and cFos staining of SON in a group of adult rats. Determinations were performed in 12 partial portal vein ligated (PVL) rats (capsaicin  $n = 8$ ; vehicle  $n = 4$ ) plus 8 sham operated rats (capsaicin  $n = 4$ ; vehicle  $n = 4$ ). Male Sprague-Dawley (Harlan, Barcelona, Spain) adult rats weighing 200–250 g were anesthetized with inhaled isoflurane (2% oxygen) and treated with capsaicin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or vehicle at a total dose of 100 mg/kg of body weight (BW), dissolved in 80% physiological saline, 10% Tween 80 and 10% ethanol, which was administered as a series of three injections (25, 25, 50 mg/kg BW, sc) using an injection volume of 1 ml/kg BW. All three injections were made within a 24-h period (0, 18, 24 h). To decrease mortality because of capsaicin, theophylline (5 mg/kg BW, i.p.) and atropine (2 mg/kg BW, i.p.) were administered 30 min prior and 3 h after the first injection. Seven days

later, PVL or sham operation was performed as described previously (4).

### Protocol 2

Protocol 2 included hemodynamic measurements, SMA and mesenteric resistance arteries markers to evaluate sympathetic atrophy, and SMG neuronal markers in adult treated and neonatal treated rats. Twenty-five PVL adult rats were studied (capsaicin  $n = 15$ ; vehicle  $n = 10$ ) plus 15 sham operated adult rats (capsaicin  $n = 6$ ; vehicle  $n = 9$ ) used as controls. In the group of neonatal treated animals, PVL was performed in adulthood in 23 male rats (capsaicin  $n = 12$ ; vehicle  $n = 11$ ), and 5 capsaicin pretreated rats were sham operated. Sprague-Dawley rat pups were subcutaneously injected 48 h after birth with one single dose of capsaicin (50 mg/kg BW) dissolved in vehicle under isoflurane anaesthesia (2% oxygen) (15). Rats were returned to their dams, weaned at 21 days, separated by gender and reared until they reached a BW of 200–250 g.

### Hemodynamic measurements

Two weeks after PVL or sham operation, all rats treated with capsaicin demonstrated lack of corneal reflex and wiping movements after instillation of a 0.33 mM capsaicin drop into one eye. Animals were deeply anaesthetized with a mix of ketamine hydrochloride (100 mg/kg BW, i.p.) plus midazolam (5 mg/kg BW, i.p.), and topical lidocaine 2% was applied to the area before any incision to avoid cFos expression caused by nociceptive stimulation. Rats that struggled or squealed during anaesthesia injection were removed from further studies to prevent cFos expression because of stress. 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 measurement of mean arterial pressure (MAP, mmHg) and portal pressure (PP, mmHg). SMA was isolated from connective tissue, and a perivascular ultrasonic transit-time flow probe (1 mm diameter, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) was placed around the artery to measure SMA blood flow (ml/min·100 g). SMA resistance (mmHg/ml·min·100 g) was calculated as (MAP-PP)/SMA blood flow). Temperature was maintained at 37°C using a rectal thermometer throughout the procedure.

### Sample extraction

In protocol 1, for brain extraction, animals were intravenously infused with an excess of sodium pentobarbital (50 mg/kg BW), and then perfused with 1 L/kg BW of cold physiological saline, followed by 1 L/kg BW of ice-cold 4% paraformaldehyde at 4°C. Brain samples were extracted and cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 mol/l

L phosphate buffer from 1 to 3 days at 4°C, and then frozen in methylbutane and kept at -80°C.

In protocol 2, SMG samples were dissected free of surrounding tissue, removed and placed either in formalin and 50% ethanol before paraffin treatment or placed in liquid nitrogen and kept at -80°C. Then, SMA samples were harvested from the aortic origin to the initiation of ramifications (main trunk), kept in 4% formalin for 20 h and changed to a 50% ethanol solution before paraffin treatment. Mesenteric resistance arteries were also isolated, as described previously (5). Third-, fourth- and fifth-order mesenteric branches were dissected free of fat and connective tissue, placed in liquid nitrogen and kept at -80°C.

#### cFos immunostaining

Serial 30 µm sections of brain samples were cut using a cryostat at the level of the SON located in the hypothalamus (interaural 8.16 mm, bregma -0.84 mm) and analysed for cFos immunoreactivity as described elsewhere (16). Sections were blocked in a 1:20 dilution of goat serum for 1 h at RT and incubated with anti-cFos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (diluted 1:3000) at 4°C during 48 h. Bound antibody was incubated with anti-rabbit-FITC (diluted 1:500) 4 h at RT. Mounted sections in Vectashield hard set mounting medium were visualized using an optical microscope Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany).

#### Immunohistochemistry

Detection of tyrosine hydroxylase was carried out on paraffin-embedded sections of SMA as described previously (see supplementary Data S1) (4, 5).

#### Immunofluorescence

Paraffin-embedded sections of SMA and SMG were incubated with a 1:20 dilution of goat serum to avoid non-specific binding and then with primary antibodies against CGRP (Biomol, Enzo, Farmingdale, NY, USA) (diluted 1:200), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) (diluted 1:200) and semaphorin-3A (Sema3A) (Abcam, diluted 1:200) at 4°C, overnight. Bound antibodies were incubated with anti-rabbit-FITC (Abcam) (diluted 1:500) for CGRP and Sema3A and anti-mouse Chromeo 546 (Abcam) (diluted 1:500) for nNOS. Slides were placed in Vectashield hard set mounting medium for fluorescence. Images were captured at ×400 magnification using an optical microscope Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany). Simultaneous immunofluorescence detection of CGRP and nNOS was also assessed in SMA sections. Images were captured at ×400 magnification with a confocal microscopy Olympus FV1000 (Olympus, Hamburg, Germany). For quantitative analysis of Sema3A in SMG, three representative images from

each ganglion sample were captured at ×400 magnifications, and the protein content was measured with the Image J analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Simultaneous detection using anti-Sema3A (diluted 1:200) and either anti-tyrosine hydroxylase (diluted 1:250), anti-nNOS (diluted 1:200), anti-CGRP (Bioporto Diagnostics, Denmark) (diluted 1:400) or anti-vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, diluted 1:200) were performed at 4°C overnight. Bound antibodies were incubated 1 h at RT with anti-rabbit-FITC for Sema3A (diluted 1:500), anti-mouse Chromeo 546 (diluted 1:500) for Th and with anti-goat IgG DyLight 594 (Bethyl, Montgomery, TX, USA, diluted 1:500) for nNOS and VAcHT. Images were visualized by confocal microscopy.

#### Western blot analysis

Expression of tyrosine hydroxylase protein in mesenteric resistance arteries was analysed using Western blot, as previously described (see supplementary Data S1) (5).

Expression of nerve growth factor (NGF) and its precursor (ProNGF) as well as tyrosine kinase receptor A (TrkA) and p75 neurotrophic receptor (p75<sup>NTR</sup>) were analysed in SMG samples. Blotted membranes were incubated with anti-NGF (Abcam) (diluted 1:1000), anti-proNGF (Alomone labs, Jerusalem, Israel) (diluted 1:200), anti-TrkA (Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:200) and anti-p75<sup>NTR</sup> (Abcam) (diluted 1:500).

#### Statistical analysis

Normally distributed values were compared using Student's *t*-test and expressed as mean ± SEM. Statistical significance was established at *P* < 0.05.

#### Ethics

All animals received humane care in compliance with institutional guidelines from the European Commission on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Experiments were approved by The Animal Care Committee of the Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain.

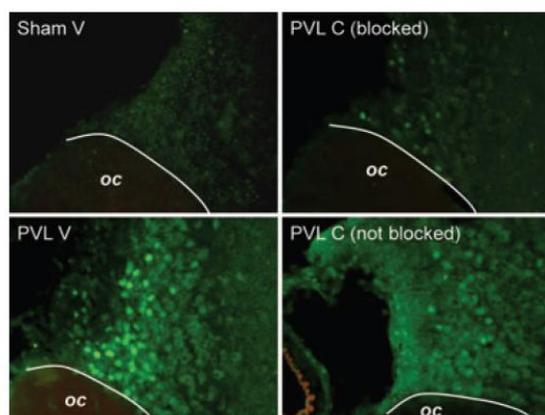
#### Results

##### Capsaicin treatment and brain cFos (protocol 1)

As the effect of capsaicin in abolishing the afferent innervation is heterogeneous, especially in adult rats, we used the lack of expression of hypothalamic SON cFos as an indicator of the effective afferent blockade. As shown in Figure 1, compared with sham vehicle treated rats, PVL vehicles showed increased cFos expression in SON. cFos immunoreactive cells are densely distributed in the SON of PVL vehicle while staining was almost

absent in both sham control and capsaicin treated sham rats. Among the eight PVL rats treated with capsaicin, four (50%) had an effective blockade of the afferent nerves with very low levels of cFos, like sham rats. The MAP ( $123.9 \pm 1.1$  mmHg) and SMA blood flow ( $3.5 \pm 0.25$  ml/min·100 g) of these PVL rats presenting effective afferent blockade were not different from sham vehicle rats (MAP =  $128.9 \pm 4.32$  mmHg and SMA blood flow =  $4.42 \pm 0.29$  ml/min·100 g). In contrast, the other four PVL rats treated with capsaicin presented a high expression of cFos, being very similar to PVL

vehicle rats (Fig. 1); in these animals, the capsaicin abrogation of the sensitive pathway was not considered effective, showing MAP ( $104.9 \pm 7$  mmHg) and SMA blood flow ( $6.5 \pm 0.3$  ml/min·100 g) values very similar to PVL vehicle rats (MAP =  $103.31 \pm 2.03$  mmHg and SMA blood flow =  $6.86 \pm 0.5$  ml/min·100 g). In consequence, effective afferent blockade by capsaicin was defined by hemodynamic criteria, setting the cut-off point in MAP  $\geq 115$  mmHg and SMA blood flow  $\leq 5$  ml/min·100 g (mean values of all eight PVL rats treated with capsaicin).



**Fig. 1.** Immunofluorescence of cFOS in the brain supraoptic nuclei (SON). Representative images (200 $\times$ ) showing null or very weak immunoreactivity in sham vehicle (Sham V) ( $n = 4$ ) and PVL effective afferent blockade animals (PVL EAB) ( $n = 4$ ) and strong cFos immunofluorescent signal in PVL vehicle (PVL V) ( $n = 4$ ) and PVL not effectively afferent blocked rats (PVL NEAB) ( $n = 4$ ). OC, optic chiasma.

#### Capsaicin treatment and sympathetic atrophy in adult rats (protocol 2)

Compared with sham rats, PVL animals pretreated with vehicle in adulthood exhibited the characteristic hemodynamic changes observed in this model of portal hypertension (Table 1). As a whole group, capsaicin treated PVL rats were not different from PVL vehicle rats. Among the capsaicin treated PVL adult animals, 7 of 15 (47%) were classified as effectively afferent blocked rats based on the hemodynamic criteria previously defined. As shown in Table 1, these PVL afferent blocked animals presented similar hemodynamic parameters to sham rats, except for PP, and significantly different from PVL vehicles.

Analysis of the total nervous area surrounding the outer part of the arterial wall in SMA sections and the tyrosine hydroxylase staining area within these nervous structures showed that both parameters were significantly lower in PVL vehicle compared with sham (Fig. 2A and B). However, compared with PVL vehicles, PVL afferent blocked rats revealed absence of nerve atrophy demonstrated by a significant increase in total SMA nervous area and tyrosine hydroxylase expressing

**Table 1.** Analysis of hemodynamic measures of portal vein ligated (PVL) and sham rats in two models of capsaicin treatment (protocol 2)

	PP (mmHg)	MAP (mmHg)	SMABF (ml/min·100 g)	SMAR (mmHg/ml·min·100 g)
<b>Adult</b>				
Sham V ( $n=9$ )	$10.3 \pm 0.4$	$125.1 \pm 3.0$	$4.3 \pm 0.2$	$27.2 \pm 1.7$
Sham C ( $n=6$ )	$10.2 \pm 0.3$	$127.4 \pm 5.6$	$4.1 \pm 0.3$	$29.3 \pm 2.7$
PVL V ( $n=10$ )	$15.6 \pm 0.5^{**}$	$105.3 \pm 1.8^{**}$	$6.6 \pm 0.4^{**}$	$14.4 \pm 0.9^{**}$
PVL C ( $n=15$ )	$15.7 \pm 0.7^{**}$	$112.7 \pm 5.6$	$5.4 \pm 0.3^{\dagger}$	$19.3 \pm 1.5$
PVL C blocked ( $n=7$ )	$14.6 \pm 0.9^*$	$120.4 \pm 5.4^{\dagger}$	$4.1 \pm 0.1^{\dagger\dagger}$	$26.0 \pm 1.1^{\dagger\dagger}$
PVL C not blocked ( $n=8$ )	$16.5 \pm 1.1^{**}$	$105.5 \pm 4.4^{**}$	$6.4 \pm 0.2^{**}$	$13.9 \pm 0.9^{**}$
<b>Neonatal</b>				
Sham C ( $n=5$ )	$10.2 \pm 0.4$	$129 \pm 3.7$	$4 \pm 0.2$	$29.7 \pm 2.2$
PVL V ( $n=11$ )	$17.9 \pm 0.5^{**}$	$106.5 \pm 1.8^{**}$	$6.3 \pm 0.4^*$	$14.4 \pm 1.2^{**}$
PVL C ( $n=12$ )	$17.4 \pm 0.5^{**}$	$120.5 \pm 4.7^{\dagger}$	$4.9 \pm 0.2^{\dagger}$	$21.5 \pm 3^{\dagger\dagger}$

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

blocked, effective afferent blockade; C, capsaicin; MAP, mean arterial pressure;  $n$ , number of rats; PP, portal pressure; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; SMAR: superior mesenteric artery resistance; V, vehicle.

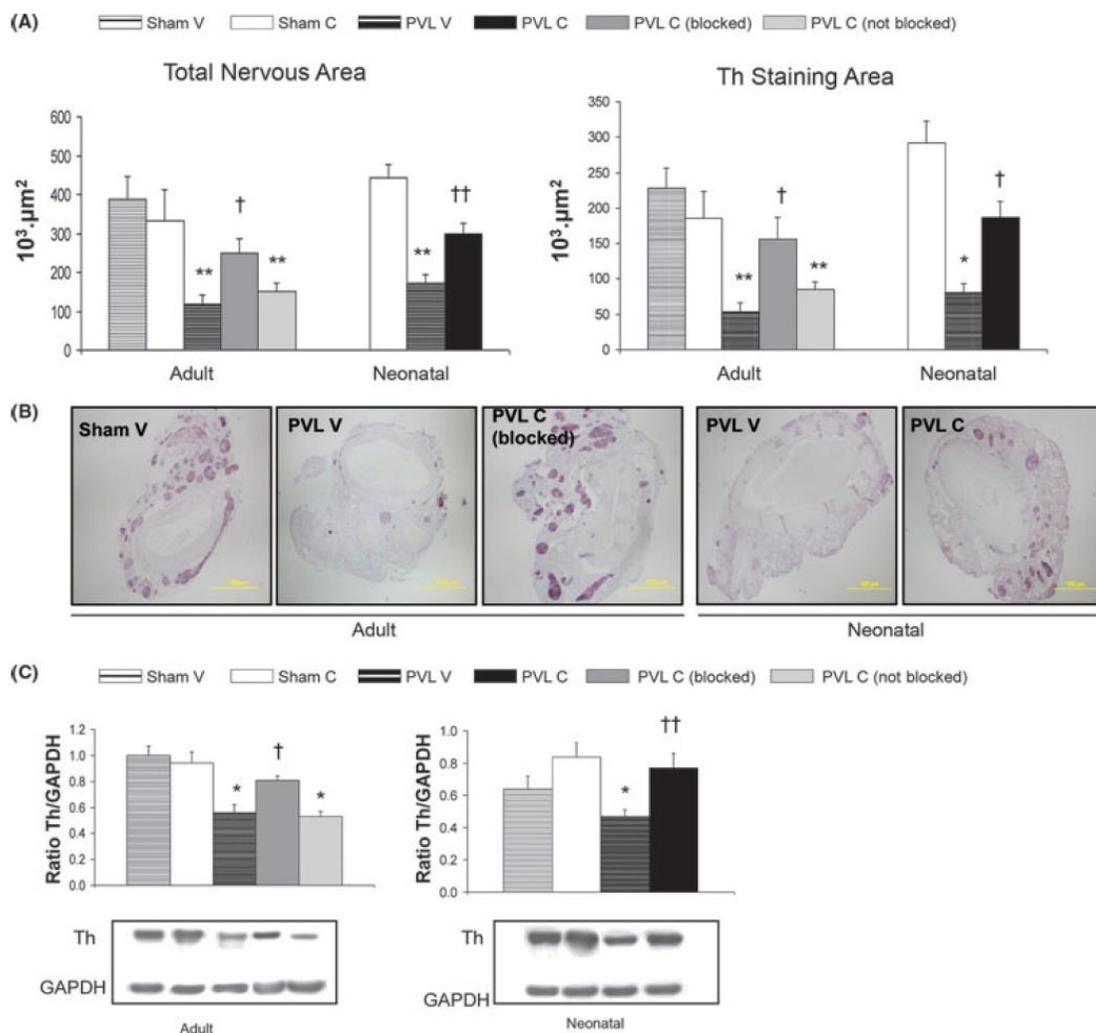
\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ , compared with sham vehicle.

$^{\dagger}P < 0.05$ ;  $^{\dagger\dagger}P < 0.001$ , compared with PVL vehicle (adult).

$^{\ddagger}P < 0.05$ ;  $^{\ddagger\dagger}P < 0.001$ , compared with PVL vehicle (neonatal).

area. Differences between PVL afferent blocked and sham rats were not observed. Moreover, tyrosine hydroxylase expression analysis by Western blot in mesenteric resistance arteries showed no significant differences between PVL afferent blocked rats and sham, and a significant increase in tyrosine hydroxylase expression (41% increase) with respect to PVL vehicles (Fig. 2C).

In this model, 53% of PVL capsaicin-treated animals were not effectively blocked, behaving as PVL vehicle rats in all hemodynamic and sympathetic innervation parameters (Table 1 and Fig. 2). In addition, capsaicin treatment in sham rats neither altered hemodynamic values nor sympathetic innervation parameters compared with vehicle sham rats (Table 1 and Fig. 2).



**Fig. 2.** Analysis of tyrosine hydroxylase (Th) in the mesenteric vasculature. (A) Bar diagrams showing immunohistochemical quantification of total nervous and tyrosine hydroxylase staining area in nerves surrounding SMA in adult treated rats: sham vehicle (Sham V) ( $n = 9$ ), sham capsaicin (Sham C) ( $n = 5$ ), PVL vehicle (PVL V) ( $n = 10$ ), PVL effectively afferent blocked (PVL C blocked) ( $n = 7$ ), PVL not effectively afferent blocked (PVL C not blocked) ( $n = 8$ ) and capsaicin neonatal treated pups: Sham C ( $n = 5$ ), PVL V ( $n = 11$ ) and PVL capsaicin (PVL C) ( $n = 12$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , compared with Sham V; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.001$  compared with PVL V. (B) Representative images of tyrosine hydroxylase immunostaining at 40 $\times$  showing transversal sections of complete arterial wall surrounded by nervous structures from each experimental group. (C) Bar diagrams representing Western blot analysis of tyrosine hydroxylase expression in mesenteric resistance arteries from adult treated rats and in neonatal treated pups (same groups as panel A). \* $P < 0.05$ , compared with Sham V; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.001$ , compared with PVL V. Representative Western blots are shown below.

### Capsaicin treatment in neonatal rats (protocol 2)

Pretreatment with capsaicin in newborn rats confirmed all results obtained in adult rats. As presented in Table 1, capsaicin-treated neonatal PVL rats significantly differed from neonatal PVL vehicles in all hemodynamic values, except for PP, showing a marked increase in MAP and SMA resistance and a significant decrease in SMA blood flow. Although an effective afferent blockade was obtained in 70% of the animals, the group was analysed as a whole.

The effect of capsaicin treatment on sympathetic innervation parameters in SMA of neonatal rats seemed to be deeper. Differences were greater between PVL afferent blocked rats and PVL vehicles both in the total nervous area and tyrosine hydroxylase staining area (Fig. 2A and B), being very similar to sham rats. Tyrosine hydroxylase expression in mesenteric resistance arteries obtained from PVL afferent blocked rats revealed a significant 63% increase ( $P < 0.001$ ) with respect to PVL vehicles (Fig. 2C). Similar to adult rats, neonatal capsaicin treatment in sham rats neither altered hemodynamic values nor sympathetic innervations parameters compared with vehicle sham rats (Table 1 and Fig. 2).

### Effect of capsaicin treatment on CGRP and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) content in SMA

The effect of capsaicin treatment in CGRP and nNOS content was assessed in the surrounding nerve fibres of SMA and inside the SMG, which also contain primary afferent and nitrergic axons. CGRP immunofluorescent signal disappeared in PVL rats pretreated with capsaicin, both in SMA and SMG (Fig. 3). Moreover, the lack of immunofluorescent CGRP signals occurred in all treated animals regardless of being effectively blocked or not (Supplementary Fig. S1). In contrast, nNOS content from nitrergic nerves was not affected by the treatment, showing an intense fluorescent signal in SMA and SMG sections from both PVL capsaicin and vehicle animals. Simultaneous immunofluorescence of CGRP and nNOS clearly demonstrated that they are not co-localizing in the same axons and run independently along the SMA (Fig. 3).

### Neuronal markers

Analysis of *Sema3A* in SMA samples from PVL and sham rats showed very weak immunofluorescent signals both in the arterial wall and inside the sympathetic fibres surrounding the SMA (Supplementary Fig. S2). It seemed that there was a higher expression in PVL samples compared with sham. The results of *Sema3A* immunofluorescence in SMG samples clearly confirmed this tendency (Fig. 4A). Quantification analysis of the average content of *Sema3A* revealed a significant increase of expression in PVL vehicles compared with

sham ( $962 \pm 160$  vs  $250 \pm 65$  intensity density;  $P = 0.003$ ). Moreover, PVL afferent blocked animals were significantly different from PVL vehicles ( $399 \pm 76$  vs  $962 \pm 160$ ;  $P = 0.009$ ) and almost identical to sham rats (Fig. 4B).

