



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

# Mecanismes involucrats en la regulació de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi: paper dels anticoagulants i antioxidants

Marina Vilaseca Barceló



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

Tesi doctoral

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

**MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DE LA  
RESISTÈNCIA VASCULAR INTRAHEPÀTICA EN LA CIRROSI:  
PAPER DELS ANTICOAGULANTS I ANTIOXIDANTS.**

Tesi presentada per:

**MARINA VILASECA BARCELÓ**

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors: Dr. Joan Carles García-Pagán

Dr. Jordi Gracia-Sancho

Tesi realitzada al laboratori d'Hemodinàmica Hepàtica i Hipertensió Portal de  
l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer- Hospital Clínic de  
Barcelona

CEK. Barcelona, Abril 2017



***A tothom que ho ha fet possible***

Many of life's failures are people who did not realize how close they were to success when they gave up.

Thomas A. Edison



# ÍNDEX

---

<b>INFORME DELS DIRECTORS DE TESI.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIACIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>11</b>
1. El fetge.....	13
1.1 Organització hepàtica.....	13
1.1.1 El sinusoid hepàtic.....	14
2. La cirrosi hepàtica.....	16
2.1 Bases fisiològiques de la hipertensió portal.....	17
2.1.1 La resistència vascular intrahepàtica.....	18
2.1.1.1 El component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica.....	19
I. L'òxid nítric (NO).....	20
II. L'estrès oxidatiu.....	22
III L'estrès oxidatiu mitocondrial.....	25
2.1.1.2 El component estructural de la resistència vascular intrahepàtica...26	
2.1.1.3 La microtrombosi hepàtica en la resistència vascular intrahepàtica.29	
2.1.2 El flux portal.....	32
3. Estratègies terapèutiques per a la regulació de la resistència vascular intrahepàtica.....	33
3.1 Anticoagulants.....	33
3.1.1 Heparines: Enoxaparina.....	34
3.1.2 Inhibidors directes del Factor Xa: Rivaroxaban.....	35
3.2 Antioxidants.....	35
3.2.1 Antioxidants dirigits a mitocondri: Mitoquinona.....	36
<b>JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS.....</b>	<b>39</b>
<b>Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure</b>	

in cirrhotic rats.....	43
<b>Estudi 2:</b> The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells.....	44
<b>Estudi 3:</b> Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats.....	45
<b>CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS.....</b>	<b>49</b>
Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.....	49
Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells.....	63
Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats.....	109
<b>RESUM DE RESULTATS.....</b>	<b>161</b>
Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.....	163
Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells.....	164
Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats.....	166
<b>DISCUSSIÓ DE RESULTATS.....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>179</b>
<b>ALTRES PUBLICACIONS.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....</b>	<b>191</b>
<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>205</b>

# INFORME DELS DIRECTORS DE TESI

---

Barcelona, 24 d'abril del 2017

Dr. Joan Carles García-Pagán, Cap d'Hemodinàmica Hepàtica de l'Hospital Clínic de Barcelona, i Dr. Jordi Gracia-Sancho, cap del Grup de Recerca en Biologia Vascul·lar Hepàtica de l'Insitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Departament de Medicina, Hospital Cínic de Barcelona- CEK. Barcelona

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral: MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DE LA RESISTÈNCIA VASCULAR INTRAHEPÀTICA EN LA CIRROSI: PAPER DELS ANTICOAGULANTS I ANTIOXIDANTS, presentada per Marina Vilaseca Barceló per a optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona s'ha realitzat sota la nostra direcció i compleix tots els requisits necessaris per a ser defensada davant el Tribunal d'avaluació corresponent.

**Dr. Joan Carles García-Pagán**

**Dr. Jordi Gracia-Sancho**





## ABREVIACIONS

---

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Actina de múscul llis
Ach	Acetilcolina
ADN	Àcid desoxirribonucleic
Ang II	Angiotensina II
APTT	Temps de tromboplastina parcial activada
ATP	Adenosinat trifosfat
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CCl <sub>4</sub>	Tetraclorur de carboni
CES	Cèl·lules endotelials sinusoidals
CHE	Cèl·lules hepàtiques estrellades
CK	Cèl·lules de Kupffer
CO	Monòxid de carboni
CTE	Cadena de transport electrònic
eNOS	Sintasa de l'òxid nítric endotelial
ERO	Espècies reactives d'oxigen
ET	Endotel·lina
Factor Xa	Factor de coagulació X activat
GMPc	Guanosina monofosfat cíclic
GSH	Glutatió
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peròxid d'hidrogen
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
iNOS	Sintasa de l'òxid nítric induïble
MCP-1	Proteïna quimioattractant de monòcit 1
MitoQ	Mitoquinona

mm Hg	mil·límetres de mercuri
Mmps	Metal·loproteïnases
Mtx	Metoxamina
nNOS	Sintasa d'òxid nítric neuronal
NO	Òxid nítric
NOS	Sintasa de l'òxid nítric
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anió superòxid
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
PAR	Receptors de proteasa activada
PDGF	Factor de creixement derivat de plaqueta
Pdgfr $\beta$	Receptor beta del factor de creixement derivat de plaqueta
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
SOD	Superòxid dismutasa
TAA	Tioacetamida
TGF $\beta$	Factor de creixement transformant $\beta$
Timps	Inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases
TNF $\alpha$	Factor de tumor necrosis alfa
TP	Temps de protrombina
TPP	Trifenilfosfonium
TXA <sub>2</sub>	Tromboxà A <sub>2</sub>
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
vWF	Factor de Von Willebrand
XO	Xantina oxidasa

# INTRODUCCIÓ

---



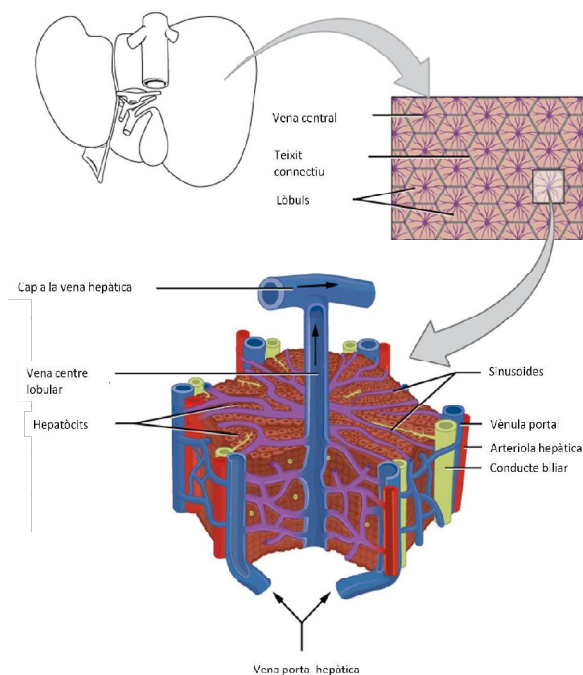
# INTRODUCCIÓ

## 1. El fetge

El fetge és l'òrgan més gran de l'organisme, amb un pes aproximat de 1,5 kg en l'adult. Realitza multitud de funcions, entre la que es troba la detoxificació de toxines i fàrmacs, regulació del metabolisme energètic i la síntesi de proteïnes implicades en la coagulació de la sang. A més a més, té com a principal propietat la capacitat de regeneració en cas de dany.

### 1.1 Organització hepàtica

El fetge està format per petites unitats estructurals conegudes com lòbuls hepàtics, que consisteix en una estructura hexagonal separada per septes. Aquesta estructura està organitzada al voltant d'una vena central que desemboca a la vena hepàtica. A cada lòbul es situa una triada portal que està formada per una rama de l'artèria hepàtica, de la vena porta i un conducte biliar. El lòbul en sí està format per moltes



**Figura 1: Organització hepàtica i el lòbul hepàtic**

làmines hepàtiques que es disposen de forma radiada al voltant de la vena central. Entre les diferents làmines hepàtiques es troben els sinusoides hepàtics (Figura 1).

