

---

**MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ  
DEL TO VASCULAR HEPÀTIC EN LA CIRROSI:  
PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU I  
BIODISPONIBILITAT D'ÒXID NÍTRIC.**

---



---

Tesi presentada per **Bàrbara Laviña Siemsen**

---

Directors: **Joan Carles García Pagán i Jaume Bosch i Genover**

---







Tesi Doctoral  
UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Facultat de Medicina

# **MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DEL TO VASCULAR HEPÀTIC EN LA CIRROSI: PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU I BIODISPONIBILITAT D'ÒXID NÍTRIC.**

**Tesi presentada per  
Bàrbara Laviña Siemsen  
Per optar al grau de  
Doctor per la Universitat de Barcelona**

Directors: Joan Carles García Pagán / Jaume Bosch i Genover

Tesi realitzada a la Unitat d'Hemodinàmica Hepàtica  
Servei d'Hepatologia, Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS  
Barcelona, Febrer 2009.



# Índex

<b>Informe dels directors de tesi</b>	p.4
<b>Agraïments</b>	p.6
<b>Abreviacions</b>	p.11
<b>1. Introducció</b>	p.13
1.1. Bases fisiopatològiques de la hipertensió portal	p.14
1.1.1. Resistència vascular intrahepàtica	
1.1.2. Component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica	
1.1.3. El flux portal	
1.1.4. Circulació hiperdinàmica	
1.2 Estrès oxidatiu i funció vascular	p.18
1.3 Estrès oxidatiu i malalties hepàtiques	p.20
<b>2. Justificació i objectius</b>	p.23
2.1. Article 1: Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduce nitric oxide bioavailability.	
2.2. Article 2: Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl <sub>4</sub> cirrhotic rat livers with portal hypertension.	
<b>3. Còpies dels articles originals</b>	
3.1. Article 1	p.28
3.2. Article 2	p.39
<b>4. Resum de resultats</b>	
4.1. Article 1	p.50
4.2. Article 2	p.51
<b>5. Discussió</b>	p.53
<b>6. Conclusions</b>	p.59
<b>7. Altres publicacions</b>	p.61
<b>8. Referències bibliogràfiques</b>	p.63



# Informe dels directors de tesi



Barcelona, a 21 de gener de 2009.

Joan Carles García Pagán, Consultor Sènior del Servei d'Hepatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, i Jaume Bosch i Genover, catedràtic de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i Consultor Sènior del Servei d'Hepatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona,

**CERTIFIQUEN:**

Que la tesi doctoral **MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DEL TO VASCULAR HEPÀTIC EN LA CIRROSI: PAPER DE L'ESTRÈS OXIDATIU I BIODIS-PONIBILITAT D'ÒXID NÍTRIC**, presentada per Bàrbara Laviña Siemsen per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la nostra direcció i compleix tots els requisits necessaris per a ser defensada davant el Tribunal d'avaluació corresponent.

**Joan Carles García Pagán**

**Jaume Bosch i Genover**

# Agraiments

Abans de començar amb els agraïments, m'agradaria fer una mica de memòria històrica recordant Dolors Aleu i Riera, la primera dona que va aconseguir, a l'estat espanyol, el títol de doctora en Medicina (1882). Sort de dones com ella que van ser pioneres i que ens han permès ser on som!

Ara sí, durant aquests últims quatre anys i mig - que m'han passat volant - m'han passat un munt de coses: experiències, vivències, aprenentatges, disgustos, alegries...Tot això sempre acompanyada per molta gent, moltes persones que han estat i són presents a la meva vida i cadascú, a la seva manera, ha fet possible que avui pugui acabar aquesta etapa, que ha estat molt intensa. Moltes gràcies a tots i totes!!!

En aquests moments m'agradaria tenir el dot de l'escriptura per poder expressar amb paraules els agraïments envers tota la gent que m'ha ajudat en la meva incipient carrera científica.

En primer lloc, agrair de tot cor a Jaume Bosch l'oportunitat de formar part de la gran família hemodinàmica! Gràcies per tot el suport professional i personal, i pels bons moments compartits, per transmetre sempre un esperit crític i per motivar-me en tot moment.

A Joan Carles per confiar en mi i deixar-me formar part del teu grup. Per dirigir-me dia a dia, per totes les hores compartides al despatx, per les xerrades científiques i no científiques sempre estimulants, per animar-me i ensenyar-me a seguir endavant, també en els moments difícils. Per les teves palmadetes a l'esquena, per les picades de mans quan alguna cosa no anava pel bon camí, per la teva paciència. La veritat és que has deixat el llistó molt, però que molt alt!!!

A l'Aina....Uf!...Em falten paraules...Hem compartit tantes coses! Per ser la meva amiga, per escoltar-me, per entendre'm, pels consells, per les alegries i els moments difícils, per compartir part de la teva polifacètica vida amb mi, per haver estat al meu costat dia a dia al laboratori enfrontant-nos a reptes científics i personals... Serà difícil no tenir-te tan a prop...

Als qui ja estàvem al laboratori quan vaig entrar i em van acollir amb el braç obert, ensenyant-me a treballar amb les ratetes. Pels bons (i no tant bons) moments compartits dins i fora del laboratori: Jordi, Hèctor, Marc i Vali.

Als que us heu anat afegint a l'equip, amb els quals també hem compartit moltes coses, fent que el dia a dia al laboratori fos més divertit: Marcos, Montse, Marta, Ester, Eugenio, Lucia i Javi. Ànims amb les tesis i amb els projectes científics i personals!

A tots els companys clínics residents, becaris, infermeres, secretàries, etc... de l'hemodinàmica hepàtica, amb els quals també he compartit aquesta etapa de la meva vida. Per ensenyar-me una mica de medicina, per les bones estones compartides: congressos, sopars, calçotades....

A Juan i Mercedes, els altres investigadors principals, gràcies pel vostre suport, els vostres suggeriments i consells científics que han millorat la meua feina i l'ajuda que m'ha permès desenvolupar-me al llarg dels anys de doctorat.

Al personal de l'estabulari i dels serveis científico-tècnics de la facultat de Medicina, per totes les hores de confocal i per la seva gran ajuda per aprendre i posar a punt noves tècniques.

Als companys de l'IDIBAPs i de la Fundació; als veïns de l'edifici i de planta, Malàrics i Gastros, pels moments compartits a la sala de cultius, per les hores compartides, per l'ajuda i l'amabilitat!

A Rosa Gasa i Lúdia, per l'amabilitat, la seva ajuda amb els adenovirus, per trobar sempre el moment per respondre les meves preguntes!

A les meves nenes de la universitat: Alba, Ari, Cristina, Eulàlia. Ja fa 10 anys que fem el camí ple-gades! D'aquí poquet totes doctores! Qui ho havia de dir! Per tots el soparets, per les nostres hores de teràpia, per estar sempre al meu costat, perquè sense vosaltres no crec que hagués arribat fins aquí! Molta sort en els vostres projectes futurs!!!!

A la resta de la colla de la uni: David, Clara, Joan, Sergio, Alberto.... Pels bons moments compartits durant els últims 10 anys! Molta sort!

A Vero, per la seva paciència, per escoltar-me sempre, pels seus bons consells, pels cafès compartits al claustre de la facultat, per creure sempre que existeix una alternativa i per treballar, quasi sempre, a contracorrent!

A la Marga, per les seves agulles, boletes i altres invents que m'han ajudat a mantenir a ratlla els efectes del meu contacte amb les ratetes.

A la meua gent, amb qui he compatit i espero seguir compartint, tants bons moments com fins ara. Per formar part del meu dia a dia, pels projectes, per les festes, les birres, pels comitès de crisis, per les vacances i sortides, per estar sempre preguntant com anaven els experiments tot i no entendre'n gaire, perquè me'ls estimo mooolt! Laia, Anna Domingo, Manuela, Eulàlia, Anna Puig, Alicia, Isa, (i Lluna)...I Didier, Roc, Genís (gràcies per la portada i la maquetació!), Jordi, Hèctor, Xavi, Àlex, Bernat, Carola, Maria, Daniel, Bru... I Ernesto, Natàlia, Estany, Gema, Susana, Ainara, i els Maleantes (Víctor, Milena, Maria)...I molta més gent amb qui comparteixo estonetes de la meua vida (la llista seria massa llarga!).√Ahhh i gràcies Irene per les teves correccions!

A tota la family, family, a l'Enric i a la resta de tiets i tietes...;-) !!!!!

A Rodrigo y su música...

A Opa y Bettina.

A Javier por apoyarme en todo.

Y, muy, muy, muy especialmente, a Ortrud...



# Abreviaciones

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AdecSOD</b>	Adenovirus ecSOD
<b>Ad<math>\beta</math>gal</b>	Adenovirus $\beta$ -galactosidasa
<b>BAEC</b>	Cèl.lules endotelials d'aorta bovina
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calci
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetraclorur de carboni
<b>CES</b>	Cèl.lula endotelial sinusoïdal
<b>CHE</b>	Cèl.lules hepàtiques estrellades
<b>COX-1</b>	Ciclooxygenasa 1
<b>CuZnSOD</b>	Coure-zinc-SOD
<b>DDC</b>	Dietilditiocarbamat
<b>DHE</b>	Dihidroetidi
<b>ecSOD</b>	Superòxid dismutasa extracel.lular
<b>eNOS</b>	Sintasa de l'òxid nítric endotelial
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>cGMP</b>	Monofosfat de la guanosina cíclic
<b>GSH</b>	Glutatió
<b>i.v</b>	Intravenós
<b>iNOS</b>	Sintasa de l'òxid nítric induïble
<b>MnSOD</b>	Manganès-SOD
<b>Mtx</b>	Metoxamina
<b>NADPH</b>	Fosfat del dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
<b>nNOS</b>	Sintasa de l'òxid nítric neuronal
<b>NOS</b>	Sintasa de l'òxid nítric
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superòxid
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrit
<b>ON</b>	Òxid nítric
<b>PAM</b>	Pressió arterial mitjana
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>XO</b>	Xantina oxidasa

# Introducció



La hipertensió portal és una síndrome clínica que representa la principal complicació de la cirrosi hepàtica i es caracteritza per un increment patològic de la pressió hidrostàtica del sistema venós portal per sobre del seu valor normal d'1-5 mmHg. Aquest increment origina la formació d'una extensa xarxa de venes col·laterals portosistèmiques que deriven part del flux sanguini portal cap a la circulació sistèmica, evitant que circuli pel fetge. Bona part de les complicacions derivades de la cirrosi hepàtica, com l'hemorràgia digestiva causada pel trencament de varices esofàgiques, l'encefalopatia hepàtica, l'ascites o la insuficiència renal, estan directament relacionades amb la presència d'hipertensió portal clínicament significativa, definida per un gradient de pressió portal mínim de 10 mmHg. A causa de la gravetat d'aquestes complicacions, la hipertensió portal representa la primera causa de morbimortalitat en malalts cirròtics (1).

### 1.1. Bases fisiopatològiques de la hipertensió portal

La pressió portal ve determinada per la interrelació entre el flux sanguini portal i la resistència que s'oposa a aquest flux. La Llei d'Ohm defineix el gradient de pressió entre dos punts en un vas sanguini segons la següent equació:

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

On  $\Delta P$  és el gradient de pressió portal o pressió de perfusió hepàtica (la diferència entre la pressió de la vena porta i la pressió de la vena cava inferior),  $Q$ , el flux sanguini de tot el sistema venós portal (que en la patologia inclou el flux de la vena porta i el flux corresponent a les venes col·laterals portosistèmiques) i  $R$ , la resistència vascular exercida pel sistema venós portal, per les venes col·laterals i pel mateix fetge (2).

El desenvolupament de la hipertensió portal en la cirrosi hepàtica és seqüencial. L'augment de la resistència vascular intrahepàtica és el mecanisme inicial de la hipertensió portal en la cirrosi i posteriorment, l'augment del flux sanguini portal contribuirà al manteniment i empitjorament d'aquesta.

#### 1.1.1. Resistència vascular intrahepàtica

L'augment de la resistència vascular intrahepàtica constitueix el fenomen fisiopatològic primari de la hipertensió portal, i en la cirrosi hepàtica aquest augment té lloc, principalment, en el sinusoides hepàtic (hipertensió portal sinusoidal). Aquesta situació és variable en funció de l'etiologia i de la fase de la malaltia (3;4).

Inicialment s'havia considerat que l'elevada resistència vascular intrahepàtica era conseqüència, únicament, de la distorsió de l'arquitectura vascular del fetge cirròtic causada per la malaltia (nòduls de regeneració, fibrosi, trombosi intravascular...) i, fins a l'actualitat, s'havia postulat que aquest component era fixe, irreversible i no modificable mitjançant fàrmacs. No obstant, recentment s'ha avançat en el coneixement de la fibrogènesi hepàtica, suggerint que el procés és potencialment reversible (5-7). A més, es coneix que existeix un component funcional dinàmic i reversible de l'augment de resistència vascular intrahepàtica, que podria arribar a representar fins el 40% de la resistència vascular intrahepàtica total (8). Aquest fet es va evidenciar mitjançant la utilització d'agents farmacològics que modulen l'augment de resistència vascular intrahepàtica (9;10).

### 1.1.2. Component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica

Amb l'objectiu de caracteritzar el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica, s'han estudiat quins són els elements contràctils intrahepàtics, i si, en la cirrosi, existeixen anormalitats en la regulació dels mecanismes de contracció cel·lular. Fins a l'actualitat s'han descrit diversos tipus de cèl·lules hepàtiques amb capacitat contràctil com els miofibroblasts portals, septals i de les vènules portals (11), però majoritàriament s'ha postulat que les principals cèl·lules involucrades en la regulació del to vascular hepàtic són les cèl·lules hepàtiques estrellades (CHE) (12).

#### *a) Cèl·lules hepàtiques estrellades i regulació de la resistència vascular intrahepàtica*

Les CHE, també conegudes com a cèl·lules d'Ito, representen aproximadament el 5% del total de cèl·lules hepàtiques i són el principal magatzem de vitamina A de l'organisme. Es troben localitzades a l'espai de Disse (espai virtual entre els sinusoids i els hepatòcits) i presenten extensions citoplasmàtiques que rodegen els sinusoides, característica que els permet regular el flux sinusoidal per contracció. En situacions de dany hepatocel·lular, les CHE sofreixen un canvi ràpid, tant a nivell morfològic com funcional, que comporta la seva "activació", donant lloc a cèl·lules amb un fenotip tipus miofibroblast. Aquestes cèl·lules activades en cultiu tenen: 1) un augment en la seva proliferació en resposta a agonistes com l'angiotensina II (13); 2) un gran augment de l'expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular; 3) expressió de metal·loproteïnases; 4) expressió de molècules d'adhesió cel·lular i secreció de citoquines proinflamatòries, així com l'adquisició característiques de cèl·lules presentadores d'antígens (14); i 5) expressió de novo de proteïnes del citoesquelet, de receptors per a substàncies vasoactives i de canals de membrana (15;16). Quan el dany hepàtic es converteix en crònic, les CHE es perpetuen en l'estat activat (12;17-19).

#### *b) Substàncies vasoactives i regulació de la resistència vascular intrahepàtica*

S'han descrit un ampli ventall de molècules amb capacitat vasomotora com a moduladores de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi (20-26). Aquestes substàncies poden procedir de la circulació sistèmica (com l'angiotensina II o la vasopressina), poden originar-se a l'endoteli i actuar de forma paracrina (com l'òxid nítric (ON), la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) o l'endotelina) o tenir un origen neuronal (norepinefrina).

El to vascular en condicions normals és el resultat d'un delicat balanç entre diversos mediadors vasoactius. En la circulació hepàtica en la cirrosi existeix un marcat desequilibri en la producció i concentració d'aquests mediadors vasoactius: els nivells de vasoconstrictors es troben elevats (com l'endotelina o el prostanoid derivat de la ciclooxigenasa 1 (COX-1): tromboxà A<sub>2</sub>) i els nivells de vasodilatadors estan reduïts (principalment l'ON) (27-30). A més, s'ha demostrat que els fetges cirròtics presenten una hiperresposta als estímuls vasoconstrictors i una hiporesposta als vasodilatadors (20;24-26;31;32), inclinant encara més la balança a favor de la contracció, actuant sobre elements contràctils, com el sinusoides hepàtic i, en conseqüència, sobre la resistència vascular intrahepàtica.

## *Òxid nítric (ON)*

Aquest gas, fonamental en diversos processos biològics, participa en processos de senyalització intra i intercel·lulars i ha estat definit com el vasodilatador més important d'origen endotelial. En el camp de la hipertensió portal s'han publicat nombrosos estudis avaluant el paper de l'ON sobre la regulació del to vascular hepàtic i la forma de modular-lo.

L'ON és sintetitzat com a subproducte de la formació de L-citrul·lina per part de tres isoformes de l'enzim sintasa d'ON (NOS), la NOS neuronal (nNOS), la forma induïble (iNOS) i l'endotelial (eNOS) (33). L'eNOS és responsable de la producció hepàtica fisiològica d'ON per part de les cèl·lules endotelials sinusoïdals (CES) en resposta a diversos estímuls com l'estrès de fregament (shear stress) i la presència de vasoconstrictors (34;35). El mecanisme d'acció de l'ON és paracrí, promovent l'activació de la guanilat ciclase soluble que estimula la formació de monofosfat cíclic de guanosina cíclic (cGMP) (36). La diana més important del cGMP és una proteïna cinasa cGMP-dependent (PKG) que fosforila nombroses proteïnes involucrades en la regulació de la homeostasi del calci ( $Ca^{2+}$ ), entre les quals trobem el receptor inositol 1,4,5-trifosfat. Aquesta fosforilació comporta una disminució de la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular que produirà la relaxació de les CHE i vasodilatació (37).

En el fetge normal, el paper de l'ON és de compensació enfront estímuls vasoconstrictors i, per tant, la seva biodisponibilitat és suficient i efectiva (38). Per altra banda, la disfunció endotelial, caracteritzada per la incapacitat de l'endoteli per a respondre a estímuls vasodilatadors i per una resposta augmentada a estímuls vasoconstrictors, es considera un dels principals mecanismes involucrats en l'augment del to vascular que s'observa en diverses patologies vasculars, entre les quals podem trobar la cirrosi. En aquestes situacions, la disfunció endotelial s'ha atribuït, entre altres factors, a una disminució en la biodisponibilitat d'ON. S'ha demostrat que en el fetge cirròtic, la biodisponibilitat d'ON es troba disminuïda (39), la qual cosa es considera un factor fonamental promovent l'augment de resistència vascular intrahepàtica.

Cal destacar que aquesta menor biodisponibilitat d'ON es produeix, malgrat que en els fetges cirròtics, l'enzim principal encarregat de la síntesi d'ON, l'eNOS, es troba en quantitats equivalents a la dels fetges normals (40). Actualment existeixen diverses hipòtesis que expliquen la disminució en l'activitat de l'enzim eNOS. En primer lloc, l'existència de diferents desregulacions posttraduccional que condueixen a un estat de baixa biodisponibilitat d'ON intrahepàtica (29;41-43), entre les quals trobem l'augment de la interacció de la eNOS amb proteïnes inhibidores, com la caveolina (41;44), la NOSIP (42) o la NOSTRIN (45), la disminució de fosforilació de l'eNOS per part de la via fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) / serin-treonin-cinasa Akt (43) i el desacoblament de l'eNOS a causa de la deficiència d'alguns dels seus cofactors, com la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) (46;47).

El dèficit d'ON en els fetges cirròtics ha proporcionat la base racional per al tractament de la hipertensió portal amb donants d'ON, en primer lloc no selectius (48) i més recentment fetge-selectius (49;50), per tal d'evitar els efectes hemodinàmics sistèmics no desitjats, manifestats per una marcada vasodilatació sistèmica i esplàncnica (51;52). Diversos estudis, a través d'estratègies experimentals ben diferents, han aconseguit incrementar la producció hepàtica d'ON reduint així la

resistència vascular intrahepàtica i la pressió portal de rates amb cirrosi sense modificar la pressió arterial. Entre aquestes estratègies trobem la transferència gènica del fetge amb adenovirus que contenen la nNOS o l'eNOS (53;54) o l'Akt constitutivament activa (40); l'administració de donants selectius d'ON, com el NCX-1000 (49); i, més recentment, augmentant la síntesi d'ON mitjançant el tractament amb estatines (55;56) o amb el cofactor de l'eNOS, la BH<sub>4</sub> (46;47).