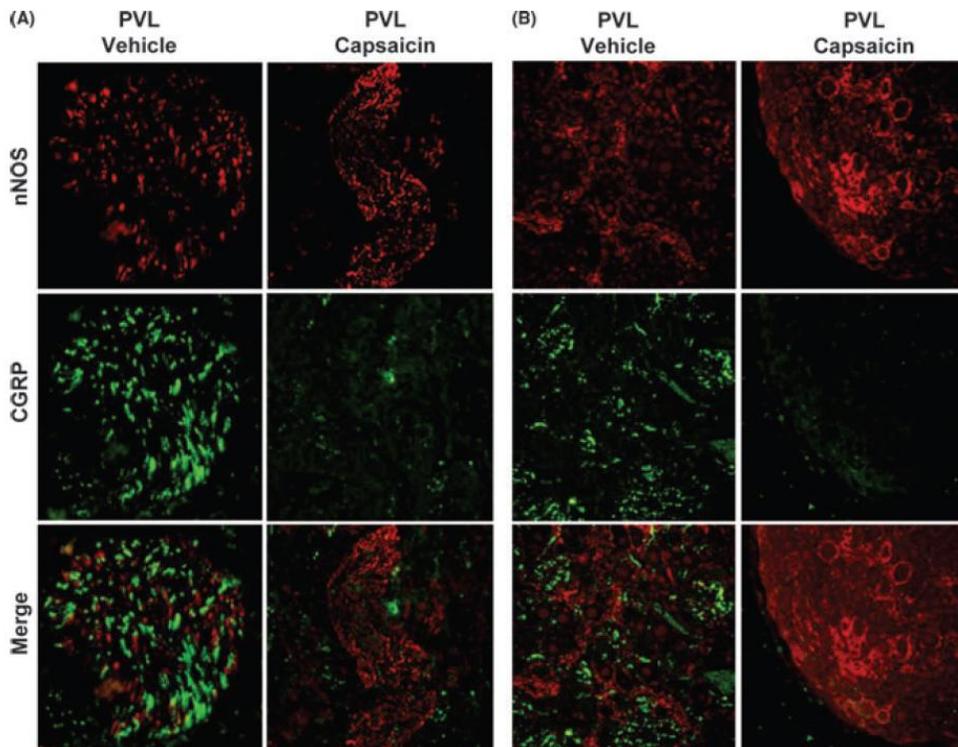
A series of double immunofluorescence experiments were carried out to locate the source of *Sema3A* in the SMG. While tyrosine hydroxylase was found inside the neuronal soma of the sympathetic neurons located in the SMG (Supplementary Fig. S3 and Fig. 5A), *Sema3A* surrounded the contour of these neurons, in the intercellular space, but never colocalizing with adrenergic axons. Although *Sema3A* presented a similar distribution as nitrergic fibres containing nNOS, confocal microscopy revealed no co-localization between these two signals (Fig. 5B). Sensory fibres containing CGRP also showed a distinct distribution from *Sema3A* in the SMG (Fig. 5C). Finally, double staining with *Sema3A* and vesicular acetylcholine transporter (VACHT) from cholinergic fibres evidenced that they could be at least in part co-localizing (Fig. 5D).

The levels of expression of nerve growth factor (NGF) and its precursor (proNGF) were also evaluated in SMG samples. As shown in Figure 4C, intensity of bands corresponding to both proNGF (30–32 kD) and the mature NGF (14 kD) were higher in SMG samples from PVL vehicles with respect to sham rats showing significant increases of 132 and 272%, respectively. Again, differences between PVL afferent blocked animals and PVL vehicles were also significant in both proNGF/NGF proteins, decreasing in PVL afferent blocked rats to almost the normal values of sham rats.

The expression of p75 receptor in the SMG was also significantly increased in PVL comparing to sham ( $P = 0.007$ ), whereas the expression of TrkA receptor showed similar values between PVL and sham (Fig. 6A and B). Finally, p75/TrkA receptors expression ratio was significantly increased in PVL comparing to sham ( $P = 0.029$ ) (Fig. 6C).

### Discussion

We have previously demonstrated that portal hypertension causes an important inhibition of messenger RNA and proteins implicated in adrenergic transmission and a marked atrophy in the sympathetic nerves surrounding the SMA, suggesting that this sympathetic atrophy could contribute to the splanchnic vasodilation of portal hypertension (4, 5). Our hypothesis assumed that during portal hypertension, pressure changes detected in the splanchnic vascular area could promote a signal through the visceral afferent sensitive pathway to the cardiovascular-regulatory nuclei of the brainstem, triggering from there an efferent response resulting in sympathetic atrophy. The present results confirm this hypothesis and support a role for sympathetic atrophy in splanchnic vasodilation of portal hypertension, showing that by blocking the sensitive afferent signal, the



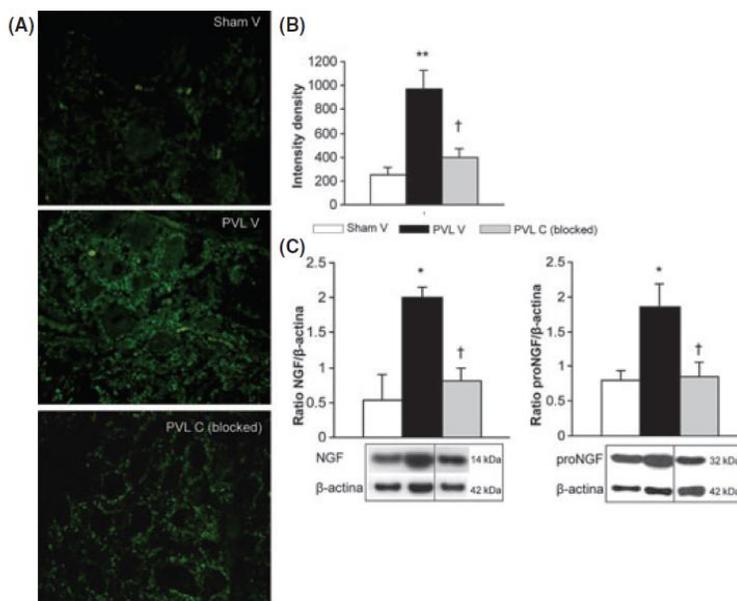
**Fig. 3.** Immunofluorescence of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). Representative confocal images (400 $\times$ ) of CGRP (green), nNOS (red) or both (merge) in (A) nerve fibres surrounding superior mesenteric artery and (B) superior mesenteric ganglion of PVL vehicle and PVL capsaicin.

splanchnic sympathetic atrophy can be prevented in those animals where, simultaneously, the hemodynamic alterations were normalized.

It is noteworthy to comment the lack of decrease in portal pressure observed in our effectively afferent blocked rats, despite the intense decrease in SMA blood flow. This result is exactly the same as published by Lee *et al.* (17) in the same model with the same treatment, and although we do not know the exact explanation, it is clear that if PP does not change and mesenteric flow decreases, the resistance in the portal venous area has to necessarily increase. As, in the PVL model, the liver is intact, and capsaicin does not increase PP in sham rats, probably capsaicin treatment, through sensitive afferent ablation, produces an increase in porto-collateral resistance that maintains portal pressure elevated. This is the most reasonable explanation, although we did not explore it and was not the aim of our study.

Capsaicin causes selective defunctionalization of unmyelinated primary afferent sensory neurons and a more or less permanent ablation of these nerves (10). This effect was not homogeneous in our animals. It is very important to understand that the aim of our study was not to analyse the effect of capsaicin treatment in

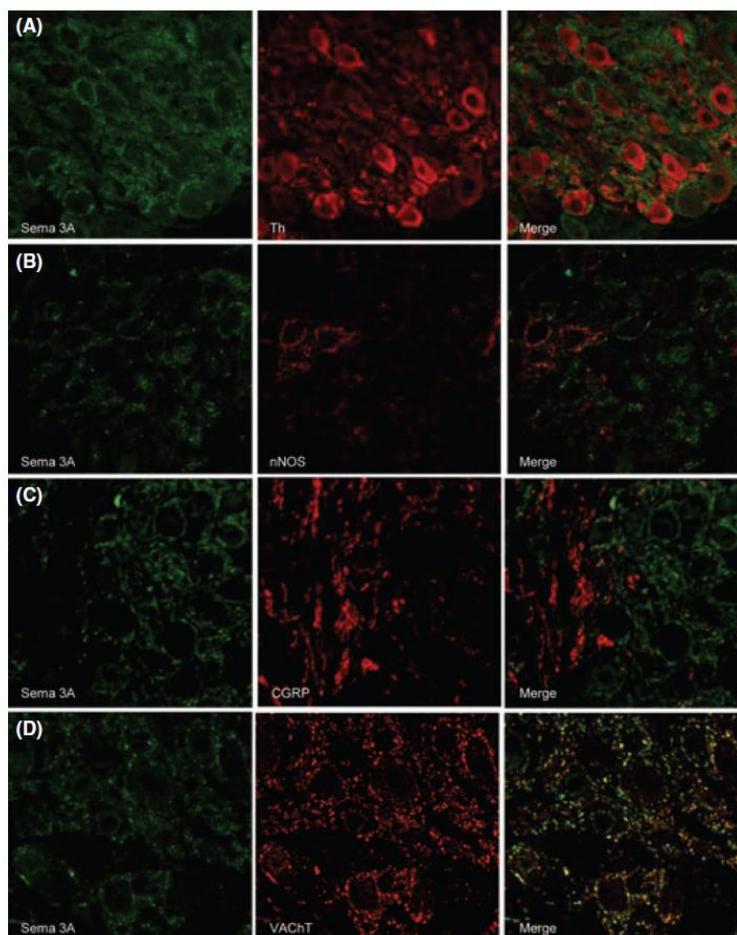
portal hypertension; this has already been precisely reported (13, 17–19), but rather to use it as a tool to explore a physiopathological pathway and prove the relationship between hemodynamic alterations and sympathetic atrophy. Response to capsaicin treatment was higher in animals treated after birth, an effect already known and possibly related to a higher susceptibility of younger neurons to capsaicin (10). In addition, the lack of corneal reflex and loss of CGRP staining does not necessarily imply loss of the afferent signal generated by other stimuli (10). In fact, although the loss of sensitivity to nociceptive chemical and heat stimuli in rats treated with capsaicin is constant, loss of nociceptive mechanical and pressure stimuli, which apply to our model, is more heterogeneous and subjected to variability (10, 20). Capsaicin-sensitive sensory neurons present dual sensory-motor functionality. In addition to the afferent sensitive function, capsaicin-sensitive sensory neurons have the ability to release stored transmitters (CGRP and substance P) from the peripheral terminal excited by the environmental stimulus. Soma and peripheral branches of sensory neurons represent independent functional entities capable of responding to environmental stimuli with local vascular responses



**Fig. 4.** Analysis of neuronal markers in superior mesenteric ganglion (SMG). (A) Representative images of Sema3A immunoreactivity in sections of SMG at 400 $\times$  from sham vehicle (Sham V) ( $n = 4$ ) and PVL vehicle (PVL V) ( $n = 4$ ) and PVL with effective afferent blockade (PVL C blocked) ( $n = 4$ ). (B) Quantification of intensity density of Sema3A fluorescence in each experimental group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.001$ , compared with sham vehicle;  $\dagger P < 0.05$  compared with PVL vehicle. (C) Bar diagrams representing Western blot analysis of nerve growth factor (NGF) and its precursor (proNGF) in Sham V ( $n = 4$ ), PVL V ( $n = 4$ ) and PVL C blocked ( $n = 4$ ).  $*P < 0.05$ , compared with Sham V,  $\dagger P < 0.05$  compared with PVL V. Representative Western blots are shown below. Grouping of bands from different parts of the same gel are denoted by dividing lines.

unrelated to the mediation of afferent messages towards the central nervous system (11, 12). It is well known that while the action of capsaicin on the sensory level is more heterogeneous with substantial variability, treatment provokes a universal ablation of functional responses at the efferent level (release of neuropeptides) (10, 20, 21). This also proved to be true in our study, as all PVL treated animals showed total loss of CGRP signal, both in SMA nervous tissue and in SMG, regardless of being or not being responders to capsaicin (Supplementary Fig. S1); indicating that the vasodilator CGRP does not participate in the generation or maintenance of splanchnic vasodilation of portal hypertension, in contrast to what prior studies had suggested (22, 23). Nitrergic nerves have also been associated to the generation of splanchnic vasodilation of portal hypertension (24, 25), and some authors suggested that nNOS was localized in capsaicin-sensitive CGRPergic terminals (26). Our results indicate that nitrergic nerves do not seem to be affected by capsaicin treatment, as a nNOS positive signal was detected in all treated and non-treated PVL rats, both in SMA and SMG. Moreover, the simultaneous staining of both CGRP and nNOS clearly demonstrated that their signals are not co-localizing.

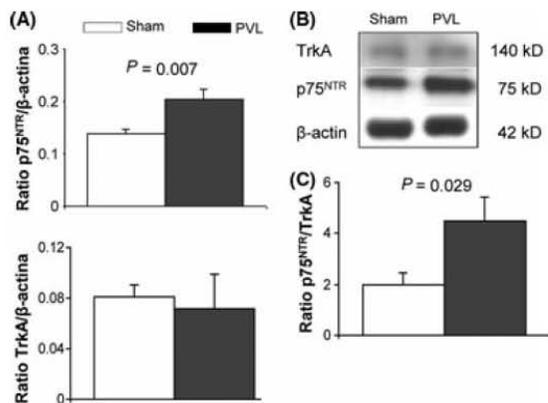
Recent studies have suggested that a vagal afferent signal (capsaicin sensitive), through a cFos dependent activation of central cardiovascular-regulatory nuclei, is necessary for development of hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats (13, 14). What it is significant in our data is that only in those animals in which the afferent sensitive pathway was completely blocked and therefore the central cardiovascular-regulatory nuclei (SON) not activated, the hyperdynamic circulation and mesenteric sympathetic atrophy could be prevented. Capsaicin was not directly responsible for the prevention of these circulatory and morphological alterations as evidenced by the presence of capsaicin treated animals in which these changes were not avoided (not effectively blocked rats) (Figs 1 and 2). In those animals that despite receiving capsaicin, hemodynamic alteration of portal hypertension were not prevented, sympathetic mesenteric atrophy was present and the signal in the SON was not blocked. The heterogeneity in the response in the rat model probably explains why in an early paper by Fernandez *et al.* (27) differences in hemodynamic parameters between sham and capsaicin treated portal hypertensive rats were not observed.



**Fig. 5.** Confocal localization of semaphorin-3A (Sema3A) in superior mesenteric ganglion. Series of images at 400 $\times$  showing immunolabeling of Sema3A (green) and (A) tyrosine hydroxylase (Th) (red) to mark adrenergic soma and axons, (B) neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (red) to mark nitroergic fibres, (C) vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) (red) to mark cholinergic preganglionic fibres and (D) calcitonin gene-related peptide (CGRP) (red) to mark sensory axons. Merging images show no co-localization of Sema3A and tyrosine hydroxylase, nNOS or CGRP and co-localization with VAcHT (yellow).

Considering that we speculated that sympathetic atrophy was a consequence of a nervous signal originated from the brain nuclei, modifications in normal activity of the sympathetic neurons located in the SMG would be expected. Sympathetic neurons, similar to other neurons, have their activity regulated by different neurotrophins and modulators that control growth/regression (neuronal and axonal), and survival/death (28). In the SMG of rats with portal hypertension, an increased expression of Sema3A, NGF and pro-NGF was detected. This overexpression was avoided in capsaicin treated animals at the same time that sympathetic atrophy was prevented. Sema3A acts mainly as a chemorepellent in the axonal guidance of peripheral nerves (29), and it is implicated in structural plasticity and

regeneration of neuronal connections, but it is also involved in neuronal cell death/apoptosis (30, 31). In addition, Sema3A strongly inhibits axonal growth in situations of intense NGF stimulation, by inactivating NGF main neuronal receptor TrkA (32). Sema3A was increased in SMA sections, but especially in SMG surrounding the contour of adrenergic neurons, in the intercellular space, no co-localizing with tyrosine hydroxylase positive axons or nitroergic fibres, but at least in part co-localizing with VAcHT positive axons, suggesting that these fibres are cholinergic and may originate in preganglionic neurons (Fig. 5 and Supplementary Fig. S3). Finally, NGF is an important neurotrophin responsible for neuronal survival and growth (33). However, NGF and especially its precursor pro-NGF,



**Fig. 6.** Analysis of neuronal receptors in superior mesenteric ganglion (SMG). (A) Bar diagrams displaying Western Blot analysis of the expression of p75<sup>NTR</sup> and TrkA receptors in PVL ( $n = 6$ ) and sham ( $n = 7$ ) rats. (B) Representative Western blots of p75<sup>NTR</sup>, TrkA and  $\beta$ -actin used as loading control (C) Bar diagrams displaying p75<sup>NTR</sup>/TrkA expression ratio.

induce regression and cellular death if their effects are mediated through the p75<sup>NTR</sup> receptor, instead of the TrkA receptor (34). The overexpression of p75<sup>NTR</sup> and especially the p75<sup>NTR</sup>/TrkA ratio observed in SMG of PVL points to the activation of the p75<sup>NTR</sup> receptor, mostly by pro-NGF, inducing apoptosis and axonal regression. This effect might contribute to the downregulation of TrkA receptor by Sema3A.

In summary, sensitive signals generated in the splanchnic area as a consequence of increased portal pressure travel through the afferent capsaicin-sensitive nerves to reach the central cardiovascular nuclei. From there efferent signals that might circulate through the sympathetic preganglionic neurons would reach the mesenteric sympathetic ganglia causing splanchnic arterial sympathetic regression by changing the expression and activity of neuronal modulators. When the afferent signal is abrogated, the brain nuclei are not activated, the neuronal modulators are not over-expressed in the mesenteric sympathetic ganglia, and the hemodynamic circulatory alterations and sympathetic atrophy are prevented. Taken together, these results indicate that the nervous system has a central role in the genesis of the circulatory abnormalities of portal hypertension, and support the contention that mesenteric sympathetic atrophy contributes to splanchnic arterial vasodilation.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Dr Marc Oria for his valuable advice on technical aspects in the animal model and Teresa Moliné for technical assistance.

**Financial Support:** Nahia Ezkurdia is a recipient of a predoctoral fellowship grant from the VHIR and is

enrolled in the postgraduate programme of the Department of Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona. Imma Raurell is a recipient of a fellowship grant from the Instituto de Salud Carlos III. CIBERehd is supported by Instituto de Salud Carlos III. The study was funded by a grant from Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) SAF2009-08354.

**Conflict of interest:** All authors declare to have no conflicts of interest and nothing to disclose with respect to this manuscript.

### References

- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006; **43**: S121–31.
- Martell M, Coll M, Ezkurdia N, Raurell I, Genesca J. Pathophysiology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol* 2010; **2**: 208–20.
- Rodriguez-Villarrupla A, Fernandez M, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension. *Ann Hepatol* 2007; **6**: 28–36.
- 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.
- Coll M, Martell M, Raurell I, et al. Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver Int* 2010; **30**: 593–602.
- Gibbins IL, Jobling P, Morris JL. Functional organization of peripheral vasomotor pathways. *Acta Physiol Scand* 2003; **177**: 237–45.
- 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.
- Keef KD, Kreulen DL. Venous mechanoreceptor input to neurones in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *J Physiol* 1986; **377**: 49–59.
- 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.
- Buck SH, Burks TF. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev* 1986; **38**: 179–226.
- Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; **24**: 739–68.
- Maggi CA, Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 1988; **19**: 1–43.
- Liu H, Schuelert N, McDougall JJ, Lee SS. Central neural activation of hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats depends on vagal afferent nerves. *Gut* 2008; **57**: 966–73.
- 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.

15. Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977; **270**: 741–3.
16. Doignon I, Julien B, Serriere-Lanneau V, et al. Immediate neuroendocrine signaling after partial hepatectomy through acute portal hyperpressure and cholestasis. *J Hepatol* 2011; **54**: 481–8.
17. Lee SS, Sharkey KA. Capsaicin treatment blocks development of hyperkinetic circulation in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1993; **264**: G868–73.
18. 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.
19. 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.
20. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991; **43**: 143–201.
21. Nagy JJ, van der KD. Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. *J Neurosci* 1983; **3**: 1145–50.
22. Bendtsen F, Schifter S, Henriksen JH. Increased circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cirrhosis. *J Hepatol* 1991; **12**: 118–23.
23. Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* 1988; **335**: 164–7.
24. Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Upregulation of nNOS and associated increase in nitric oxide vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005; **43**: 258–65.
25. 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.
26. Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, et al. Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**: 490–7.
27. Fernandez M, Casadevall M, Schuligoi R, et al. Neonatal capsaicin treatment does not prevent splanchnic vasodilatation in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1994; **20**: 1609–14.
28. Glebova NO, Ginty DD. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2005; **28**: 191–222.
29. Roth L, Koncina E, Satkauskas S, et al. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 649–66.
30. Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1999; **73**: 961–71.
31. Shirvan A, Shina R, Ziv I, Melamed E, Barzilai A. Induction of neuronal apoptosis by Semaphorin3A-derived peptide. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **83**: 81–93.
32. Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Yagil Z, Lerman O, Behar O. Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell Signal* 2008; **20**: 467–79.
33. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; **24**: 677–736.
34. Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, et al. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* 2009; **284**: 18424–33.

### Supporting Information

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

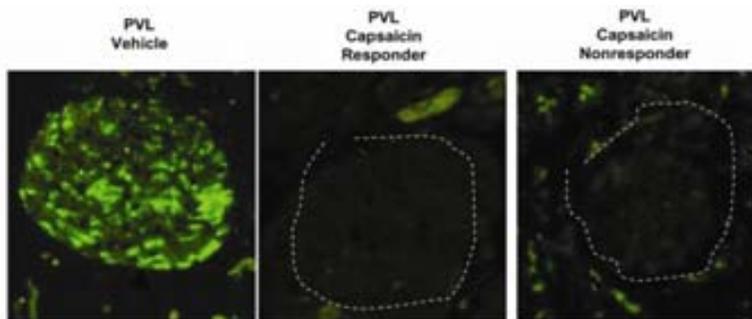
**Data S1.** Supplementary Details.

**Fig. S1.** Immunofluorescence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in nerve fibers surrounding superior mesenteric arteries.

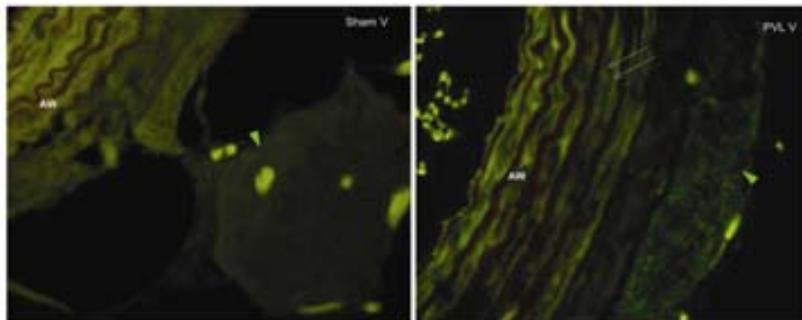
**Fig. S2.** Immunofluorescence of Semaphorin-3A (Sema3A) in superior mesenteric artery (SMA).

**Fig. S3.** Confocal double immunofluorescence of Semaphorin-3A (Sema 3A) and Tyrosine hydroxylase (Th) in the superior mesenteric ganglion.