### 1.1.1 El sinusoid hepàtic

El sinusoides hepàtics són petits “capil·lars” venosos especialitzats que reben sang de la vena porta (sang desoxigenada però rica en nutrients) i sang de l'artèria hepàtica (oxigenada) que flueix cap a la vena central del lòbul. Al sinusoid hepàtic trobem diferents tipus cel·lulars entre els que hi ha els hepatòcits, les cèl·lules endotelials sinusoïdals (CES), les cèl·lules hepàtiques estrellades (CHE) i les cèl·lules de Kupffer (CK) (Figura 2).

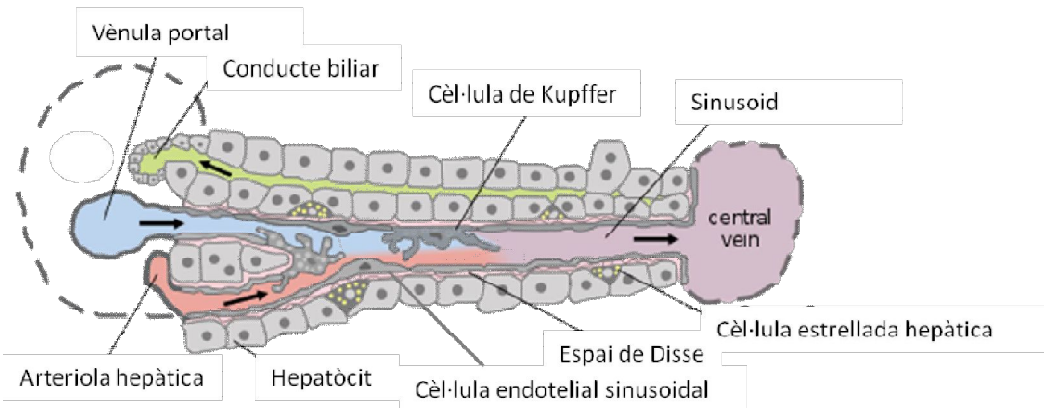
## HEPATÒCITS

Són les cèl·lules que formen el parènquima hepàtic i constitueixen aproximadament el 80% del total de cèl·lules. Són cèl·lules epitelials polaritzades, amb un costat sinusoïdal en contacte amb l'espai de Disse i amb un pol biliar formant el canalicle biliar. Són cèl·lules metabòlicament complexes ja que tenen una gran varietat de funcions. Degut precisament a això presenten una gran heterogeneïtat respecte a propietats estructurals, histològiques i bioquímiques. A més a més, tenen una gran capacitat proliferativa permetent la regeneració del fetge després d'un dany hepàtic.

## CÈL·LULES ENDOTELIALS SINUSOÏDALS

Les cèl·lules endotelials sinusoïdals (CES) formen el revestiment dels sinusoides hepàtics i representen el voltant del 15% de les cèl·lules del fetge. Aquestes cèl·lules estan en contacte amb l'espai de Disse (espai subendotelial, entre la superfície basolateral dels hepatòcits i el costat contrari al lumen de les cèl·lules endotelials sinusoïdals) i formen un endoteli diferent a l'endoteli vascular de la resta del fetge i d'altres òrgans. Aquest endoteli és fenestrat i no té presència de membrana basal, el que permet el pas de nutrients, oxigen i macromolècules de la sang als hepatòcits. Les

cèl·lules endotelials participen tant en la inflamació, alliberant citocines, com en la regulació de la contracció del sinusoid, degut a la producció del vasodilatador òxid nítric (NO).



**Figura 2: Estructura del sinusoid hepàtic i cèl·lules que el formen. Modificat de Frevert U., et al. *PLoS biology* 2005.**

### CÈL·LULES HEPÀTIQUES ESTRELLADES

Les cèl·lules hepàtiques estrellades (CHE), abans anomenades cèl·lules Ito o lipòcits, es troben a l'espai de Disse i representen el 3-4% de les cèl·lules del fetge. Les CHE tradicionalment s'han considerat cèl·lules d'origen mesenquimal degut a la seva expressió de molècules com ara la vimentina i la desmina. En fetges sans, les CHE es troben en un estat quiescent i representen el 15% del total de cèl·lules hepàtiques no parenquimals<sup>1</sup>. En el seu estat quiescent, les CHE presenten gotes de lípids perinuclears, que serveixen com a emmagatzematge de vitamina A i són essencials per a la regulació de l'homeòstasi de l'àcid retinoic. Cada cèl·lula té diverses protuberàncies allargades que embolcallen el sinusoid que permeten regular el to del sinusoid hepàtic.

### CÈL·LULES DE KUPFFER

Les cèl·lules de Kupffer (CK) són els macròfags residents del fetge. Representen al voltant del 6% de les cèl·lules del fetge i es troben situades al lumen dels sinusoides i

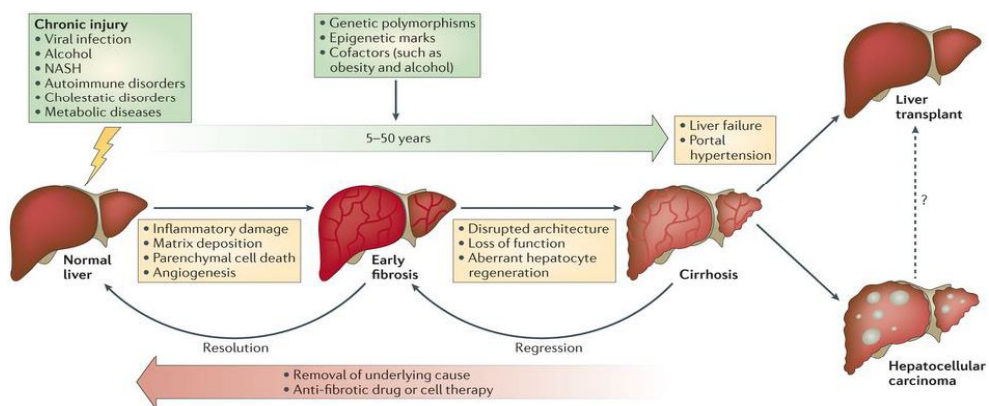


poden passar a l'espai de Disse a través de les fenestracions de l'endoteli per interaccionar amb els hepatòcits i les CHE. Són cèl·lules amb capacitat fagocitària i són responsables de l'eliminació de les partícules estranyes que entren al fetge pel torrent sanguini.

## 2. La cirrosi hepàtica

La cirrosi hepàtica és una malaltia crònica del fetge caracteritzada per la substitució del teixit del fetge per matriu extracel·lular i nòduls de regeneració, que es produeixen com a resultat d'un procés en el qual es regenera el teixit danyat. Les principals causes són l'alcoholisme, les hepatitis víriques i l'esteatosi hepàtica. El resultat de la cirrosi hepàtica és el desenvolupament de diverses complicacions de la hipertensió portal com l'ascites i la hemorràgia per varius, insuficiència renal i hepàtica, que pot progressar fins a càncer hepàtic i la mort<sup>2</sup> (Figura 3). Aquests signes i símptomes poden ser resultat directe del fracàs de les cèl·lules del fetge o com a resultat de la hipertensió portal.

La hipertensió portal és una síndrome clínica caracteritzada per un increment patològic de la pressió hidrostàtica del sistema venós portal per sobre del seu valor normal de 1-



Nature Reviews | Immunology

**Figura 3: Progrés de la cirrosi hepàtica. Extret de Pellicoro A., et al. *Nat Rev Immunol* 2014**

5 mmHg. Aquest increment origina la formació d'una extensa xarxa de venes col·laterals porto-sistèmiques que deriven part del flux sanguini portal cap a la circulació sistèmica, evitant així el pas sanguini pel fetge.

La hipertensió portal clínicament significativa està definida per un gradient de pressió portal igual o superior a 10 mmHg i està directament relacionada amb la presència de complicacions derivades de la cirrosi hepàtica com ara l'hemorràgia digestiva causada pel trencament de varius esofàgiques, l'encefalopatia hepàtica, l'ascites o la insuficiència renal. A causa de la gravetat d'aquestes complicacions, la hipertensió portal representa la primera causa de morbimortalitat en malalts cirròtics<sup>3</sup>.