### 1.1.3. El flux portal

El segon factor que contribueix a l'existència d'hipertensió portal és l'augment del flux del sistema portal. Aquest fet és secundari a una marcada vasodilatació esplàncnica causada per un alliberament exagerat de mediadors vasodilatadors endògens i circulants i a una hiporesposta als agents vasoconstrictors (57).

S'han descrit diverses substàncies com el glucagó (58;59), la PGI<sub>2</sub> (60;61), o el monòxid de carboni (62) com a possibles causes de la marcada vasodilatació esplàncnica en la cirrosi, però el mediador més important sembla ser l'ON. S'ha investigat el possible paper de l'ON regulant el to vascular esplànctic i els seus mecanismes d'acció. Pacients amb cirrosi i models experimentals d'animals amb hipertensió portal mostren nivells plasmàtic d'ON elevats, els quals són més elevats a la zona portal, suggerint una producció mesentèrica. A més, la producció esplàncnica d'ON en rates cirròtiques és superior a la de les controls, i la inhibició de la seva síntesi redueix el flux de l'artèria mesentèrica superior, el grau de col·lateralització i prevé parcialment el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica típica de la hipertensió portal (52;63-66).

Diferents estudis han hipotetitzat sobre l'origen i els mecanismes moleculars responsables dels nivells sistèmics i esplàncnics elevats d'ON en la cirrosi i s'ha demostrat que l'eNOS és la veritable responsable mitjançant un augment en la seva activitat enzimàtica (67;68).

Els mecanismes que explicarien la sobreactivació de l'eNOS en el territori esplànctic són diversos i, possiblement, encara no els coneixem tots. L'augment de l'estrès per fregament present en el territori esplànctic cirròtic, juntament amb nivells elevats de diferents factors humorals, proteïnes estabilitzadores i citosines proinflamàtores, podrien ser alguns d'aquests mecanismes (65;69-72).

L'ON té un paper antagònic en la cirrosi. En la circulació intrahepàtica existeix un dèficit en la seva producció que provoca una alteració marcada del to vascular. En canvi, en la circulació esplàncnica i sistèmica, la producció d'ON es troba augmentada, la qual cosa condueix a una forta vasodilatació arterial i a una hiporesposta a vasoconstrictors (37). Així, ambdues situacions contribueixen a mantenir i a empitjorar la síndrome d'hipertensió portal. Aquesta dualitat d'efectes negatius ha comportat la ineficàcia dels tractaments amb donants d'ON no fetge-selectius, ja que redueixen la resistència vascular intrahepàtica i la pressió portal, però alhora augmenten la vasodilatació perifèrica, la qual s'acompanya d'una disminució de la pressió arterial sistèmica (73).

#### 1.1.4. Circulació hiperdinàmica

Els pacients en fases avançades de cirrosi presenten circulació hiperdinàmica. Aquesta es caracteritza per una vasodilatació generalitzada acompanyada d'un descens en la pressió arterial i en la resistència vascular perifèrica juntament amb un augment en la despesa cardíaca i el volum plasmàtic (74).

Aquests canvis hemodinàmics a nivell sistèmic són derivats de l'exagerada vasodilatació esplàncnica típica de la cirrosi, que, en ser tan accentuada, explica, en gran part, la caiguda de la resistència vascular sistèmica. D'altra banda, es creu que part dels vasodilatadors esplàncnics passarien a la circulació general (ja sigui per no haver estat degradats hepàticament o per haver evitat el fetge al circular per venes col·laterals portosistèmiques) i que l'augment d'estrès de fregament (shear stress) que això comporta, activaria la producció d'ON i monòxid de carboni. Tots aquests factors donarien lloc a una vasodilatació arterial generalitzada, seguida d'una hipovolèmia relativa de la circulació arterial. En aquest punt l'organisme activa una sèrie de sistemes reguladors, com el sistema renina-angiotensina, el sistema nerviós o la secreció de vasopressina, que porten a la retenció d'aigua i sodi per part del ronyó, augmentant així el volum plasmàtic per intentar mantenir la pressió arterial perifèrica (51;74-76).

Com a conseqüència d'aquesta adaptació, l'alteració de la funció renal més precoç i comuna dels pacients amb hipertensió portal és un augment en la retenció de sodi. A més, diverses complicacions en altres òrgans s'han relacionat amb la síndrome de la circulació hiperdinàmica, com la síndrome hepatopulmonar, la progressió d'encefalopatia hepàtica, la síndrome d'isquèmia i formació d'estrès oxidatiu en diferents teixits, etc... (77;78). Diversos autors han relacionat la severitat de la circulació hiperdinàmica amb la prognosi i supervivència dels pacients amb hipertensió portal (79).

#### 1.2. Estrès oxidatiu i funció vascular

Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) són ions o petites molècules orgàniques i inorgàniques que presenten alta reactivitat i són generades com un subproducte del metabolisme normal de l'oxigen. Les ROS, inclouen radicals lliures (espècies amb un o més electrons desaparellats) com l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) o l'hidroxil (OH $\cdot$ ), i espècies no radicals com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), entre altres. Les ROS modulen processos fisiològics com la proliferació o la mort cel·lular (80-82). Un excés en la producció de ROS pot derivar de múltiples tipus cel·lulars, entre les quals trobem cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises vasculares, cèl·lules inflamatòries i macròfags (83;84). Nombrosos sistemes enzimàtics d'aquestes cèl·lules tenen el potencial per generar ROS. Entre els més importants cal destacar la xantina oxidasa (XO) (85), la COX (86), el citocrom P450, i els sistemes enzimàtics mitocondrials com la fosfat del dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït (NADPH) oxidasa (87;88).

L'exposició a radicals lliures de diverses fonts ha portat als organismes a desenvolupar una sèrie de mecanismes de defensa. Els mecanismes de defensa enfront les ROS inclouen: 1) mecanismes preventius; 2) mecanismes de reparació; 3) defenses físiques; i 4) defenses antioxidants (89;90).

Existeixen diversos mecanismes antioxidants que es classifiquen en: 1) no enzimàtics, com l'àcid ascòrbic (vitamina C), l' $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el glutatió (GSH), els carotenoids i els flavonoids; i 2) enzimàtics, com la catalasa (CAT), la glutatió peroxidasa i la superòxid dismutasa (SOD) (91).

La SOD és el principal enzim encarregat de metabolitzar l' $O_2^-$  i transformar-lo en  $H_2O_2$ . Existeixen 3 isoformes de la SOD: la coure-zinc-SOD (CuZnSOD) localitzada principalment al citosol, la manganes-SOD (MnSOD) a la mitocòndria i l'extracel·lular SOD (ecSOD) a l'espai extracel·lular (92-94).

En situacions normals existeix un equilibri entre la generació de ROS i l'acció dels sistemes antioxidants encarregats de disminuir-ne els nivells, mantenint un balanç en l'estat redox de les cèl·lules (91;95).

Quan existeix una pertorbació d'aquest equilibri a causa d'un augment en la producció de ROS i/o d'una disminució dels sistemes antioxidants, es produeix l'estrès oxidatiu. Així doncs, la funció de les ROS serà beneficiosa o perjudicial segons la quantitat de ROS generades, la seva reacció amb altres radicals, enzims o estructures cel·lulars, i el territori on es produeixin aquestes reaccions (96).

El potencial de les ROS d'unir-se a proteïnes, trencar DNA i promoure dany al reaccionar amb diversos components cel·lulars, s'ha involucrat en el desenvolupament de necrosi, inflamació i apoptosi en diversos trastorns i malalties (81;97;98). A més a més, l'estrès oxidatiu ha estat implicat en l'augment del to vascular observat, entre d'altres, en la hipertensió (99;100), l'arteriosclerosi (101) i la diabetis (102). En aquests trastorns, el factor principal que promou l'augment de to vascular és una disminució de la biodisponibilitat d'ON endotelial (103). S'ha demostrat que un augment del segrest de l'ON per part de l' $O_2^-$ , contribueix a reduir la biodisponibilitat d'ON. De fet, es coneix que l'ON és capaç de reaccionar amb l' $O_2^-$  donant lloc a la formació de peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) (104) amb la consegüent reducció de la biodisponibilitat d'ON (105). Un dels marcadors moleculars que es produeixen per la reacció de l' $ONOO^-$  amb biomolècules, és la nitració dels residus tirosina de les proteïnes donant lloc, a la formació de la 3-nitrotirosina (106). Aquesta modificació posttraduccional pot alterar la funció de les proteïnes, causar dany oxidatiu a les cèl·lules i, en els últims anys, s'ha associat a diverses malalties (107-112).

Les ROS també poden afectar la biodisponibilitat d'ON per la seva capacitat d'oxidar i, per tant, d'inactivar la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), un cofactor de la NOS (113). La  $BH_4$  juga un paper en la transferència d'electrons del grup prostètic hemo de la NOS a la L-arginina. En absència de  $BH_4$  activa, la NOS és incapaç de transferir electrons a la L-arginina i utilitza oxigen com a substrat donant lloc a la formació d' $O_2^-$  en lloc d'ON, situació que s'ha anomenat desacoblament de l'eNOS (114-116). El desacoblament de l'eNOS s'ha descrit en diverses condicions fisiopatològiques entre les quals s'inclouen la diabetis (102), la hipercolesterolèmia (117) i la hipertensió (113).

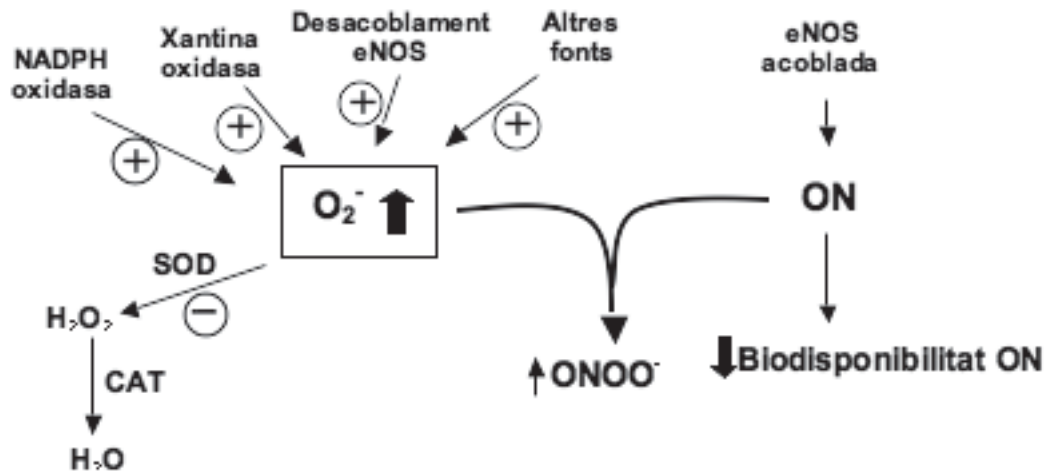


Figura 1: Representació esquemàtica de possibles mecanismes involucrats en l'augment de la producció de superòxid  $O_2^-$  i els seus efectes reduint la biodisponibilitat d'òxid nítric (ON) mitjançant el seu segrest. Adaptat de Rodriguez-Vilarrupla A et al. J Hepatol 2007.

### 1.3. Estrès oxidatiu i malalties hepàtiques

S'ha suggerit que un augment d'estrès oxidatiu podria jugar un paper fisiopatològic en la progressió de diverses malalties hepàtiques (118-120), entre les quals trobem l'hepatitis C crònica (121), l'esteatohepatitis no alcohòlica (122), la malaltia alcohòlica hepàtica (123;124), la fibrosi hepàtica (125;126) i la isquèmia/reperfusió (127;128). Moltes d'aquestes evidències deriven de dues observacions: augments plasmàtics i tissulars de marcadors d'estrès oxidatiu (malondialdehid, 4-hiroxinnonenal,  $ONOO^-$ ,  $F_2-$  isoprostans...) i nivells hepàtics i plasmàtics baixos de diversos antioxidants (GSH, SOD, CAT, vitamina A, E i C).

Recentment, el nostre grup ha descrit que el complex enzimàtic generador de radicals  $O_2^-$ , la NADPH oxidasa, no seria responsable de l'augment hepàtic d'estrès oxidatiu, de la disfunció endotelial, ni de l'increment en el to vascular intrahepàtic del fetge cirròtic (129), tot i que, en altres malalties hepàtiques, com l'hepatitis induïda per alcohol, la fibrosi hepàtica, l'esteatohepatitis no alcohòlica i la isquèmia/reperfusió, aquest complex enzimàtic sí que juga un paper important (130-133).

El paper de l'estrès oxidatiu i l'ús terapèutic d'antioxidants en la hipertensió portal en la cirrosi no ha estat àmpliament avaluat. Moore i els seus col·laboradors van ser els primers d'atorgar un paper de l'estrès oxidatiu en el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica associada a la hipertensió portal. En el seu estudi, les rates amb lligadura parcial de la vena porta que van rebre l'antioxidant N-acetilcisteïna no van desenvolupar circulació hiperdinàmica, contràriament al que va passar a les rates tractades amb vehicle. Aquest fet es va associar amb una reducció de marcadors d'estrès oxidatiu i de la pressió portal, atribuïda a una disminució del flux portal (134). El mateix grup va obtenir resultats similars utilitzant l'antioxidant àcid lipoic (135). Tot i això, aquest estudi no van caracteritzar els mecanismes pels quals els antioxidants produïen els efectes descrits.

Més recentment, s'ha observat que l'administració aguda de vitamina C a pacients cirròtics revertia la hiporeactivitat a vasoconstrictors del territori arterial, segurament a causa de l'efecte de l'antioxidants, prevenint la síndrome de circulació hiperdinàmica i reduint el flux portal (136).

Més interessant és investigar el paper de l'estrès oxidatiu com a una nova possible causa de la disminució de la biodisponibilitat hepàtica d'ON i per tant com a modulador del to vascular hepàtic en la cirrosi. Tal i com s'observa en altres malalties vasculares, és concebible la idea que, en el fetge cirròtic, un augment en l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> reaccionaria amb l'ON donant lloc a la formació d'ONOO<sup>-</sup> (137-139), contribuint així a la deficiència intrahepàtica d'ON.

La possible manipulació farmacològica de l'augment de resistència vascular intrahepàtica dels fetges cirròtics va obrir la possibilitat de trencar el paradigma clàssic que només era possible reduir la pressió portal reduint l'augment de flux del territori esplàncnic mitjançant la utilització de vasoconstrictors esplàncnics (140). En aquest sentit, el nostre grup ha avaluat si l'administració aguda de vitamina C podia millorar la disfunció endotelial en la cirrosi (141). En aquest estudi, s'ha confirmat que pacients amb cirrosi tenen nivells reduïts de vitamina C, nivells elevats de malondialdehid (un marcador d'estrès oxidatiu) i que aquests pacients experimenten un marcat augment de pressió portal postprandial que reflecteix l'existència d'una resposta vasodilatadora alterada del llit vascular hepàtic a augments de flux portal (disfunció endotelial). L'administració aguda d'altres dosis de vitamina C va reduir els nivells de malondialdehid suggerint el potent efecte com a antioxidant. Aquest fet es va associar amb un bloqueig de l'augment de pressió portal postprandial, la qual cosa suggereix una millora de la disfunció endotelial intrahepàtica.





# Justificació i objectius

## 2. Justificació i objectius

La cirrosi hepàtica és la tercera causa de mort en homes d'entre 35 i 64 anys a Catalunya i a Espanya (cinquena causa en dones de la mateixa franja d'edat) i setena en persones d'entre 25 i 64 anys als Estats Units (142;143). La hipertensió portal i les seves complicacions (trencament de varices gastroesofàgiques, ascites, síndrome hepatorenal, encefalopatia hepàtica...) són la principal causa de mort i trasplantament en pacients cirròtics. Per aquesta raó, s'han destinat nombrosos esforços en investigació clínica i bàsica per determinar els mecanismes implicats en el desenvolupament d'aquesta síndrome.

La hipertensió portal pot aparèixer per un augment de la resistència vascular intrahepàtica, per un augment del flux portal o per un augment d'ambdós factors. Tanmateix, l'augment de la resistència vascular intrahepàtica és el factor fisiopatològic primari i, per tant, aquelles teràpies que disminueixin la resistència vascular intrahepàtica produiran un descens de la pressió portal i reduiran el risc de patir complicacions.

Fins ara, a causa de la inexistència d'alternatives fiables, segures i efectives, la teràpia utilitzada majoritàriament en els pacients amb cirrosi és l'ús de  $\beta$ -bloquejants, els quals redueixen la pressió portal al disminuir els fluxos col·lateral i portal (144;145).

També és possible manipular farmacològicament el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica (sense necessitat de modificar el flux portal) (141;146). Fins a dia d'avui, encara no coneixem tots els mediadors vasoactius que contribueixen a incrementar la resistència dinàmica ni quins mecanismes regulen la seva acció.

En els últims anys s'ha posat de manifest el paper de l'estrès oxidatiu i de les ROS en el control del to vascular i en el desenvolupament de disfunció endotelial de diverses malalties vasculares com la hipertensió, l'arteriosclerosi o la diabetis (102;147;148).

L'estrès oxidatiu també juga un paper fisiopatològic en la progressió de malalties hepàtiques (118;120). Una altra qüestió important de les ROS, concretament de l'anió  $O_2^-$ , és la seva capacitat per a reaccionar amb l'ON, donant lloc a la producció de  $ONOO^-$ , contribuint així a disminuir la biodisponibilitat d'ON.

El paper de l'estrès oxidatiu i la seva capacitat per modular la biodisponibilitat d'ON, així com l'ús terapèutic d'antioxidants en diverses malalties vasculares, ha estat àmpliament avaluat per nombrosos estudis en pacients i en models experimentals (149-151). En canvi, en la hipertensió portal en la cirrosi, aquests elements no han estat avaluats.

Els treballs de recerca de la present tesi estan globalment orientats a ampliar el coneixement dels mecanismes moleculars responsables de l'augment del component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi, concretament el paper de l'estrès oxidatiu i la seva implicació en la modulació de la biodisponibilitat d'ON.

## 2.1. Article 1: Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduce nitric oxide bioavailability.

Anteriorment s'havia descrit que la baixa biodisponibilitat d'ON en el fetge cirròtic, responsable parcialment de la disfunció endotelial, és causada per una menor activitat enzimàtica d'eNOS secundària a una sèrie de desregulacions posttraduccionals .

En malalties cardiovasculars s'ha demostrat que un increment en els nivells d' $O_2^-$ , al reaccionar amb l'ON, redueix marcadament la biodisponibilitat d'aquest vasodilatador i s'acompanya d'un augment significatiu en el to vascular (96;104;147;152;153).

A més, en diferents desordres hepàtics s'han descrit elevats nivells d' $O_2^-$ , a conseqüència d'una exagerada síntesi i/o d'una deficient eliminació (118;121;124;126;135).

La **hipòtesi** del present estudi fou que, en els fetges cirròtics, un increment en els nivells d' $O_2^-$ , al reaccionar amb l'ON, contribuirien a reduir la biodisponibilitat d'ON i, per tant, l'eliminació de l' $O_2^-$  del fetge cirròtic seria una nova estratègia terapèutica encaminada a incrementar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON.

Per tant, els **objectius** d'aquest estudi són conèixer els nivells d'ON en el fetge cirròtic, el grau d'estrès oxidatiu i les seves possibles causes, a més d'avaluar l'efectivitat d'una teràpia antioxidant sobre la biodisponibilitat d'ON.

## 2.2. Article 2: Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats with portal hypertension.

Els nivells de ROS estan augmentats en els fetges cirròtics com a conseqüència de: a) un augment de la seva producció per part de diversos sistemes enzimàtics com la XO i la COX (85;86); i b) una reducció de l'activitat i dels nivells proteics d'un dels principals sistemes enzimàtics encarregats de metabolitzar l' $O_2^-$ , la SOD (154).

S'ha descrit que la transferència gènica de SOD protegeix contra l'estrès oxidatiu i millora la relaxació dependent d'endoteli en diverses situacions, entre les quals trobem l'infart de miocardi (155;156), el transplantament hepàtic (157), la hipertensió (158;159), la diabetis (160) i l'envelliment (161). Tambè s'ha descrit l'ús de transferència gènica de SOD per a millorar diverses malalties hepàtiques (162-165).