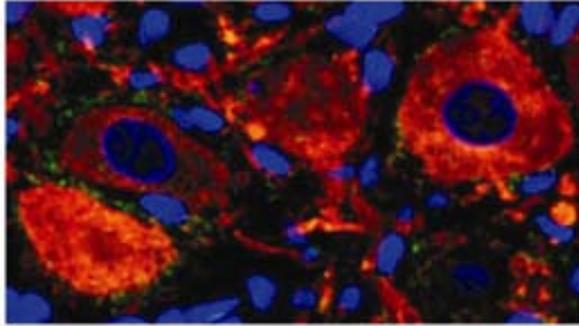
Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



**Supplementary Figure 1. Immunofluorescence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in nerve fibers surrounding superior mesenteric arteries.** Representative images (400X magnification) of CGRP staining in transversal sections of nerve fibers from PVL vehicle, and PVL capsaicin responder and nonresponder rats. Dashed lines indicate location of nervous structures with loss of CGRP signal.



**Supplementary Figure 2. Immunofluorescence of Semaphorin-3A (Sema3A) in superior mesenteric artery (SMA).** Representative images of Sema3A staining at 200X showing transversal sections of nervous structures around the arterial wall of SMA in sham vehicle (Sham V) and PVL vehicle rats (PVL V). Green arrowheads indicate nervous tissue with (PVL V) or without (Sham V) Sema3A signal. White arrows indicate mild Sema3A staining in the arterial wall.



**Supplementary Figure 3.** Confocal double immunofluorescence of Semaphorin-3A (Sema 3A) and Tyrosine hydroxylase (Th) in the superior mesenteric ganglion. Sections were double labelled for Sema3A (green) and Th (red), followed by DAPI nuclear counterstain (blue). A representative image at 600X shows no co-localization of Sema3A and adrenergic Th positive neuron soma or axons. DAPI stains nuclei of adrenergic neurons and satellite cells (smaller and numerous).



# **ESTUDIO 3**



## 9 ESTUDIO 3

### ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES EN EL GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR DURANTE LA HIPERTENSIÓN PORTAL

#### 9.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios 1 y 2 confirman que la correcta abolición de la señal aferente sensitiva (evidenciada por la ausencia de expresión de cFos en el SON de animales PVL) previene, simultáneamente, las alteraciones hemodinámicas y la atrofia simpática de los nervios que rodean la SMA y además evita el aumento en la expresión de neuromoduladores como son Sema3A, NGF y proNGF.

Con el propósito de seguir la trayectoria neuronal, desde la señal aferente hasta el SMG, fuimos a explorar la actividad del ganglio nodoso, que contiene los somas neuronales de las fibras del nervio vago por donde sube la señal aferente sensitiva, mediante el análisis de la expresión de uno de los neuropéptidos que participan en la transmisión de estas señales, el CGRP. Asimismo, el aumento de Sema3A observado en el SMG de ratas PVL y su colocación con VAcHT (estudio 2), sugirió el origen de Sema3A en las fibras simpáticas colinérgicas preganglionares, que constituyen el núcleo intermediolateral de la médula espinal. Este resultado nos condujo a explorar la expresión de Sema3A en los segmentos correspondientes, de T-9 a T-13 del núcleo intermediolateral, cuyas fibras simpáticas motoras salen por la zona ventral y hacen sinapsis en las neuronas post-ganglionares simpáticas del SMG antes de inervar el mesenterio.

Finalmente, la sobreexpresión de Sema3A, NGF y proNGF, manifestadas previamente a nivel del SMG en ratas PVL, nos condujo a seguir investigando la expresión y localización de sus respectivos receptores (Nrp1, TrkA y p75<sup>NTR</sup>) y otros neuromoduladores en sus vías de señalización que pudieran estar participando en el déficit adrenérgico mesentérico observado en animales con hipertensión portal.

## 9.2 OBJETIVOS

- Explorar alteraciones en la actividad nerviosa aferente y eferente en ratas PVL, mediante:
  - el análisis de la actividad aferente sensitiva a nivel del ganglio nodoso del vago.
  - el estudio de la expresión de Sema3A en las neuronas colinérgicas preganglionares del núcleo intermediolateral.
- Confirmar, dentro del SMG, el déficit de Th observado hasta ahora en la inervación simpática de la vasculatura mesentérica de animales con hipertensión portal.
- Profundizar en la exploración de neuromoduladores implicados en las vías de señalización de crecimiento/supervivencia neuronal y retracción axonal/muerte neuronal del SMG que pudieran estar participando en el desarrollo de la atrofia simpática en la hipertensión portal.

## 9.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se extrajeron muestras de ganglio nodoso izquierdo para el análisis de expresión de CGRP mediante Western blot, muestras de médula espinal

para el análisis de expresión de Sema3A y de VAcHT mediante inmunofluorescencia y, por último, muestras de SMG y SMA para el análisis de marcadores neuronales (Th, Sema3A, Nrp1, p75<sup>NTR</sup>, TrkA, Sort1, MAPK, JNK, AKT, ROCK, caspasa 7 activa y PARP inactiva, eNOS y nNOS) mediante Western blot e inmunofluorescencia. Se utilizaron dos grupos de 7 animales PVL y de 7 sham.

## **9.4 RESULTADOS**

### **9.4.1 CGRP se encuentra incrementado en el ganglio nodoso de ratas PVL**

El estudio de la expresión de CGRP en el ganglio nodoso mediante Western blot mostró una sobreexpresión de más de 3 veces superior en ratas PVL que en ratas sham ( $p < 0.001$ ) (Anexo II, Fig. 2), revelando un claro aumento de la actividad neuronal aferente sensitiva vía el nervio vago durante la hipertensión portal.

### **9.4.2 Las neuronas colinérgicas preganglionares de la médula espinal muestran presencia de Sema3A**

Como se observa en la figura 3 (Anexo II), la inmunofluorescencia de VAcHT en muestras de médula espinal, marcó, por un lado, las neuronas colinérgicas del asta ventral (Fig.3A de mayor tamaño) y, por otro lado, las neuronas colinérgicas que componen el asta intermediolateral (Fig.3B, de menor tamaño) correspondientes a las neuronas simpáticas preganglionares que hacen sinapsis, posteriormente, en el SMG. Estas últimas, mostraron

presencia de Sema3A en el citoplasma, sugiriendo el origen del incremento de Sema3A, observado previamente en el SMG de ratas PVL, en las fibras simpáticas colinérgicas preganglionares.

#### **9.4.3 La expresión de Th se encuentra disminuida en el ganglio mesentérico superior de ratas PVL**

El análisis de Th en el SMG mostró un descenso del 70% en la expresión de Th en ratas PVL respecto a sham ( $p=0.008$ ) mediante Western blot, corroborando el déficit de Th observado previamente en la inervación de la vasculatura mesentérica (Anexo II, Fig.4A).

#### **9.4.4 Existe un incremento de marcadores neuronales implicados en regresión axonal/ muerte neuronal en el ganglio mesentérico superior de ratas con hipertensión portal**

Iniciamos el estudio de los marcadores neuronales del SMG mediante la confirmación, por Western blot, del aumento de Sema3A contemplado previamente en ratas PVL por inmunofluorescencia (estudio 2). Efectivamente, el análisis de expresión de Sema3A mostró un incremento significativo del 97% en ratas PVL respecto a sham ( $p<0.001$ ) (Anexo II, Fig.4A). Además, el análisis cuantitativo de su receptor Nrp1, por inmunofluorescencia, también reveló un notorio aumento en ratas PVL respecto a sham ( $305\pm45$  vs  $131\pm33$  de intensidad de la densidad;  $p=0.003$ ) (Anexo II, Fig.4B)

En relación a la expresión de la forma activa del receptor de NGF, la fosfo-TrkA, implicada en las vías de crecimiento y supervivencia neuronal, resultó estar disminuida en un 50% en ratas PVL respecto a sham ( $p=0.03$ ) (Anexo II, Fig.5), a pesar de mostrar niveles similares entre sham y PVL, en la expresión de su forma total (forma fosforilada y no fosforilada), (Anexo II, Fig. 5). Por otro lado, la expresión del receptor Sort1, necesario para la actividad apoptótica de  $p75^{\text{NTR}}$ , estaba presente en ambos grupos sin presentar diferencias significativas. Este resultado junto con el aumento significativo en la expresión del receptor  $p75^{\text{NTR}}$  y del ratio de  $p75^{\text{NTR}}$ /TrkA en ratas PVL (estudio 2) sugiere una activación de las vías de regresión axonal y muerte neuronal en detrimento de las vías de supervivencia.

Además, la técnica de inmunofluorescencia nos permitió localizar la expresión de los receptores TrkA,  $p75^{\text{NTR}}$ , y Sort1 en las neuronas adrenérgicas y descartar su presencia en otras estructuras del SMG (Anexo II, Supp. Fig. 1 y Fig. 2).

Posteriormente, se estudió la expresión de proteínas intermediarias implicadas en las vías de señalización de crecimiento neuronal, MAPK y AKT, tanto en sus formas totales como en las fosforiladas, pero su expresión no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Anexo II, Fig.5).

Por el contrario, a pesar de que JNK no presentó diferencias significativas entre ratas PVL y sham, el análisis de las proteínas relacionadas con retracción axonal y apoptosis neuronal reveló que, tanto la expresión de ROCK ( $p=0.03$ ) como de Casp7 activa ( $p<0.001$ ) y de PARP inactiva ( $p=0.001$ ) estaban claramente aumentadas en ratas PVL comparado con sham.



# **ESTUDIO 4**



## 10 ESTUDIO 4

### EFECTO DE LA AMIDA GAMBÓGICA SOBRE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS, LA ATROFIA SIMPÁTICA Y LOS MARCADORES DE MODULACIÓN NEURONAL

#### 10.1 INTRODUCCIÓN

En base a los resultados del estudio 3, nos planteamos contrarrestar la notoria activación de las vías de regresión axonal y apoptosis manifestadas en el SMG de ratas PVL, mediante la estimulación de las vías de supervivencia neuronal. Para ello, se utilizó un potente agonista del receptor TrkA, la amida gambógica, que imita al NGF provocando la fosforilación de TrkA y desencadenando la activación de las vías de supervivencia neuronal a través de AKT y MAPK (74).

AKT causa la fosforilación directa de eNOS y nNOS provocando un aumento en la producción del vasodilatador NO. Este aumento podría estar inhibiendo la vía de las caspasas y de ROCK y favoreciendo, por lo tanto, la estimulación de las vías de crecimiento en el SMG. En contrapartida, la activación de AKT en la vasculatura mesentérica podría contribuir a la vasodilatación arterial esplácnica en confrontación a los beneficios adrenérgicos esperados a nivel de la inervación simpática.

#### 10.2 OBJETIVO

- Analizar los parámetros hemodinámicos de animales PVL tratados con amida gambógica.

- Estudiar la atrofia simpática de la SMA en los animales tratados mediante el análisis inmunohistoquímico de Th.
- Estudiar el efecto de la amida gambógica sobre las vías de señalización de crecimiento/apoptosis neuronal en el SMG mediante el análisis de la expresión de marcadores neuronales por Western blot.
- Investigar la expresión de marcadores de vasodilatación arterial en la SMA: eNOS y fosfo-AKT.

### **10.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El estudio 4 consistió en el análisis de las medidas hemodinámicas y de atrofia simpática mediante el examen inmunohistoquímico de Th en muestras de SMA. Asimismo, se extrajeron muestras de SMG para el análisis de expresión de fosfo-TrkA, MAPK, AKT, ROCK, caspasa 7 activa, PARP inactiva, eNOS y nNOS, por Western blot. Finalmente, se utilizaron muestras de SMA para la observación de la expresión de eNOS y de fosfo-AKT por inmunohistoquímica. Se emplearon, un grupo de 8 ratas PVL tratadas con amida gambógica (PVL GA), 8 ratas PVL vehículo y 8 ratas sham.

## 10.4 RESULTADOS

### 10.4.1 El tratamiento con amida gambógica mejora los parámetros hemodinámicos y la atrofia simpática en ratas con hipertensión portal

La tabla 1 (Anexo II) muestra los resultados de los valores hemodinámicos de las sham, PVL y PVL GA. Las ratas PVL GA se diferenciaron significativamente de ratas PVL vehículo en todos los parámetros hemodinámicos, excepto en la PP, mostrando un incremento en la MAP ( $111.6 \pm 4.6$  vs  $97.4 \pm 2.7$ ) y en la SMAR ( $16.3 \pm 0.6$  vs  $11.7 \pm 0.9$ ) y una reducción significativa del SMABF ( $5.8 \pm 0.39$  vs  $7.2 \pm 0.5$ ). Sin embargo, los parámetros no se restablecieron completamente, exhibiendo también diferencias significativas respecto a ratas sham (MAP=  $121.9 \pm 2.0$  mmHg, SMABF=  $4.4 \pm 0.4$  ml/min.100g, SMAR=  $26.9 \pm 2.4$  mmHg/ml.min.100g).

Los resultados de los parámetros de inervación simpática están expuestos en la figura 6 del Anexo II donde se observa un incremento significativo en el área nerviosa total que rodea la parte externa de la pared de la SMA en ratas PVL tratadas con amida gambógica respecto a ratas PVL vehículo ( $p=0.03$ ), manteniendo valores similares a las sham. En cuanto al área de tinción de Th dentro de las estructuras nerviosas, las PVL GA también mostraron un incremento significativo respecto a las PVL vehículo ( $p=0.04$ ), aunque sin restablecer completamente los valores presentados por las sham ( $p=0.02$ ).

#### **10.4.2 El tratamiento con amida gambógica activa las vías de crecimiento y supervivencia neuronal en detrimento de las vías de muerte neuronal**

Con el fin de corroborar la efectividad del agonista, se efectuó el análisis de la expresión de fosfo-TrkA por Western blot. Efectivamente, las ratas PVL tratadas con amida gambógica mostraron un importante aumento del 95% en la expresión de fosfo-TrkA comparando con ratas PVL vehículo ( $p=0.012$ ), sin revelar diferencias significativas respecto a sham (Anexo II, Fig. 7) y demostrando por lo tanto, una eficiente estimulación del receptor por parte del agonista.

En cuanto a las proteínas MAPK y AKT, ambas relacionadas con la vía de crecimiento neuronal, la fosfo-MAPK mostró un claro aumento en ratas PVL GA respecto a sham (80%,  $p=0.006$ ) y un incremento en relación a PVL vehículo, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, la expresión de fosfo-AKT/AKT sí que mostró un incremento muy importante, relativo a ratas PVL vehículo (172%,  $p=0.05$ ) y a sham (205%,  $p=0.03$ ). En base al incremento de fosfo-AKT/AKT observado, se estudió la expresión nNOS que mostró un incremento en las ratas PVL GA respecto a ratas PVL vehículo y a sham, aunque sólo presentando diferencias significativas respecto a PVL vehículo ( $p=0.008$ ), (Anexo II, Fig. 7).

En cuanto a las proteínas relacionadas con regresión axonal/apoptosis neuronal, la sobreexpresión de ROCK observada en ratas PVL vehículo disminuyó significativamente en un 65% en las PVL GA ( $p < 0.001$ ), manteniéndose similar al grupo de las sham. Lo mismo ocurrió con la expresión de PARP en PVL GA donde se mostró reducida en un 60 %

respecto a las ratas PVL vehículo ( $p=0.04$ ) y semejante a las sham. A pesar de que la expresión de Casp7 disminuyó en ratas PVL GA, el descenso no fue significativo (Anexo II, Fig. 7).

#### **10.4.3 El tratamiento con amida gambógica no previene la sobreexpresión de fosfo-AKT y de eNOS en la arteria mesentérica superior de ratas PVL**

La estimulación de la vía de AKT observada en el SMG de animales PVL tratados con amida gambógica, nos condujo a explorar la expresión de fosfo-AKT y eNOS en la pared arterial de la SMA. La figura 3 (Anexo II, Supp.) muestra los resultados inmunohistoquímicos de ambas proteínas, cuya tinción se visualiza, únicamente, en las células endoteliales de la pared arterial de la SMA de ratas PVL vehículo y PVL GA, pero no de ratas sham.



## **ANEXO II**



## 11 ANEXO II

### INHIBITION OF NEURONAL APOPTOSIS AND REGRESSION AMELIORATES SYMPATHETIC ATROPHY AND HEMODYNAMIC ALTERATIONS IN PORTAL HYPERTENSIVE RATS

**Nahia Ezkurdia<sup>1</sup>, Imma Raurell<sup>1</sup>, Sarai Rodriguez<sup>1</sup>, Antonio González<sup>1</sup>, Rafael Esteban<sup>1,2</sup>, Joan Genescà<sup>1,2</sup> and María Martell<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Hepatic Diseases Laboratory, Liver Unit-Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

#### ABSTRACT

Splanchnic arterial vasodilation of portal hypertension is accompanied by sympathetic nerve atrophy. A neuronal pathway participates in the development of experimental portal hypertension: blockade of afferent sensory nerves in portal vein ligated (PVL) rats simultaneously prevents activation of brain cardiovascular regulatory nuclei, neuromodulator overexpression in superior mesenteric ganglia (SMG), sympathetic atrophy of mesenteric innervation and hemodynamic alterations. Here we confirm this neuronal pathway analyzing two intermediate structures. An increase in neuronal afferent activity was demonstrated in the vagal nodose ganglia of PVL rats and the presence of semaphorin3A in the cholinergic sympathetic pre-ganglionic neurons of the intermediolateral nucleus of the spinal cord suggested that it was the origin of the increased expression of semaphorin3A in the SMG. We also investigated alterations in neuromodulators and signaling pathways that, in the SMG of PVL rats, lead to axonal regression or apoptosis. We found that the active form of tyrosine kinase receptor A (TrkA), leading to proliferation and survival signaling, was decreased in PVL compared to sham rats. In contrast, the apoptotic and axonal retraction pathways were stimulated in PVL, demonstrated by a significant overexpression of semaphorin3A/neuropilin1, together with increases of cleaved caspase7, inactive poly(ADP-ribose) polymerase and Rho Kinase expression. Finally, we tested the administration of a TrkA agonist, gambogic amide, in PVL rats. Our results showed an amelioration of hemodynamic alterations and sympathetic atrophy, through the activation of survival pathways and the inhibition of the apoptotic cascade and axonal regression mediated by Rho Kinase. In conclusion, the adrenergic alteration and sympathetic atrophy in mesenteric

vessels during portal hypertension is caused by alterations on neuromodulation leading to post-ganglionic sympathetic regression and apoptosis and contributing to splanchnic vasodilation.

## INTRODUCTION

The hemodynamic alteration of portal hypertension in patients with liver cirrhosis contributes to most of the clinical manifestations of the disease: gastrointestinal bleeding, hepatic encephalopathy, ascites and renal failure. In the physiopathology of this vascular alteration, splanchnic vasodilation plays an essential role by initiating the hemodynamic process. Regardless of the extensively demonstrated humoral factors involved in splanchnic vasodilatation (1, 2), we have previously shown a remarkable local alteration of the mesenteric adrenergic system (inhibition of adrenergic genes and proteins and atrophy of sympathetic structures), as a possible contributory factor to splanchnic arterial vasodilation (3, 4). It has also been proposed that during portal hypertension, pressure changes detected at portal level could be the afferent sensory signal triggering this hemodynamic response (5). We have demonstrated that blocking sensory afferent nerves in portal hypertensive rats, simultaneously prevents c-fos activation in cardiovascular regulatory nuclei of the brain, hemodynamic alterations and also sympathetic atrophy of nerves innervating the superior mesenteric artery (SMA) (6-8).

Considering this neuronal pathway, the signal responsible for the post-ganglionic sympathetic atrophy could be originated in pre-ganglionic fibers that synapse with the superior mesenteric ganglion (SMG). By analyzing the SMG of portal vein ligated (PVL) rats, we have shown an overexpression of nerve growth factor (NGF) and its precursor (proNGF), as well as an increase in the neurotrophin receptor p75 (p75<sup>NTR</sup>) and in the chemorepellent molecule semaphorine 3A (Sema3A) (6). This altered neuromodulator expression in the SMG of PVL rats suggested that the adrenergic downregulation and sympathetic atrophy observed in mesenteric vessels might have its origin in disorders leading to axonal regression and/or apoptosis. Interplaying signaling pathways are responsible for the modulation of axonal survival and death (figure 1). While NGF is a neurotrophin responsible for neuronal survival and growth, its precursor pro-NGF can directly induce neuronal regression/death, when its effect is mediated by p75<sup>NTR</sup> (9, 10) or indirectly by inhibiting tyrosine kinase receptor A (TrkA) NGF-mediated activity (11). Sema3A strongly inhibits axonal growth in situations of intense NGF stimulation, by dephosphorylating the NGF main neuronal receptor TrkA (12). In turn, when active, TrkA promotes neuronal survival through the silencing of the apoptotic signal of

p75<sup>NTR</sup> (13). Finally, neurotrophin binding to p75<sup>NTR</sup> is necessary for Semaphorin 3A-mediated axonal regression/growth cone collapse (14, 15).

This study was aimed to (i) confirm the implication of the neuronal pathway in portal hypertension by analyzing two intermediate structures: the nodose ganglia in the afferent direction, containing the neuronal soma of afferent sensitive nerves running along the vagus nerve and the intermediolateral nucleus of the spinal cord in the efferent direction, containing the neuronal bodies of pre-ganglionic sympathetic nerves; (ii) further explore the neuromodulators and signaling pathways that, in the SMG of PVL rats, lead to Semaphorin 3A/ProNGF/p75<sup>NTR</sup>-mediated axonal regression or apoptosis; and (iii) find out whether treatment of PVL rats with gambogic amide, a TrkA agonist, inhibits this neurodegenerative pathway, and the hemodynamic alteration and sympathetic atrophy of portal hypertension disappear or improve.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Experimental portal hypertension**

Prehepatic portal hypertension was induced by partial portal vein ligation as described previously (3). Two groups of 7 portal hypertensive rats and 7 sham operated rats were studied. A third group of 16 PVL animals were treated daily with gambogic amide (n=8) (Enzo, Farmingdale, NY, USA) or vehicle (1% DMSO) (n=8), beginning the same day of the PVL surgery and during 14 days. Gambogic amide was injected (i.p.) at 0.35mg/kg body weight (BW). Eight control sham rats were used for this group.

### **Hemodynamic measurements**

Two weeks after PVL surgery or sham operation, animals were anaesthetized with a mix of ketamine hydrochloride (100 mg/kg BW, i.p.) plus midazolam (5 mg/ kg BW, i.p.). 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). SMA was isolated from connective tissue and a perivascular ultrasonic transit-time flow probe (1mm diameter, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) was placed around the artery to measure SMA blood flow (SMABF, ml/ min.100g). SMA resistance (SMAR, mmHg/ml.min.100 g) was calculated as (MAP-PP)/SMABF. Animal temperature was maintained at 37°C using a rectal thermometer throughout the procedure.