## 2.1 Bases fisiològiques de la hipertensió portal

Un fetge sà rep sang des de la vena porta i de l'artèria hepàtica. Essent la vena porta la que aporta més flux sanguini, al voltant d'un 75% del total. Per tal d'entendre els factors que regulen el flux sanguini a través del fetge, s'han d'entendre i aplicar els conceptes de dinàmica de fluids com qualsevol altre sistema hidrodinàmic. En aquest cas, la pressió portal ve determinada per la relació entre el flux sanguini portal i la resistència vascular que s'oposa a ell mateix.

Segons la llei d'Ohm, el gradient de pressió entre dos punts en un vas sanguini ve definit per la següent equació:

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

On, en el nostre àmbit,  **$\Delta P$**  és el gradient de pressió portal determinat per la diferència entre pressió portal i pressió de la vena cava inferior, mesurat com a mil·límetres de mercuri (mm Hg).  **$Q$**  és el flux sanguini dins el sistema venós portal, mesurat en unitats de volum per unitats de temps (ml/min). Finalment,  **$R$**  és la resistència vascular

exercida pel sistema venós portal, per les venes col·laterals i pel fetge (mm Hg/ml·min-1)<sup>3</sup>.

La resistència no es pot mesurar directament però es pot calcular amb les mesures simultànies de flux sanguini i el gradient de pressió portal.

A més a més, els diferents factors que regulen la resistència en el sistema vascular venen definits per la llei de Poiseuille:

$$R = 8 \eta L / \pi r^4$$

On  $\eta$  és coeficient de viscositat de la sang,  $L$  la longitud del vas i  $r$  el radi del vas.

Com que la longitud dels vasos i la viscositat de la sang és relativament constant, el factor més important implicat en la modulació de la resistència vascular intrahepàtica és el radi del vas. A l'estar elevat a la quarta potència, una petita disminució del radi del vas pot provocar un augment important de la resistència vascular intrahepàtica i, per tant, del gradient de pressió portal.

Durant la progressió de la cirrosi, el primer factor involucrat en el desenvolupament de la hipertensió portal és l'augment de la resistència vascular intrahepàtica i, posteriorment, l'augment del flux sanguini portal contribuirà a la perpetuació i empitjorament de la malaltia<sup>4,5</sup>.

### 2.1.1 La resistència vascular intrahepàtica

L'augment de la resistència vascular al flux sanguini portal és el fenomen fisiopatològic primari i necessari en el desenvolupament de la hipertensió portal<sup>6</sup>, i pot tenir lloc a qualsevol lloc del sistema venós portal<sup>7</sup>.

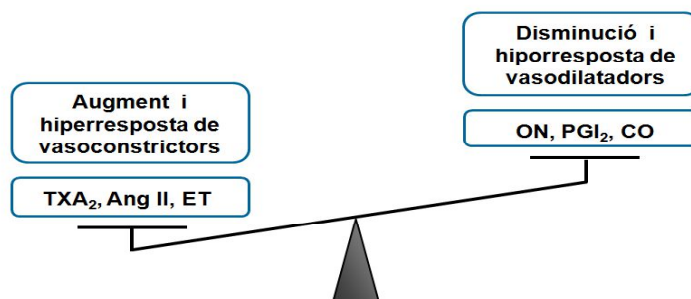
La resistència vascular intrahepàtica és resultat de dos factors diferents:

- D'un costat existeix el component estructural, que prové d'una distorsió estructural de l'arquitectura vascular hepàtica causada per la fibrosi, cicatrizació, formació de nòduls i trombosi<sup>8</sup>, i representa al voltant del 60% del total de la resistència vascular intrahepàtica. En un inici es va postular que aquest component estructural era irreversible i no modificable per fàrmacs però amb el temps s'ha demostrat que el procés de fibrosi és potencialment reversible<sup>9,10</sup>.
- D'altra banda hi ha el component funcional dinàmic que representa aproximadament el 40% del total de la resistència vascular intrahepàtica i és potencialment modificable per fàrmacs que regulen el to vascular.

### 2.1.1.1 El component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica

El component dinàmic és derivat de l'existència d'elements contràctils intrahepàtics que responen a diferents agonistes vasoactius endògens i exògens promovent un augment del to vascular hepàtic.

El to vascular del fetge normal és el resultat d'un equilibri regulat entre la producció de factors vasodilatadors i vasoconstrictors tant a nivell sinusoïdal com a nivell extra-sinusoïdal. Aquestes substàncies vasoactives són produïdes, entre altres, per les CES, que difonen fins les CHE induint la seva relaxació o contracció.



**Figura 4:** Factors vasoactius implicats en la regulació del component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi. TXA<sub>2</sub>: tromboxà A<sub>2</sub>; Ang II: angiotensina II; ET: endotel·lina; ON: òxid nítric; PGI<sub>2</sub>: prostaciclina; CO: monòxid de carboni.

Existeixen diverses substàncies vasoactives que regulen el to vascular hepàtic<sup>11-14</sup>. L'angiotensina II, la vasopressina, l'endotel·lina, la norepinefrina i diversos eicosanoids, com el tromboxà A<sub>2</sub>, la prostaglandina F<sub>2a</sub> i els cisteinil-leucotriens pertanyen al grup de vasoconstrictors<sup>11,15</sup>. En canvi, l'òxid nítric (NO), el monòxid de carboni i el prostanoid prostaciclina s'inclouen com a vasodilatadors<sup>16-18</sup> (Figura 4).

Durant la progressió de la malaltia, les CES perden els seu fenotip característic, procés conegut com a "capil·larització". Es perden les fenestres, adquireixen membrana basal, disminueix la síntesi de vasodilatadors<sup>11-14,19</sup> com el NO<sup>20</sup> i augmenta la síntesi de vasoconstrictors<sup>15</sup>, perdent així l'equilibri entre vasoconstrictors i vasodilatadors que existeix en un fetge sà<sup>16,21,22</sup>. A més, comencen a sintetitzar proteïnes típiques d'un endoteli capil·laritzat, com ara el factor von Willebrand (vW). Aquest fenomen dona lloc a la disfunció endotelial, és a dir, una pèrdua o desregulació dels mecanismes homeostàtics propis de l'endoteli sà<sup>23,24</sup>.

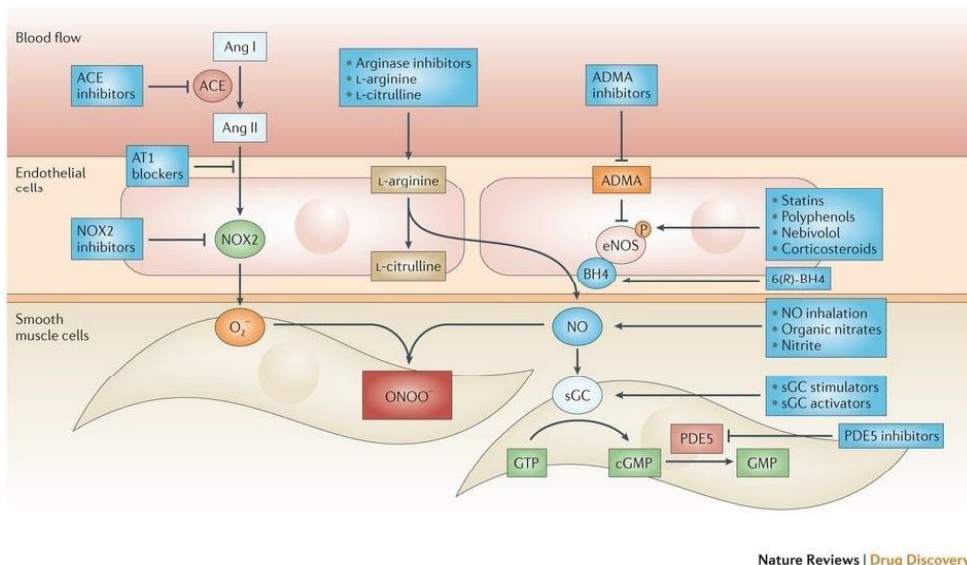
Conseqüentment, les CES d'un fetge cirròtic presenten un fenotip vasoconstrictor que comportarà un increment en la contracció de les CHE i, finalment, un increment en la resistència vascular intrahepàtica.