La **hipòtesi** del present estudi fou que, disminuir els elevats nivells d' $O_2^-$  del fetge cirròtic podria ser una nova estratègia terapèutica encaminada a incrementar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON, reduir la resistència vascular intrahepàtica i millorar la hipertensió portal en la cirrosi.

Els **objectius** d'aquest estudi són avaluar si la transferència gènica de SOD és capaç de reduir els nivells d' $O_2^-$ , augmentar la biodisponibilitat d'ON i, en conseqüència, millorar la disfunció endotelial hepàtica i reduir la pressió portal en rates cirròtiques amb hipertensió portal



# Còpies dels articles originals

#### 3.1. Article 1

Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduce nitric oxide bioavailability.

Gracia-Sancho J\*, Laviña B\*, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC.

*Hepatology* 2008 Apr;47(4):1248-56.

IF: 10.734

\* These authors contributed equally to this study

## LIVER FAILURE/CIRRHOSIS/PORTAL HYPERTENSION

# Increased Oxidative Stress in Cirrhotic Rat Livers: A Potential Mechanism Contributing to Reduced Nitric Oxide Bioavailability

Jorge Gracia-Sancho,\* Bàrbara Laviña,\* Aina Rodríguez-Vilarrupla, Héctor García-Calderó, Mercedes Fernández, Jaume Bosch, and Joan-Carles García-Pagán

In cirrhotic livers, decreased nitric oxide (NO) bioavailability is a major factor increasing intrahepatic vascular tone. In several vascular disorders, an increase in superoxide ( $O_2^-$ ) has been shown to contribute to reduced NO bioavailability through its reaction with NO to form peroxynitrite. This study was aimed to test the hypothesis that, in cirrhotic livers, increased  $O_2^-$ , by reacting with NO, reduces NO bioavailability. In control and cirrhotic rat livers, NO bioavailability was evaluated by the measurement of cyclic guanosine monophosphate in liver tissue and by 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA) fluorescence in isolated sinusoidal endothelial cells (SEC); the  $O_2^-$  content was determined by dihydroethidium staining in fresh liver sections. In addition, the role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), xanthine oxidase (XO), and cyclooxygenase (COX) as possible sources of  $O_2^-$  and the role of superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity as an  $O_2^-$  scavenger were determined in liver homogenates. Protein-nitrotyrosination, a marker of the NO- $O_2^-$  reaction, was evaluated in liver homogenates. Furthermore, in control SEC and bovine aortic endothelial cells, NO modulation by  $O_2^-$  was evaluated. Cirrhotic livers exhibited increased  $O_2^-$  levels. This was due, at least in part, to increased production by COX and XO but not eNOS and to reduced scavenging by SOD. Increased  $O_2^-$  was associated with a significant reduction in NO bioavailability and increased nitrotyrosinated proteins. In endothelial cells, an inverse relationship between  $O_2^-$  levels and NO bioavailability was observed. **Conclusion:** Our data show that oxidative stress may contribute to reduced NO bioavailability in cirrhotic livers, supporting the evaluation of  $O_2^-$  reduction as a potential mechanism to restore NO content. (HEPATOLOGY 2008;47:1248-1256.)

*Abbreviations:* 3-NT, nitrotyrosine; Ad, adenoviral; Allop, allopurinol;  $\beta$ gal,  $\beta$ -galactosidase; BAEC, bovine aortic endothelial cells;  $CCl_4$ , carbon tetrachloride; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CH, cirrhotic; COX, cyclooxygenase; CT, control; CuZnSOD, cytoplasmic superoxide dismutase; DAF-FM-DA, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DDC, diethyldithiocarbamate; DHE, dihydroethidium; EcSOD, extracellular superoxide dismutase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; Indo, indomethacin; L-NAME, N-nitro-L-arginine methyl ester; Mn-SOD, mitochondrial superoxide dismutase; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NBT, nitro blue tetrazolium; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase;  $O_2^-$ , superoxide; PQ, paraquat; SEC, sinusoidal endothelial cells; SOD, superoxide dismutase; Veh, vehicle; XO, xanthine oxidase.

From the Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques (IMDiM), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, University of Barcelona, Spain.

Received May 18, 2007; accepted November 28, 2007.

Supported by a fellowship to J.G.-S. from the Instituto de Salud Carlos III (FI05/00133) and by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07/61298) and the Instituto de Salud Carlos III (PI04-0655 and PI06-0623).

\*These authors contributed equally to this study.

Address reprint requests to: Joan-Carles García-Pagán, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: jgarcia@clinic.ub.es; fax: (34) 93-2279856.

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

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

DOI 10.1002/hep.22166

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Increased resistance to portal blood flow is the primary factor in the pathophysiology of portal hypertension, the main complication of cirrhosis.<sup>1,2</sup> Architectural alterations of the liver parenchyma as well as a dynamic increase in the hepatic vascular tone contribute to the increased resistance to portal blood flow of cirrhotic livers. The increase in hepatic vascular tone is partly due to increased release of cyclooxygenase-1 (COX-1)-derived vasoconstrictive prostanoids<sup>3,4</sup> and to reduced bioavailability within the liver of the potent vasodilator nitric oxide (NO),<sup>5-7</sup> both mechanisms favoring the contraction of different elements within the cirrhotic liver. Indeed, activated hepatic stellate cells have been shown to contract or relax in response to vasoconstrictive prostanoids or NO, respectively.<sup>8-10</sup>

Reduced NO bioavailability has been attributed to decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity<sup>11</sup> secondary to several disturbances in the post-translational regulation of the enzyme.<sup>12-15</sup>

In several vascular disorders, the potential of reactive oxygen species to bind proteins, break DNA, and promote cell damage by reacting with several cellular compo-



nents has been involved in the development of necrosis, inflammation, and apoptosis.<sup>16-18</sup> In addition, an increase in the reactive oxygen specie superoxide ( $O_2^-$ ), by a rapid reaction with NO,<sup>19</sup> promotes a marked reduction in NO bioavailability followed by an increase in vascular tone.<sup>20-23</sup>

An increase in  $O_2^-$  levels due to increased production by xanthine oxidase (XO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, or COX, among other enzymatic systems, and reduced  $O_2^-$  scavenging by superoxide dismutase (SOD) has been suggested to play a pathophysiological role in different liver disorders such as alcoholic and nonalcoholic liver disease.<sup>24-28</sup>

We hypothesize that in cirrhotic livers, increased  $O_2^-$ , by reacting with NO, would contribute to reduced NO bioavailability. As a result, removing  $O_2^-$  from cirrhotic livers could be a new therapeutic strategy to improve intrahepatic NO bioavailability. The present study was designed to be a proof of concept of this hypothesis.

## Materials and Methods

### Induction of Cirrhosis by Carbon Tetrachloride ( $CCl_4$ )

Male Wistar rats weighing 175 to 200 g underwent inhalation exposure to  $CCl_4$ . Phenobarbital (0.3 g/L) was added to the drinking water as previously described.<sup>3</sup> A high yield of micronodular cirrhosis was obtained after approximately 12 to 15 weeks of  $CCl_4$  inhalation. When the cirrhotic rats developed ascites, administration of phenobarbital was stopped, and the subsequent experiments were performed 1 week later. Control animals received only phenobarbital. The animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, NIH Publication 86-23, revised 1985).

### Isolation and Culture of Liver Sinusoidal Endothelial Cells (SEC)

SEC were isolated from control and cirrhotic rat livers as described previously.<sup>29,30</sup> Briefly, after collagenase perfusion of the livers and isopycnic sedimentation of the resulting dispersed cells through a two-step density gradient of Percoll, pure monolayer cultures of SEC were established by selective attachment on a substrate of fibronectin. Afterwards, cells were cultured for 12 hours (37°C, 5%  $CO_2$ ) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 as previously described.<sup>30</sup> Almost 93% of

these cells were SEC, as assessed by specific immunocytochemical marking using rat endothelial cell antigen-1<sup>31</sup> (Fig. 1), and they had a viability of 95% (by trypan blue exclusion). All studies were performed on cells from the first passage, 12 hours after SEC isolation, to preserve their typical phenotype.<sup>32</sup>

### Evaluation of NO Bioavailability in Liver Tissue and SEC of Cirrhotic and Control Rats

**Measurement of NO Levels in SEC.** *In situ* NO levels in SEC were assessed with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) as described.<sup>33,34</sup> DAF-FM-DA is a cell-permeable, NO-sensitive dye that is virtually nonfluorescent until it reacts with NO to form benzotriazole. Isolated SEC were washed in RPMI 1640 without phenol red and loaded with DAF-FM-DA (10  $\mu$ M final concentration, 20 minutes, 37°C). Then, SEC were rinsed three times with phosphate-buffered saline, kept in the dark, and maintained at 37°C with a warm stage on a laser scanning confocal microscope (model TCS-SL DMIRE2, Leica, Wetzlar, Germany), and images were obtained with a 488-nm (excitation) and 505- to 530-nm (emission) filter set for DAF-FM-DA, with a 40  $\times$  1.3 oil objective. Quantitative analysis was obtained by averaging of the peak relative fluorescent intensity (optical density arbitrary units) of each confocal microscope image (Image J 1.33u software, National Institutes of Health)<sup>35</sup> and normalization of the fluorescent result by the total number of cultured cells counted from each corresponding digitalized phase contrast microscope image.

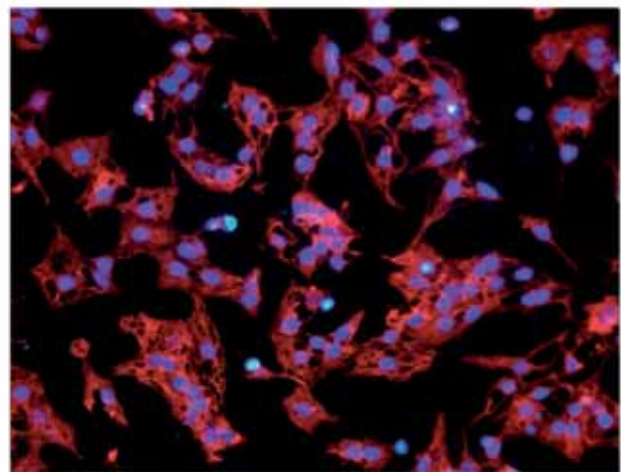


Fig. 1. Representative immunocytochemical image of primary cultured rat sinusoidal endothelial cells (SEC). High-purity SEC (>93%) were calculated as the number of cells expressing rat endothelial cell antigen-1-positive staining (red) divided by the total number of cells (stained with nuclear Hoescht dye in blue). Original magnification, 20 $\times$ .

In some experiments, the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1.5 mM) as a negative control or the NO donor diethylenetriamine NONOate (DETANONOate) (500  $\mu$ M) and the eNOS inductor vascular endothelial growth factor as positive controls were added 20 minutes before the loading of DAF-FM-DA.

**Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) Levels.** Measurements of cGMP, a marker of NO bioavailability, were performed in liver homogenates.<sup>36</sup> Briefly, equal amounts of liver tissue (200 mg) were dropped into 10 volumes of 5% trichloroacetic acid and homogenized at 4°C. The precipitate was removed by centrifugation at 2000g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to a clean test tube, washed with water-saturated diethyl ether three times, and lyophilized. The dried extract was dissolved in assay buffer, and cGMP levels were determined by enzyme immunoassay (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI). Results were expressed as picomoles per milliliter.

**eNOS Protein Detection.** SEC isolated from control and cirrhotic rat livers were homogenized in triton-lysis buffer as previously described.<sup>37</sup> Aliquots from each sample containing equal amounts of protein (20  $\mu$ g) were run on an 8% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. After the transfer, the blots were subsequently blocked for 1 hour with tris(hydroxymethyl)aminomethane-buffered saline containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 and 5% (wt/vol) non-fat dry milk and were probed with a mouse anti-eNOS (1  $\mu$ g/mL) antibody (BD Biosciences, San Jose, CA) overnight at 4°C followed by incubation with rabbit anti-mouse horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (1:10000, 1 hour, room temperature; Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada).

Protein expression was determined by densitometric analysis with the Science Lab Image Gauge (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Germany). After stripping, blots were assayed for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) expression as a standardization of the sample loading. Quantitative densitometric values of all proteins were normalized to GAPDH.

### Evaluation of $O_2^-$

**Measurement of the  $O_2^-$  Content in the Liver Tissue of Cirrhotic and Control Rats.** *In situ*  $O_2^-$  levels were evaluated with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Molecular Probes).<sup>38</sup> DHE specifically reacts with intracellular  $O_2^-$  and is converted to the red fluorescent compound ethidium bromide, which then binds irreversibly to double-stranded DNA and appears as

punctuate nuclear staining.<sup>39</sup> Ethidium bromide is excited at 488 nm with an emission spectrum of 610 nm. Liver cryosections (10  $\mu$ m) were incubated with DHE (10  $\mu$ mol/L) in phosphate-buffered saline. In order to demonstrate the specificity of the assay for  $O_2^-$ , parallel incubations with SOD (200 U; AppliChem, Darnstadt, Germany) were performed. Fluorescence images were obtained with a laser scanning confocal microscope (TCS-SL DMIRE2, Leica), and quantitative analysis was performed with Image J 1.33u software (National Institutes of Health).

**$O_2^-$  Generation.** To determine which proteins are responsible for  $O_2^-$  generation, cirrhotic rats (n = 3 per group) were pretreated with the specific XO inhibitor allopurinol (50 mg/kg intraperitoneally, 18 hours and 1 hour before the experiment), with the COX inhibitor indomethacin (20 mg/kg orally, 5 hours before the experiment), with the NOS inhibitor L-NAME (15 mg/kg intravenously, 15 minutes before the experiment), or with vehicle (saline), and the hepatic  $O_2^-$  content was evaluated in fresh liver sections by DHE staining as described previously. The efficacy of these doses inhibiting their respective enzymatic systems has been previously demonstrated.<sup>36,40,41</sup>

**SOD Activity Assay.** Total SOD activity was measured in liver homogenates by an indirect assay previously described.<sup>42</sup> The nitro blue tetrazolium (NBT) method is based on the competition reaction between SOD and the indicator molecule NBT. In brief, NBT is reduced to formazan by  $O_2^-$ . The production of formazan is photometrically quantified at 560 nm. Dilutions of SOD were used to generate a standard curve. One unit of SOD activity is defined as the amount of protein required to give half-maximal inhibition of NBT reduction. SOD activity was expressed as units per milligram of total tissue.

**SOD Isoform Protein Detection.** Frozen liver samples from control and cirrhotic rats were crushed to powder and subsequently homogenized in triton-lysis buffer as previously described.<sup>36</sup> SOD isoforms were determined with antibodies against cytoplasmic superoxide dismutase (CuZnSOD; Stressgen), mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), and extracellular superoxide dismutase (EcSOD; Stressgen) by western blotting as described previously.

### NO- $O_2^-$ Interaction

**Nitrotyrosine Protein Detection.** Protein nitrotyrosination, a marker of peroxynitrite production, was determined by western blotting with a mouse anti-nitrotyrosine (1  $\mu$ g/mL) antibody (Cayman Chemical Co.) as described previously.

**NO Modulation by  $O_2^-$ .** SEC isolated from control rat livers were incubated for 6 hours with vehicle or with the CuZnSOD inhibitor diethyldithiocarbamate (DDC; 25  $\mu$ M)<sup>43</sup> alone or in association with the  $O_2^-$  scavenging enzyme SOD (300 U). Then,  $O_2^-$  and NO levels were evaluated in different subsets of SEC by DHE (10  $\mu$ mol/L) and DAF-FM-DA staining, respectively.

In order to further strengthen data on NO modulation by  $O_2^-$ , a complementary molecular approach was designed: Low-passage ( $n < 6$ ) bovine aortic endothelial cells (BAEC) were seeded into p35 plates and infected in duplicate for 16 hours at a multiplicity of infection of 100 with either the adenoviral (Ad) construct codifying for the antioxidant enzyme SOD (the extracellular isoform EcSOD; constructed by Dr. Chu and provided by the Vector Core at the University of Iowa) or the control adenovirus  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ gal; kindly provided by Dr. C. B. Newgard of Duke University, Durham, NC) as previously described.<sup>44</sup> These EcSOD adenoviruses are capable of infecting and expressing enzymatically active SOD in endothelial cells.<sup>45</sup> After 48 hours, the medium was replaced, and endothelial cells were incubated for 6 hours with the oxidative stress inductor paraquat (0.01 mM).<sup>46</sup> Then,  $O_2^-$  and NO levels were evaluated as described previously.

#### Drugs and Reagents

Mouse anti-rat endothelial cell antigen 1 monoclonal antibody was obtained from Serotec (Oxford, United Kingdom). Collagenase was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Percoll was from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Reagents for cell culture were provided by Biological Industries, Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel). L-NAME, paraquat, and other chemical reagents were purchased from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain).

#### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS 12.0 for Windows statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL). All results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Comparisons between groups were performed with the Student *t* test or Mann-Whitney *t* test for unpaired data when adequate. Differences were considered significant at a *P* value  $< 0.05$ .

## Results

### NO Bioavailability Is Reduced in SEC from Cirrhotic Livers

SEC isolated from cirrhotic rat livers had decreased NO bioavailability in comparison with SEC isolated from control livers as shown by the significant and marked

reduction in DAF-FM-DA fluorescence ( $40.1\% \pm 8\%$  versus  $100\% \pm 24\%$  in SEC from control rat livers;  $P < 0.01$ ; Fig. 2). However, no differences in eNOS protein expression were observed in SEC isolated from cirrhotic or control rat livers (Fig. 2).

Almost no DAF-FM-DA fluorescence was observed in SEC pretreated with the NOS inhibitor L-NAME (65% reduction versus those pretreated with vehicle;  $P < 0.01$ ), and a strong cytoplasmic fluorescence was observed in SEC isolated from both control and cirrhotic rats pretreated with the NO donor DETANONOate (10-fold increase versus those pretreated with vehicle;  $P < 0.01$ ). Similarly, BAEC incubated with vascular endothelial growth factor showed a significant increase in DAF-FM-DA fluorescence (data not shown).

Reduced NO bioavailability within the cirrhotic liver was further confirmed by the measurement of hepatic cGMP levels, a surrogate marker of NO bioavailability. Indeed, hepatic cGMP levels were significantly lower in cirrhotic rat livers than in control rat livers ( $2.5 \pm 0.2$  versus  $5.0 \pm 1.1$  pmol/mL;  $P < 0.05$ ; Fig. 2).

### $O_2^-$ Is Increased in Cirrhotic Livers Because of Overproduction by COX and XO and Reduced Degradation by SOD

Along with reduced NO bioavailability, cirrhotic livers exhibited an increase in  $O_2^-$  content. Thus, confocal microscopy showed a marked increase in DHE fluorescence in tissue sections from cirrhotic rat livers in comparison with control rat livers (Fig. 3). Cirrhotic livers preincubated with SOD, the enzyme that metabolizes  $O_2^-$  to  $H_2O_2$ , had a marked attenuation in DHE fluorescence ( $66.4\% \pm 0.6\%$  reduction versus cirrhotic livers preincubated with vehicle), demonstrating the specificity of the assay for  $O_2^-$ .

Specific inhibition of XO or COX resulted in a significant reduction in cirrhotic hepatic  $O_2^-$  levels in comparison with those animals receiving vehicle. However, no differences were observed when animals were treated with the NOS inhibitor L-NAME (Fig. 3).

Total SOD activity was significantly reduced in cirrhotic rat livers ( $n = 10$ ) compared with control rat livers ( $n = 8$ ,  $2.1 \pm 0.2$  versus  $4.2 \pm 0.4$  U/mg of tissue;  $P < 0.01$ ; Fig. 4). This was associated with a significant reduction in CuZnSOD and MnSOD protein expressions (Fig. 4), without significant changes in EcSOD expression (Fig. 4).