### Sample extraction

The SMG located at the confluence of the SMA and the aorta, was dissected free of surrounding tissue, removed and placed either in formalin and 50% ethanol before paraffin treatment, or in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed. Then, SMA harvested from the aortic origin to the initiation of ramifications were kept in 4% formalin for approximately 20 hours and changed to a 50% ethanol solution before paraffin treatment. Nodose ganglion samples were separated from the internal carotid artery and the internal jugular vein, with the aid of a microscope (Carl Zeiss OPML 9FC, Germany), immersed in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Finally, in order to extract spinal cord samples, once animals were dead, a portion of the spine (from T9 until T13) was extracted (vertebrae plus spinal cord). After 48 hours in 4% paraformaldehyde at  $4^{\circ}\text{C}$ , the spinal cords were separated from vertebrae and immersed in 30% sucrose in 0.1 mol/l phosphate buffer during 1-3 days at  $4^{\circ}\text{C}$ , frozen in methyl butane and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Western blot analysis

Expression of calcitonin gene related protein (CGRP) in nodose ganglion samples and of tyrosine hydroxylase (Th), Sema 3A, TrkA, phospho-TrkA (pTrkA), sortilin (Sort1), Rho kinase (ROCK), mitogen activated protein kinase (MAPK), phospho-MAPK (pMAPK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-JNK (pJNK), protein kinase B (AKT), phospho-AKT (pAKT), neural nitric oxide synthase (nNOS), cleaved caspase 7 (casp-7) and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in SMG samples were analyzed by Western blot. Tissue samples were homogenized in 250 ml RIPA buffer and 15 ml of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Protein quantification in the supernatants was performed by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein extracts (4-20  $\mu\text{g}$ ) were separated on 10–12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and incubated with antibodies against CGRP (diluted 1/500) (Biomol, Pennsylvania PA, USA), Th (dil 1/600), Sema3A, Sort1 (diluted 1/1000) (Abcam, Cambridge, UK), TrkA, ROCK (diluted 1/200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), nNOS (1/1000) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), pTrkA, MAPK, pMAPK, JNK, pJNK, AKT, pAKT, Casp-7 and PARP (diluted 1/1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Bands were quantified by the QUANTITY ONE software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### **Immunofluorescence**

Serial 8  $\mu\text{m}$  sections of spinal cord were cut using a cryostat (Leica CM3050S) and analyzed for vesicular acetylcholine transporter (VACHT) immunoreactivity, as a marker of preganglionic sympathetic cholinergic neurons. Successive slides were then used to analyze *Sema3A* immunoreactivity. Sections were blocked in a 1:20 dilution of goat serum for 1 h at RT and incubated with anti-VACHT (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) or *Sema3A* (diluted 1:200) at 4°C during 48 h. Bound antibodies were incubated 1 h at RT with anti-goat IgG DyLight 594 (diluted 1:500) (Bethyl, Montgomery, TX, USA) for VACHT and with anti-rabbit-FITC (diluted 1/500) (Abcam, Cambridge, UK) for *Sema3A*. Mounted sections in Vectashield hard set mounting medium were visualized with an optical microscope Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany).

Paraffin-embedded sections of SMG were blocked for 1 h and incubated overnight at 4°C with primary antibody against receptors neuropilin-1 (Nrp-1)(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (diluted 1:20), p75<sup>NTR</sup> (diluted 1/500) (Abcam), Sort-1 (diluted 1/200) and TrkA (diluted 1/200). Bound antibodies were incubated 1 h at RT with anti-rabbit-FITC. Slides were mounted in Vectashield hard set mounting medium for fluorescence. Quantitative analysis of Nrp-1, was performed with the Image J analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), as previously (6).

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical detection and quantitative analysis of Th was carried out on paraffin-embedded sections of SMA incubated with primary antibody anti-Th (diluted 1:250) as previously described (4,8). Image ProPlus analysis software (Media Cybernetics, Infaimon, Barcelona, Spain) was used to measure total nervous area and Th staining area. SMA sections were also incubated with primary antibodies against pAKT and endothelial NOS (eNOS) (diluted 1/50) at 4°C, overnight.

### **Statistical analysis**

Normally distributed values were compared using Student's t-test and expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

## Ethics

Animals received humane care according to the recommendations of the European Commission on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/report\\_ewg.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf)). All animal experiments were approved by The Animal Care Committee of the Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain.

## RESULTS

### The afferent signal through the vagus nerve is increased in portal hypertension

Visceral afferent sensitive nerves release the neurotransmitter CGRP upon stimulation, not only from the terminals of primary afferent fibers, but also from the cell bodies and along axons. CGRP expression was analyzed in the nodose ganglia containing the neuronal soma of afferent sensitive nerves running along the vagus nerve. The result clearly showed a significant 4-fold increase of CGRP expression in PVL rats compared to sham ( $p < 0.001$ ) (figure 2).

### Expression of semaphorin 3A in pre-ganglionic cholinergic neurons

In a previous study, we found Sema3A overexpression in the SMG, localized at the cholinergic axon fibers surrounding adrenergic neurons (8). We hypothesized a cholinergic pre-ganglionic origin for this increase in Sema3A and searched for its presence in the intermediolateral nucleus of the spinal cord, at the spinal segments from T9 to T13. At this level this nucleus contains the cell bodies of preganglionic sympathetic neurons that synapse at the SMG. As shown in figure 2, cholinergic VAcHT immunoreactive neurons were present in the ventral horn (figure 3A) and in the intermediolateral nucleus (figure 3B) of the spinal cord. Note that, as expected, the size and the staining pattern was different between neurons from both locations, being smaller and uniformly stained in the intermediolateral nucleus, without the punctuated appearance of the cholinergic neurons at the ventral horn. In successive sections, positive Sema3A immunofluorescent signal was only found in neurons located at the intermediolateral nucleus of the spinal cord of PVL rats, showing a similar size and staining pattern than the cholinergic neurons.

### **Tyrosine hydroxylase deficit and semaphorine 3A/Neuropilin 1 overexpression in adrenergic neurons of the superior mesenteric ganglion in PVL rats**

In order to confirm the adrenergic deficit previously found in mesenteric arteries of PVL rats (4, 6), Th expression was analyzed by Western blot in the SMG of PVL and sham rats. We found a significant 70% decreased expression of Th in PVL animals ( $p=0.008$ ) (figure 4A). The increased expression of Sema3A in the SMG, already demonstrated by us in a previous work using another method (6), was also confirmed by Western blot analysis. A significant increase of Sema3A was shown in PVL animals compared to sham (figure 4A). Moreover, Sema3A receptor Nrp1 was localized and quantified by immunofluorescence. The results demonstrated that Nrp1 is only located at the cytoplasm of adrenergic neurons of the SMG and that it is more significantly expressed in neurons from the SMG of PVL animals compared to sham ( $p=0.003$ ) (fig 4B). Finally, the neurotrophin receptors p75<sup>NTR</sup>, Sort1 and TrkA were immunodetected in the SMG to verify their location. The results demonstrated their presence in the cytoplasm of adrenergic neurons (supplementary figure 1). Moreover, co-localization of p75<sup>NTR</sup> and Sort1 can be visualized (supplementary figure 2).

### **The axonal retraction/apoptotic pathways are activated in the superior mesenteric ganglion from PVL rats**

The expressions of different proteins involved in the signaling pathways activated by either pro-NGF/NGF or Sema 3A were studied (figure 1). TrkA is the specific receptor for NGF and its activation leads to proliferative and prosurvival signaling through MAPK/AKT pathways. Although TrkA expression was not different between sham and PVL rats (not shown), its activated form, pTrkA, was decreased in PVL animals ( $p=0,03$ ) (figure 5). Nevertheless, both total (not shown) and phosphorylated forms of MAPK and AKT showed no differences between PVL and sham groups (figures 1 and 5). In contrast, the apoptotic and axonal retraction pathways, activated by Pro-NGF-p75<sup>NTR</sup> and Sema3A-Nrp1, respectively, showed changes in portal hypertensive rats. In one hand, the apoptotic cascade seemed to be activated in PVL compared to sham, demonstrated by strong increments in cleaved forms of Casp7 (25 and 20 kD) ( $p<0.001$ ) and in the inactive form of PARP ( $p=0.001$ ) in PVL animals. Surprisingly, we were not able to find differences in JNK (not shown) or pJNK expression between PVL and sham rats (figure 5). Finally, our results demonstrated that ROCK expression, which regulates axonal retraction in response to Sema3A signaling, was largely increased (>3-fold) in PVL rats compared to sham ( $p=0.03$ ) (figures 1 and 5).

### **Gambogic amide improves hemodynamic alterations and sympathetic atrophy in PVL rats**

Compared to sham rats, PVL animals treated with vehicle exhibited the characteristic hemodynamic changes observed in this model of portal hypertension (table 1). In contrast, PVL animals treated with gambogic amide (PVL-GA) improved the hemodynamic parameters, except for PP, being significantly different from PVL vehicle, but they were also significantly different from sham rats. As shown in table 1, PVL-GA animals presented a distinct intermediate hemodynamic state between PVL vehicle and sham rats.

Analysis of the total nervous area surrounding the outer part of the arterial wall in SMA sections and the Th staining area within these nervous structures showed that both parameters were significantly lower in PVL vehicle compared to sham (figure 5). However, compared to PVL vehicles, PVL-GA revealed less nerve atrophy demonstrated by a significant increase in total SMA nervous area ( $p=0.03$ ) and similar to that observed in sham rats. Regarding the Th expressing area within the nervous structures, PVL-GA animals also showed a significant increment compared to PVL vehicle ( $p=0.04$ ), but without achieving normal sham values (figure 6).

### **Axonal regression/apoptosis within the superior mesenteric ganglia is decreased in PVL rats treated with gambogic amide**

Administration of the TrkA agonist, gambogic amide, in PVL rats also changed the expression of most proteins implicated in neuronal growth/apoptosis pathways (figure 1). As expected, PVL-GA animals showed a significant increase in pTrkA, being different from PVL vehicle ( $p=0.012$ ) and similar to sham rats. Moreover, pMAPK and the pAKT/AKT ratio were also significantly increased in PVL-GA compared with sham animals ( $p=0.006$  and  $p=0.05$ , respectively) (figure 7). This increased pAKT/AKT ratio suggested that it might be interesting to study the expression of nNOS, as the main source of NO in this tissue. As shown in figure 6, nNOS expression was not significantly different between sham and PVL, but there was a significant 62% increase between PVL-GA and PVL vehicle rats ( $p=0.008$ ). On the other hand, compared with PVL vehicle, ROCK expression was significantly diminished in PVL-GA ( $p<0.001$ ), showing almost the same values as sham rats. Although cleaved Casp7 expression presented a slight non significant decrease in PVL-GA compared to PVL vehicle, the expression of cleaved PARP showed a significant decrease in PVL animals ( $p=0.04$ ), being very similar to sham animals (figures 1 and 7).

### **Effect of gambogic amide on the superior mesenteric artery**

Immunohistochemical detection of pAKT and eNOS was carried out in SMA sections (main trunk) from sham and PVL rats treated with GA or vehicle. Only endothelial cells showed pAKT and eNOS positive staining both in PVL-GA and PVL vehicle with no apparent differences between them. In contrast, no traces or very faint signal was detected in sham rats (supplementary figure 3).

## **DISCUSSION**

Based on previous studies, we have hypothesized that the observed post-ganglionic sympathetic nerve regression in the splanchnic area leading to neurotransmission inhibition and vasoconstriction impairment, could be an additional contributory factor to arterial splanchnic vasodilation of portal hypertension (3, 4, 6). This sympathetic nerve regression could be the result of efferent sympathetic signals synapsing at the SMG level. The origin of this neural response being an afferent signal, coming from portal or mesenteric pressure increments and reaching the brain stem cardiovascular nuclei through the vagus nerve (5, 7, 8).

### ***The neural signaling in portal hypertension***

In this work, we have first analyzed two intermediate structures of this neural routing, the nodose ganglia in the afferent direction and the intermediolateral nucleus of the spinal cord in the efferent direction. The increased expression of the neuropeptide CGRP in the nodose ganglia of PVL rats, containing afferent capsaicin sensitive neurons, confirms the augmented afferent signal through the vagus nerve in portal hypertension (supplementary figure 4). In this sense, it has been recently shown that capsaicin vagal denervation could completely block this increased sensitive signal and abrogate hyperdynamic circulation in PVL rats (7). In the efferent direction, the intermediolateral nucleus of the spinal cord at the spinal segments T9 to T13 contains the cell bodies of pre-ganglionic neurons that synapse with the post-ganglionic sympathetic neurones at the SMG. *Sema3A* immunoreactive neurons were found in the IML of PVL rats. These neurons were also positive for VAcHt immunostaining, being therefore cholinergic neurons, and putatively corresponding to the cholinergic pre-ganglionic fibers that co-localized with *Sema3A* in the SMG and around adrenergic neurons (6). Therefore, the efferent signal coming from the brain cardiovascular nuclei may induce the pre-ganglionic sympathetic neurons at the intermediolateral nucleus to produce *Sema3A*. From there, *Sema3A* can travel and be secreted at the SMG, affecting post-ganglionic adrenergic neurons and leading to axon growth inhibition, retraction or death (16-18) (supplementary

figure 4). It is well known that the development of hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats is an angiogenesis-dependent process that can be markedly inhibited by blockade of the VEGF signaling pathway (19, 20). The increase in Sema3A might also be necessary to redirect axons to innervate newly formed blood vessels from preexisting vasculature during portal hypertension (21). In this process, activation of neuronal death or axonal retraction might be a collateral damage of the increased Sema3A levels.

#### ***Altered neuromodulator expression in superior mesenteric ganglia***

Data from the present study expands and completes our previous results (6) on the exploration of neuronal markers in the SMG and its signaling pathways in portal hypertension. First of all, we verified the adrenergic deficit in the SMG of PVL rats, previously observed in mesenteric arteries (3, 4, 6), through the analysis of Th expression, a well-accepted marker of sympathetic activity. An increased expression of Sema3A and its receptor Nrp1 was also confirmed in the SMG of PVL rats. Moreover, to rule out the possibility that Sema3A, NGF or proNGF could be acting on different cells other than adrenergic neurons of the SMG, we analyzed the expression of receptors Nrp1, TrkA, p75<sup>NTR</sup> and Sort1 by immunofluorescence and found that they only localized in the cytoplasm of adrenergic neurons. These results reinforce the idea that an altered activity in the sympathetic neurons of the SMG is in the origin of the mesenteric sympathetic atrophy.

The mature NGF coreceptors consist of TrkA and p75<sup>NTR</sup>, wherein TrkA transduces survival and differentiative signaling and p75<sup>NTR</sup> modulates the affinity and selectivity of TrkA activation (9) (figure 1). On the other hand, proNGF engages p75<sup>NTR</sup> and coreceptor sortilin to initiate p75<sup>NTR</sup>-dependent apoptotic cascade (22, 23) or to activate, in partnership with Sema3A, the signaling pathway leading to growth cone collapse and axonal retraction (15). In turn, Sema3A is a negative regulator of NGF-induced neurite outgrowth via de-phosphorylation of TrkA, independent of its growth cone repulsion activity (12) (figure 1). Our data pointed out to the activation of p75<sup>NTR</sup> inducing axonal regression and apoptosis and to the inactivation of TrkA by Sema3A. Although TrkA expression did not change in portal hypertensive animals, our results showed a diminished expression of its active phosphorylated form. This was predictable as the observed overexpression in Sema3A could be acting on TrkA de-phosphorylation of the residues Tyr490 and Tyr785 (SCH and PLC $\gamma$  docking sites, respectively) (12, 24). Surprisingly, we could not find differences in the downstream signaling cascade regulated by these two tyrosine residues; levels of MAPK/ERK or its active phosphorylated form showed no difference between sham and PVL rats. We don't have an exact explanation for this result. In one hand, the predicted deactivation of pTrk exerted by Sema3A is clearly not complete. On the other hand, the fact that the preferred TrkA ligand, NGF, was also found overexpressed (6), could possibly explain why the decline

in MAPK/ERK pathway in the SMG of PVL rats, was not enough to be detected by our methods. Moreover, our *in vivo* tissue-type analysis certainly adds difficulty to discriminate between the expression of MAPK/ERK originated only from NGF-TrkA stimulation in adrenergic neurons and from the many other sources of MAPK/ERK activation (25).

On the contrary, the signaling pathways activated by proNGF/Sema3A leading to neuronal apoptosis and axonal regression showed to be markedly activated in PVL animals. Sema3A repulsive guidance signaling converges upon ROCK which propagates this signal down to the cytoskeleton acting as a key mediator of neuron growth inhibition and axon retraction (26) (figure 1). Moreover, caspases have been shown to irreversibly activate ROCK by truncation and generation of a constitutively active form (27). Our results showed that the caspase cascade is activated in our PVL rats demonstrated by important increases in cleaved Casp7 expression and in the inactive form of PARP; this caspase activation might be unrelated to the JNK pathway signaling. Simultaneously, the increased expression of ROCK points out to an activated process of axon retraction in portal hypertension, either from Sema3A signaling or from caspase-dependent apoptosis.

#### ***Treatment with gambogic amide***

In the last part of this study, we tested the hypothesis that by manipulating this altered survival/death neuromodulator pathways, substantial changes in sympathetic atrophy and splanchnic vasodilation could be observed. We have tested gambogic amide, a small-molecule agonist for TrkA receptor, to reverse or modify TrkA altered expression or the intermediary molecules in its signaling pathway (28). The selective interaction of gambogic amide with the cytoplasmic juxtamembrane domain of TrkA triggers the phosphorylation of TrkA at tyrosine residues Y490 and Y751, elicits AKT and MAPK activation and prevents neuronal cell death (28). The results obtained from the analysis of proteins involved in the opposed neuronal pathways of growth and death in the SMG agree with the observed improvement of the sympathetic atrophy in the nervous fibers surrounding the SMA of PVL rats treated with gambogic amide. As a primary effect, gambogic amide significantly induces the activation of TrkA, consequently increasing the expression of AKT and MAPK above the expression level found in sham and PVL vehicles. This increase in neuronal growth and proliferation, by itself, could be counteracting the neurodegenerative process demonstrated in the SMG of PVL rats. Moreover, the dramatic decrease in ROCK and PARP content of PVL rats treated with gambogic amide, suggests that the activation of the AKT survival pathway promotes not only the inhibition of axon retraction via ROCK, but also the blockade of the caspase cascade leading to apoptosis. To this inhibition might also contribute the overexpressed nNOS by the generation of nitric oxide (figure 1).

Our results showed that the hemodynamic alteration and sympathetic atrophy are simultaneously improved in PVL rats treated with gambogic amide. We believe that the improvement in hemodynamic parameters is mostly due to the prevention of sympathetic atrophy. An increase in sympathetic nervous area and an almost normal content of tyrosine hydroxylase in PVL-GA probably contribute to restore a normal state of vasoconstriction. However, the hemodynamic improvement is not complete, because PVL-GA rats do not show hemodynamic parameters equal to sham rats. Instead, they clearly reach an intermediate state between control and portal hypertensive rats. The main reason for this incomplete improvement is that sympathetic atrophy only partially explains mesenteric vasodilation; other factors certainly intervene in this alteration. Another possible explanation to the lack of a complete hemodynamic/nervous restoration could come from the possible opposed effects of gambogic amide in different tissues in the mesenteric territory. Activation of TrkA in the SMG can promote the proliferation and survival of sympathetic nerve structures, the consequent increment on adrenergic neurotransmission and eventually vasoconstriction. On the other hand, gambogic amide could be inducing at the same time vasodilation locally at the SMA via an increased phosphorylation of TrkA, AKT and eNOS. Our results demonstrated that, as expected, both pAKT and eNOS were overexpressed in endothelial cells of the SMA from rats with portal hypertension compared with sham. However, gambogic amide treatment did not seem to further increase this activation. In a previous study of gene expression profiling using DNA microarrays (3), in the SMA from PVL and sham rats we had observed a strong downregulation of TrkA at 14-day after PVL induction. Fewer TrkA receptors in PVL rats could contribute to a diminished neurotrophin binding, like NGF, eventually acting as attracting guidance molecules for vasoconstrictive adrenergic axons maintaining vascular tone. In this context, the administration of a TrkA agonist, as gambogic amide, could only had a partial effect on the already attenuated NGF receptors and therefore contribute only moderately to vasodilatation in this area.

In summary, during portal hypertension splanchnic arterial vasodilation is accompanied by sympathetic nerve atrophy. This sympathetic nerve regression is caused by a simultaneous inhibition of neuronal growth/survival pathways and the stimulation of neuronal apoptosis and axonal retraction processes, at the level of ganglionic sympathetic neurons. Reverting this altered neuromodulator alteration with a TrkA receptor agonist, partially prevents mesenteric sympathetic regression and improves the hemodynamic alteration of portal hypertension, indicating that sympathetic nerve regression is a contributory factor to splanchnic vasodilation in portal hypertension.

**BIBLIOGRAPHY**

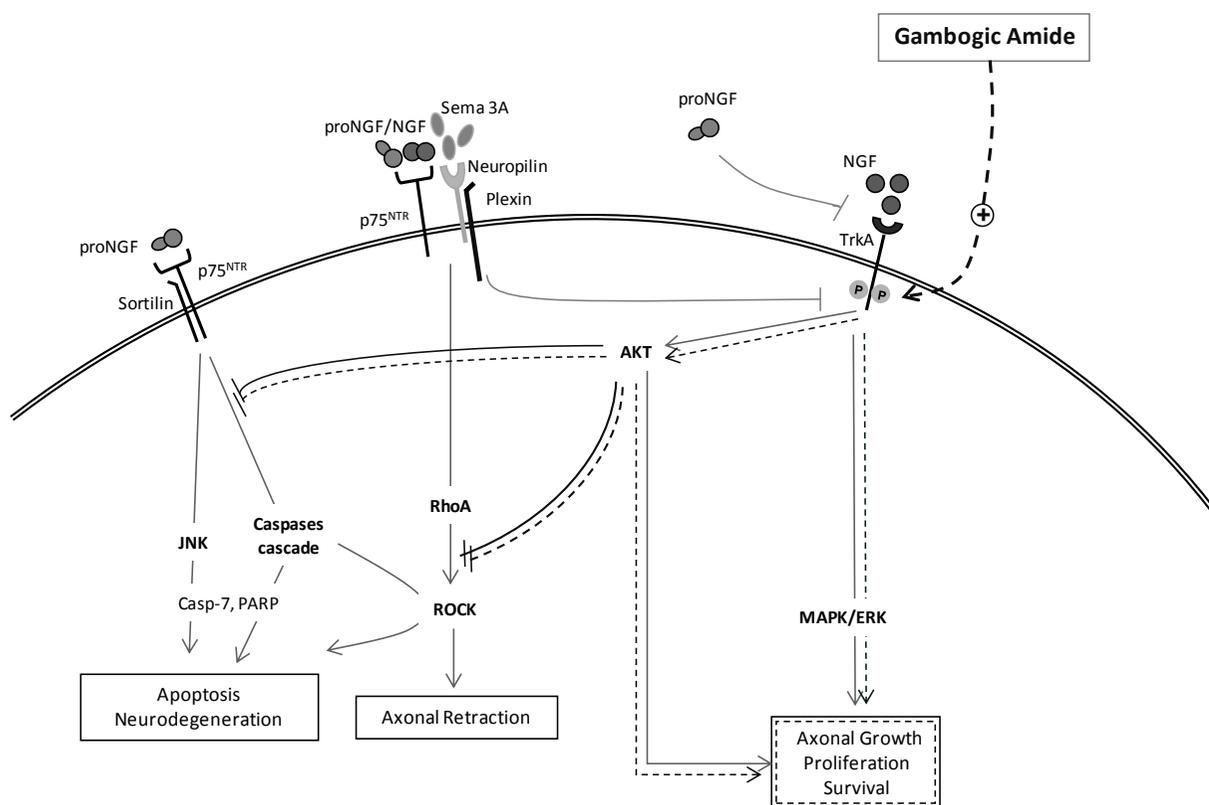
1. Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007 May;46(5):927-934.
2. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002 Feb;35(2):478-491.
3. Coll M, Genesca J, Raurell I, Rodriguez-Vilarrupla 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.
4. 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* 2010;30(4):593-602.
5. 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.
6. Ezkurdia N, Coll M, Raurell I, Rodriguez S, Cuenca S, Gonzalez A, et al. Blockage of the afferent sensitive pathway prevents sympathetic atrophy and hemodynamic alterations in rat portal hypertension. *Liver Int* 2012 Sep;32(8):1295-1305.
7. Liu H, Schuelert N, McDougall JJ, Lee SS. Central neural activation of hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats depends on vagal afferent nerves. *Gut* 2008 Jul;57(7):966-973.
8. Song D, Liu H, Sharkey KA, Lee SS. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rats is dependent on central c-fos gene expression. *Hepatology* 2002 Jan;35(1):159-166.
9. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 Sep 29;361(1473):1545-1564.
10. Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding Proneurotrophin Actions: Recent Advances and Challenges. *Developmental Neurobiology* 2010 Apr;70(5):350-359.

11. Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F. ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 2008 Dec;107(5):1294-1303.
12. Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Yagil Z, Lerman O, Behar O. Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell Signal* 2008 Mar;20(3):467-479.
13. Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *Journal of Cell Biology* 2001 Dec 24;155(7):1275-1285.
14. Gallo G. RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. *Journal of Cell Science* 2006 Aug 15;119(16):3413-3423.
15. Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2010 Oct;45(2):108-120.
16. Nangle MR, Keast JR. Semaphorin 3A inhibits growth of adult sympathetic and parasympathetic neurones via distinct cyclic nucleotide signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* 2011 Mar;162(5):1083-1095.
17. Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, Shina R, He ZG, Brudo I, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 1999 Sep;73(3):961-971.
18. Tang XQ, Tanelian DL, Smith GM. Semaphorin3A inhibits nerve growth factor-induced sprouting of nociceptive afferents in adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 2004 Jan 28;24(4):819-827.
19. 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. *Journal of Hepatology* 2005 Jul;43(1):98-103.
20. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by

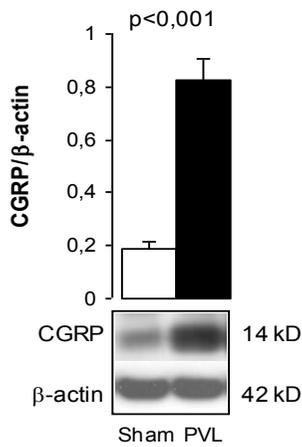
- combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007 Oct;46(4):1208-1217.
21. Larrivee B, Freitas C, Suchting S, Brunet I, Eichmann A. Guidance of Vascular Development Lessons From the Nervous System. *Circulation Research* 2009 Feb 27;104(4):428-441.
  22. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001 Nov 30;294(5548):1945-1948.
  23. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004 Feb 26;427(6977):843-848.
  24. Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Miller FD, Kaplan DR. Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: A mechanism for growth cone collapse. *Journal of Neuroscience* 2003 Aug 20;23(20):7602-7609.
  25. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002 Mar;12(1):9-18.
  26. Tonges L, Planchamp V, Koch JC, Herdegen T, Bahr M, Lingor P. JNK Isoforms Differentially Regulate Neurite Growth and Regeneration in Dopaminergic Neurons In Vitro. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011 Oct;45(2):284-293.
  27. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology* 2001 Apr;3(4):339-345.
  28. Jang SW, Okada M, Sayeed I, Xiao G, Stein D, Jin P, et al. Gambogic amide, a selective agonist for TrkA receptor that possesses robust neurotrophic activity, prevents neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Oct 9;104(41):16329-16334.

	PP (mmHg)	MAP (mmHg)	SMABF (ml/min.100g)	SMAR (mmHg/ml.min.100g)
Sham (n=8)	10,2 ± 0,2	121,9 ± 2,0	4,4 ± 0,4	26,9 ± 2,4
PVL (n=8)	15,7 ± 0,4 **	97,4 ± 2,7 **	7,2 ± 0,5 **	11,7 ± 0,9 **
PVL GA (n=8)	14,6 ± 0,8 **	111,6 ± 4,6 *†	5,8 ± 0,39 †	16,3 ± 0,6 **††

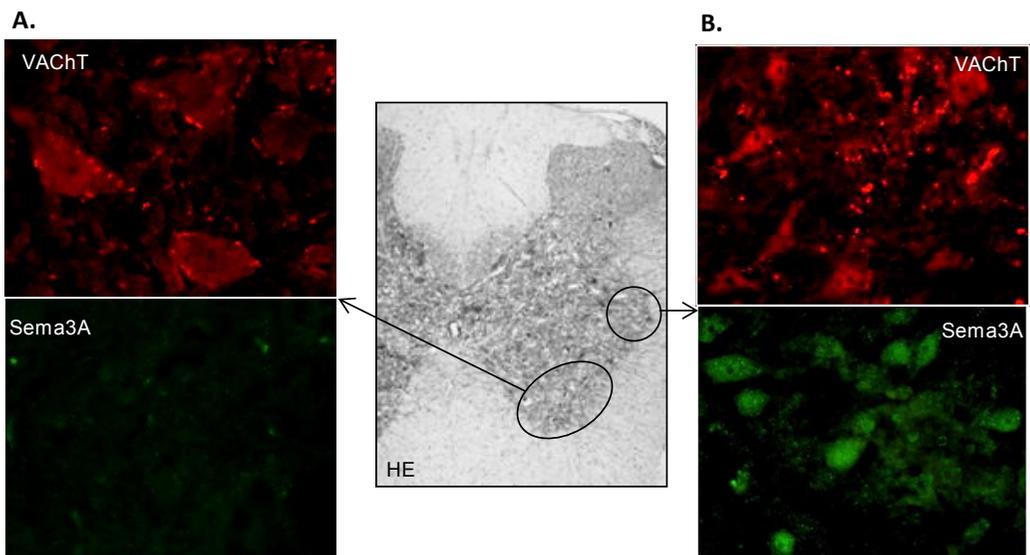
**Table 1.** Analysis of hemodynamic measurements of sham and PVL rats after gambogic amide or vehicle administration.



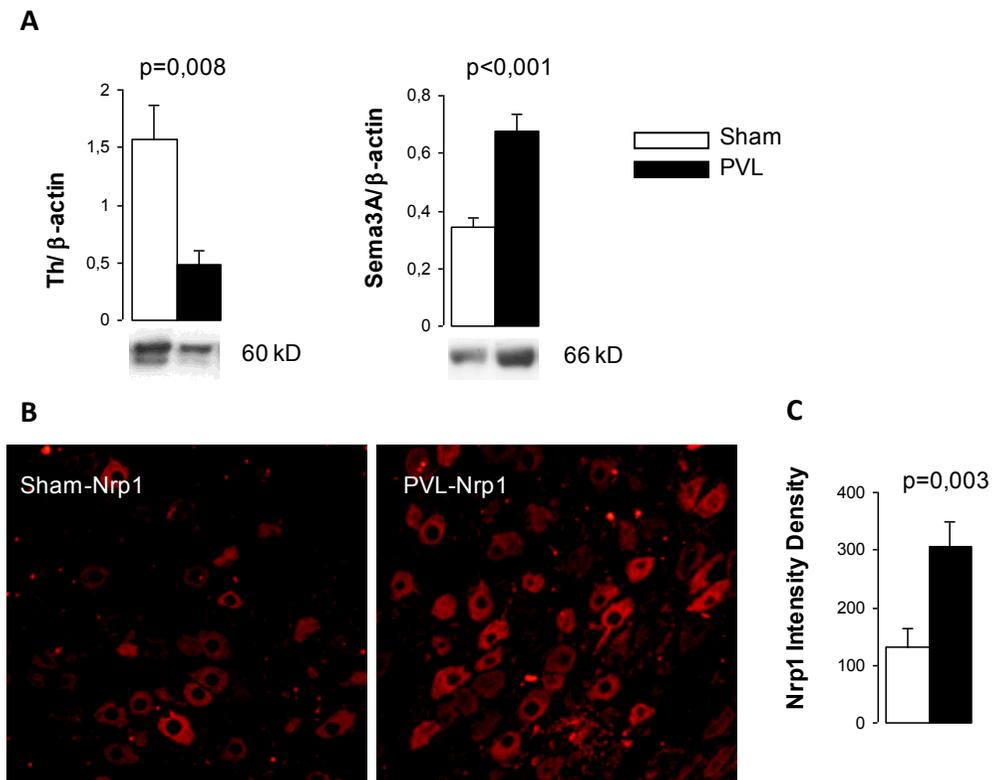
**Figure 1.** Interplaying signaling pathways responsible for the modulation of axonal survival and death. NGF, nerve growth factor; proNGF, NGF precursor; TrkA, tyrosine kinase receptor A; p75<sup>NTR</sup>, neurotrophin receptor p75; Sema3A, semaphorin 3A; JNK, c-Jun N-terminal kinase; RhoA, Ras homolog family member A; ROCK, Rho kinase; MAPK/ERK, mitogen activated protein kinase; AKT, protein kinase B; Casp-7, cleaved caspase 7; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase.



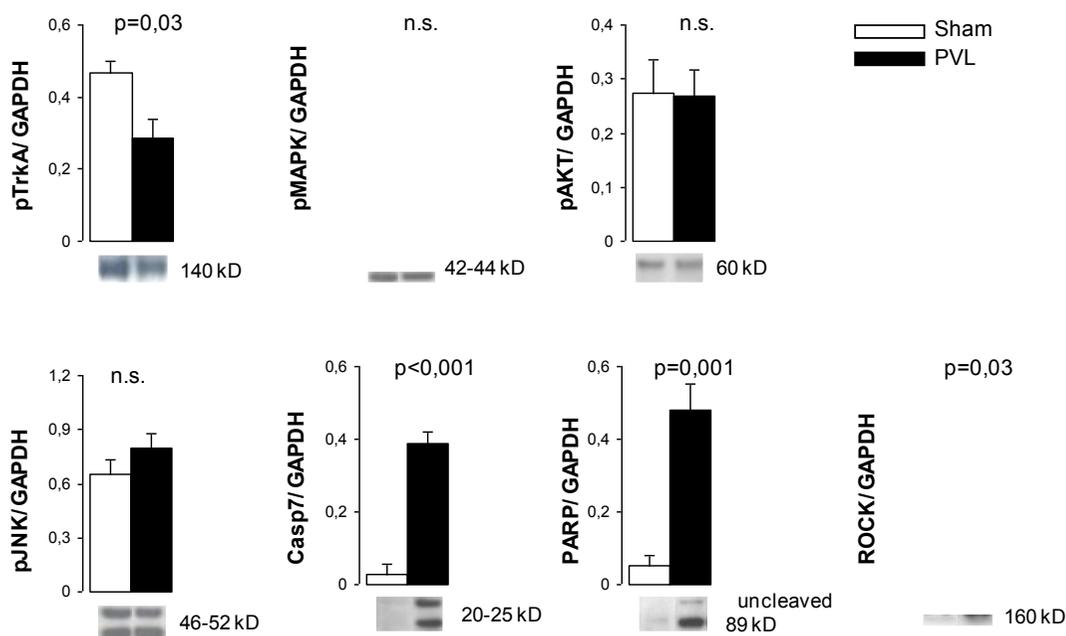
of calcitonin gene related protein  
e ganglion. Bar diagram showing  
y Western blot analysis in sham  
) . Representative Western blot is



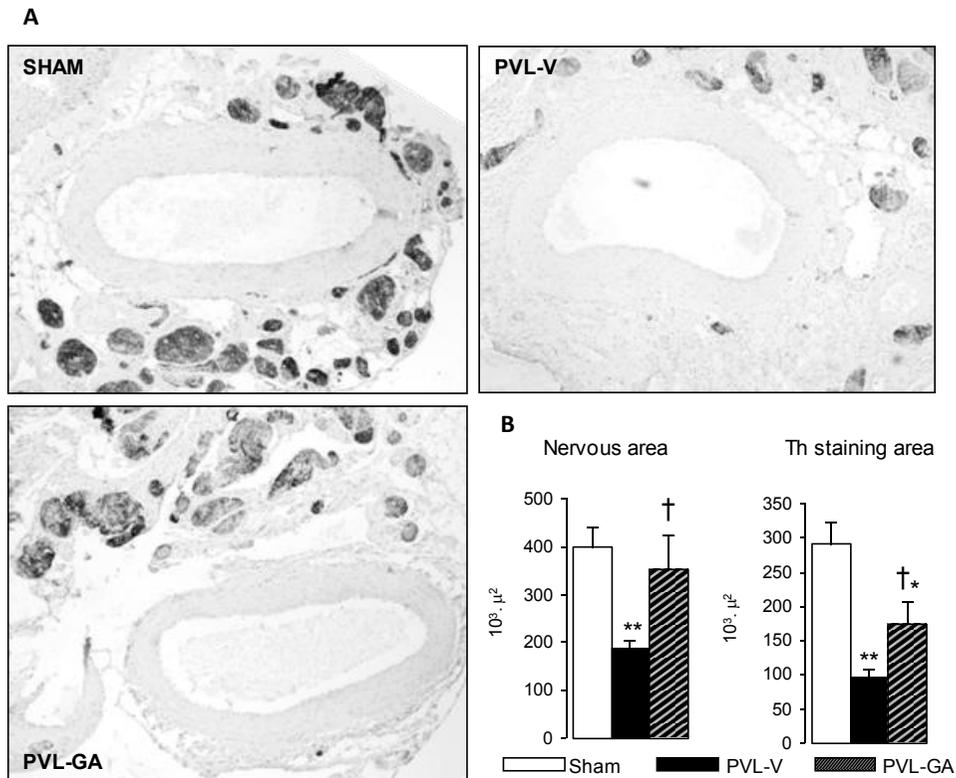
**Figure 3.** Immunofluorescence of vesicular acetylcholine transporter (VACht) and semaphorin 3A (Sema3A) in the intermediolateral nucleus of the spinal cord in PVL rats. (A) Representative images (400X) of the ventral horn area, containing cholinergic neurons, showing strong VACht immunofluorescent signal and null immunoreactivity for Sema3A. (B) Representative images (400X) of the intermediolateral nucleus containing cholinergic preganglionic sympathetic neurons. These neurons show positive immunofluorescent signal for both VACht and Sema3A. HE, hematoxylin-eosin staining.



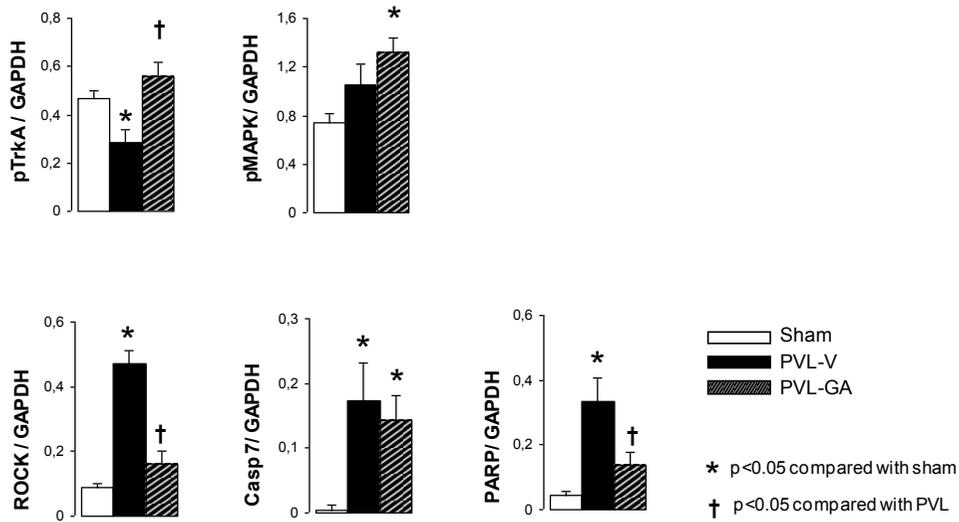
**Figure 4.** Analysis of tyrosine hydroxylase (Th), semaphorine 3A (Sema3A) and neuropilin (Nrp1) in superior mesenteric ganglion (SMG). (A) Bar diagrams showing Th and Sema 3A quantitation by Western blot analysis in sham (n=6) and PVL (n=7). Representative Western blots are shown below. (B) Representative images of Nrp1 immunoreactivity in sections of SMG at 400X from sham (n=6) and PVL (n=5). (C) Quantitation of intensity density of Nrp1 fluorescence in each experimental group.



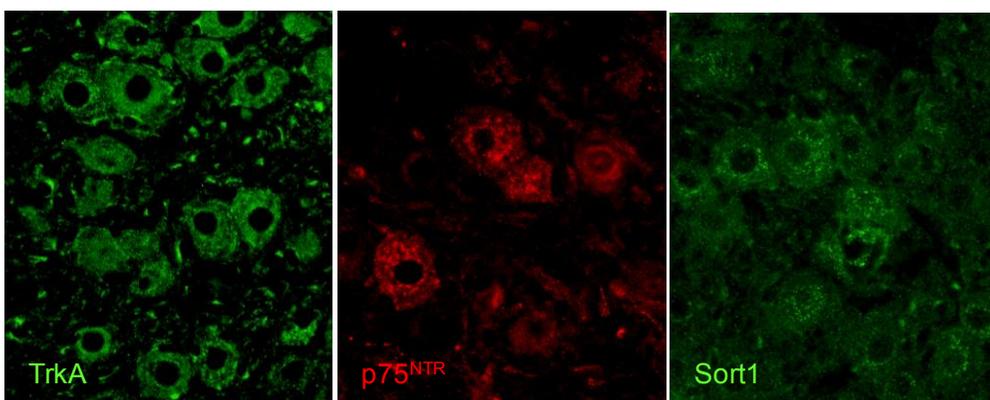
**Figure 5.** Expression of proteins involved in axonal survival and death signaling pathways in the superior mesenteric ganglion. Bar diagrams showing quantitation by Western blot of phospho-tyrosine kinase receptor A (pTrkA), phospho-mitogen activated protein kinase (pMAPK), phospho-protein kinase B (pAKT), phospho-c-Jun N-terminal kinase (pJNK), cleaved caspase 7 (Casp-7), poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) and Rho kinase (ROCK), in sham (n=7) and PVL (n=7). Representative Western blots are shown below.



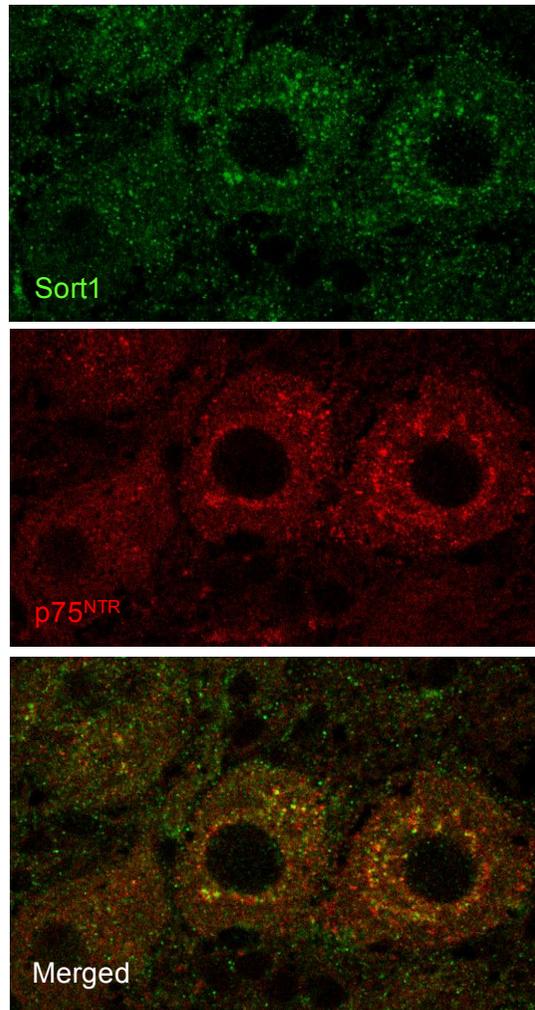
**Figure 6.** Analysis of tyrosine hydroxylase (Th) in sympathetic fibers of the superior mesenteric artery (SMA). (A) Representative images of Th immunostaining at 40X showing transversal sections of complete arterial wall surrounded by nervous structures from sham (n=7), PVL vehicle (PVL-V) (n=6), PVL gambogic amide (PVL-GA) (n=6) \*p<0.05, \*\*p<0.001, compared to sham; †p<0.05, compared to PVL-V. (B) Bar diagrams showing immunohistochemical quantitation of total nervous area and Th staining area in nerves surrounding the SMA from each experimental group.



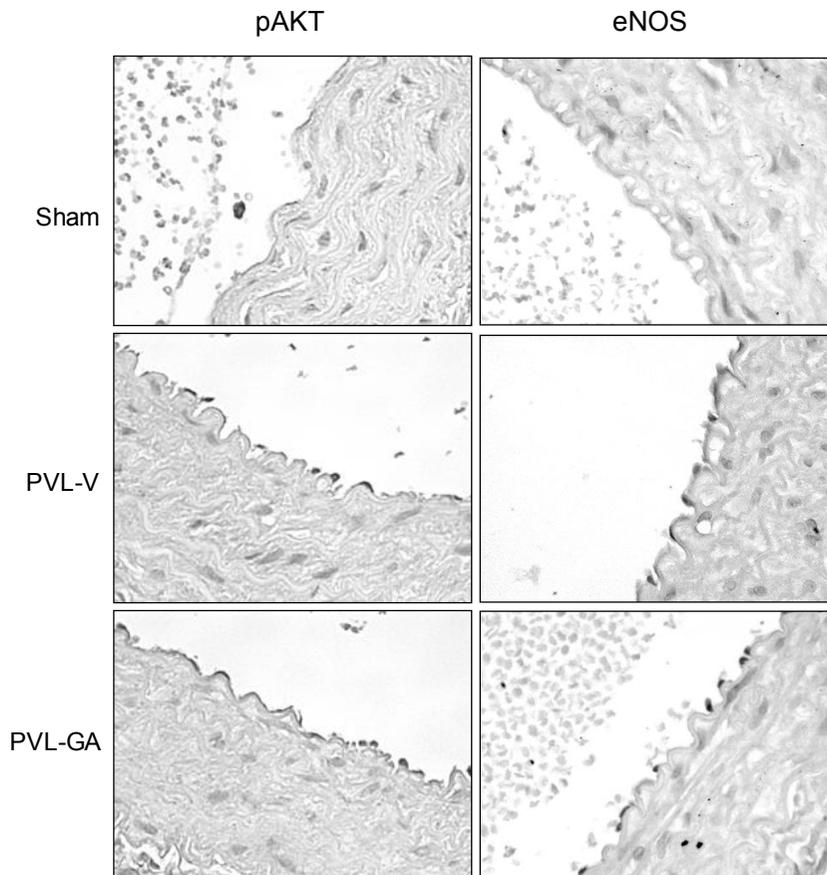
**Figure 7.** Expression of protein involved in axonal survival and death signaling pathways in the superior mesenteric ganglion after gambogic amide administration. Bar diagrams showing quantitation by Western blot analysis of phospho-tyrosine kinase receptor A (pTrkA), phospho-mitogen activated protein kinase (pMAPK), the ratio of phosphorylated and total forms of protein kinase B (pAKT/AKT), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), Rho kinase (ROCK), cleaved caspase 7 (Casp-7) and poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), in sham (n=8) and PVL treated with vehicle (PVL-V) (n=8) or gambogic amide (PVL-GA) (n=8).