## I. L'òxid nítric (NO)

Un dels factors més importants a tenir en compte en la regulació del to vascular és l'òxid nítric. El NO és una molècula gasosa, amb una vida mitjana curta d'uns 3-5 segons, que a part de regular l'homeòstasi vascular, també està implicada en altres funcions biològiques com ara la inhibició de l'agregació plaquetària, la coagulació i l'adhesió leucocitària a l'endoteli<sup>25</sup>. L'enzim responsable de la formació del NO és la proteïna sintasa del NO (NOS). Existeixen tres isoformes diferents: la NOS neuronal (nNOS), la induïble (iNOS) i l'endotelial (eNOS). L'eNOS s'expressa de forma constitutiva en les cèl·lules endotelials i produeixen NO en petites quantitats en resposta a estímuls físics

com ara el estrès per fregament o a fisiològics com ara els estrògens, el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), acetilcolina, bradixinina o altres agonistes de receptors acoblats a proteïna G<sup>25,26</sup>. La regulació de l'eNOS és complexa tant a nivell transcripcional com post-traduccional. El NO derivat de l'eNOS difon a les cèl·lules musculars llises, (que en el cas del fetge seran les CHE) on actua a través del seu lligand natural, la guanilat ciclasa soluble, un enzim que promou la síntesi del missatger secundari: GMPc<sup>25</sup>.

En el fetge sà, la funció principal del NO és de compensació enfront a estímuls vasoconstrictors i la seva producció és principalment endotelial. No obstant, el fetge cirròtic es caracteritza per un dèficit de NO<sup>27</sup>. Aquesta disminució dels nivells de NO és causada tant per una disminució de l'activitat enzimàtica de l'enzim eNOS, ja sigui per desregulacions posttraduccionals<sup>16</sup>, oxidació del cofactor de la eNOS, la tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>)<sup>28</sup> o un augment de la interacció amb proteïnes inhibidores com la caveolina-1<sup>29</sup>, com per una disminució de la seva biodisponibilitat degut al segrest del NO per part de les ERO (Espècies Reactives d'Oxigen) (Figura 5).



**Figura 5: Vies de síntesi i senyalització de l'òxid nítric. Extret de Lundberg J.O., et al. *Nat Rev Drug Discov* 2015**

Donada la relació del dèficit de NO i el desenvolupament i progressió de la hipertensió portal, diverses estratègies s'han dut a terme. Estudis pioners van confirmar que l'administració de substàncies donadores de NO, com ara el nitroprussiat sòdic, reduïen la pressió portal de perfusió del fetge cirròtic<sup>30</sup>. També es va estudiar el tractament amb el cofactor BH<sub>4</sub> que va augmentar la biodisponibilitat intrahepàtica de NO, reduir la resistència intrahepàtica i finalment, reduir la pressió portal sense modificar cap paràmetre hemodinàmic sistèmic<sup>31</sup>. Tanmateix, el tractament amb estatines produïa una millora en l'activitat i l'expressió de l'eNOS, millorant la biodisponibilitat de NO intrahepàtic en rates cirròtiques<sup>32,33</sup>. Altres estudis emprant adenovirus que codificaven per la nNOS o l'eNOS aconseguien resultats similars<sup>34,35</sup>. Tot i així, totes aquestes estratègies terapèutiques s'han dut a terme per tal d'augmentar la síntesi de NO però no la seva biodisponibilitat.

De fet, se sap que en moltes malalties, i de manera important en la cirrosi<sup>36</sup>, l'estrès oxidatiu es troba augmentat i pot reaccionar amb el NO disminuint-ne la seva biodisponibilitat i afavorint l'aparició de peroxinitrits (ONOO<sup>-</sup>). És per això que moltes de les actuals estratègies terapèutiques van dirigides a disminuir els nivells d'estrès oxidatiu per tal d'augmentar la biodisponibilitat de NO.

## II. Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu és un fenomen causat per un desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (ERO) i la capacitat d'un sistema biològic de detoxificar ràpidament els reactius intermedis o reparar els danys produïts.

Les ERO són molècules altament reactives i inestables que es produeixen com a subproductes del metabolismes de l'oxigen. Dins dels diferents tipus de ERO, s'engloben principalment l'anió superòxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), l'anió hidroxil (OH<sup>-</sup>), el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i el peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>)<sup>37,38</sup>.

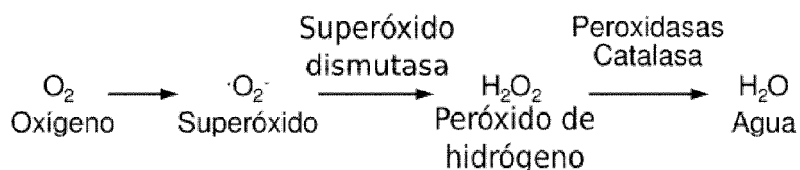
Existeixen diversos sistemes enzimàtics que són capaços de generar ERO com a subproductes, com ara l'eNOS<sup>39</sup>, la xantina oxidasa (XO)<sup>40</sup> o les proteïnes que intervenen en la cadena respiratòria mitocondrial<sup>41</sup>. Són presents en condicions fisiològiques i són regulades pels mecanismes antioxidants de l'organisme<sup>42</sup>. Aquests sistemes poden ser mecanismes enzimàtics o no enzimàtics. Els sistemes no enzimàtics són l'àcid ascòrbic (Vitamina C), el tocoferol (Vitamina E) i el glutatió. El principal mecanisme enzimàtic és la superòxid dismutasa (SOD)<sup>43</sup> però també hi juguen un paper molt important els enzims involucrats a la cadena respiratòria mitocondrial.

Aquests mecanismes es troben en equilibri en situacions fisiològiques. En canvi, en condicions patològiques, com ara la cirrosi, es pertorba l'equilibri, hi ha un excés de producció d'ERO que els sistemes antioxidants no són capaços de controlar<sup>44</sup>.

L'excés d'ERO produeix diferents efectes adversos, com ara la unió a proteïnes, trencament de cadenes d'ADN, reaccionar amb components vitals per a la cèl·lula i oxidar lípids, en el procés anomenat peroxidació lipídica.

Aquesta situació es coneix com estrès oxidatiu i pot provocar diferents situacions patològiques, com ara necrosi, inflamació, apoptosi, o augment del to vascular, entre d'altres.

De fet, el paper de les ERO s'ha descrit en diverses malalties hepàtiques<sup>45-47</sup>. En un principi es va relacionar les ERO amb el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica i es va demostrar que l'antioxidant N-acetilcisteïna era capaç de prevenir-la en rates amb hipertensió portal<sup>48</sup>.



**Figura 6: Metabolisme de l'oxigen. Via de la superòxid dismutasa.**



En el fetge, una de les principals cèl·lules productores de ERO són les CK. Com a resultat del dany hepàtic, té lloc un canvi de fenotip de les CK en el que s'inicia la generació de mediadors citotòxics com ara interleuquines i ERO. De fet, se sap que l'eliminació de les CK durant la progressió de la cirrosi comporta una menor activació de les CHE i una menor deposició de matriu extracel·lular<sup>49</sup>.

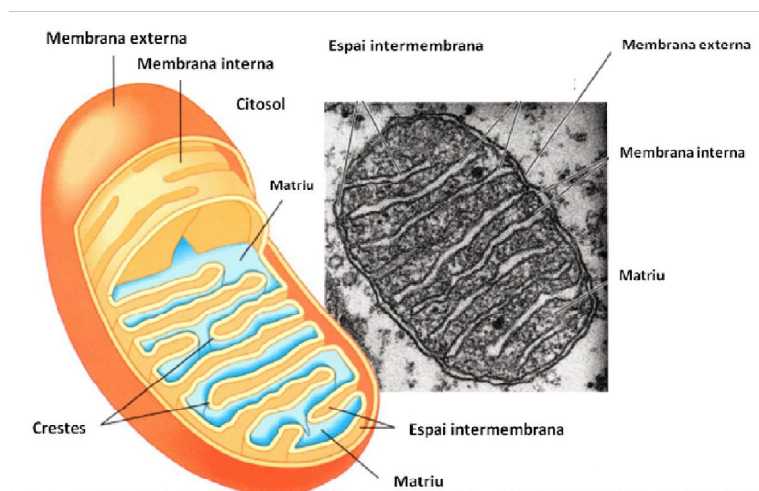
A més a més, estudis del nostre grup han posat de manifest el paper de les ERO com a possible causa de la disminució de la biodisponibilitat hepàtica del NO, i per tant, possible modulador de la resistència vascular intrahepàtica<sup>36</sup>. Altres estudis han corroborat que el tractament de la hipertensió portal amb antioxidants tenen un alt interès terapèutic. En un primer lloc es va estudiar com augmenta l'eficiència de la SOD mitjançant la transferència gènica de SOD amb un adenovirus codificant per una isoforma de la SOD (Figura 6). Amb aquesta estratègia terapèutica es va aconseguir augmentar la biodisponibilitat intrahepàtica de NO, millorant així la disfunció endotelial i disminuint la pressió portal en rates cirròtiques amb hipertensió portal<sup>51</sup>. També es va avaluar el tractament amb una molècula mimètica de la SOD, el tempol, i també va ser capaç de reduir la pressió portal de rates cirròtiques, tot i que en aquest cas tenia efectes deleteris sobre la pressió arterial mitja<sup>52</sup>. Altres antioxidants s'han avaluat en un context similar, i es van obtenir resultats similars, millora de la disfunció endotelial i reducció de la pressió portal en animals cirròtics<sup>53</sup>.