### NO Bioavailability Can Be Modulated by $O_2^-$

Decreased NO bioavailability and increased  $O_2^-$  content in cirrhotic livers coexist with an increase in hepatic nitrotyrosinated proteins ( $16.2 \pm 8.1$  versus  $1 \pm 0.6$  AU

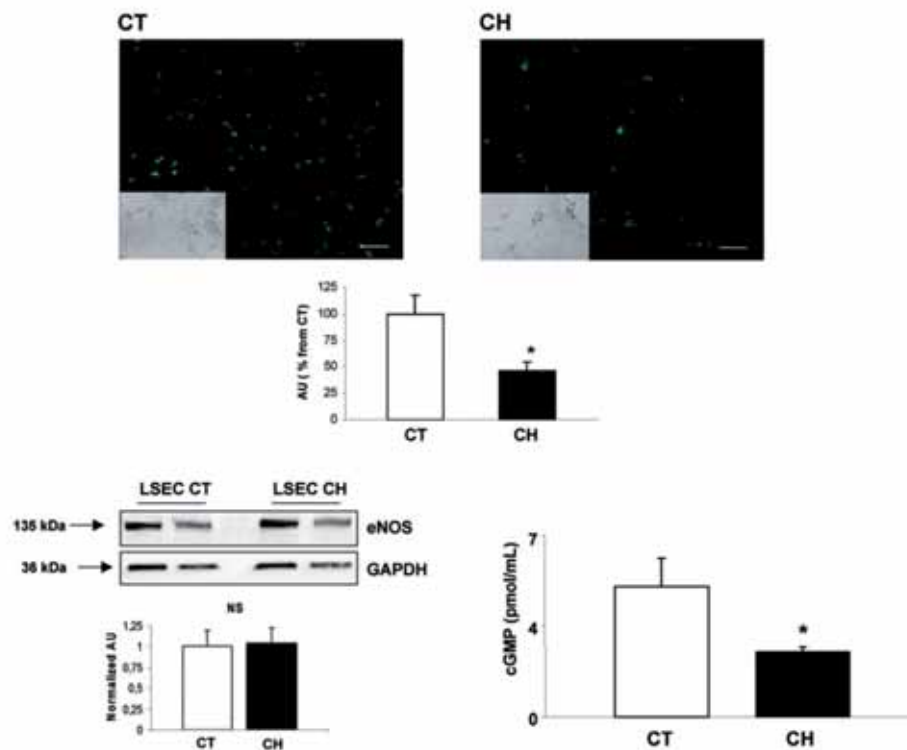


Fig. 2. Top: Fluorescent detection of intracellular nitric oxide (NO) in sinusoidal endothelial cells (SEC) isolated from control (CT) and cirrhotic (CH) rat livers. Representative images of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA) fluorescence from CT SEC and CH SEC, including an area of the corresponding phase contrast images, were visualized and collected with confocal laser scanning microscopy. Original magnification, 40 $\times$ ; bar, 10  $\mu$ m. The fluorescence intensity of DAF-FM-DA in arbitrary units was normalized by the total number of counted cells, indicating NO bioavailability. The data shown are from 1105 individual CT SEC and 1245 CH SEC obtained from three different experiments. The DAF-FM-DA fluorescence intensity was significantly lower in SEC isolated from CH rats ( $*P < 0.01$  versus CT). Bottom left: Representative western blot and analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression in SEC isolated from CT ( $n = 4$ ) and CH ( $n = 4$ ) rat livers. Densitometry quantification in arbitrary units, normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), showed no differences between both groups. Bottom right: Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in liver homogenates from CT ( $n = 5$ ) and CH ( $n = 5$ ) rats. cGMP levels were significantly reduced in CH rat livers ( $*P = 0.05$  versus CT).

in control livers;  $P = 0.025$ ; Fig. 5). Nitrotyrosinated proteins are considered a fingerprint of peroxynitrite formation, the result of  $O_2^-$  reacting with, and therefore scavenging, NO.

SEC isolated from control rat livers treated with the SOD inhibitor DDC displayed a marked and significant increase in  $O_2^-$  levels, as shown by DHE staining under confocal microscopy, in comparison with vehicle-treated SEC (Fig. 6, top). The increase in  $O_2^-$  was associated with a significant reduction in NO bioavailability, as evidenced by DAF-FM-DA staining. Coadministration of SOD attenuated both the increase in  $O_2^-$  levels observed with DDC and the reduction in NO bioavailability (Fig. 6, top).

Similarly, endothelial cells (BAEC) transfected with EcSOD-Ad overexpressing SOD had significantly lower paraquat-induced  $O_2^-$  generation associated with significantly higher NO bioavailability in comparison with cells transfected with  $\beta$ gal-Ad (Fig. 6, bottom).

## Discussion

Reduced NO bioavailability within the liver plays a major role in increasing hepatic vascular tone in cirrhosis. Up to now, it has been attributed to decreased NO production due to reduced eNOS activity in the liver.<sup>12</sup> Our present results confirm diminished NO bioavailability within cirrhotic livers as shown by the observed reduced hepatic cGMP content. In addition, by using DAF staining and confocal microscopy, we were able to directly demonstrate reduced NO bioavailability in SEC from cirrhotic livers. This is the first time that NO content has been directly quantified in SEC only 12 hours after their isolation while they still preserve their typical phenotype.

Reduced NO content was associated with increased  $O_2^-$  levels. On the basis of indirect data, such as the increase in plasma and tissue levels of lipid peroxidation markers and the observation of reduced hepatic and plasma antioxidant content, it has been previously sug-

Fig. 3. Top: Representative confocal microscopy images of *in situ* detection of superoxide ( $O_2^-$ ) using the oxidative dye dihydroethidium (bar, 10  $\mu$ m), in fresh liver sections from control rats ( $n = 3$ ) and cirrhotic rats treated with vehicle (Veh;  $n = 3$ ), with the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME;  $n = 3$ ), with the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (Allop;  $n = 3$ ), or with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (Indo;  $n = 3$ ). Bottom: Fluorescence intensity analysis showed increased  $O_2^-$  levels in cirrhotic livers in comparison with controls. A significant reduction in the cirrhotic intrahepatic  $O_2^-$  content was observed when xanthine oxidase or cyclooxygenase was selectively inhibited (values represent arbitrary units normalized to control livers; \* $P < 0.01$  versus control; # $P < 0.05$  versus cirrhotic-Veh).

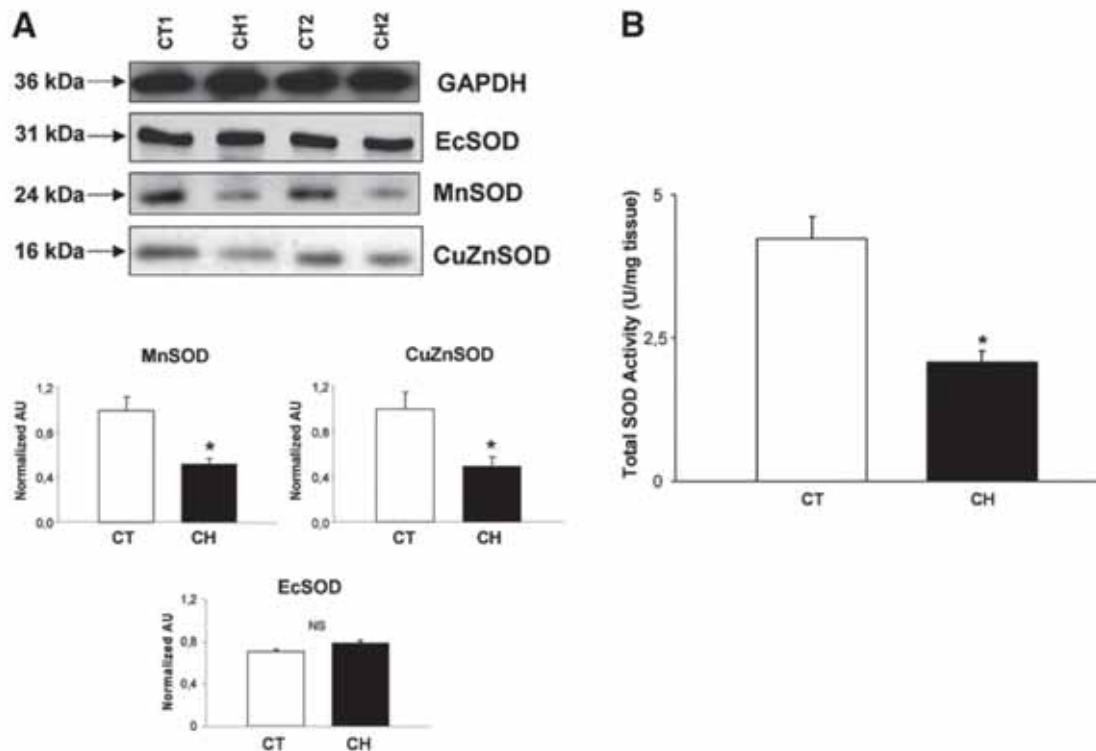
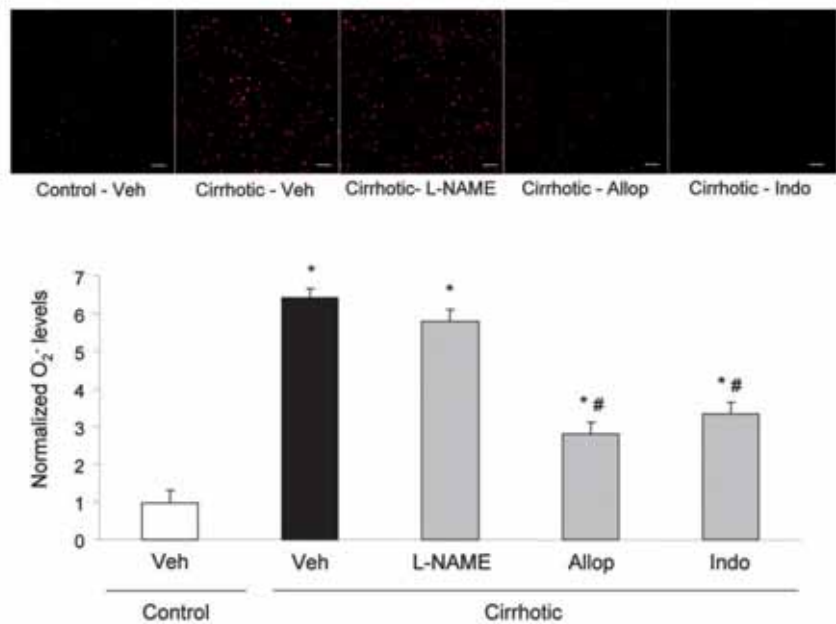


Fig. 4. (A) Representative western blots and analysis of cytoplasmic superoxide dismutase (CuZnSOD), mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD), and extracellular superoxide dismutase (EcSOD) protein expression in liver homogenates of control (CT;  $n = 4$ ) and cirrhotic (CH;  $n = 4$ ) rats. Densitometry quantification in arbitrary units, normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), showed a decreased expression of CuZnSOD and MnSOD isoforms in CH livers, whereas no differences in EcSOD protein expression were observed (\* $P < 0.01$  versus CT). (B) Total superoxide dismutase (SOD) activity in liver homogenates from CT ( $n = 8$ ) and CH ( $n = 10$ ) rats. Total SOD activity was significantly reduced in CH rat livers (\* $P < 0.01$  versus CT).

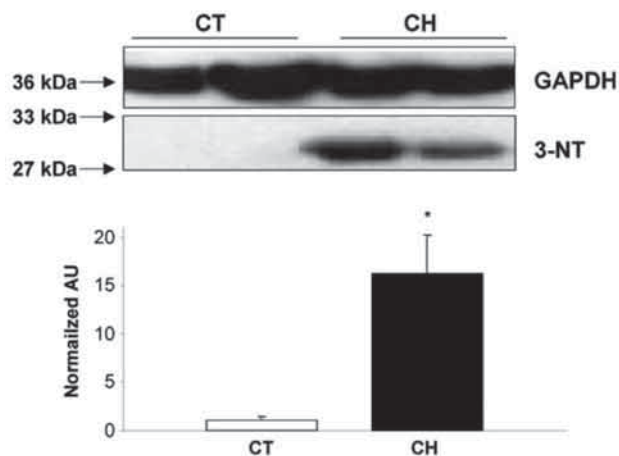


Fig. 5. Top: Representative western blot of nitrotyrosine (3-NT) abundance in liver homogenates from control (CT;  $n = 4$ ) and cirrhotic (CH;  $n = 4$ ) rats. Bottom: Densitometry quantification in arbitrary units, normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), showing more than a 20-fold increase in the main nitrated protein band in CH livers ( $*P < 0.01$  versus CT).

gested that there is an increase in oxidative stress in several liver disorders.<sup>25,47</sup> However, this is the first study that, by using DHE staining and confocal microscopy, specifically demonstrates a marked increase in  $O_2^-$  levels in livers of rats induced to cirrhosis by  $CCl_4$  administration.

In agreement with a previous report,<sup>6</sup> we found reduced SOD activity, the enzyme dismutating  $O_2^-$  to  $H_2O_2$ , as a possible mechanism underlying the observed increase in  $O_2^-$  in cirrhotic livers. Furthermore, our study clarifies that reduced SOD activity is, at least in part, due to decreased protein expression of the CuZnSOD and MnSOD isoforms but not of the EcSOD isoform.

In addition to reduced metabolism, the increase in  $O_2^-$  content may also be due to enhanced generation. In a previous study, we demonstrated that eNOS uncoupling, secondary to tetrahydrobiopterin deficiency, contributed to the reduced NO bioavailability of the cirrhotic liver.<sup>15</sup> Uncoupled eNOS may also produce  $O_2^-$ ; however, in our study, no reduction in  $O_2^-$  was observed after NOS inhibition, and this suggests that eNOS is not a

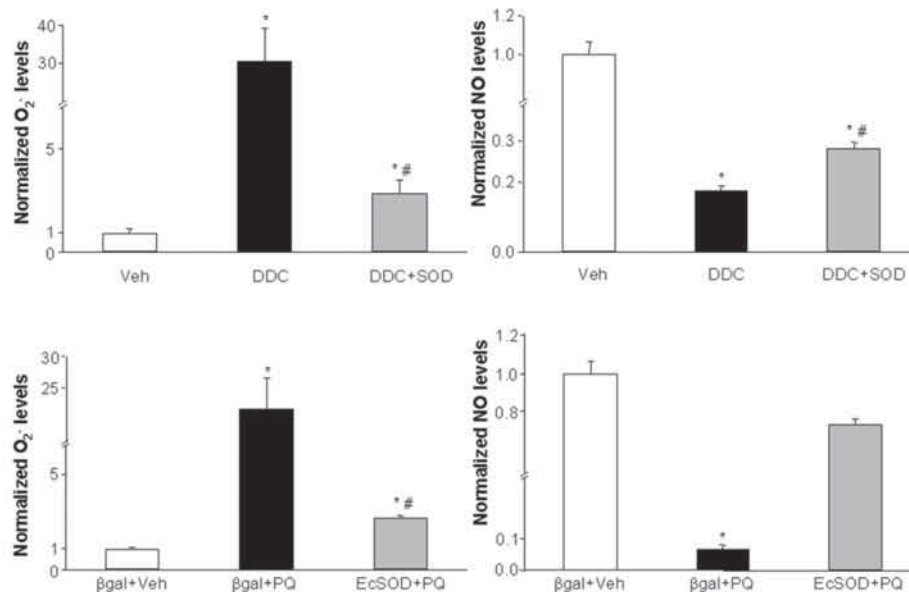


Fig. 6. Top: *In situ* superoxide ( $O_2^-$ ) detection by dihydroethidium staining ( $10 \mu M$ ) and nitric oxide (NO) quantification by 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA) staining ( $10 \mu M$ ) in sinusoidal endothelial cells (SEC) isolated from control rat livers treated with the specific superoxide dismutase (SOD) inhibitor diethylthiocarbamate (DDC) alone or in association with SOD (DDC + SOD). Left: DDC-treated SEC had markedly increased intracellular  $O_2^-$  levels, which were significantly inhibited by coinubation with SOD [ $*P < 0.01$  versus vehicle (Veh);  $\#P < 0.01$  versus DDC]. The data shown are from 817 individual Veh-SEC, 829 DDC-SEC, and 723 DDC + SOD-SEC obtained from three different experiments. Right: NO levels were significantly reduced when intracellular oxidative stress was induced by DDC. This low NO content was significantly ameliorated when cells were coinubated with SOD ( $*P < 0.01$  versus Veh;  $\#P < 0.01$  versus DDC). The data shown are from 1395 individual Veh-SEC, 878 DDC-SEC, and 1083 DDC + SOD-SEC obtained from three different experiments. Bottom: *In situ*  $O_2^-$  and NO detection in bovine aortic endothelial cells (BAEC) infected with the adenovirus encoding for extracellular superoxide dismutase (EcSOD) or with the control adenovirus  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ gal) and treated with the oxidative stress inductor paraquat (PQ) or its Veh. PQ-treated BAEC transfected with  $\beta$ gal-Ad had a marked increase in intracellular  $O_2^-$  levels and a significant reduction in NO bioavailability. EcSOD-Ad transfection attenuated the increase in  $O_2^-$  promoted by PQ and blunted the reduction in NO bioavailability (left:  $*P < 0.05$  versus  $\beta$ gal-Veh and  $\#P < 0.01$  versus  $\beta$ gal-PQ; right:  $*P < 0.01$  versus  $\beta$ gal-Veh and  $P < 0.05$  versus EcSOD + PQ). The data shown are from three independent experiments.

significant contributor of the increased  $O_2^-$  content of cirrhotic livers.

By contrast, our results showing that COX or XO inhibition markedly reduced intrahepatic  $O_2^-$  levels point out, for the first time, that these enzymatic systems are potential sources of  $O_2^-$  in cirrhosis, which provides the rationale for further investigations of potential conceptual and therapeutic relevance. The possible role of another potential source of  $O_2^-$  in cirrhosis, the NADPH oxidase system, has been recently discarded.<sup>37</sup>

The pathophysiological role of increased  $O_2^-$  reducing NO bioavailability has been extensively demonstrated in several vascular disorders.<sup>48-50</sup> Our finding of an increase in nitrotyrosinated proteins, a well-recognized marker of the reaction of  $O_2^-$  with NO, strongly supports that this mechanism of reduction in NO bioavailability also occurs in the cirrhotic liver. The relationship between NO bioavailability and  $O_2^-$  content in the liver is further supported by our experiments in SEC demonstrating that NO bioavailability is modulated by  $O_2^-$ . Indeed, increasing  $O_2^-$  content in SEC by incubation with the SOD inhibitor DDC was associated with a prominent reduction in NO bioavailability. Furthermore, abolition of the increase in  $O_2^-$  with SOD supplementation was followed by partial restoration of NO bioavailability.  $O_2^-$ -NO interaction in endothelial cells is further emphasized by our complementary molecular experiments showing that, when endothelial cells are transfected with EcSOD and the increase in  $O_2^-$  caused by paraquat is prevented, NO bioavailability is maintained.

Altogether, these findings strongly support the concept that NO scavenging by  $O_2^-$  may be an important determinant of decreased NO bioavailability, endothelial dysfunction, and increasing hepatic vascular tone in cirrhosis.

The role of increased  $O_2^-$  in impairing NO biology within cirrhotic livers probably goes beyond its direct reaction with NO. Indeed,  $O_2^-$  could oxidize and therefore inactivate the NO synthase cofactor tetrahydrobiopterin<sup>51</sup> or adjust interactions of eNOS with other inactivating or activating proteins.<sup>52</sup> These considerations further emphasize that antioxidant therapy, by removing  $O_2^-$  from the cirrhotic livers, could be a new therapeutic strategy to improve intrahepatic NO bioavailability and to ameliorate hepatic vascular tone in cirrhosis and encourage further studies elucidating the mechanism of the  $O_2^-$ -NO interaction and testing antioxidants as adjunctive therapy in the medical treatment of portal hypertension.

*Acknowledgment:* The authors are in debt to Montse Monclús for technical assistance.

## References

- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141-156.
- Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:S125-S130.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragular M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *HEPATOLOGY* 2003;37:172-181.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, Abraldes JG, Rosello J, Bosch J, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;39:515-521.
- Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *HEPATOLOGY* 2002;35:478-491.
- Van de Casteele M, Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: a comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003;2:2.
- Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G567-G574.
- Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric-oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric-oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995;95:1199-1206.
- Zhang JX, Pegoli W, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1994;266:G624-G632.
- Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993;92:1795-1804.
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-351.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-1228.
- Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1209-G1216.
- Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;125:522-531.
- Matei V, Rodriguez-Villarupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl<sub>4</sub> cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2006;44:44-52.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 1997;404:249-252.
- Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004;337:1-13.
- Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753-766.
- Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18:195-199.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844.
- Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C719-C741.
- Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 2006;40:183-192.
- Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:689-695.

24. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G847-G851.
25. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.
26. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, et al. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *HEPATOLOGY* 1999;29:1358-1363.
27. Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:110S-115S.
28. Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Ther* 2001;89:295-308.
29. Braet F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrod B, et al. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab Invest* 1994;70:944-952.
30. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220-227.
31. Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G763-G770.
32. DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G757-G763.
33. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999;38:3209-3212.
34. Balcerzyk A, Soszynski M, Bartosz G. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluoro fluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2005;39:327-335.
35. Gilchrist M, Hesslinger C, Befus AD. Tetrahydrobiopterin, a critical factor in the production and role of nitric oxide in mast cells. *J Biol Chem* 2003;278:50607-50614.
36. Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;46:1040-1046.
37. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, Brandes RP, Fernandez M, Bosch J, et al. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:959-966.
38. Brandes RP, Janiszewski M. Direct detection of reactive oxygen species *ex vivo*. *Kidney Int* 2005;67:1662-1664.
39. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1359-1368.
40. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13313-13318.
41. Lee WY, Lee SM. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1087-1093.
42. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
43. Didion SP, Hathaway CA, Faraci FM. Superoxide levels and function of cerebral blood vessels after inhibition of CuZn-SOD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1697-H1703.
44. Chu Y, Heistad DD. Gene transfer to blood vessels using adenoviral vectors. *Methods Enzymol* 2002;346:263-276.
45. Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Extracellular superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure and improves intrahepatic endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers by diminishing superoxide and increasing nitric oxide bioavailability. *J Hepatol* 2007;6:S51-S52.
46. Takizawa M, Komori K, Tampo Y, Yonaha M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Toxicol In Vitro* 2007;21:355-363.
47. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1-10.
48. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006;71:247-258.
49. Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2005;7:242-248.
50. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:E14-E22.
51. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003;111:1201-1209.
52. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999;85:29-37.





### 3.2. Article 2

Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats with portal hypertension.

Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, García-Pagán JC.

*Gut* 2009; 58: 118-125.

IF: 10.015

# Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats with portal hypertension

B Laviña,<sup>1</sup> J Gracia-Sancho,<sup>1</sup> A Rodríguez-Vilarrupla,<sup>1</sup> Y Chu,<sup>2</sup> D D Heistad,<sup>2</sup> J Bosch,<sup>1</sup> J C García-Pagán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hepatic Hemodynamic Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, University of Barcelona, Spain; <sup>2</sup> Department of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, USA

Correspondence to: Dr J C García-Pagán, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; jcgarcia@clinic.ub.es

Revised 23 July 2008  
Accepted 2 September 2008  
Published Online First  
1 October 2008

## ABSTRACT

**Background:** Increased intrahepatic vascular tone in cirrhosis has been attributed to a decrease of hepatic nitric oxide (NO) secondary to disturbances in the post-translational regulation of the enzyme eNOS. NO scavenging by superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) further contributes to a reduction of NO bioavailability in cirrhotic livers.

**Aim:** To investigate whether removing increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels could be a new therapeutic strategy to increase intrahepatic NO, improve endothelial dysfunction and reduce portal pressure in cirrhotic rats with portal hypertension.

**Methods:** Adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (SOD) (AdECSOD) or β-galactosidase (Adβgal) were injected intravenously in control and CCl<sub>4</sub>-induced cirrhotic rats. After 3 days, liver O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels were determined by dihydroethidium staining, NO bioavailability by hepatic cGMP levels, nitrotyrosinated proteins by immunohistochemistry and western blot, and endothelial function by responses to acetylcholine in perfused rat livers. Mean arterial pressure (MAP) and portal pressure were evaluated *in vivo*.

**Results:** Transfection of cirrhotic livers with AdECSOD produced a significant reduction in O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels, a significant increase in hepatic cGMP, and a decrease in liver nitrotyrosinated proteins which were associated with a significant improvement in the endothelium-dependent vasodilatation to acetylcholine. In addition, in cirrhotic livers AdECSOD transfection produced a significant reduction in portal pressure (17.3 (SD 2) mm Hg vs 15 (SD 1.6) mm Hg; *p* < 0.05) without significant changes in MAP. In control rats, AdECSOD transfection prevents the increase in portal perfusion pressure promoted by an ROS-generating system.

**Conclusions:** In cirrhotic rats, reduction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> by AdECSOD increases NO bioavailability, improves intrahepatic endothelial function and reduces portal pressure. These findings suggest that scavenging of O<sub>2</sub><sup>-</sup> might be a new therapeutic strategy in the management of portal hypertension.

Increased intrahepatic vascular resistance to portal blood flow is the main cause of portal hypertension in cirrhosis and is the result of both structural changes and an increase in the hepatic vascular tone within the cirrhotic liver.<sup>1</sup> Sinusoidal endothelial cell dysfunction, characterised by impaired endothelium-dependent vasodilation, appears to be an important mechanism of the increased vascular tone of cirrhotic livers and has been attributed to increased release of cyclooxygenase-1-derived

vasoconstrictive prostanoids<sup>2</sup> and to reduced nitric oxide (NO) bioavailability.<sup>3-5</sup>

Reduced NO bioavailability within cirrhotic livers is the result of a decrease in endothelial NO synthase (eNOS) activity due to alterations on its post-translational regulation.<sup>6,7</sup> However, recent data from our group have demonstrated that scavenging of NO by the increased levels of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) found in cirrhotic livers contributes further to a reduction of NO bioavailability. This study suggests that removing increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels in cirrhotic livers could be a new therapeutic strategy for improving intrahepatic NO bioavailability, reducing intrahepatic resistance and improving portal hypertension.<sup>8</sup>

Increased production of reactive oxidative species (ROS) in cirrhotic livers was shown to be the consequence of an increased production by several enzymatic systems (such as cyclooxygenase and xanthine oxidase)<sup>9,10</sup> but, in addition, to a reduced expression and activity of superoxide dismutase (SOD), a critical enzyme that metabolises O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>8,10</sup>

Gene transfer of SOD has been shown to protect against oxidative stress and to improve endothelium-dependent relaxation in several situations, including myocardial infarction,<sup>11</sup> liver transplantation,<sup>12</sup> hypertension,<sup>13,14</sup> diabetes<sup>15</sup> and ageing.<sup>16</sup>

Therefore, the present study was aimed at investigating whether adenovirus-mediated gene transfer of SOD is able to decrease O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels, increase NO bioavailability, and, consequently, improve hepatic endothelial dysfunction and reduce portal pressure in rats with cirrhosis and portal hypertension.

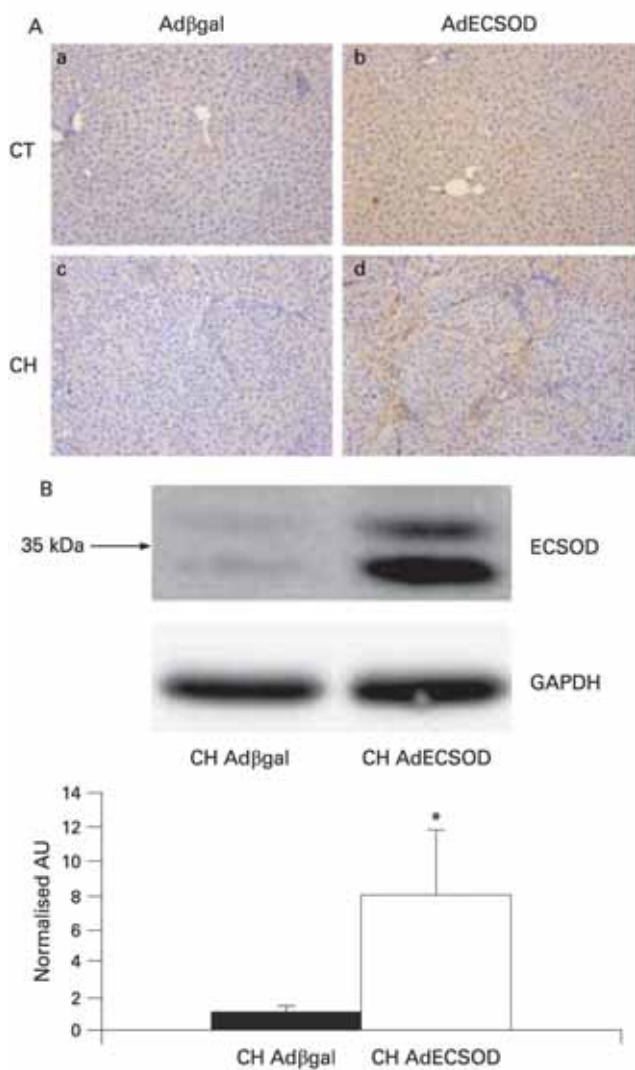
## MATERIAL AND METHODS

### Induction of cirrhosis

Cirrhosis was induced in male Wistar rats (175–200 g) by inhalation of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) three times a week. Phenobarbital (0.3 g/l) was added to the drinking water as previously described.<sup>17</sup> When cirrhotic rats had developed ascites, 12–15 weeks after inhalation of CCl<sub>4</sub>, administration of CCl<sub>4</sub> and phenobarbital was stopped and experiments were performed 1 week later. Control animals received only phenobarbital. The animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

### Adenoviral vectors and gene transfer *in vivo*

Replication-deficient adenoviral constructs, under the control of the human cytomegalovirus (CMV)



**Figure 1** (A) Representative histological images of liver tissues immunostained for human extracellular superoxide dismutase (ECSOD) from control (CT) and cirrhotic (CH) rats, 3 days after intravenous injection of adenoviral vectors expressing either  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) (a and c) or ECSOD (AdECSOD) (b and d) ( $5 \times 10^{11}$  viral particles per rat) ( $n = 4$  animals per group). (B) *Top*. Representative western blot of ECSOD in livers from cirrhotic (CH) rats transfected with Ad $\beta$ gal or AdECSOD. *Bottom*. Densitometry analysis of ECSOD expression in cirrhotic rat livers transfected with Ad $\beta$ gal ( $n = 4$ ) or AdECSOD ( $n = 6$ ) (normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); normalised arbitrary units (AU) (SEM). \* $p < 0.05$  vs CH Ad $\beta$ gal).

promoter/enhancer were used. One, expressing human extracellular SOD (AdECSOD) constructed by Dr Chu, was provided by the Vector Core at the University of Iowa, and the other, expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal), was provided by Dr CB Newgard (Duke University, Durham, North Carolina, USA). The viruses were propagated in the human embryonic kidney (HEK) 293 cell line. Purification and titres were determined using established protocols.<sup>19</sup> These ECSOD adenoviruses are capable of infecting and expressing enzymatically active SOD in endothelial cells.<sup>13</sup>

Gene transfer in vivo was performed in rats anaesthetised with isoflurane (Abbott, Madrid, Spain) (2–5%). The AdECSOD or the control virus, Ad $\beta$ gal ( $5 \times 10^{11}$  particles in 3% sucrose in

phosphate-buffered saline) were injected into the penile vein of control and cirrhotic animals and all studies were performed 3 days later. Three days after intravenous injection of AdECSOD ( $5 \times 10^{11}$  particles), plasma alanine aminotransferase was not modified and no gross changes were revealed in the histological examination of the liver.<sup>14</sup>

#### ECSOD protein expression

To confirm the expression of human ECSOD in transfected livers, immunohistochemistry and western blot for ECSOD were performed.

Immunohistochemistry was performed in paraffin-embedded liver sections (8  $\mu$ m thick) from control and cirrhotic rats, after transfection with AdECSOD or Ad $\beta$ gal, as previously described ( $n = 4$  animals per group).<sup>14</sup> Immunohistochemistry was performed using a polyclonal rabbit anti-human ECSOD antibody that specifically recognises human ECSOD (1:500, 4°C, overnight), which was a generous gift from Professor JD Crapo (National Jewish Medical Research Center, Denver, Colorado, USA), followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat-anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (1:200). Binding was visualised using 3',3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako, Carpinteria, California, USA) and 0.01%  $H_2O_2$  as the chromogen. For the negative control, phosphate-buffered saline was used instead of the primary antibody. All sections were air dried, counter-stained with haematoxylin and examined by light microscopy using a  $\times 10$  objective (Axiovert 135; Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Immunoreactivity for human ECSOD was quantified with an image-analysis system (AxioVision Release 4.6.3; Carl Zeiss) that allows a semiquantitative grading from 0 to 3 (0, minimal staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining). Preparations were blindly assessed by the same investigator (BL).<sup>19</sup>

Western blot was performed in frozen liver samples from cirrhotic rats transfected with AdECSOD ( $n = 6$ ) or Ad $\beta$ gal ( $n = 4$ ). Samples were crushed to a powder and subsequently homogenised in Triton-lysis buffer as previously described.<sup>20</sup>

Aliquots from each sample containing equal amounts of protein (20  $\mu$ g) were run on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. After transfer, the blots were subsequently blocked for 1 h with Tris-buffered saline containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 and 5% (wt/vol) nonfat dry milk and probed with a rabbit anti-extracellular SOD (1  $\mu$ g/ml) antibody (ECSOD; Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada) overnight at 4°C followed by incubation with anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (1:10 000, 1 h, room temperature; Stressgen).

Protein expression was determined by densitometric analysis using the Science Lab Image Gauge (Fuji Photo Film, Düsseldorf,

**Table 1** Semiquantitative data of extracellular superoxide dismutase immunohistochemistry studies

Group	Score				Staging score
	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
CT Ad $\beta$ gal	100	0	0	0	0
CT AdECSOD	0	0	30	70	2.7 (0.15)*
CH Ad $\beta$ gal	0	0	0	0	0
CH AdECSOD	0	0	70	30	2.3 (0.15)†

Data are mean (SEM).  $n = 4$  animals per group.

\* $p < 0.05$  vs CTAd $\beta$ gal; † $p < 0.05$  vs CHAd $\beta$ gal.

AdECSOD, adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase; Ad $\beta$ gal, adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase; CH, cirrhotic rats; CT, control rats.

Germany). After stripping, blots were assayed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) expression as standardisation of sample loading. Quantitative densitometric values of all proteins were normalised to GAPDH.

#### Measurement of $O_2^-$ content in liver tissue

The generation of  $O_2^-$  in situ was evaluated in fresh liver cryosections taken from nine cirrhotic livers (three transfected with AdECsOD, three with Ad $\beta$ gal or three treated with vehicle (3% sucrose in phosphate-buffered saline) and three control livers with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Ten fields for each animal, using a  $\times 40$  objective, were chosen at random and quantified as previously described.<sup>9</sup> DHE specifically reacts with intracellular and extracellular  $O_2^-$  and is converted to the red fluorescent compound ethidium bromide (EtBr), which then binds irreversibly to double-stranded DNA and appears as punctate nuclear staining.

#### Nitric oxide bioavailability

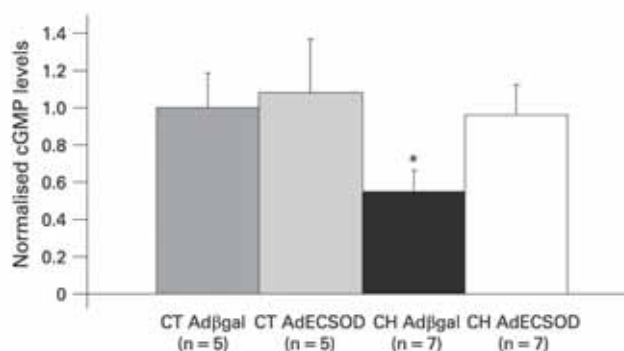
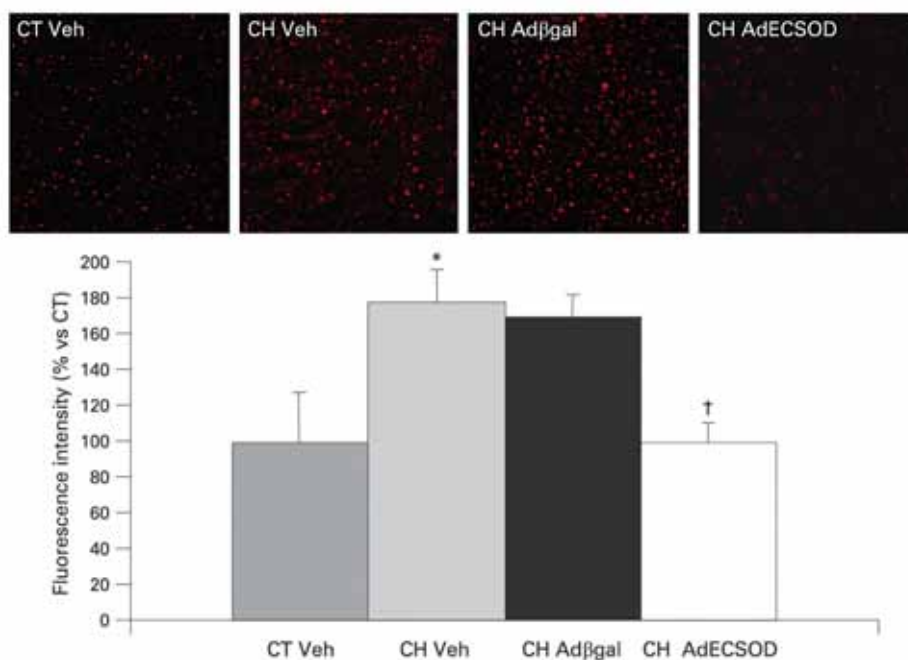
Measurements of cGMP, a marker of NO bioavailability, were performed in control (n = 5 per group) and cirrhotic (n = 7 per group) rat liver homogenates transfected with AdECsOD or Ad $\beta$ gal using an enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), as previously described.<sup>20</sup>

#### Nitrotyrosine protein detection

Immunohistochemistry for nitrotyrosine (NT) was performed in paraffin-embedded liver sections (8  $\mu$ m thick) from cirrhotic rats, transfected with AdECsOD (n = 3) or Ad $\beta$ gal (n = 3), using a polyclonal rabbit anti-nitrotyrosine antibody (Upstate, Lake Placid, New York, USA) (1:100 dilution), as described above. A semiquantitative analysis was performed as previously described.

In addition, in cirrhotic rat livers transfected with AdECsOD (n = 4) or Ad $\beta$ gal (n = 4) protein nitrotyrosination was

**Figure 2** (A) Representative confocal fluorescence microscopy images of in situ detection of superoxide with the oxidative dye dihydroethidium (DHE) in fresh liver sections from control (CT) and cirrhotic (CH) rats 3 days after adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECsOD), adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) transfection or vehicle (Veh). (B) DHE fluorescence intensity (% vs CT Veh) of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs CT Veh; † $p < 0.05$  vs CH Ad $\beta$ gal.



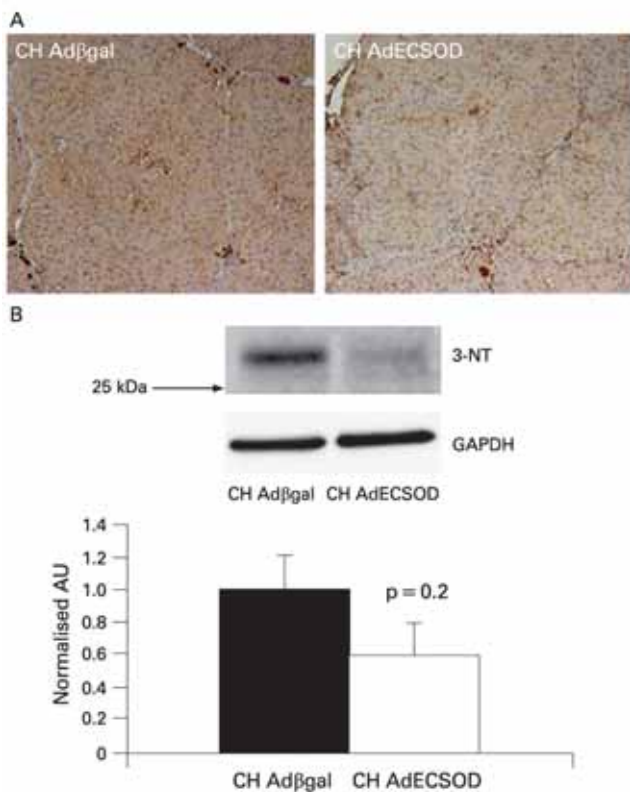
**Figure 3** Intrahepatic cGMP levels in control (CT) and cirrhotic (CH) rats transfected with adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) or adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECsOD). Data are expressed as normalised mean (SEM). \* $p < 0.05$  vs CT Ad $\beta$ gal.

determined by western blot using a mouse anti-nitrotyrosine (1  $\mu$ g/ml) antibody (Cayman Chemical) as previously described.<sup>9</sup>

After stripping, blots were assayed for GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) expression as standardisation of sample loading. Quantitative densitometric values of all proteins were normalised to GAPDH.