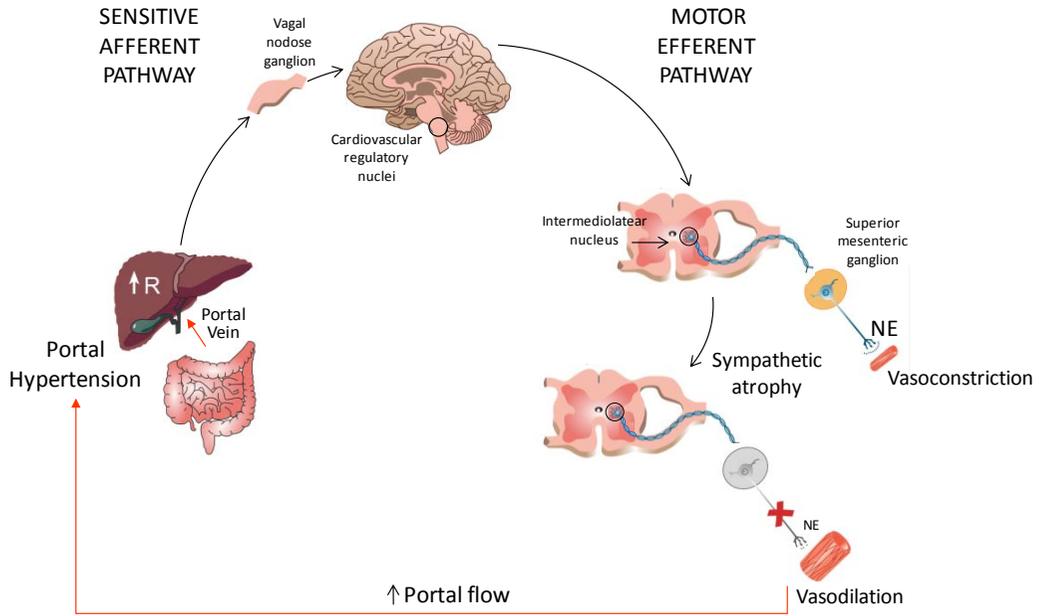
**Supplementary figure 1.** Immunofluorescent detection of TrkA, p75<sup>NTR</sup> and Sort1 in the sympathetic adrenergic neurones of the superior mesenteric ganglion.



**Supplementary figure 2.** Immunofluorescent co-localization of Sort1 and p75<sup>NTR</sup> in sympathetic adrenergic neurons of the superior mesenteric ganglion.



**Supplementary figure 3.** Immunohistochemical detection of pAKT and eNOS in the endothelial cell layer of the superior mesenteric artery, in sham and PVL rats treated with vehicle (PVL-V) or gambogic amide (PVL-GA).



**Supplementary figure 4.** The neural pathway in portal hypertension. NE: norepinephrine.

# **DISCUSIÓN**



## 12 DISCUSIÓN

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la hipertensión portal causa una importante inhibición de RNA mensajeros y proteínas implicadas en la neurotransmisión adrenérgica, acompañada de una marcada atrofia simpática de los nervios que rodean la vasculatura mesentérica. Esta atrofia simpática local podría estar contribuyendo a la vasodilatación esplácnica de la hipertensión portal. (27;73).

### *La vía neuronal en la hipertensión portal*

La hipótesis que se estableció a partir de los resultados obtenidos asumía que durante la hipertensión portal, los cambios de presión detectados en la vasculatura esplácnica podrían promover una señal a través de la vía sensitiva aferente hasta los núcleos de regulación cardiovascular del tronco cerebral, donde se desencadenaría una respuesta eferente responsable de provocar la atrofia simpática. Los resultados de la primera parte del trabajo confirman esta hipótesis y apoyan el papel de la atrofia simpática en la vasodilatación arterial esplácnica de la hipertensión portal, demostrando que mediante el bloqueo de la señal aferente, se consigue evitar la atrofia simpática esplácnica en aquellos animales en los que, simultáneamente, se normalizan los parámetros hemodinámicos.

Es importante destacar que en los animales en los que el bloqueo aferente con capsaicina resultó ser efectivo no se redujo la presión portal, a pesar de la intensa disminución del flujo mesentérico. Este resultado es exactamente igual que el publicado por Lee y col. (31) utilizando el mismo modelo y

tratamiento. Aunque desconocemos la explicación, es evidente que si la presión portal no varía y el flujo mesentérico disminuye, la resistencia en el área venosa portal debe, necesariamente, aumentar. Puesto que en las ratas PVL el hígado está intacto y la administración de capsaicina en ratas sham no causa un aumento en la presión portal, es probable que el tratamiento con capsaicina, por medio de la ablación aferente sensitiva, produzca un aumento en la resistencia intrahepática o en las colaterales, que mantiene la presión portal elevada.

La capsaicina causa la desfuncionalización selectiva de los nervios aferentes sensitivos primarios (67). Los nervios sensibles a la capsaicina poseen una capacidad dual “sensitiva-motora” y son capaces, por un lado, de liberar su contenido de neurotransmisores (CGRP y sustancia P) (75;76) de las terminales periféricas directamente en el tejido inervado (función motora) y, por otro lado, de transmitir mensajes hacia el sistema nervioso central a través del soma y de las terminales centrales (función sensitiva) (Fig. 5). En estas neuronas sensitivas, el soma y los procesos centrales, por una parte, y las ramas periféricas por otra, actúan como entidades funcionales independientes (37;38;68). En nuestros animales, especialmente en el modelo adulto, la administración de la neurotoxina capsaicina provocó un efecto heterogéneo a nivel aferente. Es bien conocido que mientras el tratamiento con capsaicina provoca una ablación completa a nivel de la respuesta eferente (liberación de neurotransmisores), el efecto a nivel aferente, es heterogéneo y sujeto a una variabilidad sustancial (67-69). Además, la actividad aferente en el modelo de tratamiento neonatal es más susceptible a la capsaicina que en el modelo adulto. La heterogeneidad en la respuesta de este modelo, probablemente, explica por qué Fernandez y col.

(32) no observaron diferencias en los parámetros hemodinámicos entre ratas PVL y PVL tratadas con capsaicina. La separación realizada entre nuestros animales con bloqueo efectivo aferente y los animales sin bloqueo efectivo (evidenciado por la actividad de cFos) nos permitió evaluar nuestros resultados. Es muy importante entender que la finalidad de este estudio no era analizar el efecto del tratamiento con capsaicina en la hipertensión portal: esto ya ha sido previamente reportado (31;33;34), sino más bien utilizarla como herramienta para explorar una vía fisiopatológica y probar la relación entre las alteraciones hemodinámicas y la atrofia simpática.

En la misma línea, la falta de reflejo corneal y la pérdida de tinción de CGRP en todos los individuos tratados con capsaicina no implica necesariamente la pérdida total de la señal aferente (67). Por ejemplo, la pérdida de sensibilidad a estímulos químicos nociceptivos y de calor en ratas tratadas con capsaicina es total mientras que la de estímulos mecánicos y de presión, que justamente afectan nuestro modelo, es heterogénea (67;68). Este hecho se confirmó en nuestro estudio donde todas las ratas PVL tratadas con capsaicina mostraron pérdida de la señal de CGRP, tanto en el tejido nervioso de la SMA como en el SMG, independientemente de si habían sido bloqueadas de manera efectiva o no a nivel aferente. Este resultado sugiere que el vasodilatador CGRP no participa en la generación y mantenimiento de la vasodilatación esplácnica durante la hipertensión portal, como ha sido propuesto por otros autores (70;71). Los nervios nitrérgicos también se han asociado con la generación y mantenimiento de la vasodilatación esplácnica durante la hipertensión portal (25;72), y algunos autores han sugerido que nNOS se localiza en las terminales CGRPérgicas sensibles a la capsaicina (26). Sin embargo, nuestros resultados indican que los nervios nitrérgicos no

parecen estar afectados por el tratamiento con capsaicina ya que la señal de nNOS en la SMA y en el SMG permaneció en todas las ratas PVL tratadas y no tratadas. Además la tinción simultánea de CGRP y nNOS demostró claramente que sus señales no colocalizan.

Estudios previos han demostrado que una señal aferente “vagal” (capsaicina sensible), a través de una activación dependiente de cFos en los núcleos reguladores cardiovasculares del cerebro, es necesaria para el desarrollo de la circulación hiperdinámica en ratas con hipertensión portal (33;34). En nuestras ratas PVL se observó un incremento en la expresión de cFos en el SON hipotalámico comparando con ratas sham. Además, en el ganglio nodoso, que contiene los somas neuronales de las fibras del nervio vago, también se observó un aumento en la expresión del neuropéptido CGRP en ratas PVL. Estos datos apoyan un aumento de la actividad aferente sensitiva a través del nervio vago y de la actividad neuronal en el SON hipotalámico durante la hipertensión portal.

El resultado más relevante del segundo estudio es que solamente en aquellos animales en los que se bloqueó la señal aferente sensitiva y en los que, por lo tanto, no se activaron los núcleos cardiovasculares (SON), se evitó tanto la circulación hiperdinámica como la atrofia simpática mesentérica. La presencia de animales tratados con capsaicina que mantuvieron alteraciones a nivel hemodinámico y de inervación simpática puso en evidencia que la capsaicina no es responsable directa de la prevención de estas alteraciones. Además, en estos animales se mantuvo la actividad en el SON hipotalámico.

Si suponemos que la atrofia simpática mesentérica es consecuencia de una señal nerviosa originada en los núcleos cardiovasculares del cerebro, se esperarían modificaciones en la actividad normal de las neuronas simpáticas localizadas en el SMG. Esta idea se confirmó al observar una sobreexpresión de los neuromoduladores Sema3A, NGF y proNGF en el SMG de ratas PVL que, además, se previno en los animales PVL tratados con capsaicina que presentaban valores hemodinámicos y de inervación simpática normales.

En resumen, cuando la señal aferente se anula, no se activan los núcleos del cerebro, se previene la sobreexpresión de los moduladores neuronales en el SMG, y se evitan las alteraciones hemodinámicas y la atrofia simpática. En conjunto, estos resultados indican que el sistema nervioso juega un papel central en la génesis de las alteraciones circulatorias durante la hipertensión portal, y apoya la afirmación de que la atrofia simpática mesentérica contribuye a la vasodilatación arterial esplácnica.

***Las alteraciones en la modulación neuronal en el ganglio mesentérico superior durante la hipertensión portal.***

El aumento en la expresión de la molécula quimiorepelente Sema3A y las neurotrofinas NGF y proNGF observadas en el SMG de ratas PVL nos condujo a explorar otras proteínas y sus vías de señalización implicadas en regulación neuronal. El análisis confirmó una alteración en la señalización de las vías de crecimiento, supervivencia, retracción y muerte neuronal, que podría ser responsable del origen de la atrofia nerviosa simpática en la vasculatura mesentérica.

En primer lugar, la disminución en la expresión de Th en el SMG de ratas PVL confirmó el déficit observado previamente en la inervación simpática mesentérica de ratas con hipertensión portal.

En relación a los moduladores neuronales, la expresión de Sema3A y de su receptor Nrp1 se reveló aumentada en el SMG de ratas con hipertensión portal. Se ha descrito que Sema3A posee un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento axonal en los ganglios simpáticos (52). Además, está implicada en la retracción y en el colapso axonal y en la apoptosis neuronal (52;53). La técnica de inmunofluorescencia permitió localizarla alrededor de las neuronas adrenérgicas, en el espacio interneuronal, sin colocalizar con axones adrenérgicos, ni con fibras nitrérgicas pero sí, al menos en parte, colocalizando con axones positivos a VACHT, sugiriendo su origen en las fibras colinérgicas preganglionares. Los somas de las neuronas colinérgicas preganglionares se encuentran en el núcleo intermediolateral de la región torácica de la médula espinal y sus fibras hacen sinapsis con las neuronas post-ganglionares en el SMG. La tinción de Sema3A observada tanto a nivel del núcleo intermediolateral en las neuronas simpáticas preganglionares como en el espacio interneuronal dentro del SMG, apoya el origen de Sema3A en las fibras colinérgicas preganglionares.

Estos datos sugieren que la señal eferente proveniente de los núcleos cardiovasculares del cerebro podría estar induciendo a las neuronas simpáticas preganglionares a producir Sema3A. De ahí, Sema3A podría ser secretada en el SMG afectando a las neuronas adrenérgicas post-ganglionares y provocando la inhibición del crecimiento axonal, retracción o a muerte neuronal (52;77;78). Fernandez y col. demostraron que el desarrollo de la circulación hiperdinámica durante la hipertensión portal

depende de la angiogénesis y que esta se puede inhibir, mediante el bloqueo de la vía de señalización del factor de crecimiento vascular (VEGF) (79;80). Dado que VEGF y Sema3A son moduladores de la inervación simpática de la vasculatura (81), el incremento observado de Sema3A podría ser debido a una necesidad de reorientación de axones hacia nuevos vasos en formación durante la hipertensión portal (82). En este proceso, el incremento de Sema3A también podría estar provocando la activación de la vía de muerte neuronal o retracción axonal en el SMG.

El aumento simultáneo observado en la expresión de NGF y Sema3A en ratas PVL, concuerda con el hecho de que ambas proteínas actúan conjuntamente como moléculas de señalización neuronal que se modulan entre sí para asegurar una correcta orientación axonal. NGF regula la repulsión mediada por Sema3A y sus receptores Nrp1 y PlexinaA. A su vez, en situaciones de intensa estimulación por NGF, Sema3A inhibe el crecimiento axonal inducido por NGF inactivando su receptor principal TrkA (50). Por su parte, NGF regula la supervivencia y la muerte neuronal mediante la unión a los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup> (83;84;84), mientras que proNGF induce apoptosis uniéndose selectivamente a p75<sup>NTR</sup> y Sort1 (44;45;85). Además, proNGF inhibe la activación de TrkA mediada por NGF (46) (Figura 7). En base a estos datos, se podría suponer que el aumento observado en SMG de proNGF, NGF, Sema3A y de su receptor Nrp1 en ratas PVL podría estar inhibiendo la activación de la vía de crecimiento neuronal dependiente de NGF y TrkA. Puesto que la supervivencia de las neuronas depende del ratio de la expresión de los receptores de neurotrofinas (86), se analizó la expresión de los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup>. Los resultados demostraron que en ratas PVL, la forma activa de TrkA estaba claramente

disminuida debido, probablemente, a la inactivación por desfosforilación de los residuos Tyr490 y 785 del receptor TrkA mediada por el incremento de expresión de Sema3A (50;87). También se observó un aumento en la expresión de p75<sup>NTR</sup> en ratas PVL y en el ratio de expresión de los receptores p75<sup>NTR</sup>/TrkA comparando con sham. Estos resultados sugieren un balance de la señalización neuronal hacia la vía apoptótica a través de p75<sup>NTR</sup> (Figura 7). Finalmente, la presencia de Sort1 observada en el SMG de ratas PVL demuestra la capacidad de estas neuronas en estimular la vía apoptótica, puesto que Sort1 actúa como correceptor e interruptor molecular esencial en la inducción de la señal apoptótica mediada por proNGF y p75<sup>NTR</sup> (44). Es importante apuntar que la técnica de inmunofluorescencia permitió localizar los receptores TrkA, p75<sup>NTR</sup> y Sort1 mayoritariamente en las neuronas adrenérgicas del SMG confirmando su actividad en estas neuronas y no en las células gliales del SMG.

El incremento en la expresión de Sema3A, proNGF, NGF, y p75<sup>NTR</sup> se ha descrito en numerosas condiciones patológicas de tipo neurodegenerativo. La alteración en la expresión de Sema3A se ha relacionado con epilepsia (88), isquemia, esclerosis múltiple (89), esquizofrenia y regeneración neuronal (90;91). Asimismo, se ha demostrado un incremento en la expresión de proNGF y p75<sup>NTR</sup> en pacientes con Alzheimer (92), y tras una lesión de la médula espinal (84;93;94) y de NGF y p75<sup>NTR</sup> en lesiones de retina (95). Además, la reducción en la expresión del receptor TrkA está correlacionada con atrofia neuronal y precede a la muerte neuronal y a desarreglos cognitivos graves en pacientes con Alzheimer. Estas alteraciones en la neuromodulación observadas en enfermedades neurodegenerativas concuerdan con nuestros resultados de atrofia simpática.

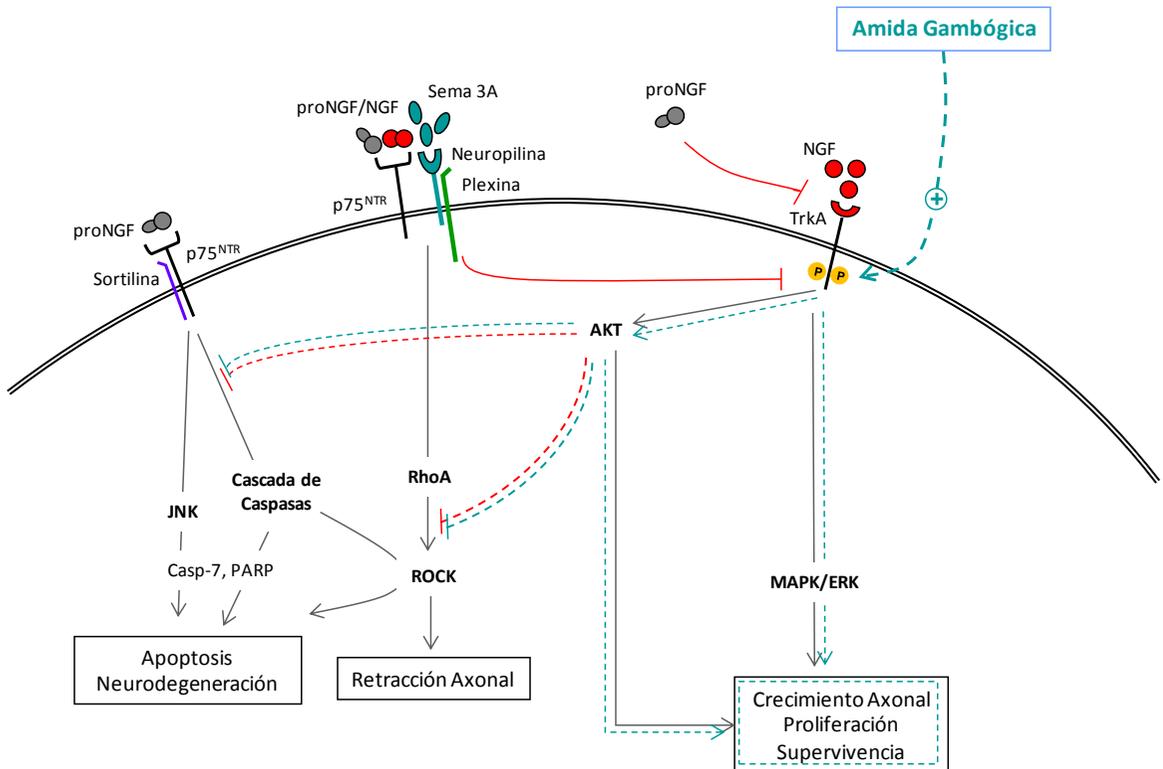
Una vez analizada la expresión de señales extracelulares y de receptores de membrana, se estudiaron las vías de señalización intracelular desencadenadas por NGF, proNGF y Sema3A. La unión de NGF a TrkA inicia la fosforilación del receptor que junto con proteínas adaptadoras, activa cascadas de señalización intracelulares derivando en dos vías principales de señalización, la vía de AKT y la vía de MAPK/ERK (Figura 7). Estos eventos, a su vez, influyen en eventos de transcripción que afectan la diferenciación y la supervivencia neuronal (96). Resulta lógico pensar que la disminución en la expresión de fosfo-TrkA observada en PVL conduciría a una reducción en la actividad de MAPK/ERK, ya que la desfosforilación de TrkA por Sema3A afecta a esta vía de señalización, aunque no a la de AKT (50). Sin embargo, no fuimos capaces de observar diferencias significativas entre sham y PVL. Es posible que la desfosforilación parcial por Sema3A, junto con la sobreexpresión de NGF, no sea suficiente para detectar una disminución en la actividad de la vía MAPK/ERK con nuestros métodos. Asimismo, las vías de AKT y de MAPK/ERK transmiten, amplifican e integran señales a partir de un amplio rango de estímulos provocando proliferación celular principalmente mediante receptores tirosina quinasa, pero también a través de receptores acoplados a proteínas G y de citoquinas (61). Este hecho podría explicar la dificultad para distinguir la expresión de AKT y de MAPK/ERK derivada de la estimulación de NGF-TrkA de las neuronas adrenérgicas o de otro origen en nuestro análisis *in vivo*, en muestras de tejido ganglionar.

Por otro lado, se ha demostrado que, a través de un conjunto de proteínas adaptadoras, el receptor p75<sup>NTR</sup> produce un aumento en la actividad de JNK contribuyendo a la muerte celular mediante la activación de la cascada de caspasas (62;84;97). El aumento en PVL de la expresión de Casp7, clave en la

ejecución de la apoptosis (63) confirmó la activación de la vía apoptótica a través de p75<sup>NTR</sup>. Además, el aumento en ratas PVL en la expresión de la forma inactiva de PARP (98;99), necesaria en la reparación del ADN, confirmó la actividad proteolítica mediada por las caspasas efectoras durante la apoptosis en el SMG. El aumento en la expresión de p75<sup>NTR</sup> en ratas PVL no se relacionó con un aumento de JNK, lo que sugiere, en nuestro caso, la activación de la vía de las caspasas independiente de JNK.

Finalmente, también se observó un incremento significativo en la expresión de ROCK. El incremento de Sema3A en presencia de p75<sup>NTR</sup> y neurotrofinas induce la retracción axonal mediada por ROCK (54;56;101). Además, el aumento observado en la expresión de ROCK podría deberse, también, a la activación irreversible mediada por las caspasas (57;100) (Figura 7). Por último, la activación de ROCK podría estar participando en la inhibición indirecta de la vía de supervivencia mediada por AKT (57).

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la atrofia simpática observada en la inervación de los vasos mesentéricos podría tener su origen en alteraciones de neuromodulación que conducen a regresión axonal y apoptosis en el SMG.