L'estudi dels efectes dels antioxidants en la cirrosi també s'han dut a terme en diversos estudis en pacients amb hipertensió portal. Aquests estudis confirmen que el tractament amb antioxidants són capaços de disminuir els nivells d'estrès oxidatiu intrahepàtics, millorar la disfunció endotelial, revertir la baixa reactivitat a vasoconstrictors i prevenir la circulació hiperdinàmica reduint el flux sanguini portal<sup>54,55</sup>. Tot i això, noves estratègies terapèutiques són requerides i donat que els mitocondris

són uns dels principals orgànuls on es produeix l'estrès oxidatiu, han esdevingut un nou focus per a noves dianes terapèutiques.

### III. Estrès oxidatiu mitocondrial

Els mitocondris són orgànuls subcel·lulars (entre 1-10  $\mu\text{m}$ ), que es troben en el citoplasma de les cèl·lules eucariòtiques. Juguen un paper important en l'apoptosi i en la biogènesis d'energia, aportant el 90% de l'energia cel·lular a través de la cadena de transport electrònic (CTE)<sup>56</sup>. Els mitocondris tenen membranes externes i internes, compostes per bicapes fosfolipídiques i proteïnes. La membrana interna està formada per diferents plectes, anomenats crestes, que augmenten l'àrea de superfície (Figura 7).



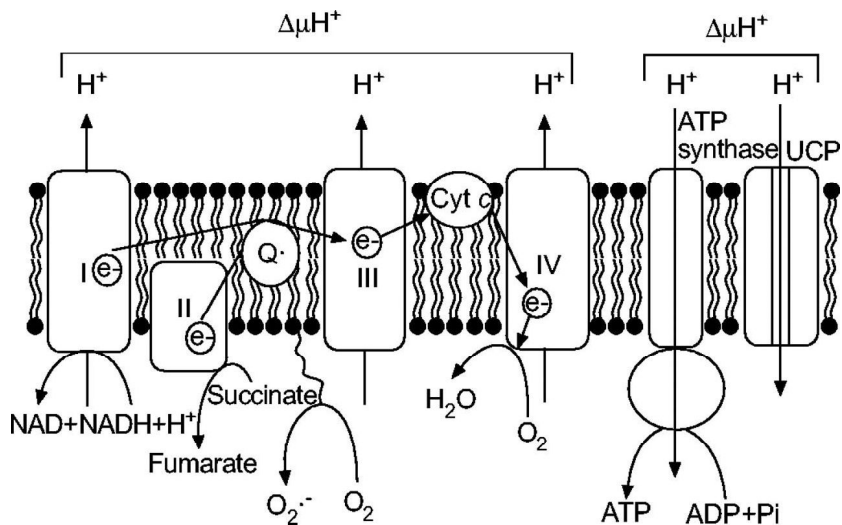
**Figura 7: Estructura i parts del mitocondri. Modificat de Mathews and van Holde.**

**Biochemistry. Ed. 2**

En aquestes crestes és on es troben els diferents complexos que formen part de la CTE on es produeix, en terme final, l'adenosinatrifosfat o ATP. Els mitocondris són la principal font intracel·lular de ERO degut a la transferència d'electrons durant la producció d'ATP<sup>57</sup>. En condicions normals, aproximadament un 2% dels electrons de

la cadena respiratòria s'escapen de la cadena respiratòria, sobretot en el complex I i III, que resulta en la formació de  $O_2^-$  al mitocondri<sup>58</sup> (Figura 8).

La formació d'aquests ERO juguen un paper molt important en vies de senyalització cel·lular, com ara en la inflamació<sup>59</sup>. Tot i així, durant una patologia hi ha una excessiva producció de ERO, associada a una disfunció mitocondrial, que pot acabar en un desequilibri entre la producció de ERO i la seva eliminació per part dels mecanismes de defensa de les cèl·lules, induint l'estrès oxidatiu. Aquest augment en la generació de ERO és perjudicial, i cada cop hi ha més evidències de la implicació de les ERO creades pels mitocondris en la patogènesis de diverses malalties, com les malalties neurodegeneratives o la disfunció endotelial associada a l'edat<sup>60,61</sup>.



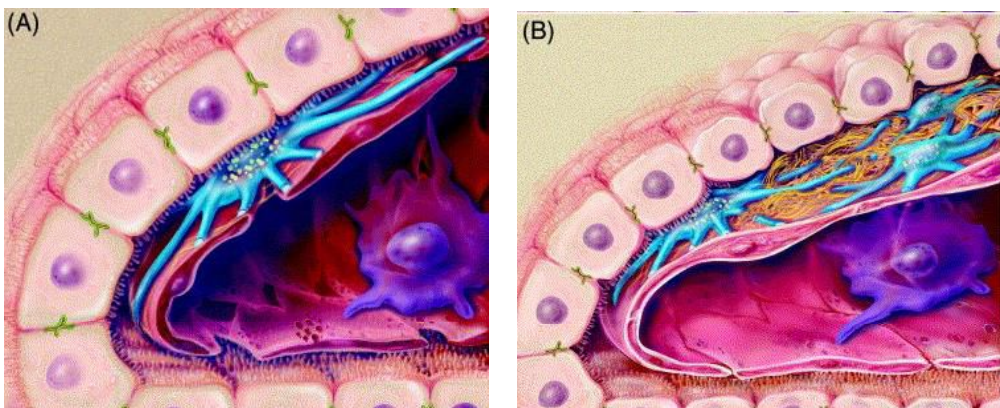
**Figura 8: Cadena respiratòria mitocondrial.** Extret de Couillard A., et al. *European Respiratory Journal* 2005

### 2.1.1.2 El component estructural de la resistència vascular intrahepàtica

El component estructural de la resistència ve determinat per les modificacions estructurals del parènquima hepàtic a causa de la fibrosi. Durant un dany hepàtic agut,

la primera resposta del fetge és la inducció de la inflamació i es comencen a sintetitzar mediadors inflamatoris com TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 o MCP-1, que estimulen el reclutament de més cèl·lules inflamatòries i gens implicats en la proliferació cel·lular i la fibrogènesi, com ara PDGF (de l'anglès. Platelet Derived Growth Factor) o VEGF (de l'anglès, Vacular Endothelial Growth Factor). Aquest procés està associat a una limitada producció de matriu extracel·lular que pot finalitzar amb una regeneració hepàtica de cèl·lules apoptòtiques o necròtiques.

D'altra banda, la fibrosi i la cirrosi són la conseqüència d'una resposta sostinguda a un procés de cicatrització degut a un dany crònic<sup>62</sup>. Quan el dany es perpetua, la regeneració hepàtica no s'assoleix i els hepatòcits són substituïts progressivament per matriu extracel·lular formada parcialment per col·lagen tipus I, III i IV, fibronectina, laminina, àcid hialurònic i proteoglicans<sup>10</sup>. L'acumulació de matriu extracel·lular és present en el procés fibròtic i resulta tant d'una augmentada síntesi com d'una disminuïda degradació dels seus components<sup>63</sup>.