#### Effects on portal perfusion pressure and superoxide levels promoted by the superoxide generating system NADPH/NADPH oxidase in control rat livers

Control livers transfected with Ad $\beta$ gal (n = 5) or AdECsOD (n = 7) were isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as previously described.<sup>17</sup> Briefly, livers were perfused with Krebs buffer in a recirculation fashion with a total volume of 100 ml at a constant flow rate of 35 ml/min with an ultrasonic flow probe (T201; Transonic System, Ithaca, New York, USA). A pressure transducer was placed immediately



**Figure 4** (A) Representative histological images of liver tissues immunostained for nitrotyrosine from cirrhotic (CH) rats transfected with adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) or adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECSOD) (three different animals for each treatment). (B) *Top*. Representative western blot of nitrotyrosinated proteins (3-NT) of livers from cirrhotic (CH) rats transfected with Ad $\beta$ gal or AdECSOD. *Bottom*. Densitometry analysis of nitrotyrosinated proteins in cirrhotic rat livers transfected with Ad $\beta$ gal ( $n = 4$ ) or AdECSOD ( $n = 4$ ) (normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); normalised arbitrary units (AU) (SEM)).

before the portal inlet cannula to continuously monitor portal flow and portal perfusion pressure. The flow probe and the pressure transducers were connected to a Powerlab (4SP) linked to a computer using the Chart v5.0.1 for Windows software (ADInstruments, Mountain View, Louisiana, USA).

The perfused rat liver preparation was allowed to stabilise for 20 min before nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH 100 mmol/l; Applichem, Darmstadt, Germany), the substrate of NADPH oxidase, or its vehicle (Krebs buffer) was added. The gross appearance of the liver, portal perfusion pressure, and buffer pH (7.4 (SD 0.1)) were observed during this period. Responses to NADPH were calculated as a per cent change in portal perfusion pressure.

Measurements of  $O_2^-$  in liver tissue were evaluated as described above in two independent experiments.

#### Splanchnic and systemic in vivo haemodynamics of control and cirrhotic rats

Control ( $n = 6$ ) and cirrhotic ( $n = 10$ ) rats were anaesthetised with ketamine hydrochloride (100 mg/kg intraperitoneally; Merial Laboratories, Barcelona, Spain) plus midazolam (5 mg/kg intramuscularly; Laboratorios Reig Jofré, Barcelona, Spain). The temperature was maintained at 37 (SD 0.5) $^{\circ}$ C. A tracheotomy was performed to maintain adequate ventilation.

**Table 2** Semiquantitative data of nitrotyrosine immunohistochemistry studies

Group	Score				Staging score
	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
CH Ad $\beta$ gal	0	25.00	33.33	41.67	2.17 (0.24)
CH AdECSOD	0	66.67	33.33	0	1.33 (0.14)*

Data are mean (SEM).  $n = 4$  animals per group.

\* $p < 0.05$  vs CH Ad $\beta$ gal.

Ad $\beta$ gal, adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase; AdECSOD, adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase; CH, cirrhotic rats.

The femoral artery and ileocolic vein were cannulated to continuously monitor mean arterial pressure (MAP; mm Hg) and portal pressure (mm Hg). Measurements were taken after 20 min of stabilisation.

#### Evaluation of endothelial function in control and cirrhotic perfused rat livers

After haemodynamic measurements in vivo, livers were quickly isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as described above. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilise for 20 min before vasoactive substances were added. The intrahepatic microcirculation was precontracted by adding the  $\alpha_1$ -adrenergic agonist methoxamine (Sigma, St Louis, Missouri, USA) to the reservoir to achieve a final concentration of  $10^{-4}$  mol/l. After 5 min, concentration–response curves to cumulative doses of acetylcholine,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  mol/l (Sigma), were evaluated. The concentration of acetylcholine was increased by one log unit every 1.5 min interval. Responses to acetylcholine were calculated as per cent change in portal perfusion pressure, as previously described.<sup>22</sup>

#### Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS 14.0 for Windows statistical package. All results are expressed as mean (SD) unless otherwise specified in the figure legends. Comparisons between two groups were performed with the Student *t* test for unpaired data. The ANOVA test for repeated measurements was used when appropriate. Significance was established at the 0.05 level.

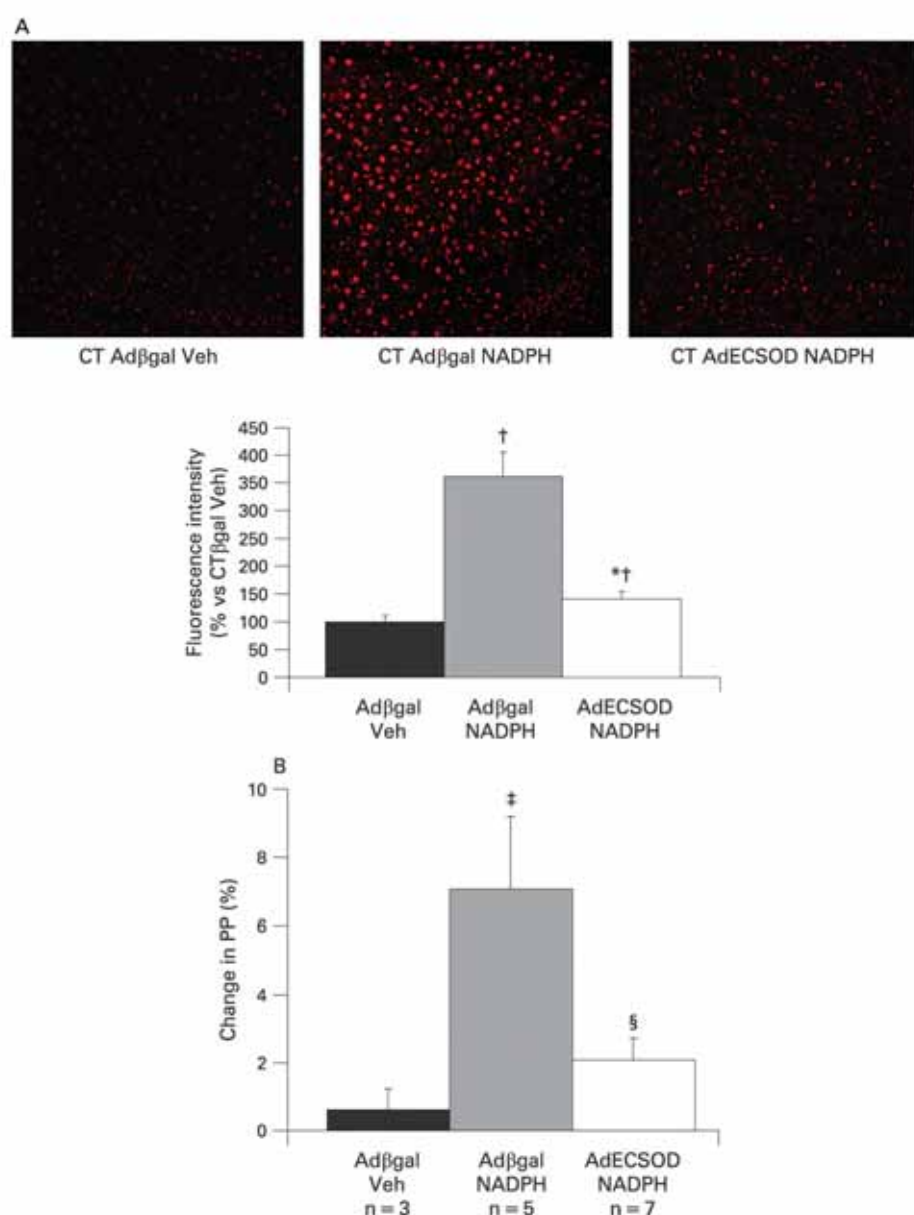
## RESULTS

#### Effect of ECSOD gene transfer on $O_2^-$ levels and NO bioavailability in rat livers

Control and cirrhotic rat livers transfected with AdECSOD effectively expressed human ECSOD, as shown by semiquantitative analysis of ECSOD immunostainings (fig 1A and table 1) and western blot (fig 1B) in comparison to control and cirrhotic rat livers transfected with Ad $\beta$ gal.

Superoxide levels were significantly higher in cirrhotic rat livers than in control rat livers (fig 2). AdECSOD, but not Ad $\beta$ gal, transfection produced a marked and significant reduction of  $O_2^-$  levels in cirrhotic rat livers to a point that was similar to those found in control livers (fig 2). cGMP levels, a surrogate marker of NO bioavailability, were significantly lower in cirrhotic than in control livers (fig 3). cGMP content did not change after AdECSOD transfection in the control livers but significantly increased in those cirrhotic rat livers transfected with AdECSOD. In addition, in cirrhotic rat livers AdECSOD transfection produced a reduction of nitrotyrosinated proteins, as shown by semiquantitative analysis of nitrotyrosine immunostaining (fig 4A and table 2) and western blot analysis (fig 4B).

**Figure 5** (A) *Top*. Representative confocal fluorescent microscopy images of in situ detection of  $O_2^-$  with dihydroethidium (DHE) in fresh liver sections from control (CT) rats transfected with adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECSOD) or adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) in response to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) or its vehicle (Veh). *Bottom*. DHE fluorescence intensity (% vs CT Ad $\beta$ gal Veh). ( $\dagger p < 0.05$  vs CT Ad $\beta$ gal Veh;  $* p < 0.05$  vs CT Ad $\beta$ gal NADPH). (B) Portal perfusion pressure change (PP) after NADPH or its vehicle, in control (CT) rats transfected with Ad $\beta$ gal ( $n = 5$ ) or AdECSOD ( $n = 7$ ). Results are expressed as mean (SEM). ( $\dagger p < 0.05$  vs CT Ad $\beta$ gal Veh;  $\S p < 0.05$  vs CT Ad $\beta$ gal NADPH).



#### Effects on portal perfusion pressure and superoxide levels promoted by the superoxide generating system NADPH/NADPH oxidase in control rat livers transfected with AdECSOD

NADPH produced a significant increase in hepatic  $O_2^-$  levels and in portal perfusion pressure (7 (SD 5)% vs 0.6 (SD 0.8)% increase,  $p < 0.05$ ) in control rats transfected with Ad $\beta$ gal in comparison to those treated with vehicle. AdECSOD transfection attenuated both the increase in hepatic  $O_2^-$  levels and the elevation of portal perfusion pressure produced by NADPH (2 (SD 2)% increase in portal perfusion pressure,  $p < 0.05$  vs Ad $\beta$ gal+NADPH) (fig 5B).

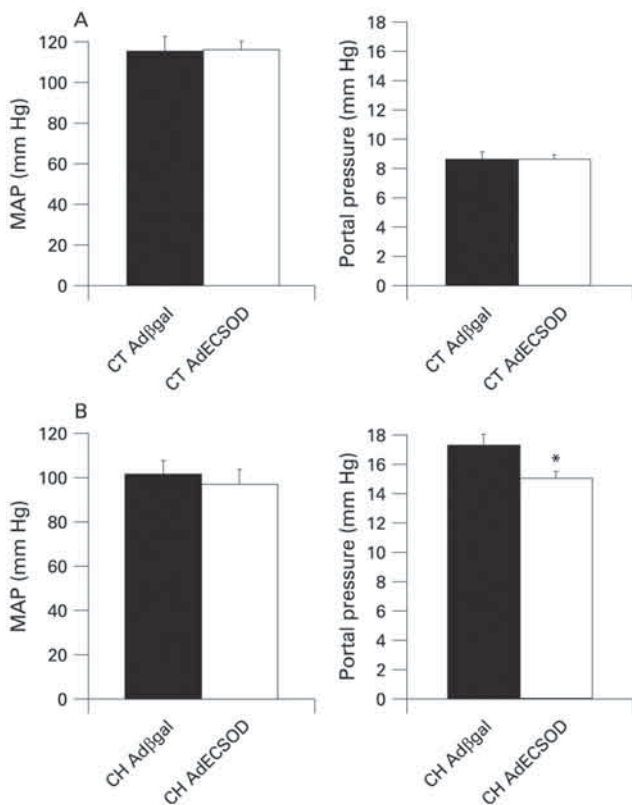
#### Effects of ECSOD gene transfer on portal pressure in control and cirrhotic rats

The cirrhotic rats transfected with Ad $\beta$ gal showed arterial hypotension and portal hypertension when compared with those control rats transfected with Ad $\beta$ gal.

MAP or portal pressure was not significantly different in control rats transfected with AdECSOD or Ad $\beta$ gal (fig 6A). However, in contrast, cirrhotic rats transfected with AdECSOD had significantly lower portal pressure than those transfected with Ad $\beta$ gal (15 (SD 1.6) mm Hg vs 17.3 (SD 2) mm Hg;  $p < 0.05$ ), without significant differences in MAP (97 (SD 17) mm Hg vs 102 (SD 15) mm Hg; not significant) (fig 6B).

#### Effect of ECSOD gene transfer on endothelial function in rat livers

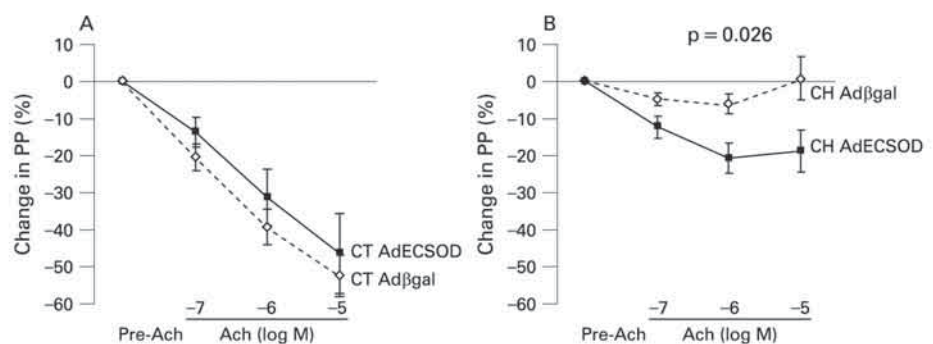
To further characterise the effects of AdECSOD transfection on the liver vasculature, control and cirrhotic rat livers transfected with AdECSOD or Ad $\beta$ gal were isolated and perfused. Baseline portal perfusion pressure was significantly greater in Ad $\beta$ gal cirrhotic rat livers than in Ad $\beta$ gal control rat livers (10.9 (SD 2.3) vs 4.8 (SD 1.1) mm Hg;  $p < 0.0001$ ). In addition, in accordance with results obtained from previous studies,<sup>4,22</sup>



**Figure 6** Mean arterial pressure (MAP) and portal pressure (PP) in (A), control (CT) ( $n = 6$ ) and (B) cirrhotic (CH) ( $n = 10$ ) rats 3 days after transfection with adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal) or adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECSOD). Results are expressed as mean (SEM). \* $p < 0.05$  vs Ad $\beta$ gal.

Ad $\beta$ gal cirrhotic livers exhibited a significantly higher portal perfusion pressure response to methoxamine (20.9 (SD 3) vs 10.1 (SD 3.8) mm Hg;  $p < 0.001$ ) and a lower vasodilator response to acetylcholine than Ad $\beta$ gal control livers (fig 7). In the control livers, AdECSOD transfection did not significantly modify the portal perfusion pressure response to methoxamine or the vasodilator response to acetylcholine (fig 7A). However, in cirrhotic livers, AdECSOD transfection reduced the portal perfusion pressure response to methoxamine (18.3 (SD 3) vs 20.9 (SD 3) mm Hg in Ad $\beta$ gal cirrhotic livers;  $p = 0.06$ ) and significantly improved the vasodilatory response to acetylcholine (fig 7B).

**Figure 7** Vasorelaxation to acetylcholine (ACh) in (A) control (CT,  $n = 6$ ) or (B) cirrhotic (CH,  $n = 10$ ) rat livers 3 days after adenoviral infection with adenoviral vectors expressing extracellular superoxide dismutase (AdECSOD) or adenoviral vectors expressing  $\beta$ -galactosidase (Ad $\beta$ gal). Results are expressed as mean (SEM). PP, portal pressure.



## DISCUSSION

In cirrhosis, increased resistance to portal blood flow is determined by structural changes in the liver and is further aggravated by an increase in hepatic vascular tone.<sup>1, 23</sup> This latter component, which results from the reduction of hepatic NO bioavailability<sup>4, 24</sup> and an increased production of circulating and local vasoconstrictors,<sup>25-28</sup> is theoretically amenable to treatment with vasodilators.<sup>29</sup>

Attempts to correct the intrahepatic NO deficiency have been based on either over-expressing NOS by transfecting the liver with adenovirus encoding eNOS,<sup>30, 31</sup> nNOS,<sup>32</sup> or constitutively active Akt,<sup>33</sup> by administration of NO donors,<sup>34, 35</sup> or by enhancing eNOS activity by simvastatin (a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitor)<sup>20, 36</sup> or by the eNOS co-factor tetrahydrobiopterin.<sup>6</sup> These strategies, which effectively increased NO production, have been shown to be associated, in most cases, with a slight reduction in portal pressure. This paradox may, at least in part, be due to the fact that the increased ROS levels observed in cirrhotic livers could lead to NO inactivation attenuating the efficacy of those strategies aimed at increasing NO synthesis.<sup>8-10</sup>

For this reason, the goal of the present study was to pursue the strategy of increasing NO bioavailability not by increasing its production but by reducing its scavenging by  $O_2^-$ . The local concentration of SOD is a determinant of  $O_2^-$  and therefore we tested the hypothesis that, by increasing dismutation of  $O_2^-$  by SOD, NO bioavailability could be increased by reducing  $O_2^-$  levels.

We used the gene transfer approach, using recombinant replication-deficient adenovirus vectors carrying the human ECSOD gene, in order to reduce  $O_2^-$  levels because gene transfer causes stable expression of protective enzymes and proteins.<sup>37</sup> Human ECSOD protein was used because it is tetrameric and glycosylated<sup>38</sup> and thus it has a longer plasma half-life than intracellular CuZnSOD. In addition, ECSOD contains a positively charged heparin-binding domain, which aids the binding of ECSOD to heparin sulfate proteoglycans on the cell surface and in the extracellular matrix. ECSOD in these extracellular locations is highly effective in preventing the scavenging of NO when it diffuses from sinusoidal endothelial cells to hepatic stellate cells.<sup>39</sup> One possible concern of our approach could be the accumulation of hydrogen peroxide, which can act as a vasoconstrictor.<sup>40</sup> However, the results of the present study support the hypothesis that, once produced, hydrogen peroxide is rapidly decomposed to water and oxygen by the action of catalase, an enzyme mostly produced in the liver and which constitutes 0.5-1% of the total protein in this organ.<sup>41</sup>



Cirrhotic rat livers showed an increased  $O_2^-$  content in comparison to control rat livers. Superoxide levels were similar in cirrhotic rats livers treated with vehicle or transfected with Ad $\beta$ gal, discarding a significant effect of adenoviral transfection increasing hepatic  $O_2^-$  per se.