**Figura 7. Efecto de la amida gambógica sobre las vías de señalización neuronal.**

Representación esquemática del efecto de la amida gambógica sobre el receptor TrkA y sus cascadas de señalización. La fosforilación de TrkA conduce a la activación de las vías de crecimiento neuronal y proliferación (AKT y MAPK/ERK) en detrimento de las vías de retracción axonal y apoptosis neuronal (ROCK, JNK, Caspasas, PARP).

### ***El tratamiento con amida gambógica***

Partiendo de que la activación de las vías de retracción y apoptosis conduce a un importante déficit de Th en PVL, una estimulación de las vías de crecimiento y supervivencia en estos animales debería oponerse a la vía apoptótica y por lo tanto, prevenir el déficit de Th y mejorar la vasodilatación esplácnica.

En este último estudio nos planteamos manipular las vías de señalización de crecimiento y muerte neuronal mediante la administración de un agonista de TrkA, la amida gambógica, que provoca la fosforilación de los residuos Y490 y 751 del receptor TrkA, conduciendo a la activación de las vías de AKT y MAPK/ERK y previniendo la muerte neuronal (74). Los resultados demostraron la activación de las vías de crecimiento neuronal y proliferación, acompañada de una mejora importante de la atrofia simpática y de la vasodilatación arterial esplácnica.

El incremento en la expresión de fosfo-TrkA en las PVL tratadas con amida gambógica confirmó la efectividad del tratamiento, corroborado también por un incremento en la actividad de las vías de señalización intracelular de MAPK y AKT (Fig. 7). El aumento en la actividad de AKT concuerda con el aumento de expresión de nNOS observado en PVL GA. Este incremento podría estar contribuyendo a un aumento del vasodilatador NO que podría estar participando en la inhibición de la vía de las caspasas y de ROCK (97;102). De hecho, aunque la disminución de Casp7 revelada en PVL GA no resultó estadísticamente significativa respecto a PVL, el nivel de expresión tanto de ROCK como de PARP sí que disminuyó significativamente, demostrando un descenso de la vía apoptótica en los animales tratados con amida gambógica (Fig. 7).

Por otro lado, en los animales PVL tratados con amida gambógica tanto los parámetros hemodinámicos como los de inervación simpática mejoraron significativamente respecto a las ratas PVL vehículo. Pensamos que la mejora hemodinámica en estos animales se debe mayormente a la prevención de la atrofia simpática puesto que el aumento de estructuras nerviosas y del contenido de Th en los animales tratados implica,

probablemente, vasoconstricción en la zona esplácnica. Sin embargo, los parámetros hemodinámicos no se restablecieron por completo manteniéndose en un estado intermedio entre ratas con hipertensión portal y ratas control. La razón principal de esta mejora parcial podría ser simplemente que la atrofia simpática no es el único factor que interviene en la vasodilatación arterial esplácnica. Además, la amida gambógica podría estar produciendo efectos opuestos en los diferentes tejidos del territorio mesentérico. Por un lado, la activación de TrkA promueve la proliferación y supervivencia de las neuronas adrenérgicas en el SMG mejorando la neurotransmisión adrenérgica y eventualmente la vasoconstricción esplácnica pero, por otro lado, la activación de TrkA podría promover la fosforilación de AKT y eNOS en la vasculatura mesentérica produciendo vasodilatación. Nuestros resultados demostraron que fosfo-AKT y eNOS están sobreexpresados en las células endoteliales de la arteria mesentérica superior de ratas con hipertensión portal comparando con sham. Aún así, el tratamiento con *Gambogic amide* no pareció incrementar esta sobreexpresión. Resultados previos de microarrays de DNA del laboratorio (27), demostraron que el receptor TrkA se encuentra infraexpresado en la SMA a los 14 días post-cirugía PVL. Un menor nivel en la expresión de receptores TrkA en PVL implica una menor unión de neurotrofinas, como NGF, y posiblemente, una menor atracción de axones adrenérgicos vasoconstrictores, mediada por NGF, que influiría en el tono vascular. En este contexto de baja expresión de TrkA, la administración de un agonista de TrkA como la amida gambógica podría únicamente tener un efecto parcial y por lo tanto contribuir de manera moderada a la vasodilatación en esta zona.

En resumen, el tratamiento con amida gambógica restablece parcialmente, pero significativamente, la alteración hemodinámica y la atrofia simpática. Esta mejoría se debe, muy probablemente, a un aumento significativo en la actividad de las vías de proliferación y supervivencia neuronal (TrkA, AKT, MAPK/ERK) y a una disminución de la retracción axonal y apoptosis neuronal (ROCK y PARP y Casp7) (Fig. 7).

# **RESUMEN Y CONCLUSIONES**



## 13 RESUMEN

- El bloqueo de la señal aferente con capsaicina previene la expresión de cFos en el SON hipotalámico, las alteraciones hemodinámicas, la atrofia simpática y la sobreexpresión de moduladores neuronales en el SMG de ratas PVL.
- El aumento de CGRP en el ganglio nodoso de los animales con hipertensión portal indica un aumento de la señal aferente a través del nervio vago.
- El incremento de Sema3A (inhibidor de crecimiento neuronal) en PVL muestra un patrón alrededor de las neuronas adrenérgicas y colocaliza con fibras positivas para VAcHT en el SMG. Además, en el núcleo intermediolateral de la médula espinal, las neuronas colinérgicas presentan Sema3A, sugiriendo su origen en estas fibras.
- La disminución en la expresión de Th en el SMG confirma el déficit observado previamente en la innervación simpática de la vasculatura mesentérica.
- El incremento de Sema3A y de su receptor Nrp1, junto con el aumento de neurotrofinas NGF y proNGF en el SMG, apuntan hacia la inhibición de la vía de crecimiento axonal.
- La expresión de p75<sup>NTR</sup> y del ratio de los receptores de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>/TrkA muestran un aumento en PVL respecto a sham. Además la forma activa del receptor TrkA se encuentra disminuida en PVL, sugiriendo la activación de la vía apoptótica a través de p75<sup>NTR</sup>.

- El aumento en la expresión de Casp7 activa, de PARP inactiva y de ROCK indican presencia de apoptosis y de retracción axonal en el SMG durante la hipertensión portal.
- El tratamiento con amida gambógica restablece parcialmente, pero significativamente, la alteración hemodinámica y la atrofia simpática debido, muy probablemente, a un aumento significativo en la actividad de las vías de proliferación y supervivencia neuronal (TrkA, AKT, MAPK/ERK) y una disminución de la retracción axonal y apoptosis neuronal (ROCK y PARP y Casp7).

## 14 CONCLUSIONES

- El sistema nervioso juega un papel central en la génesis de las alteraciones circulatorias durante la hipertensión portal: los cambios de presión generados por la hipertensión portal desencadenan una señal aferente a través de la vía sensitiva aferente hasta los núcleos de regulación cardiovascular del tronco cerebral, donde se produce una respuesta eferente responsable de provocar la atrofia simpática.
- La alteración adrenérgica y la atrofia simpática en la vasculatura mesentérica durante la hipertensión portal tiene su origen en alteraciones de neuromodulación que conducen a regresión simpática post-ganglionar y a apoptosis que contribuyen a la vasodilatación esplácnica.
- La inhibición de la apoptosis neuronal y de la regresión axonal puede mejorar la atrofia simpática de la vasculatura mesentérica y como consecuencia, las alteraciones hemodinámicas de la hipertensión portal, en especial la vasodilatación arterial esplácnica.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 15 MATERIAL Y MÉTODOS

### 15.1 TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

#### 15.1.1 Modelo de ligadura calibrada de la vena porta

Para el modelo de ligadura de la vena porta (PVL), se induce una hipertensión pre-hepática por estenosis calibrada de la vena porta a ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Charles River, Barcelona, España) de entre 250 y 300 gramos de peso corporal, tal como describió Vorobioff et al (4). Mediante una incisión abdominal y bajo anestesia isofluorane (5% para la inducción y 2% para el mantenimiento) y oxígeno (2%) se aísla la vena porta del tejido graso mediante una ligadura, posteriormente, se coloca una aguja de 20G (0.889mm) de punta roma entre la ligadura y la vena, y finalmente, después de cerrar con fuerza el nudo, se retira la aguja. A las ratas control (sham) se las somete a una operación ficticia, realizando exactamente la misma operación con la diferencia de que, después del aislamiento de la vena porta, no se procede a la ligadura. Tras la intervención, los animales se devuelven a sus jaulas, donde quedan con libre acceso al agua y comida durante 14 días.

#### 15.1.2 Administración de capsaicina en ratas adultas

La administración de capsaicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) o vehículo (80% de solución salina fisiológica, 10% Tween 80 y 10% de etanol),

a una dosis total de 100mg/kg de peso corporal, se lleva a cabo en ratas macho adultas de 200-250g anestesiadas con isofluorane (5% inducción y 2% mantenimiento) y oxígeno (2%). Se administra en series de tres inyecciones de 1ml (25, 25, 50 mg/kg subcutáneo) en un periodo de 24h (0, 18, 24h). La posible mortalidad provocada por la capsaicina se disminuye administrando teofilina (5mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) y atropina (2mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) 30 minutos previos y 3 horas después de la primera inyección de capsaicina. La cirugía PVL o sham descrita previamente se realiza una semana después de la primera inyección de capsaicina. La eficacia del tratamiento a nivel motor se confirma instilando una gota de 0.33mM de capsaicina en el ojo el día de la cirugía y la víspera del análisis de las medidas hemodinámicas. Todos los animales deben mostrar pérdida de reflejo corneal y de sus característicos movimientos de limpieza.

### **15.1.3 Administración de capsaicina en ratas neonatales**

A las 48 horas de vida de los animales, se administra una única dosis de capsaicina (50mg/kg de peso corporal) diluida en vehículo (80% de solución salina fisiológica, 10% Tween 80 y 10% de etanol) bajo anestesia isofluorane (5% inducción y 2% mantenimiento) y oxígeno (2%) (39). Las crías se devuelven a sus jaulas, se destetan a los 21 días y se separan por género. Entonces, al alcanzar un peso de 250-300g se realiza la cirugía PVL o sham. Este mismo día y la víspera del análisis de las medidas hemodinámicas, al igual que en el modelo adulto, se instila una gota de 0.33mM de capsaicina

en el ojo, y se verifica que todas las ratas tratadas muestran pérdida de reflejo corneal y de sus característicos movimientos de limpieza.

#### **15.1.4 Administración de amida gambógica en ratas adultas**

La administración diaria, por vía intraperitoneal, de amida gambógica (Enzo, Farmingdale, NY, USA) se inicia el mismo día de la cirugía PVL hasta el día 14 del modelo. Se administra en ratas macho adultas de 200-250g a una dosis de 0.35mg/kg de peso corporal por día, diluida en 500µl totales de vehículo (20mg de amida gambógica en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) que se completa con solución salina fisiológica).

#### **15.1.5 Medida de los parámetros hemodinámicos**

Las medidas de los parámetros hemodinámicos se realizan 14 días después de haber practicado la ligadura de la vena porta (ratas PVL). Se llevan a cabo bajo condiciones de anestesia con ketamina (100mg/kg) y midazolam (5mg/kg) por vía intraperitoneal. Es importante apuntar que en el caso del grupo de animales utilizados para el análisis del marcador cFos en el cerebro; se presta especial cuidado para prevenir el aumento de cFos debido al estrés o a la estimulación nociceptiva. Así, por un lado, los animales que chillan o se resisten durante la inyección de anestesia se descartan de los estudios posteriores, y por otro lado, se aplica lidocaína tópica al 2% antes de la incisión abdominal. Durante el registro, se controla la temperatura rectal del animal manteniéndolo a 37°C. Las medidas se

registran a través de la unidad de adquisición de datos PowerLab (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), que consta del software Chart 5.0

#### **15.1.5.1 Medida de la presión arterial media**

La presión arterial media se mide mediante una cánula de instalación intravascular en la arteria femoral derecha con un catéter de polietileno PE 50 conectado a un transductor de presión de alta sensibilidad (Harvard Apparatus). Inicialmente, se realiza una incisión en la ingle derecha del animal, abriéndose paso y rompiendo el músculo, hasta localizar el paquete compuesto por la arteria, la vena y el nervio femoral. Una vez aislada la arteria, se hace una incisión con una aguja de 23G para facilitar la introducción de la cánula. Mediante dos nudos (seda de 3-0), se inmoviliza el catéter dentro de la arteria.

#### **15.1.5.2 Medida de la presión portal**

La presión portal se mide mediante una cánula de instalación intravascular en la vena ileocólica con un catéter de polietileno PE 50 conectado a un transductor de presión de alta sensibilidad (Harvard Apparatus). Después de una incisión abdominal, se extraen y se expanden los intestinos sobre una gasa empapada con suero fisiológico. Una vez localizada la vena ileocólica, se introduce el catéter directamente por una ramificación de la misma. El catéter se inmoviliza dentro de la vena con una gota de pegamento instantáneo.

### **15.1.5.3 Medida del flujo mesentérico**

El flujo de la SMA se mide mediante una sonda perivascular ultrasónica (Doppler) de 1mm de diámetro (TRANSONIC Systems Inc., Ithaca, NY, USA). Tras la incisión abdominal, se aísla la SMA del tejido conectivo y graso que la rodea. Posteriormente, se aplica un gel de transmisión de ultrasonidos sobre la sonda para facilitar la transmisión de la señal y finalmente, se pinza la sonda sobre la arteria aislada.

### **15.1.5.4 Medida de la resistencia mesentérica**

La resistencia mesentérica se determina mediante el siguiente cálculo:  
(MAP-PP) / SMABF)

## **15.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **15.2.1 Western Blot**

#### **15.2.1.1 Extracción y conservación de muestras**

Las muestras de SMA se extraen desde el inicio aórtico hasta las primeras ramificaciones, inmediatamente después, se sumergen en N<sub>2</sub> líquido, y finalmente se conservan a -80°C hasta su procesamiento.

En cuanto a las muestras de SMG simpático, que se encuentra junto a la SMA y cerca del inicio aórtico, se localizan con la ayuda de un microscopio (Carl Zeiss OPML 9FC, Alemania) y se separan del tejido conectivo y de la arteria mesentérica. Inmediatamente después se sumergen en N<sub>2</sub> líquido y se conservan a -80°C hasta su procesamiento.

Para la extracción de muestras de las arterias mesentéricas de resistencia, seguimos el protocolo descrito por Briones et al. (103). Tras la decapitación del animal, se extrae el arco mesentérico y lo expandimos sobre una superficie de silicona donde queda sumergido en solución de Krebs a 4°C. Con la ayuda del microscopio, las arterias de resistencia de tercer, cuarto y quinto orden, se separan de su correspondiente vena (componente rígido) y del tejido graso y conectivo que las rodea. Durante la operación de aislamiento se va renovando la solución salina fría cada 10 minutos. Los vasos se sumergen en N<sub>2</sub> líquido y se guardan a -80°C.

Finalmente, las muestras de ganglio nodoso, se separan de la arteria carótida interna y de la vena yugular interna, con la ayuda del microscopio se sumergen en N<sub>2</sub> líquido y se conservan a -80°C hasta su procesamiento.

#### **15.2.1.2 Extracción de proteínas**

- Las muestras de tejido se introducen dentro de los tubos específicos del Fast Prep Lysis Matrix D (contienen unas bolitas de cerámica) y se homogeneizan con 75-250µl (dependiendo de la cantidad de tejido) de tampón de lisis (10 mg deoxicolato sodio / ml RIPA) y 5 µl de solución de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). El tiempo y la intensidad de la homogeneización con el Fast Prep varía según la naturaleza del tejido.
- Durante 15 minutos se realizan ciclos de 10 segundos vortex / hielo (para la rotura de las paredes celulares).
- Las muestras se dejan 60 minutos a -80°C.
- A continuación, la muestra se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C.

- Finalmente, se cuantifica el sobrenadante mediante el ensayo BSA que consiste en la detección colorimétrica a 652 nm (Pierce Biotechnology, IL, USA).

### 15.2.1.3 Electroforesis SDS-PAGE (Método Laemmli)

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE) utilizamos el sistema XCell SureLock™ de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) con geles de 1mm de grosor de un porcentaje de acrilamida del 4% para la zona de concentración y de 12% para la zona de separación o bien, geles uniformes del 10% en función del tamaño de la proteína.

- Las muestras y el peso molecular (SeeBlue® prestained standard 1x) se preparan añadiendo tampón de carga y un agente reductor.
- Seguidamente, las muestras se hierven a 95°C durante 10 minutos.
- Cargamos de 4-20µg (dependiendo del anticuerpo utilizado, ver tabla 1) de proteína total de cada muestra.
- Los geles se corren a voltaje constante de 120V durante aproximadamente dos horas.

reactivo	volumen (µl)
extracto proteína	7,8
NuPage LDS sample buffer 4x	3
NuPage LDS reducing agent	1,2

reactivo	volumen ( $\mu$ l)
peso molecular	3,6
NuPage LDS sample buffer 4x	3
NuPage LDS reducing agent	1,2
H <sub>2</sub> O	4,2

#### 15.2.1.4 Electrotransferencia

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a una membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) utilizando el sistema Western Breeze (Invitrogen).

- En un vaso de precipitados colocamos las esponjas (blotting Pads) en remojo, con el tampón de transferencia, para sacar las burbujas de agua que podrían bloquear la transferencia.
- Se hidratan las membranas (30 segundos en metanol, 4 minutos en H<sub>2</sub>O, 10 minutos en tampón de transferencia).
- Los papeles de filtro se empapan con el tampón de transferencia y se monta el sándwich en el Blot Module (Invitrogen), colocando por orden: 2 esponjas, 1 papel de filtro, el gel, la membrana, 1 papel de filtro y 2 esponjas más, procurando que no quede ninguna burbuja entre ninguna de las capas que forman el sándwich.
- Se llena tanto el interior del módulo (hasta que el sándwich quede cubierto) como el interior de la cubeta con tampón de transferencia.
- La transferencia se realiza durante una hora a temperatura ambiente a una diferencia de potencial de 30V, o durante toda la noche a 4°C a 15V, dependiendo del anticuerpo que vayamos a utilizar (tabla 1).

Una vez finalizada la transferencia, se comprueba la presencia de proteínas, tiñendo la membrana, durante diez minutos, con rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich). Se lava con H<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de colorante.

#### **15.2.1.5 Inmunodetección**

La detección de las proteínas de interés se lleva a cabo mediante la hibridación secuencial de la membrana con un anticuerpo primario (ver tabla 1) para las diferentes proteínas y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano. El control de carga se realiza con la inmunodetección de GAPDH.

- La membrana se bloquea con 5% de leche desnatada en polvo, 1% de BSA, o 5% de fosfobloqueante (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) dependiendo del anticuerpo primario (Tabla 1) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C, siempre en agitación.
- A continuación, se incuba la membrana con la dilución adecuada de anticuerpo primario (ver tabla 1) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, o durante toda la noche a 4°C en agitación.
- Se realizan tres lavados de 10 minutos con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario.
- La membrana se incuba con el anticuerpo secundario, anti IgG, diluido en TBS-T (1/3000 cuando se revela con ECL y 1/50000 cuando se revela con ECL prime), durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
- Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se lava la membrana por triplicado con TBS-T durante 10 minutos.
- Las bandas electroforéticas obtenidas se detectan mediante un sistema

quimioluminescente, ECL Western Blotting Analysis System (Amersham) o ECL prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham). Durante un minuto las membranas se incuban con el tampón de detección que contiene el sustrato de la peroxidasa (500µl tampón A y 500µl tampón B). Con papel de filtro absorbemos el exceso de dicho tampón.

- Las membranas se revelan con película fotográfica, Amersham Hyperfilm ECL (Amersham). El tiempo de exposición de la película sobre la membrana depende del anticuerpo primario utilizado.

Para re-incubar la membrana con diferentes anticuerpos primarios, se sumerge en tampón “stripping” (ThermoScientific) durante 30 minutos a 55°C con agitación. Posteriormente, la membrana se bloquea y se sigue el protocolo de inmunodetección descrita.

Anticuerpo primario (Ac I)	Casa comercial,	Dilución Ac I	transferencia	bloqueo
Th	Ab112	1/600 T *	1h, 30V, Ta	5% leche T
CGRP	CA1135	1/500 T	1h, 30V, Ta	5% leche T
Sema3A	Ab23393	1/1000 T*	ON, 15V, 4°C	5% leche T
proNGF	AL-Ant-005	1/200 TX	1h, 30V, Ta	5% leche T
NGF	Ab6199	1/1000 T	1h, 30V, Ta	5% leche T
p75 <sup>NTR</sup>	Ab38335	1/500 T	1h, 30V, Ta	5% leche T
sort1	Ab16640	1/1000 T *	ON, 15V, 4°C <sup>+</sup>	5% leche T
fosfo-TrkA (Tyr490)	#9141	1/1000 T *	ON, 15V, 4°C	5% leche T
TrkA	sc-118	1/200 T *	ON, 15V, 4°C	5% leche T
fosfo-JNK (Thr183/Tyr185)	#9251	1/1000, 5% fosfobloqueante T	1h, 30V, Ta	5% fosfobloqueante
JNK	#9252	1/1000, 5% BSA T	1h, 30V, Ta	1% BSA T
fosfo-MAPK/ERK (Thr202/Tyr204)	#4370	1/2000, 5% fosfobloqueante T	1h, 30V, Ta	5% fosfobloqueante
MAPK/ERK	#4695	1/1000, 5% BSA T	1h, 30V, Ta	1% BSA T
fosfo-AKT (Ser 473)	#9271	1/1000 5% BSA T	ON, 15V, 4°C	5% fosfobloqueante
AKT	#9272	1/1000 5% BSA T	ON, 15V, 4°C	1% BSA T
Casp-3 partida	#9661	1/1000 5% BSA T	1h, 30V, Ta	5% leche T
Casp-7 partida	#9491	1/1000 5% BSA T	1h, 30V, Ta	5% leche T
ROCK	sc-5561	1/200 en T *	ON, 15V, 4°C	5% leche T
PARP	#9542	1/1000 5% BSA T	1h, 30V, Ta	5% leche T
eNOS	BD610296	1/500 T *	ON, 15V, 4°C	5% leche T
nNOS	BD610309	1/1000 T *	ON, 15V, 4°C	5% leche T
GAPDH	AM4300	1/5000 T	1h, 30V, Ta	5% leche T
β-actina	A5441	1/5000 T	1h, 30V, Ta	5% leche T

**Tabla 1: Tabla de anticuerpos primarios (Ac I) de Western blot:** Los Ac I se incuban toda la noche a 4°C excepto los marcados con (\*) (1h a temperatura ambiente). Los Ac I son de conejo excepto: GAPDH, βactina, eNOS, nNOS (de ratón). La concentración de proteína por muestra es de 10µg para todos los Ac I excepto para Th (4µg), fosfo-TrkA/TrkA (20µg), casp-7 partida (20µg) y PARP (20µg). Todos los geles de acrilamida son al 12% excepto para Sema3A, p75<sup>NTR</sup> y TrkA (al 10%). Revelado con ECL normal excepto Sort1. V: voltaje, T: TTBS 1x, Ta: temperatura ambiente.