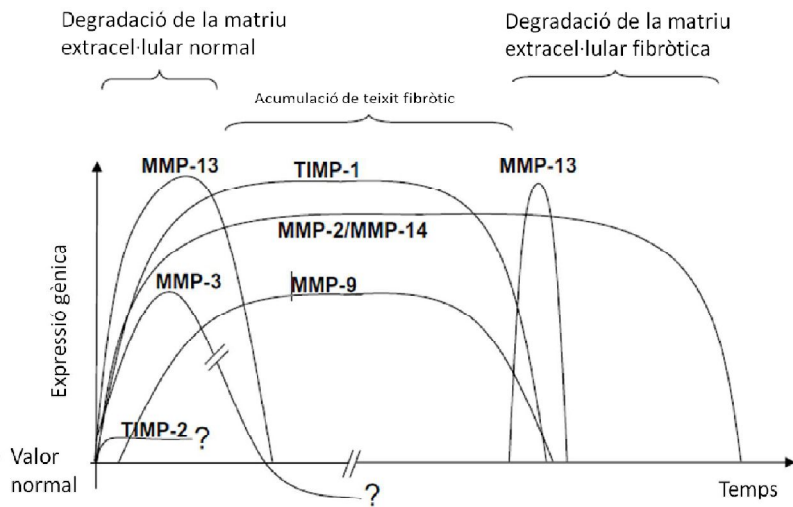
**Figura 9: Les cèl·lules hepàtiques estrellades (CHE) d'un fetge sa (A) i d'un fetge cirròtic (B), en el fetge cirròtic s'observa un augment de la producció de col·lagen.**

**Extret de Friedman SL, *J Hepatol* 2003**

Se sap que les CHE són les principals cèl·lules implicades en la producció excessiva de matriu extracel·lular que s'observa en la fibrosi hepàtica<sup>64,65</sup>. De fet, com a resultat d'un dany hepàtic, les CHE tenen un procés anomenat "procés d'activació" o transdiferenciació on les cèl·lules passen d'un estat quiescent que acumula vitamina A, a un estat similar a una cèl·lula tipus miofibroblast, amb diverses noves característiques, com ara una millor migració i adhesió cel·lular, augment d'expressió d'alfa actina de múscul llis ( $\alpha$ -SMA), increment de proliferació, producció de substàncies quimiotàctiques, contractibilitat, pèrdua de la capacitat emmagatzemadora de retinoids i, el més important, adquireixen capacitat fibrogènica (Figura 9).

De fet, augmenten l'expressió gènica dels components de la matriu extracel·lular, d'enzims degradants de matriu i els seus respectius inhibidors, resultant en un remodelat i acumulació de matriu extracel·lular amb abundant presència de CHE activades<sup>2,66</sup>.

A més a més, a l'activar-se comencen a expressar les proteïnes inhibidores de les metal·loproteïnases (TIMPs)<sup>50</sup>, en particular TIMP1 i en menor mesura TIMP2. Aquestes proteïnes són secretades per les CHE a l'espai extracel·lular, s'uneixen al domini actiu de les metal·loproteïnases (MMPs) i les inhibeix. La funció principal de les MMPs és trencar els components de la matriu extracel·lular, de manera que amb la seva inhibició s'afavoreix l'acumulació de les proteïnes de la matriu. Existeixen diverses isoformes de MMPs que s'expressen de manera diferencial durant la progressió de la cirrosi i diversos tipus cel·lulars poden sintetitzar-les, com ara les CES, les CK o les mateixes CHE<sup>67</sup> (Figura 10).



**Figura 10: Expressió diferencial de MMPs i TIMPs durant la progressió de la cirrosi.**

Modificat de Hemmann S., et al. *Journal of hepatology*, 2007

### 2.1.1.3 La microtrombosi hepàtica en la resistència vascular intrahepàtica

La microtrombosi es descriu com el procés on té lloc la formació de trombes als capil·lars i vasos de petit calibre. Quan un vas sanguini es danya, es posen en funcionament una sèrie de mecanismes que comprèn: la vasoconstricció local del vas (en aquest cas deguda a la contracció de les CHE), el depòsit i agregació de plaquetes, i la coagulació de la sang.

En un inici, degut a la observació clínica de sagnats, menor nombre i menor funcionalitat de les plaquetes i la disminució de la síntesi dels factors de coagulació en pacients amb malaltia hepàtica crònica, es va considerar que hi havia una situació de baixa coagulació en aquests malalts<sup>68</sup>. De fet, tests convencionals de coagulació com ara el temps de protrombina i el temps de tromboplastina parcial activada o APTT, que estan dissenyats per identificar defectes dels procoagulants però no dels

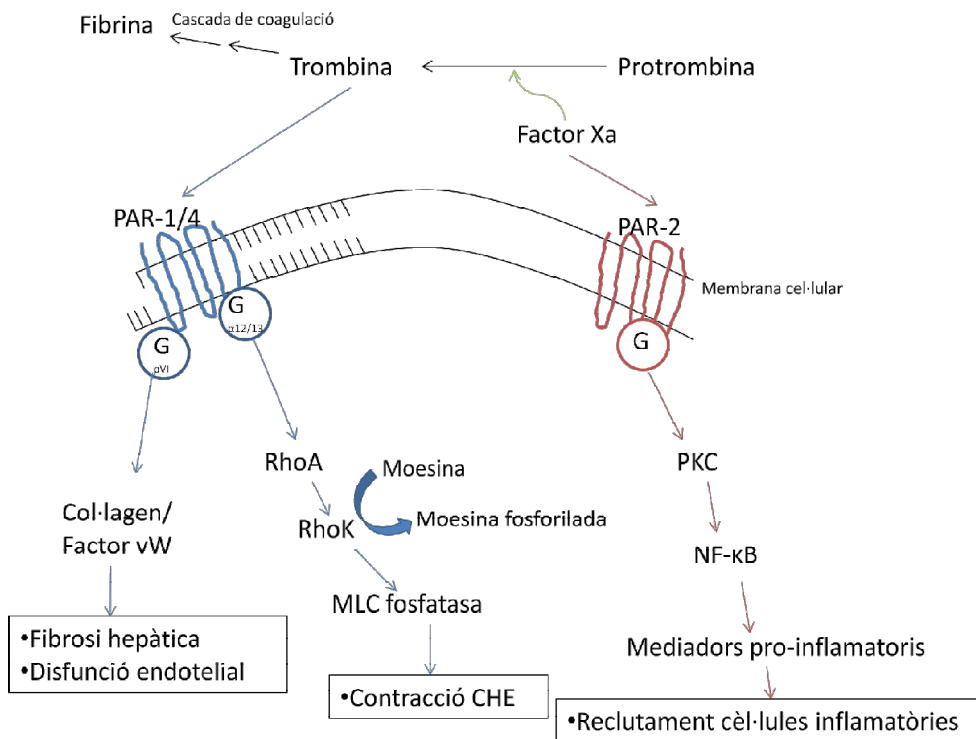
anticoagulants, es troben prolongats en pacients amb cirrosi, suggerint defectes en l'hemostàsia i afavorint-ne, per tant, el sagnat.

Recentment, tests d'hemostàsia més sofisticats que permeten estudiar el balanç real entre pro i anticoagulants s'han utilitzat per estudiar la capacitat hemostàtica dels pacients amb cirrosi. Concretament, el test de generació de trombina ha demostrat que els pacients cirròtics poden tenir un augment de síntesi de trombina comparat amb voluntaris sans<sup>69</sup>. Aquests estudis, juntament amb les observacions clíniques han donat lloc al concepte “hemostàsia re-balancejada”, que suggereix un balanç hemostàtic tot i la disminució de la síntesi de factors pro i anticoagulants. Tot i aquest equilibri, el balanç és molt inestable comparat amb el que es veu en individus sans i fàcilment es pot decantar cap a un dels dos estats<sup>70</sup>.

De fet, la històrica creença de que els pacients amb malaltia hepàtica estaven “auto-anticoagulats” es contradiu amb les complicacions trombòtiques que apareixen en els malalts cirròtics i formen evidències de l'estat hiperocoagulat d'aquests pacients<sup>71</sup>. Degut a l'aparició de sagnats en aquests pacients, l'ús d'anticoagulants s'ha utilitzat en menor mesura<sup>71</sup>. Tot i això, avui dia hi ha més reconeixement de l'existència de complicacions trombòtiques en pacients cirròtics i, per tant, s'esperaria que hi hagués un augment en la utilització d'anticoagulants en aquests pacients. Donada la limitada experiència de l'ús d'anticoagulants en aquests malalts no hi ha un criteri clar de quina seria la indicació més correcta.