As shown by immunohistochemical and western blot analysis, intravenous administration of AdECSOD resulted in effective transgene expression either in control or cirrhotic rat livers. This resulted in a marked reduction in  $O_2^-$  and enhanced NO bioavailability in cirrhotic livers which were then associated with a reduction in intrahepatic nitrotyrosinated proteins, a well recognised marker of the reaction of  $O_2^-$  with NO. For the first time, these findings support, in vivo, the concept that reducing increased hepatic  $O_2^-$  levels in cirrhosis can improve hepatic NO bioavailability, which has recently been demonstrated in vitro.<sup>6</sup>

In accordance with the working hypothesis, increasing NO bioavailability by AdECSOD transfection improved the impaired vasorelaxation to the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine observed in cirrhotic rat livers and, more importantly, promoted a significant reduction of portal pressure in vivo. Reduction in portal pressure was probably due to the improvement of the hepatic vascular bed to vasodilatory stimuli and the attenuation of the hyper-response to vasoconstrictors. However, we can not completely discard the suggestion that a possible reduction in portal blood flow could also contribute. It is important to note that AdECSOD transfection did not modify MAP, and this may be the result of a relatively targeted effect of SOD on the liver microcirculation. This would be a theoretical advantage over other non-selective strategies aimed at increasing NO bioavailability, which may produce deleterious effects worsening the hyperdynamic syndrome found in cirrhosis.<sup>42</sup> This possibility seems reasonable because previous studies in rodents have shown that approximately 90% of the adenoviral vector is localised in the liver, both in animals with normal liver function<sup>43</sup> and in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhotic rats. Although transduction efficiency is reduced in cirrhosis, expression is nevertheless of high magnitude,<sup>44,45</sup> and the liver is still the main adenoviral target.<sup>46</sup>

Reduction in portal pressure averaged 13.3% on magnitude. This is similar to that observed in other studies aimed at reducing portal pressure in cirrhotic rats through other strategies, such as the administration of non-selective beta-blockers.<sup>47</sup>

In conclusion, this study provides evidence, for the first time in vivo, that decreasing hepatic  $O_2^-$  levels by increasing SOD activity (ie, an antioxidant treatment) may represent an effective strategy to improve NO bioavailability within the liver and therefore, strongly supports the possibility that antioxidant therapy might be an attractive proposition to treat portal hypertension in cirrhosis.

**Acknowledgements:** The authors thank Dr R Gasa and Dr Morales-Ruiz for skilful technical assistance in adenovirus amplification and purification; H García for technical help with cGMP measurements and superoxide detection; and C Millán and M Monclús for technical assistance with liver immunohistochemistry.

**Funding:** BL has a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (BES 05/10638). This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07/61298) and Instituto de Salud Carlos III (PI 06/0623). Ciberehd is funded by Instituto de Salud Carlos III.

**Competing interests:** None.

**Ethics approval:** All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona, and were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, NIH publication 86-23, revised 1985).

## REFERENCES

- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;**32**(1 Suppl):141-56.
- Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;**47**:220-7.
- Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;**284**:G567-74.
- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, et al. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;**28**:926-31.
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;**114**:344-51.
- Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl<sub>4</sub> cirrhosis. *Hepatology* 2006;**44**:44-52.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;**117**:1222-8.
- Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;**47**:1248-56.
- Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2007;**46**:193-7.
- Van de Casteele M, Van Pelt JF, Nevens F, et al. Low NO bioavailability in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003;**2**:2.
- Li QH, Bolli R, Qiu YM, et al. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation* 2001;**103**:1893-8.
- Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, et al. Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 2003;**76**:28-37.
- Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, et al. Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther* 2002;**9**:110-7.
- Chu Y, Iida S, Lund DD, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res* 2003;**92**:461-8.
- Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, et al. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**:2516-23.
- Brown KA, Chu Y, Lund DD, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**290**:2600-5.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, et al. 5-Lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: A possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;**122**:387-93.
- Chu Y, Heistad DD. Gene transfer to blood vessels using adenoviral vectors. *Methods Enzymol* 2002;**346**:263-76.
- Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut* 1999;**45**:199-209.
- Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;**46**:1040-6.
- Peshvariya HM, Dusting GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic Res* 2007;**41**:699-712.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;**39**:515-21.
- Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol* 2005;**39**(4 Suppl 2):S131-7.
- Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, et al. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;**267**(3 Pt 1):G416-22.
- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;**118**:1149-56.
- Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996;**24**:233-40.
- Titos E, Claria J, Bataller R, et al. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* 2000;**119**:794-805.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;**37**:172-81.
- Garcia-Pagan JC, Bosch J. The resistance of the cirrhotic liver: a new target for the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2004;**40**:887-90.

30. **Van de Castele M**, Omasta A, Janssens S, *et al*. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;**51**:440–5.
31. **Shah V**, Chen AF, Cao S, *et al*. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;**279**:G1023–30.
32. **Yu Q**, Shao R, Qian HS, *et al*. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;**105**:741–8.
33. **Morales-Ruiz M**, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, *et al*. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;**125**:522–31.
34. **Fiorucci S**, Antonelli E, Morelli O, *et al*. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:8897–902.
35. **Loureiro-Silva MR**, Cadelina GW, Iwakiri Y, *et al*. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003;**39**:940–6.
36. **Zafra C**, Abralde JG, Turnes J, *et al*. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004;**126**:749–55.
37. **Fujimoto J**, Kaneda Y. Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Ther* 1999;**6**:305–6.
38. **Omar BA**, Flores SC, McCord JM. Superoxide dismutase: pharmacological developments and applications. *Adv Pharmacol* 1992;**23**:109–61.
39. **Kmiec Z**. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;**161**:III–XIII, 1–151.
40. **Rodríguez-Martínez MA**, García-Cohen EC, Baena AB, *et al*. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998;**125**:1329–35.
41. **Higashi T**, Peters T Jr. Studies on rat liver catalase. i. combined immunochemical and enzymatic determination of catalase in liver cell fractions. *J Biol Chem* 1963;**238**:3945–51.
42. **Van de Castele M**, Hosli M, Sagesser H, *et al*. Intraportal administration of glyceryl trinitrate or nitroprusside exerts more systemic than intrahepatic effects in anaesthetised cirrhotic rats. *J Hepatol* 1999;**31**:300–5.
43. **Drazan KE**, Csete ME, Da S X, *et al*. Hepatic function is preserved following liver-directed, adenovirus-mediated gene transfer. *J Surg Res* 1995;**59**:299–304.
44. **Yu Q**, Que LG, Rockey DC. Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal cells in normal and injured liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**282**:G565–72.
45. **Nakamura T**, Akiyoshi H, Saito I, *et al*. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 1999;**30**:101–6.
46. **García-Banuelos J**, Siller-Lopez F, Miranda A, *et al*. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;**9**:127–34.
47. **Pizcueta MP**, de Lacy AM, Kravetz D, *et al*. Propranolol decreases portal pressure without changing portocollateral resistance in cirrhotic rats. *Hepatology* 1989;**10**:953–7.



# Resum de resultats

### 4.1. Article 1: Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduce nitric oxide bioavailability.

- Les CES procedents de rates cirròtiques presenten menors nivells d'ON, mesurats de manera directa, utilitzant marcatge amb DAF-FM i microscòpia confocal, que les CES procedents de rates controls. Tot i això, no s'observen diferències en els nivells proteics d'eNOS en CES procedents de fetges cirròtics respecte les de fetges controls. La disminució en la biodisponibilitat d'ON dels fetges cirròtics es confirma amb la presència de menor quantitat de cGMP, marcador de la biodisponibilitat d'ON, en comparació amb els fetges controls.
- La quantitat d'estrès oxidatiu, mesurant els nivells de radical  $O_2^-$  mitjançant tinció amb DHE, en els fetges de rates cirròtiques és marcada i significativament superior al present en fetges de rates controls. Dues de les possibles fonts d'aquest augment de radicals  $O_2^-$  són els enzims COX i XO, ja que la inhibició de la seva activitat enzimàtica va acompanyada d'una reducció en els nivells d' $O_2^-$  en fetges cirròtics.
- L'activitat de la SOD, l'enzim principal encarregat de la degradació d' $O_2^-$ , es troba significativament disminuïda en els fetges cirròtics respecte els controls, probablement per una disminució en l'expressió proteica de les isoformes citoplasmàtica i mitocondrial de la SOD.
- El marcador per excel·lència de la reacció entre el radical  $O_2^-$  i l'ON, la nitrotirosinació proteica, un marcador de la formació d' $ONOO^-$ , es troba significativament augmentat en els fetges cirròtics comparant-los amb els controls.
- La inhibició farmacològica de la SOD mitjançant dietilditiocarbamat (DDC) en CES aïllades de rates control induïx un augment significatiu dels nivells intracel·lulars d' $O_2^-$  que s'acompanya marcada reducció en la biodisponibilitat d'ON. Aquests dos fets són corregits si les cèl·lules són suplementades exògenament amb SOD, demostrant l'íntima i alhora oposada relació entre els nivells d' $O_2^-$  i d'ON.
- De forma semblant, la sobreexpressió de SOD mitjançant la transfecció gènica amb adenovirus codificant per SOD extracel·lular (AdecSOD), en cèl·lules endotelials d'aorta bovina (BAEC) dona lloc a una menor generació d' $O_2^-$  induïda per paraquat i aquest fet s'associa a un augment significatiu de la biodisponibilitat d'ON en comparació amb cèl·lules transfectades amb l'adenovirus control  $\beta$ -galactosidasa (Ad $\beta$ gal).

#### 4.2. Article 2: Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats with portal hypertension.

- Els fetges de rates controls i cirròtiques transfectades amb l'AdecSOD sobreexpressen de manera efectiva ecSOD.
- La transfecció amb l'AdecSOD, però no amb l'Adβgal, produeix una disminució marcada i significativa dels nivells d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en fetges cirròtics, que arriben als nivells observats en fetges de rates control.
- Els nivells de cGMP, un marcador de biodisponibilitat d'ON, en fetges de rates controls no es modifiquen després de la transfecció amb AdecSOD, però augmenten de manera significativa en fetges de rates cirròtiques transfectades amb AdecSOD.
- La nitrotirosinació proteica, marcador de la reacció entre el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> i l'ON, es troba significativament disminuïda en els fetges cirròtics de rates transfectades amb AdecSOD comparant-los amb les transfectades amb l'Adβgal.
- La producció de ROS mitjançant un sistema generador d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, com la NADPH, produeix un augment significatiu dels nivells hepàtics d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> i de la pressió portal de perfusió en rates controls transfectades amb Adβgal en comparació amb les rates transfectades amb Adβgal i tractades amb vehicle. L'AdecSOD atenua tant l'augment dels nivells hepàtics d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, com l'augment de la pressió portal de perfusió produïda per la NADPH.
- La pressió arterial mitjana (PAM) i la pressió portal no presenten diferències significatives en rates control transfectades amb Adβgal o AdecSOD.
- Les rates cirròtiques transfectades amb AdecSOD presenten una disminució significativa de la pressió portal sense canvis significatius en la PAM respecte a les rates cirròtiques transfectades amb Adβgal.
- Els fetges de les rates cirròtiques transfectades amb Adβgal tenen una pressió de perfusió basal significativament superior a les rates controls. A més a més, presenten hiperresposta a l'agonista adrenèrgic α<sub>1</sub>-metoxamina (Mtx) i una menor resposta vasodilatadora a acetilcolina (Ach). La transfecció d'AdecSOD a rates cirròtiques redueix la hiperresposta a Mtx i millora significativament la resposta vasodilatadora a Ach.



# Discussió



La hipertensió portal és la complicació més important d'una gran varietat de malalties hepàtiques agudes i cròniques entre les quals la cirrosi és la més freqüent. L'impacte de les seves complicacions, entre les quals podem trobar el dessagnament per varices esofàgiques, l'ascites, la disfunció renal i l'encefalopatia, fa que aquesta síndrome sigui la principal causa de mort i transplantament hepàtic en pacients amb cirrosi hepàtica.

El factor primari que porta al desenvolupament d'hipertensió portal és l'augment de resistència vascular intrahepàtica i els últims avenços en el coneixement de la fisiopatologia de la malaltia indiquen aquest factor com a diana per a una de les teràpies més prometedores. L'augment de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi té dues causes: primerament, una distorsió en l'arquitectura vascular del fetge a causa del transcurs de la pròpia malaltia; i, en segon lloc, un component dinàmic secundari a la contracció de diferents estructures contràctils de localització sinusoïdal i extrasinusoïdal, principalment CHE, resultat del desequilibri entre forces vasoconstrictores i vasodilatadores intrahepàtiques.

El fet que aquest component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica sigui reversible i, per tant, potencialment manipulable, ha constituït la base racional per al tractament farmacològic de la hipertensió portal (1).

Un dels mecanismes fisiopatològics involucrats en l'augment dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica dels fetges cirròtics és un dèficit d'ON. Per això, un increment selectiu a nivell intrahepàtic de la biodisponibilitat d'ON constitueix una opció terapèutica per tal d'actuar sobre l'augment de resistència vascular intrahepàtica. En aquest sentit s'han utilitzats diverses estratègies, entre les quals trobem la transferència gènica del fetge amb adenovirus que contenen la nNOS o l'eNOS (53;54) o Akt constitutivament activa (40); l'administració de donants selectius d'ON (49) i, més recentment, augmentant la síntesi d'ON mitjançant el tractament amb estatines (55;56) o amb el cofactor de l'eNOS, BH<sub>4</sub> (46;47). Aquestes estratègies, que augmenten la producció d'ON d'una manera efectiva, s'han associat en la majoria de casos a una reducció lleu de la pressió portal. Aquesta paradoxa podria ser explicada, en part, a causa del fet que el possible augment de ROS podria portar a la inactivació de l'ON, atenuant l'eficàcia d'aquestes estratègies dirigides a augmentar la síntesi d'ON.

Conseqüentment, els objectius dels treballs d'investigació aquí presentats van ser ampliar el coneixement entorn la possible implicació de l'estrès oxidatiu en la reduïda biodisponibilitat del vasodilatador intrahepàtic ON, així com avaluar el possible ús d'antioxidants com a nova teràpia per a millorar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON i contribuir així a la millora de la hipertensió portal a en la cirrosi.

Els resultats del primer estudi ens mostren que els fetges cirròtics presenten una baixa biodisponibilitat d'ON, determinada al quantificar el missatger secundari cGMP. A més, es demostra per primer cop, mitjançant microscòpia confocal, que les CES en cultiu primari aïllades de fetges cirròtics també presenten baixa biodisponibilitat d'ON, mitjançant la tinció amb DAF-FM, que permet la quantificació de baixes concentracions cel·lulars d'ON *in vivo*.

Aquesta disminució d'ON intrahepàtic es troba associada a un augment significatiu dels nivells d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Estudis previs han suggerit que, en el fetge cirròtic, existeix un elevat estrès oxidatiu (126;166), però aquest és el primer cop que emprant la tinció específica amb DHE es demostra que els fetges cirròtics presenten elevats nivells d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> comparant-los amb fetges sans.

D'acord amb els resultats d'un estudi previ (154), hem demostrat que els fetges cirròtics presenten una disminució en l'activitat enzimàtica de SOD respecte als fetges controls. Aquest fet podria representar una de les causes de l'augment dels nivells intrahepàtics d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> dels fetges cirròtics. No obstant, hem esbrinat per primera vegada, que la baixa activitat enzimàtica de SOD és conseqüència d'una disminució en l'expressió proteica de les isoformes citoplasmàtica i mitocondrial de la SOD.

A més d'una reducció en la seva eliminació, l'increment en l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> intrahepàtic també podria ser causat per un excés en la seva formació. Estudis recents han demostrat que el desacoblament de l'enzim eNOS, a conseqüència de deficiència de BH<sub>4</sub>, està involucrat en la reducció de la generació d'ON (46;47). L'eNOS desacoblada és capaç de produir O<sub>2</sub><sup>-</sup>, però els resultats del nostre estudi mostren que la inhibició selectiva d'aquest enzim no redueix els nivells intrahepàtics d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, indicant que l'eNOS no tindria una contribució significativa en l'augment de l'estrès oxidatiu existent en el fetge cirròtic. En canvi, els resultats de la marcada reducció en el contingut d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> quan s'inhibeixen els enzims COX o XO mitjançant els inhibidors Indometacina i Allopurinol respectivament, suggereixen que aquestes són fonts efectives d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> i requereixen, per tant, un estudi futur més profund. Recentment s'ha descartat que la NADPH oxidasa sigui una font potencial d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la cirrosi (129).

En l'àmbit cardiovascular, s'ha demostrat que un augment fisiopatològic d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> redueix la biodisponibilitat d'ON (100;101;167). La troballa d'una marcada nitrotirosinació proteica, marcador específic de la reacció d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> amb l'ON, ens demostra que aquest mecanisme de reducció dels nivells d'ON també succeeix en el fetge cirròtic. Addicionalment, la relació entre la presència d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> i la biodisponibilitat d'ON es demostra, més encara, amb els experiments realitzats en CES, on s'observa *in vivo*, que la biodisponibilitat d'ON és modulada per la presència d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. De fet, l'increment de radicals O<sub>2</sub><sup>-</sup> obtingut a l'inhibir selectivament la SOD mitjançant DDC (168), s'acompanya d'una reducció marcada en la biodisponibilitat d'ON. A més, la reducció dels nivells d'estrès oxidatiu a l'afegir exògenament SOD promou una recuperació parcial dels nivells d'ON intracel·lulars. Aquest fet també s'ha demostrat mitjançant una aproximació molecular utilitzant transfecció gènica amb adenovirus. Aquests experiments utilitzant cèl·lules BAEC mostren que aquelles cèl·lules transfectades amb l'AdecSOD mostren un menor augment d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> quan són tractades amb l'inductor d'estrès oxidatiu Paraquat (169) respecte les cèl·lules transfectades amb Adβgal i això s'acompanya del manteniment de la biodisponibilitat d'ON.

Els resultats d'aquest estudi evidencien la prova del concepte que, el segrest d'ON per part dels radicals O<sub>2</sub><sup>-</sup> podria ser un factor contribuent a la reducció de la biodisponibilitat d'ON, a la disfunció endotelial i, en conseqüència, a l'increment del to vascular intrahepàtic en la cirrosi.

El segon estudi representa un canvi important en les estratègies utilitzades fins al moment per a augmentar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON en la cirrosi, ja que no va dirigit a augmentar la producció d'ON sinó que va dirigit a reduir el seu segrest per part de  $\text{IO}_2^-$ .

Per a això, s'ha utilitzat la transferència gènica amb vectors adenovirals recombinants replicació-deficients portadors del gen ecSOD humà, per a reduir els nivells hepàtics d' $\text{O}_2^-$  ja que la transferència gènica permet l'expressió estable d'enzims i proteïnes (170). S'ha utilitzat la isoforma ecSOD ja que aquesta té una estructura tetramèrica, està glicosilada i, per tant, té una vida mitjana plasmàtica més llarga que la isoforma citoplasmàtica (CuZnSOD) (171). A més a més, l'ecSOD conté un domini d'unió a heparina (172), que permet la seva unió a proteoglicans de la matriu extracel·lular, essent, en aquesta localització, molt efectiva prevenint el segrest de l'ON quan aquest difon de les CES cap a les CHE (173).

Els resultats d'aquest estudi mostren que tres dies després de l'administració intravenosa (i.v) d'AdecSOD, s'observa una expressió efectiva del transgen tant en fetges de rates controls com cirròtiques i que la transferència gènica no augmenta per se els nivells hepàtics d' $\text{O}_2^-$ , descartant un possible efecte tòxic dels adenovirus.

També es van avaluar els efectes causats per un sistema generador d' $\text{O}_2^-$ , NADPH/NADPH oxidasa, en rates controls transfectades amb adenovirus, sobre la pressió portal de perfusió i sobre els nivells d' $\text{O}_2^-$ . L'AdecSOD va atenuar l'augment de pressió portal de perfusió i l'augment dels nivells intrahepàtics d' $\text{O}_2^-$ , confirmant així el seu efecte antioxidant i la contribució de l' $\text{O}_2^-$  sobre l'augment de la pressió portal de perfusió.