Anticuerpo secundario (Ac II)	Casa comercial, código Ac II	Dilución, incubación del Ac II
Anti-rabbit IgG	#7074	1/50000 T si ECL prime, 1/3000 si ECL normal
ECL Anti-Mouse IgG	NA931	1/50000 T, si ECL prime 1/3000 si ECL normal
ECL Anti-Rabbit IgG	NA934	1/50000 T, si ECL prime 1/3000 si ECL normal

**Tabla 2. Tabla de anticuerpos secundarios (Ac II) de Western blot: #, Cell Signaling; NA: GE Healthcare.**

### 15.2.1.6 Análisis

La densitometría de las bandas se cuantifica mediante el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Posteriormente, la intensidad de las bandas se corrige (eliminando el ruido de fondo) y se normaliza (por GAPDH). Finalmente, se comparan las intensidades de las bandas que provienen de diferentes muestras detectadas con un mismo anticuerpo, mediante un test t, utilizando el programa Sigma Stat 3.0.

### 15.2.2 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

#### 15.2.2.1 Extracción y conservación de muestras para la inclusión en bloques de parafina

Tanto la SMA como el SMG de cada animal se extraen tal y como está explicado en el apartado de Western blot. Acto seguido, se fijan con paraformaldehído tamponado al 4% durante 20 horas y se conservan a 4°C con etanol al 50% hasta su inclusión en un bloque de parafina. El primer

paso consiste en una deshidratación, donde el tejido, dentro de un casete, se sumerge en alcoholes crecientes para eliminar el H<sub>2</sub>O. A continuación se sumerge en xilol que llena el espacio que ocupaba el H<sub>2</sub>O en el tejido y finalmente tiene lugar la impregnación con parafina.

<b>solución</b>	<b>tiempo (min)</b>
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

Durante la inclusión, la muestra de SMA se orienta para que la zona de interés, la parte más próxima al origen aórtico, quede lo más cerca posible de la superficie de corte.

Se realizan cortes histológicos de 3 micras de espesor a partir de los bloques de parafina con el microtomo, y se van depositando en sucesivos porta-objetos.

### **15.2.2.2 Extracción y conservación de muestras para la inclusión en bloques de OCT**

Para la extracción de muestras de cerebro, los animales se sacrifican mediante la administración de un exceso de pentobarbital de sodio (50mg/kg de peso corporal) y se perfunden con suero salino fisiológico a 4°C seguido de 4% de paraformaldehído a 4°C. Las muestras de cerebro se extraen y se crioprotegen en 30% de sucrosa en 0.1mol/l de tampón fosfato entre 1 y 3 días a 4°C, después se congelan en metilbutano y se conservan a -80°C. Para proceder al corte de la muestra, se construye un bloque de OCT (Tissue-Tek<sup>®</sup>) alrededor de ésta a -20°C, y mediante un criostato (Leica CM3050S) se realizan secciones sucesivas de 30 micras, a nivel del núcleo supraóptico del cerebro que se encuentra en el hipotálamo (interaural 8.16mm, bregma -0.84mm). Las secciones se van depositando en portaobjetos que se conservarán a -80°C hasta su procesamiento.

En cuanto a las muestras de médula espinal, una vez el animal sacrificado, se extrae un tramo de la columna vertebral (desde la T9 a la T13) conservando las vértebras de alrededor, sin las costillas. Tras sumergir las muestras en 4% de paraformaldehído a 4°C durante 48 horas, se separa y se extrae la médula espinal de las vértebras. Una vez aisladas, se sumergen en 30% de sucrosa en 0.1mol/l de tampón fosfato entre 1 y 3 días a 4°C, se congelan en metilbutano y se conservan a -80°C. De la misma manera que con las muestras de cerebro, se incluyen en un bloque de OCT y se realizan cortes sucesivos transversales de 8 micras que se van depositando en portaobjetos que se conservarán a -80°C hasta su procesamiento.

### 15.2.2.3 Pretratamiento de muestras parafinadas

- Los porta-objetos que contienen las muestras se desparafinan a 60°C durante 60min.
- A continuación se lleva a cabo el proceso de deshidratación, dentro de cubetas, sin agitación y a temperatura ambiente.

<b>solución</b>	<b>tiempo (min)</b>
citrosol	20
etanol 100%	5
etanol 95%	5
etanol 70%	5
H2O d	5

- Los porta-objetos se introducen en tampón citrato, durante 20 minutos a 95°C, después se dejan enfriar dentro del mismo tampón durante 25 minutos.
- Se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1x manteniendo la cubeta en agitación.

### 15.2.2.4 Pretratamiento de muestras congeladas

- Las preparaciones se dejan descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- A continuación, se fijan las muestras con acetona durante 10 minutos.

- Se realiza un lavado rápido seguido de tres lavados de 5 minutos en PBS 1x, en agitación y a temperatura ambiente.

#### **15.2.2.5 Detección por inmunohistoquímica**

Realizamos la técnica de inmunohistoquímica en los paquetes nerviosos de muestras parafinadas de SMA de ratas con hipertensión portal y ratas control.

- Se bloquea la peroxidasa endógena con una solución de  $H_2O_2$  (3% v/v) durante 10 minutos en agitación.
- Se realizan dos lavados de 5 minutos, el primero con  $H_2O$  destilada y el segundo con PBS 1x.
- A continuación, se bloquean las muestras con una solución de suero de cabra y PBS 1x (5% p/v). Se aplican 50 $\mu$ l de solución de bloqueo sobre cada muestra y se dejan incubar dentro de una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Después de escurrir la solución de bloqueo, sin lavar, se aplican 50 $\mu$ l de dilución de anticuerpo primario sobre cada muestra y se deja incubar en una cámara húmeda toda la noche a 4°C. La dilución del anticuerpo primario (1/250 v/v) se realiza con Antibody diluyente (Dako, Glostrup, Dinamarca). En el caso del control negativo, en vez de la solución del anticuerpo primario, las muestras se incuban en PBS 1x.
- Para eliminar el exceso de anticuerpo primario se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1x.
- El anticuerpo secundario Envision anti-rabbit (Dako) se aplica sobre cada muestra y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se lavan las preparaciones por triplicado con PBS 1x durante 5 minutos.
- Para detectar la proteína se utiliza la solución de revelado para la enzima peroxidasa del kit de revelado VIP substrate kit (Vector, Burlingame, CA, USA) que produce un precipitado violeta. Se deja incubar bajo el microscopio hasta que el marcaje aparece, aproximadamente 5 minutos. La reacción de marcaje se para con H<sub>2</sub>O destilada, y finalmente con agua corriente.
- La contra tinción se realiza sumergiendo las preparaciones unos segundos con hematoxilina de Mayer (Sigma, Aldrich). Seguidamente, se elimina el exceso lavando con abundante agua corriente.
- Después de dejar las muestras con H<sub>2</sub>O destilada durante 5 minutos, se deshidratan sumergiéndolas 10 veces en alcoholes crecientes (etanol al 70, 95 y 100% v/v), finalmente se dejan 5 minutos en xilol.
- El montaje se lleva a cabo con una gota de DPX (Fluka) que posteriormente cubrimos con un cubre-objetos.

#### **15.2.2.6 Cuantificación y análisis de inmunohistoquímica**

El análisis de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica se realiza sacando varias fotografías por cada muestra de SMA a un aumento de 200X de los paquetes nerviosos que rodean la SMA utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Hamburgo, Alemania). El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante el programa de análisis de imagen Image Pro Plus (Media Cybernetics, Infaimon, Barcelona, Spain). Cada imagen de color de tipo RGB se convierte en dos imágenes en escala de grises correspondientes a la información contenida en los canales azul y verde. El canal azul se utiliza para definir y seleccionar las regiones de

interés (ROI) correspondientes a los paquetes nerviosos. Para calcular el porcentaje de tinción dentro del ROI se determina un umbral de intensidad en la imagen del canal verde. También se calcula el área ocupada por las estructuras nerviosas. Los parámetros morfológicos relativos a las estructuras nerviosas se comparan con un test de Mann Withney (no paramétrico) utilizando el programa Sigma Stat 3.0. Establecemos la significancia estadística a  $p < 0.05$ .

### **15.2.3 Detección por inmunofluorescencia**

Realizamos la técnica de inmunofluorescencia en muestras de tejido parafinado o congelado para detectar y localizar diferentes marcadores en los paquetes nerviosos de muestras de SMA, en muestras de SMG, de médula espinal y de cerebro de ratas con hipertensión portal y ratas control (ver tabla 3).

- Las muestras se permeabilizan con 0.25% de tritón-100X en PBS 1x 10 minutos en agitación y a temperatura ambiente.
- A continuación, se bloquean las muestras sumergiéndolas en una solución de 1% BSA y PBS-T 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Después de escurrir la solución de bloqueo, sin lavar, se aplican 50 $\mu$ l de dilución de anticuerpo primario sobre cada muestra y se deja incubar en una cámara húmeda a 4°C toda la noche o 48 horas, dependiendo del anticuerpo (ver tabla 3). La dilución del anticuerpo primario se realiza con PBS-T 1x. Para el control negativo, en vez de la solución del anticuerpo primario, las muestras se incuban con PBS-T 1x.

- Para eliminar el exceso de anticuerpo primario se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 1x.
- El anticuerpo secundario (tabla 3), diluido en PBS-T 1x, se aplica sobre cada muestra y se incuba durante 1 o 4 horas dependiendo del anticuerpo a temperatura ambiente.
- Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se lavan las preparaciones por triplicado con PBS 1x, durante 5 minutos.
- Las muestras se dejan secar y se montan con una gota de medio de montaje *Vectashield hard set mounting medium for fluorescence* y un cubre.
- Se dejan secar de 20-30 minutos a temperatura ambiente a oscuras y se miran en el microscopio Olympus BX61 (Olympus, Hamburgo, Alemania).

Anticuerpo primario (Ac I)	Casa comercial, código Ac I	Dilución del Ac I
Th	Abcam, Ab112	1/250
CGRP	Enzo, CA1135	1/200
CGRP	Bioporto, ABS 026-04	1/400
nNos	BD Transduction, 610309	1/200
Sema3A*	Abcam, Ab23393	1/200
Nrp-1	R&D Systems, AF566	1/20
Vacht*	Novus biologicals, NB110-74764	1/200
cFos*	Sta Cruz, sc-52	1/3000
p75 <sup>NTR</sup>	Abcam, Ab38335	1/500
TrkA	Santa Cruz, sc-118	1/200
fosfo-Akt (Ser 473)	Cell Signalling, #9271	1/50
eNOS	BD Transduction, 610296	1/50
sorilina	Abcam, Ab16640	1/200
Anticuerpo primario (AcII)	Casa comercial, código AcII	Dilución del Ac II
anti-rabbit IgG (FITC)	Abcam, ab6717	1/500
anti-mouse (Chromeo546)	Abcam, ab60316	1/500
DyLight 596	Bethyl, A50200D4	1/500

**Tabla 3. Tabla de anticuerpos primarios (Ac I) y anticuerpos secundarios (Ac II) de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia:** Los Ac I se incuban toda la noche a 4°C excepto los marcados con (\*) que se incubaron 48 horas a 4°C en muestras de médula espinal y cerebro.

### 15.2.3.1 Cuantificación y análisis de inmunofluorescencia

Para el análisis cuantitativo de inmunofluorescencia en el SMG, se toman tres imágenes representativas para cada muestra de ganglio, a un aumento de 400X y se mide el contenido de proteína con el software de análisis de Image J. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Para la detección de proteínas realizadas mediante inmunofluorescencia simultánea con diferentes anticuerpos, las imágenes se toman a un aumento de 400x con el microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus, Hamburg, Germany).

### **15.3 REACTIVOS Y TAMPONES**

#### **15.3.1 WESTERN BLOT**

##### **Solución 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

##### **Tampón de lisis para la extracción de proteínas**

10% (p/v) deoxicolato sódico

6% cóctel de Inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) en tampón RIPA (Sigma-Aldrich)

##### **Tampón de electroforesis (espacio exterior)**

1x NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen)

**Tampón de electroforesis (espacio interior)**

200 ml 1x NuPAGE MES SDS Running Buffer

500µl NuPAGE Antioxidante (Invitrogen)

**TBS 10x (1L)**

160 g NaCl

4 g KCl

150 g Tris-HCl

pH 8

**TBS-T 1x (1L)**

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

**Tampón de transferencia (1L)**

50 ml NuPAGE Transfer Buffer 20x (Invitrogen)

1 ml NuPAGE Antioxidante (Invitrogen)

50 ml MeOH

849 ml H<sub>2</sub>O MQ

**15.3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFUORESCENCIA**

**PBS 10x (1L)**

80g NaCl

2.0g KCl

14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7.4

**PBS-T 1x (1L)**

0,1% (p/v) Tween 20 en PBS 1x

**Tampón citrato (1L)**

10mm tri-sodium Citrate

pH 6



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 16 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):141-56.
- (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) Vorobioff J, Bredfedt 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.
- (5) Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994 Nov;20(5):1359-63.
- (6) 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.
- (7) Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kvietys 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.
- (8) Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 2008 Sep;57(9):1300-14.

- (9) 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):1909-15.
- (10) 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.
- (11) 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):1467-73.
- (12) Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992 Jul;103(1):235-9.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.

- (17) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990 Oct 25;347(6295):768-70.
- (18) 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.
- (19) Piascik MT, Soltis EE, Piascik MM, Macmillan LB. Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacol Ther* 1996;72(3):215-41.
- (20) Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Lacroix JS, Pernow J. Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 1990;611:166-74.
- (21) 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):100-1.
- (22) 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):350-8.
- (23) 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):203-13.
- (24) 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):1113-8.
- (25) Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitroergic vasodilation in

superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005 Aug;43(2):258-65.

- (26) 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):490-7.
- (27) 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.
- (28) Martell M, Coll M, Ezkurdia N, Raurell I, Genesca J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol* 2010 Jun 27;2(6):208-20.
- (29) Henriksen JH, Moller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol* 1998 Aug;29(2):328-41.
- (30) Coll M, Rodriguez S, Raurell I, Ezkurdia N, Brull A, Augustin S, et al. Droxidopa, an oral norepinephrine precursor, improves hemodynamic and renal alterations of portal hypertensive rats. *Hepatology* 2012 Nov;56(5):1849-60.
- (31) 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.
- (32) 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):1609-14.

- (33) Liu H, Schuelert N, McDougall JJ, Lee SS. Central neural activation of hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats depends on vagal afferent nerves. *Gut* 2008 Jul;57(7):966-73.
- (34) Song D, Liu H, Sharkey KA, Lee SS. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rats is dependent on central c-fos gene expression. *Hepatology* 2002 Jan;35(1):159-66.
- (35) 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):293-9.
- (36) Rubino A, Burnstock G. Capsaicin-sensitive sensory-motor neurotransmission in the peripheral control of cardiovascular function. *Cardiovascular Research* 1996 Apr;31(4):467-79.
- (37) Maggi CA, Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* 1988;19(1):1-43.
- (38) Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988 Mar;24(3):739-68.
- (39) Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977 Dec 22;270(5639):741-3.
- (40) Jancso G, Kiraly E, Joo F, Such G, Nagy A. Selective Degeneration by Capsaicin of A Subpopulation of Primary Sensory Neurons in the Adult-Rat. *Neuroscience Letters* 1985;59(2):209-14.
- (41) Glebova NO, Ginty DD. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:191-222.

- (42) Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:677-736.
- (43) Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.
- (44) Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004 Feb 26;427(6977):843-8.
- (45) Hempstead BL. The many faces of p75(NTR). *Current Opinion in Neurobiology* 2002 Jun;12(3):260-7.
- (46) Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F. ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 2008 Dec;107(5):1294-303.
- (47) Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *Journal of Cell Biology* 2001 Dec 24;155(7):1275-85.
- (48) Dontchev VD, Letourneau PC. Growth cones integrate signaling from multiple guidance cues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003 Apr;51(4):435-44.
- (49) de Wit J, Verhaagen J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Progress in Neurobiology* 2003 Oct;71(2-3):249-67.
- (50) Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Yagil Z, Lerman O, Behar O. Semaphorin3A regulates axon growth independently of growth cone repulsion via modulation of TrkA signaling. *Cell Signal* 2008 Mar;20(3):467-79.
- (51) Gavazzi I. Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons. *Cell and Tissue Research* 2001 Aug;305(2):275-84.

- (52) Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, Shina R, He Z, Brudo I, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1999 Sep;73(3):961-71.
- (53) Shirvan A, Shina R, Ziv I, Melamed E, Barzilai A. Induction of neuronal apoptosis by Semaphorin3A-derived peptide. *Brain Res Mol Brain Res* 2000 Nov 10;83(1-2):81-93.
- (54) Gallo G. RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. *Journal of Cell Science* 2006 Aug 15;119(16):3413-23.
- (55) Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *Journal of Neurobiology* 2000 Aug;44(2):219-29.
- (56) Naska S, Lin DC, Miller FD, Kaplan DR. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2010 Oct;45(2):108-20.
- (57) Tonges L, Planchamp V, Koch JC, Herdegen T, Bahr M, Lingor P. JNK Isoforms Differentially Regulate Neurite Growth and Regeneration in Dopaminergic Neurons In Vitro. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011 Oct;45(2):284-93.
- (58) Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997 Feb 21;88(4):435-7.
- (59) Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 2003;72:609-42.
- (60) Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004 Jun;68(2):320-+.

- (61) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002 Mar;12(1):9-18.
- (62) Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EBE, Said F, et al. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires jun kinase-dependent phosphorylation of bad. *Journal of Neuroscience* 2003 Dec 10;23(36):11373-81.
- (63) Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005 Nov;37(11):719-27.
- (64) Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000 Nov;1(2):120-9.
- (65) Keef KD, Kreulen DL. Venous mechanoreceptor input to neurones in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *J Physiol* 1986 Aug;377:49-59.
- (66) 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 Nov 5;397(1):145-51.
- (67) Buck SH, Burks TF. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev* 1986 Sep;38(3):179-226.
- (68) Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):143-201.
- (69) Nagy JI, van der KD. Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. *J Neurosci* 1983 Jun;3(6):1145-50.

- (70) Bendtsen F, Schifter S, Henriksen JH. Increased circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cirrhosis. *J Hepatol* 1991 Jan;12(1):118-23.
- (71) Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* 1988 Sep 8;335(6186):164-7.
- (72) 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.
- (73) 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* 2010;30(4):593-602.
- (74) Jang SW, Okada M, Sayeed I, Xiao G, Stein D, Jin P, et al. Gambogic amide, a selective agonist for TrkA receptor that possesses robust neurotrophic activity, prevents neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Oct 9;104(41):16329-34.
- (75) Fujimori A, Saito A, Kimura S, Goto K. Release of Calcitonin Gene-Related Peptide (Cgrp) from Capsaicin-Sensitive Vasodilator Nerves in the Rat Mesenteric-Artery. *Neuroscience Letters* 1990 May 4;112(2-3):173-8.
- (76) Manzini S, Perretti F, Tramontana M, Delbianco E, Santicioli P, Maggi CA, et al. Neurochemical Evidence of Calcitonin Gene-Related Peptide-Like Immunoreactivity (Cgrp-Li) Release from Capsaicin-Sensitive Nerves in Rat Mesenteric-Arteries and Veins. *General Pharmacology* 1991;22(2):275-8.

- (77) Nangle MR, Keast JR. Semaphorin 3A inhibits growth of adult sympathetic and parasympathetic neurones via distinct cyclic nucleotide signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* 2011 Mar;162(5):1083-95.
- (78) Tang XQ, Tanelian DL, Smith GM. Semaphorin3A inhibits nerve growth factor-induced sprouting of nociceptive afferents in adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 2004 Jan 28;24(4):819-27.
- (79) 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.
- (80) Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007 Oct;46(4):1208-17.
- (81) Long JB, Jay SM, Segal SS, Madri JA. VEGF-A and Semaphorin3A: Modulators of vascular sympathetic innervation. *Developmental Biology* 2009 Oct 1;334(1):119-32.
- (82) Larrivee B, Freitas C, Suchting S, Brunet I, Eichmann A. Guidance of Vascular Development Lessons From the Nervous System. *Circulation Research* 2009 Feb 27;104(4):428-41.
- (83) Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk - A 2-Receptor System. *Trends in Neurosciences* 1995 Jul;18(7):321-6.
- (84) Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 2003 Apr;4(4):299-309.

- (85) Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001 Nov 30;294(5548):1945-8.
- (86) Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O, et al. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* 2009 Jul 3;284(27):18424-33.
- (87) Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Miller FD, Kaplan DR. Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: A mechanism for growth cone collapse. *Journal of Neuroscience* 2003 Aug 20;23(20):7602-9.
- (88) Holtmaat AJGD, Gorter JA, de Wit J, Tolner EA, Spijker S, Giger RJ, et al. Transient downregulation of *Sema3A* mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy - A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Experimental Neurology* 2003 Jul;182(1):142-50.
- (89) Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Theaudin M, Petermann F, et al. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 2007 Oct;130:2554-65.
- (90) Hashimoto M, Ino H, Koda M, Murakami M, Yoshinaga K, Yamazaki M, et al. Regulation of semaphorin 3A expression in neurons of the rat spinal cord and cerebral cortex after transection injury. *Acta Neuropathologica* 2004 Mar;107(3):250-6.
- (91) Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Cremel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* 2009 Feb;66(4):649-66.
- (92) Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arevalo JC, Lee R, Hempstead B, et al. Pro-NGF isolated from the human brain affected by

- Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75<sup>NTR</sup>. *American Journal of Pathology* 2005 Feb;166(2):533-43.
- (93) Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: To cleave or not to cleave. *Neuron* 2002 Jan 3;33(1):9-12.
- (94) Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neuroscience* 2002 Nov;5(11):1131-6.
- (95) Bai YJ, Dergham P, Nedev H, Xu J, Galan A, Rivera JC, et al. Chronic and Acute Models of Retinal Neurodegeneration TrkA Activity Are Neuroprotective whereas p75(NTR) Activity Is Neurotoxic through a Paracrine Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2010 Dec;285(50):39392-400.
- (96) Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 2000 Jun;10(3):381-91.
- (97) Lievreumont JP, Sciorati C, Morandi E, Paolucci C, Bunone G, Della Valle G, et al. The p75(NTR)-induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 1999 May 28;274(22):15466-72.
- (98) Satoh MS, Lindahl T. Role of Poly(Adp-Ribose) Formation in Dna-Repair. *Nature* 1992 Mar 26;356(6367):356-8.
- (99) Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis - Lesson from an uncleavable mutant. *Journal of Biological Chemistry* 1998 Dec 11;273(50):33533-9.
- (100) Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC

phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* 2001 Apr;3(4):346-52.

- (101) Deinhardt K, Kim T, Spellman DS, Mains RE, Eipper BA, Neubert TA, et al. Neuronal Growth Cone Retraction Relies on Proneurotrophin Receptor Signaling Through Rac. *Science Signaling* 2011 Dec 6;4(202).
- (102) Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007;46:242-53.
- (103) 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):679-91.