Dades clíniques de l'ús d'heparines de baix pes molecular indiquen que els fàrmacs són segurs i efectius tant pel tractament com la prevenció de la trombosi venosa portal<sup>72,73</sup> i hi ha evidències que suggereixen que la fibrogènesi està influenciada per la trombosi<sup>74</sup>. De fet, està demostrat que tant la trombina com el factor Xa, que són agonistes dels receptors PAR (del seu nom en anglès: Protease Activated

Receptors)<sup>75-78</sup>, representen una de les principals vies d'activació de les CHE, promovent la seva proliferació i activant la síntesis de col·lagen<sup>77,79-82</sup> (Figura 11).



**Figura 11. Esquema dels efectes de la trombina a través dels receptors PAR en la malaltia hepàtica. MLC: miosina de cadena lleugera; PKC: fosfoquinasa C; NF-κB: factor de necrosi κB; factor vW: factor von Willebrand**

Els PAR són receptors acoblats a proteïna G<sup>76,77,79,83,84</sup>. Estudis moleculars han identificat quatre tipus diferents de PAR: PAR1, PAR3 i PAR4 que poden ser activats per la trombina i PAR2 que pot ser activat pel factor Xa i la tripsina. En fetges sans, les PAR s'expressen en diversos tipus cel·lulars<sup>82</sup>. A més, se sap que l'expressió de les PAR està augmentada en els fetges humans durant un dany agut i crònic<sup>85</sup>.



De fet, diversos estudis han demostrat els efectes beneficiosos de la inhibició de PAR<sup>86,87</sup> i de la inhibició de la cascada de coagulació en la fibrosi hepàtica<sup>88,89</sup> ja que resulta en una millora el fenotip de les CHE i en una menor progressió de fibrosi hepàtica en diversos models de dany hepàtic.

### 2.1.2 El flux portal

Està descrit que en la cirrosi hi ha un augment del flux portal, resultat d'una marcada vasodilatació arteriolar dels òrgans esplàncnics que produeix un increment en el volum sanguini que arriba a la vena porta. Aquesta situació condueix a una circulació hiperdinàmica esplàncnica, en que s'ha descrit una sobreproducció i hiperresposta a vasodilatadors circulants (ex. glucagó i òxid nítric (NO)) i una producció deficient i hiporesposta a vasoconstrictors (ex. tromboxà)<sup>3,90,91</sup>. De fet, les principals teràpies per a millorar la hipertensió portal estan actualment dirigides a disminuir el flux sanguini per a tal de disminuir-ne conseqüentment la pressió portal.

Els betabloquejants són els principals fàrmacs que s'utilitzen per a aquest efecte ja que disminueixen el flux sanguini portal actuant per dues vies:

- a) En el bloqueig dels receptors beta 1 adrenèrgics disminuint la freqüència i el despesa cardíaca.
- b) En el bloqueig dels receptors beta 2 adrenèrgics causant vasoconstricció arterial esplàncnica.

El principal problema d'aquests fàrmacs és que hi ha un percentatge de pacients que són no responedors a betabloquejants i no en disminueixen la pressió portal. Per això, durant els últims anys s'han estudiat altres estratègies terapèutiques per tal de disminuir la pressió portal a través de la disminució de la resistència vascular intrahepàtica.

### 3. Estratègies terapèutiques per a la regulació de la resistència vascular intrahepàtica

Actualment, la principal estratègia que es duu a terme en malalts amb cirrosi i hipertensió portal és la utilització de betabloquejants que ajuden a disminuir la pressió del sistema venós portal mitjançant la reducció del flux esplàncnic. Degut a la falta de resposta dels betabloquejants en alguns dels pacients, i la manca de tractaments per reduir la resistència vascular intrahepàtica, teràpies alternatives s'estan estudiant per tal de suplir aquesta necessitat. Algunes d'aquestes teràpies es dirigeixen a disminuir la microtrombosi hepàtica i a desactivar les CHE mitjançant l'ús d'anticoagulants, ja siguin heparines de baix pes molecular, com ara l'enoxaparina, o inhibidors directes del factor Xa, com el rivaroxaban.

Altres teràpies van dirigides a disminuir l'estrès oxidatiu que es troba augmentat en la cirrosi. En aquest cas teràpies amb antioxidants han demostrat ser efectives tant disminuint l'estrès oxidatiu, millorant el fenotip de la CHE i reduint la pressió portal.

#### 3.1 Anticoagulants

Els anticoagulants són substàncies tant endògenes com exògenes que inhibeixen la coagulació de la sang a l'interferir en algun punt de la via de coagulació (Figura 12).

Hi ha diversos tipus de fàrmacs anticoagulants: els antiagregants plaquetaris, les heparines, anti-vitamina K i els nous anticoagulants inhibidors directes del Factor Xa.

Per a l'estudi dels anticoagulants com a possibles estratègies terapèutiques per a la cirrosi, ens hem centrat en dos tipus d'anticoagulants: les heparines de baix pes molecular i els nous fàrmacs inhibidors directes del Factor Xa.

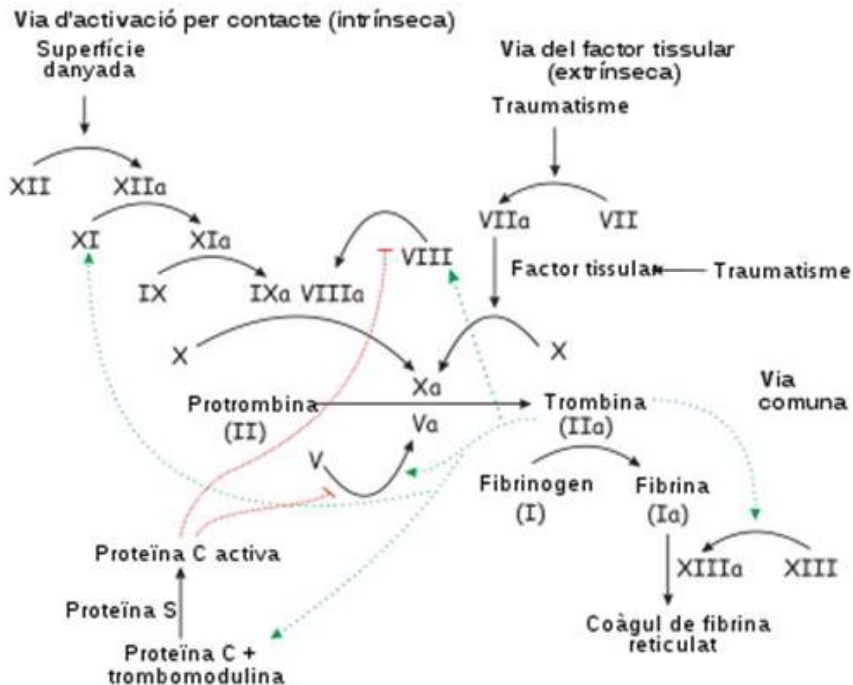


Figura 12. Via de la coagulació sanguínia

### 3.1.1 Heparines: Enoxaparina

Les heparines s'utilitzen àmpliament com anticoagulants injectables i tenen una densitat de càrrega molt alta. Per això, s'han desenvolupat nous productes farmacèutics derivats de les heparines, les heparines de baix pes molecular, en que s'han sotmès al fraccionament per tal de tenir una farmacodinàmica més previsible.

Les heparines de baix pes molecular s'uneixen a l'antitrombina (un dels anticoagulants endògens) i formen un complex irreversible que inactiva el factor Xa, tot i que també té una certa activitat anti-factor IIa (trombina). La via d'administració pot ser subcutània o endovenosa, amb una vida mitja més llarga que els altres anticoagulants i no requereixen monitorització clínica. Com a exemple d'aquestes heparines hi trobem l'enoxaparina.