En rates cirròtiques, l'AdecSOD va produir una marcada reducció dels nivells intrahepàtics d' $\text{O}_2^-$  i un augment en la biodisponibilitat hepàtica d'ON. Aquests dos fets es van acompanyar d'una disminució en la nitro tirosinació de proteïnes hepàtiques, que representa un bon marcador de la reacció entre  $\text{O}_2^-$  i l'ON. Aquests resultats recolzen per primer cop *in vivo*, el concepte que, reduint els nivells hepàtics augmentats d' $\text{O}_2^-$  en la cirrosi, es pot millorar la biodisponibilitat hepàtica d'ON. L'augment de biodisponibilitat d'ON mitjançant la transfecció gènica amb l'AdecSOD va millorar la disfunció endotelial observada en els fetges de rates cirròtiques i, de manera encara més important, va promoure una reducció significativa de la pressió portal *in vivo*. La reducció de la pressió portal va ser causada, probablement, per la millora de la resposta enfront estímuls vasodilatadors i l'atenuació de la hiperresposta a vasoconstrictors del llit vascular hepàtic. Tot i això, no podem descartar completament que una possible reducció del flux portal també hagués pogut contribuir a la disminució de la pressió portal observada. Aquesta possibilitat, però, és molt petita, donat que l'efecte esperat d'un increment de la biodisponibilitat d'ON farà el contrari, i que no es van observar canvis en la PAM que permetin suggerir una vasoconstricció esplàncnica reflexa. També cal destacar el fet que la transfecció gènica amb l'AdecSOD no va modificar la PAM, i això podria ser el resultat d'un efecte relativament específic de l'ecSOD sobre la microcirculació hepàtica.

Aquest fet representaria un avantatge sobre altres estratègies no fetge-selectives dirigides a augmentar la biodisponibilitat d'ON, que produeixen efectes deleteris empitjorant la síndrome hiperdinàmica observada en la cirrosi, ja que augmenten la biodisponibilitat d'ON també en el territori esplàncnic, produint una important vasodilatació (48).

Aquesta possibilitat sembla raonable perquè estudis amb rosegadors han mostrat que els vectors adenovirals tenen un tropisme molt elevat pel fetge, ja que aproximadament el 90% del transgen es localitza en aquest òrgan tant a les cèl·lules parenquimals (hepatòcits) com a les no-parenquimals (cèl·lules de kupffer, CES, CHE). Cal destacar, però, que en rates cirròtiques l'eficàcia de la transfecció gènica amb adenovirus disminueix respecte les rates amb funció hepàtica normal, tot i que segueix sent de gran magnitud i el fetge segueix sent la diana principal (174-178).

Els resultats d'aquest estudi evidencien, per primer cop *in vivo*, que disminuir els nivells hepàtics d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitjançant un tractament antioxidant, en aquest cas augmentant l'activitat de la SOD, podria representar una estratègia efectiva per tal de millorar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON i, per tant, recolza la idea que les teràpies antioxidants podrien ser una alternativa interessant per a tractar la hipertensió portal en la cirrosi.



# Conclusions

## 6. Conclusions

- El fetge cirròtic presenta nivells elevats d'estrès oxidatiu.
- Les causes d'aquest augment d'estrès oxidatiu del fetge cirròtic podrien ser una disminució de la seva eliminació per part de l'enzim SOD i una elevada síntesi per part dels enzims COX i XO.
- El segrest d'ON per part de l' $O_2^-$ , donant lloc a la formació d' $ONOO^-$ , podria ser un determinant important que participaria en la disminució intrahepàtica d'ON observada en la cirrosi, que dóna lloc a disfunció endotelial i a un augment de to vascular hepàtic.
- Una teràpia antioxidant capaç de disminuir els nivells elevats d'estrès oxidatiu dels fetges cirròtics, contribueix a millorar: 1) la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON; 2) la disfunció endotelial (la vasodilatació endoteli-dependent); i 3) la hipertensió portal, produint un descens significatiu de la pressió portal *in vivo*.

Els resultats de la present tesi aporten evidències a favor del paper de l'estrès oxidatiu, modulant la biodisponibilitat d'ON i la circulació intrahepàtica en la cirrosi, i recolzen la teràpia amb antioxidants, com a nova estratègia terapèutica per a millorar la biodisponibilitat intrahepàtica d'ON i, per tant, atenuar l'elevat to vascular hepàtic en la cirrosi.

D'aquesta manera suggerim que en el futur seria interessant desenvolupar estudis que resolguin els mecanismes de reacció entre el radical  $O_2^-$  i l'ON en el fetge cirròtic, així com l'assaig d'antioxidants com a teràpia en la hipertensió portal.

# Altres publicacions



## 7. Altres publicacions

**7.1** - Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases perfusion portal pressure in cirrhotic rat livers.

Gracia-Sancho J, **Laviña B**, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Bosch J, García-Pagán JC.  
*Journal of Hepatology* 2007;47 (2): 220-227. IF: 6.642

**7.2** - Evidence against a role for NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis.

Gracia-Sancho J, **Laviña B**, Rodríguez-Vilarrupla A, Brandes RP, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC.  
*Gastroenterology* 2007;133 (3): 959-966. IF: 11.673

# Referències bibliogràfiques

## 7. Referències bibliogràfiques

- ① Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32(1 Suppl):141-156.
- ② Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21(1):1-14.
- ③ Groszmann RJ, Atterbury CE. The pathophysiology of portal hypertension: a basis for classification. *Semin Liver Dis* 1982; 2(3):177-186.
- ④ Navasa M, Pares A, Bruguera M, Caballeria J, Bosch J, Rodes J. Portal hypertension in primary biliary cirrhosis. Relationship with histological features. *J Hepatol* 1987; 5(3):292-298.
- ⑤ Iredale J. Recent developments in targeting liver fibrosis. *Clin Med* 2008; 8(1):29-31.
- ⑥ Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3:S84-S87.
- ⑦ Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46(4):443-446.
- ⑧ Bathal PS, Grossmann HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985; 1:325-329.
- ⑨ Marteau P, Ballet F, Chretien Y, Rey C, Jaillon P, Poupon R. Effect of vasodilators on hepatic microcirculation: a study of the inhibition of norepinephrine-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1988; 8(2):228-231.
- ⑩ Marteau P, Ballet F, Chazouilleres O, Chretien Y, Rey C, Petit D et al. Effect of vasodilators on hepatic microcirculation in cirrhosis: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 9(6):820-823.
- ⑪ Kaneda K, Ekataksin W, Sogawa M, Matsumura A, Cho A, Kawada N. Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction. *Hepatology* 1998; 27(3):735-747.
- ⑫ Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999; 19(4):397-410.
- ⑬ Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118(6):1149-1156.
- ⑭ Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999; 31(6):1120-1130.
- ⑮ Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110(2):534-548.

- 16 Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbic MN, Nicolas JM et al. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001; 33(4):956-962.
- 17 Sancho-Bru P, Bataller R, Gasull X, Colmenero J, Khurdayan V, Gual A et al. Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *Journal of Hepatology* 2005; 43(2):272-282.
- 18 Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213(2):815-823.
- 19 Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993; 92(4):1795-1804.
- 20 Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996; 24(1):233-240.
- 21 Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007; 47(2):220-227.
- 22 Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y et al. Carbon-Monoxide - An Endogenous Modulator of Sinusoidal Tone in the Perfused-Rat-Liver. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96(5):2431-2437.
- 23 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G et al. The third gas: H<sub>2</sub>S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42(3):539-548.
- 24 Ballet F, Chretien Y, Rey C, Poupon R. Differential response of normal and cirrhotic liver to vasoactive agents. A study in the isolated perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244(1):283-289.
- 25 Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J et al. 5-Lipoxygenase Inhibition Reduces Intrahepatic Vascular Resistance of Cirrhotic Rat Livers: A Possible Role of Cysteinyl-Leukotrienes. *Gastroenterology* 2002; 122(2):387-393.
- 26 Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abrales JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003; 37(1):172-181.
- 27 Bosch J, Arroyo V, Betriu A, Mas A, Carrilho F, Rivera F et al. Hepatic hemodynamics and the renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis. *Gastroenterology* 1980; 78(1):92-99.
- 28 Moller S, Gulberg V, Henriksen JH, Gerbes AL. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J Hepatol* 1995; 23(2):135-144.

- 29 Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28(4):926-931.
- 30 Kuddus RH, Nalesnik MA, Subbotin VM, Rao AS, Gandhi CR. Enhanced synthesis and reduced metabolism of endothelin-1 (ET-1) by hepatocytes--an important mechanism of increased endogenous levels of ET-1 in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33(5):725-732.
- 31 Grossman HJ, Grossman VL, Bhathal PS. Enhanced vasoconstrictor response of the isolated perfused cirrhotic rat liver to humoral vasoconstrictor substances found in portal venous blood. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7(3):283-287.
- 32 Elliot AJ, Vo LT, Grossman VL, Bhathal PS, Grossman HJ. Endothelin-induced vasoconstriction in isolated perfused liver preparations from normal and cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(4):314-318.
- 33 Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31(3):131-143.
- 34 Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2923-2930.
- 35 Pastor CM, Hadengue A. Shear stress modulates the vascular tone in perfused livers isolated from normal rats. *Hepatology* 2000; 32(4 Pt 1):786-791.
- 36 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-142.
- 37 Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35(2):478-491.
- 38 Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994; 267(3 Pt 1):G416-G422.
- 39 Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998; 114(2):344-351.
- 40 Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003; 125(2):522-531.
- 41 Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999; 117(5):1222-1228.
- 42 Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(3):818-824.

- 43 Liu S, Reynolds CR, Huang J, Rockey DC. The Role of Akt in sinusoidal endothelial cell production of nitric oxide: implications for the pathogenesis of portal hypertension. *Hepatology* 2002; 36(4):229A.
- 44 Hendrickson H, Chatterjee S, Cao S, Ruiz MM, Sessa WC, Shah V. Influence of caveolin on constitutively activated recombinant eNOS: insights into eNOS dysfunction in BDL rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(3):G652-G660.
- 45 Mookerjee RP, Wiesenthal A, Icking A, Hodges SJ, Davies NA, Schilling K et al. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132(7):2533-2541.
- 46 Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis. *Hepatology* 2006; 44(1):44-52.
- 47 Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J et al. Three-day tetrahydrobiopterin therapy increases in vivo hepatic NOS activity and reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol* 2008; 49(2):192-197.
- 48 Van de CM, Hosli M, Sagesser H, Reichen J. Intraportal administration of glyceryl trinitrate or nitroprusside exerts more systemic than intrahepatic effects in anaesthetised cirrhotic rats. *J Hepatol* 1999; 31(2):300-305.
- 49 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T et al. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15):8897-8902.
- 50 Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003; 39(6):940-946.
- 51 Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994; 20(5):1359-1363.
- 52 Battista S, Bar F, Mengozzi G, Zanon E, Grosso M, Molino G. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J Hepatol* 1997; 26(1):75-80.
- 53 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105(6):741-748.
- 54 Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L et al. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(5):G1023-G1030.
- 55 Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007; 46:1040-1046.

- 56 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(1):242-253.
- 57 Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 2008; 57(9):1300-1314.
- 58 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; 247(5 Pt 1):G486-G493.
- 59 Kravetz D, Bosch J, Arderiu MT, Pizcueta MP, Casamitjana R, Rivera F et al. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1988; 254(3 Pt 1):G322-G328.
- 60 Bruix J, Bosch J, Kravetz D, Mastai R, Rodes J. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1985; 88(2):430-435.
- 61 Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Mourelle MI, Pique JM, Bosch J et al. Acute and chronic cyclooxygenase blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996; 110(5):1529-1535.
- 62 Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *Hepatology* 1999; 29(6):1672-1679.
- 63 Pizcueta MP, Pique JM, Bosch J, Whittle BJ, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992; 105(1):184-190.
- 64 Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18(5):1139-1143.
- 65 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; 28(6):1467-1473.
- 66 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; 267(6 Pt 1):G984-G990.
- 67 Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piera C, Whittle BJ et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; 108(5):1487-1495.
- 68 Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, St John J et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996; 270(3 Pt 2):F494-F499.

- 69 Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 1991; 17(2):187-193.
- 70 Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999; 104(9):1223-1233.
- 71 Shah V, Wiest R, Garcia-Cardena G, Cadelina G, Groszmann RJ, Sessa WC. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol* 1999; 277(2 Pt 1):G463-G468.
- 72 Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ et al. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(6):H2084-H2090.
- 73 Salmeron JM, Ruiz dA, Gines A, Garcia-Pagan JC, Gines P, Feu F et al. Renal effects of acute isosorbide-5-mononitrate administration in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17(5):800-806.
- 74 Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8(5):1151-1157.
- 75 Gines P, Martin PY, Niederberger M. Prognostic significance of renal dysfunction in cirrhosis. *Kidney Int Suppl* 1997; 61:S77-82.
- 76 Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. The role of central blood volume in the development of sodium retention in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1996; 110(1):193-198.
- 77 Fallon MB, Abrams GA. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 2000; 32(4 Pt 1):859-865.
- 78 Lockwood AH, Yap EW, Rhoades HM, Wong WH. Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11(2):331-336.
- 79 Fernandez-Esparrach G, Sanchez-Fueyo A, Gines P, Uriz J, Quinto L, Ventura PJ et al. A prognostic model for predicting survival in cirrhosis with ascites. *J Hepatol* 2001; 34(1):46-52.
- 80 Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42(6):1075-1081.
- 81 Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 1997; 404(2-3):249-252.
- 82 Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.
- 83 Meier B. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma* 2001; 217(1-3):117-124.



- 84 Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL, Geiszt M. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(5):1281-1288.
- 85 Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555(Pt 3):589-606.
- 86 Siedlik PH, Marnett LJ. Oxidizing radical generation by prostaglandin H synthase. *Methods Enzymol* 1984; 105:412-416.
- 87 Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(5-6):691-728.
- 88 Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(9):471-478.
- 89 Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16:33-50.
- 90 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.
- 91 Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* 1999; 31(4):261-272.
- 92 Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8):1367-1373.
- 93 Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(12):2466-2471.
- 94 Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(3):236-256.
- 95 Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995; 61:1-31.
- 96 Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(4):689-695.
- 97 Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 337:1-13.
- 98 Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85(8):753-766.
- 99 Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44(3):248-252.
- 100 Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2):247-258.

- 101 Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2005; 7(3):242-248.
- 102 Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W et al. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens* 2005; 18(6):839-843.
- 103 Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113(13):1708-1714.
- 104 Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18(4):195-199.
- 105 Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 1):L699-L722.
- 106 Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(12):4003-4008.
- 107 Alvarez B, Demicheli V, Duran R, Trujillo M, Cervenansky C, Freeman BA et al. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(6):813-822.
- 108 Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002; 51(4):1076-1082.
- 109 Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103(9):1282-1288.
- 110 Pacher P, Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(2):136-141.
- 111 Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215(3):1111-1118.
- 112 Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003; 140:113-24.
- 113 Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111(8):1201-1209.
- 114 Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9220-9225.
- 115 Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003;278(25):22546-22554.

- 116 Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1998; 438(3):161-164.
- 117 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91(6):2546-2551.
- 118 Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Ther* 2001; 89(3):295-308.
- 119 Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2007; 46(2):193-197.
- 120 Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 2004; 3(3):86-92.
- 121 Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(5):G847-G851.
- 122 Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22:71-73.
- 123 Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1):S63-S74.
- 124 Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(11 Suppl):110S-115S.
- 125 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(9):1383-1394.
- 126 Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35(2):297-306.
- 127 Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002; 36(3):562-572.
- 128 Moon KH, Hood BL, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Abdelmegeed MA, Kwon YI et al. Oxidative inactivation of key mitochondrial proteins leads to dysfunction and injury in hepatic ischemia reperfusion. *Gastroenterology* 2008; 135(4):1344-1357.
- 129 Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, Brandes RP, Fernandez M, Bosch J et al. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007; 133(3):959-966.
- 130 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106(7):867-872.

- 131 De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: Defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131(1):272-275.
- 132 Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 2005; 19(1):136-138.
- 133 Harada H, Hines IN, Flores S, Gao B, McCord J, Scheerens H et al. Role of NADPH oxidase-derived superoxide in reduced size liver ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423(1):103-108.
- 134 Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 1998; 28(3):689-694.
- 135 Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D et al. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29(5):1358-1363.
- 136 Ferlitsch A, Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, Homoncik M, Peck-Radosavljevic M et al. Vasoconstrictor hyporeactivity can be reversed by antioxidants in patients with advanced alcoholic cirrhosis of the liver and ascites. *Crit Care Med* 2005; 33(9):2028-2033.
- 137 Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-C1437.
- 138 Heller J, Sogni P, Barriere E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC et al. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33(3):376-381.
- 139 Sanz-Cameno P, Medina J, Garcia-Buey L, Garcia-Sanchez A, Borque MJ, Martin-Vilchez S et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2002; 37(6):723-729.
- 140 Garcia-Pagan JC, Bosch J. The resistance of the cirrhotic liver: a new target for the treatment of portal hypertension. 1985. *J Hepatol* 2004; 40(6):887-890.
- 141 Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Turnes J, Bellot P, Deulofeu R, Abraldes JG et al. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 2006; 43(3):485-491.
- 142 Centro Nacional de Epidemiología. Mortalidad en España en 2001.
- 143 Miniño A., Heron M., Smith B. Deaths: Preliminary data for 2004. *National Vital Statistics Reports* 2006; 54(19).
- 144 D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Semin Liver Dis* 1999; 19(4):475-505.

- 145 Bosch J, Abraldes JG, Groszmann RJ. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38:S54-S68.
- 146 Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, Garca-Pagan JC et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126(3):749-755.
- 147 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87(10):840-844.
- 148 De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130(5):963-974.
- 149 Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001; 103(12):1618-1623.
- 150 Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med* 2005; 72(2):71-80.
- 151 Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM et al. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia - Endothelial assessment of risk from lipids in youth (EARLY) trial. *Circulation* 2003; 108(9):1059-1063.
- 152 Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4):C719-C741.
- 153 Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(2):183-192.
- 154 Van de Castele M., Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003; 2(1):21.
- 155 Li QH, Bolli R, Qiu YM, Tang XL, Guo YR, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103(14):1893-1898.
- 156 Lida S, Chu Y, Francis J, Weiss RM, Gunnett CA, Faraci FM et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2):H525-H532.
- 157 Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, Schwabe RF, Bunzendahl H, Samulski RJ et al. Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 2003; 76(1):28-37.
- 158 Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, Hamilton CA, Alexander MY, Nicklin SA et al. Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther* 2002; 9(2):110-117.

- 159 Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res* 2003; 92(4):461-468.
- 160 Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6):H2516-H2523.
- 161 Brown KA, Chu Y, Lund DD, Heistad DD, Faraci FM. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(6):H2600-H2605.
- 162 Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res* 2008; 151(2):68-78.
- 163 Laukkanen MO, Leppanen P, Turunen P, Tuomisto T, Naarala J, Yla-Herttuala S. EC-SOD gene therapy reduces paracetamol-induced liver damage in mice. *J Gene Med* 2001; 3(4):321-325.
- 164 Zhong Z, Froh M, Wheeler MD, Smutney O, Lehmann TG, Thurman RG. Viral gene delivery of superoxide dismutase attenuates experimental cholestasis-induced liver fibrosis in the rat. *Gene Ther* 2002; 9(3):183-191.
- 165 Wheeler MD, Katuna M, Smutney OM, Froh M, Dikalova A, Mason RP et al. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 2001; 12(18):2167-2177.
- 166 Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(1):1-10.
- 167 Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88(2):E14-E22.
- 168 Didion SP, Hathaway CA, Faraci FM. Superoxide levels and function of cerebral blood vessels after inhibition of CuZn-SOD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(4):H1697-H1703.
- 169 Takizawa M, Komori K, Tampo Y, Yonaha M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(3):355-363.
- 170 Fujimoto J, Kaneda Y. Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Therapy* 1999; 6(3):305-306.
- 171 Omar BA, Flores SC, McCord JM. Superoxide dismutase: pharmacological developments and applications. *Adv Pharmacol* 1992; 23:109-61.

- 172 Chu Y, Piper R, Richardson S, Watanabe Y, Patel P, Heistad DD. Endocytosis of extracellular superoxide dismutase into endothelial cells: role of the heparin-binding domain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(9):1985-1990.
- 173 Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161:III-XIII, 1-151.
- 174 Yu Q, Que LG, Rockey DC. Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal cells in normal and injured liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282(3):G565-G572.
- 175 Drazan KE, Csete ME, Da S, X, Bullington D, Cottle G, Busuttill RW et al. Hepatic function is preserved following liver-directed, adenovirus-mediated gene transfer. *J Surg Res* 1995; 59(2):299-304.
- 176 Nakatani T, Kuriyama S, Tominaga K, Tsujimoto T, Mitoro A, Yamazaki M et al. Assessment of efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers. *Gut* 2000; 47(4):563-570.
- 177 Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, Sato K. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 1999; 30(1):101-106.
- 178 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Therapy* 2002; 9(2):127-134.







**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE MEDICINA**