L'enoxaparina sòdica és una heparina de baix pes molecular (4500 Dalton). La seva via d'administració és subcutània i té una vida mitjana és de 4,5 hores i té metabolisme hepàtic amb una biodisponibilitat del 92%. S'utilitza àmpliament per prevenir trombosi venosa i embòlies pulmonars i la seva administració és subcutània. Aproximadament entre el 10-40% dels fragments actius i inactius s'eliminen via ronyó.

### 3.1.2 Inhibidors directes del Factor Xa: Rivaroxaban

El factor Xa és un factor de coagulació clau per a la formació de trombina i en la formació de coàguls. Per tant, representa un punt estratègic alhora de dissenyar nous anticoagulants. Els inhibidors directes del factor Xa actuen directament sobre el lloc actiu de la molècula del factor Xa i inhibeixen tant el factor Xa com al factor Xa unit al complex de protrombinasa<sup>92</sup>. Un dels exemples d'inhibició directa del factor Xa és el rivaroxaban. El rivaroxaban és un anticoagulant oral que ja s'ha provat en malalties tromboembòliques en assajos clínics i ha demostrat tenir una eficàcia similar a les teràpies estàndard però amb un menor risc de sagnat<sup>93</sup>.

## 3.2 Antioxidants

El terme antioxidant no està clarament definit i, segons està descrit a la literatura, pot referir-se a una gran quantitat de compostos que tenen un ampli rang de mecanismes d'acció. Halliwell<sup>94</sup> va proposar la definició dels antioxidants com a molècules capaces de retardar o prevenir l'oxidació d'altres molècules.

La oxidació és una reacció química de transferència d'electrons d'una substància a un agent oxidant. Les reaccions d'oxidació poden produir radicals lliures que comencen una sèrie de reaccions en cadena que poden danyar els diferents components d'una cèl·lula, tals com les proteïnes o l'ADN, arribant a induir l'apoptosi en les cèl·lules.

La funció dels antioxidants és acabar amb aquestes reaccions seqüencials eliminant els radicals lliures intermediaris i inhibint reaccions d'oxidació oxidant-se ells mateixos.

Tot i que les reaccions d'oxidació són imprescindibles per a la vida, poden arribar a ser molt perjudicials, per això tant plantes com animals contenen una sèrie de sistemes múltiples capaços de mantenir l'estat d'oxidació total de la cèl·lula. Alguns dels exemples són el glutatió, la vitamina C, o enzims com ara la catalasa, la superòxid dismutasa o la quinona. De fet, l'estrès oxidatiu s'ha associat a la patogènesi de moltes malalties cardiovasculars, Alzheimer, càncer, etc<sup>95-97</sup>.

### 3.2.1 Antioxidants dirigits a mitocondri: Mitoquinona

Els mitocondris juguen un paper molt important en la senyalització cel·lular i contribueixen tant en l'adaptació a l'estrès oxidatiu com en el desenvolupament de malalties com el dany en isquèmia-reperfusió, malalties neurodegeneratives, diabetis i arteriosclerosi<sup>98</sup>. Els mitocondris també són importants reguladors de l'estat bioenergètic de les cèl·lules en condicions fisiològiques, i per tant són potencials objectius de teràpies dirigides. A més, els mitocondris són un dels llocs on es produeix més dany oxidatiu en circumstàncies clíniques<sup>99</sup>. Per tot això, durant la última dècada, hi ha hagut un augment d'interès en desenvolupar teràpies dirigides als mitocondris per al tractament de diferents malalties<sup>61,100,101</sup>. Una de les estratègies per dirigir els antioxidants als mitocondris és mitjançant la conjugació a un catió lipofílic, com és el trifenilfosfonium (TPP)<sup>102,103</sup>. Aquest procediment permet administrar molècules que s'acumulen a la cèl·lula i que, gràcies al potencial de membrana plasmàtica, s'acumulen dins dels mitocondris on el compost protegirà de l'estrès oxidatiu.

La membrana mitocondrial externa és permeable a molècules petites, però la membrana mitocondrial interna representa la major barrera per a introduir fàrmacs dins dels mitocondris. La cadena de transport electrònic genera un gradient de protons que s'utilitza per a la síntesi d'ATP amb l'ATP sintetasa. D'aquesta manera es genera un

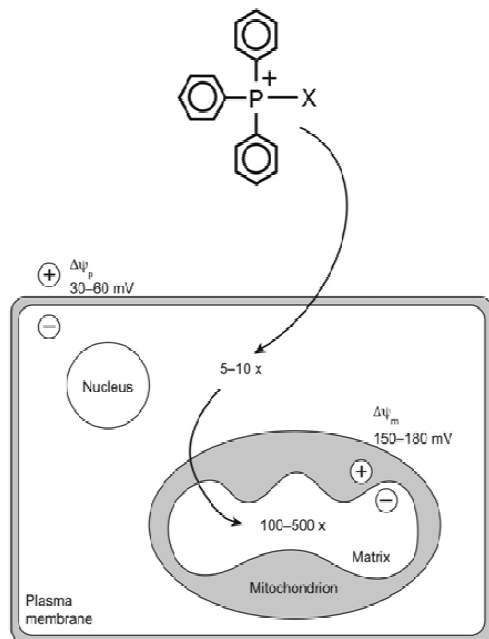
potencial negatiu a través de les dues membranes mitocondrials. Aquest potencial entre les membranes es pot utilitzar per dirigir cations lipofílics dins dels mitocondris. Moltes característiques fan que els cations lipofílics siguin molt efectius alhora de lliurar antioxidants als mitocondris:

1. Poden passar directament a través de la bicapa de fosfolípids sense necessitar cap mecanisme de captació
2. S'acumulen dins del mitocondri degut al potencial de membrana
3. Es poden moure lliurement per la bicapa lipídica

Per tant, unint un compost a un catió lipofílic permet la seva distribució selectiva dins dels mitocondris.

En principi, una gran quantitat d'antioxidants són susceptibles d'unir-se al catió TPP per a ser dirigits al mitocondri. Un dels més utilitzats és la ubiquinona endògena, anomenada coenzim Q<sub>10</sub>, que és sintetitzada a la membrana mitocondrial interna. A part del seu paper en l'obtenció d'energia per a la cèl·lula s'ha descrit el seu paper en la inhibició de trombosi i reduint ERO<sup>104</sup>. L'activitat redox de la ubiquinona li permet actuar com a transportadora

d'electrons a la mateixa membrana mitocondrial interna, on és reduïda a ubiquinol per diferents deshidrogenases i tornada a oxidar a ubiquinona, principalment pel complex III de la cadena transportadora d'electrons.

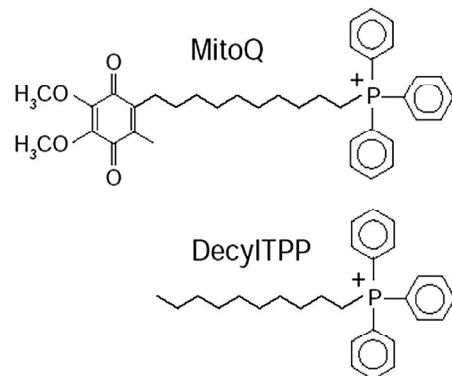


**Figura 13: Acumulació del catió TPP dins del mitocondri. Extret de Murphy MP. *Biochemical Society Transactions* 2016**

Donades les propietats antioxidants de la ubiquinona, diversos estudis s'han dut a terme per a preparar i provar anàlegs de la ubiquinona. Posteriorment, es va sintetitzar la Mitoquinona (MitoQ), que és la ubiquinona unida al catió TPP, i es va demostrar que la seva administració oral reduïa la pressió sanguínia, augmentava la biodisponibilitat de NO i reduïa la hipertrofia cardíaca en un model murí d'hipertensió arterial<sup>105</sup>. La

MitoQ s'ha utilitzat per prevenir el dany oxidatiu mitocondrial i per demostrar el paper de les ERO mitocondrials en les vies de senyalització. També s'ha descrit que la MitoQ és captada per mitocondris funcionals i que s'absorbeix cap a la membrana mitocondrial interna. A més a més, quan la forma ubiquinol de la MitoQ actua com a antioxidant, s'oxida cap a la forma ubiquinol, que és ràpidament oxidada restaurant el seu efecte antioxidant. Aquest

és un efecte important, perquè el reciclatge dels antioxidants és un dels factors més importants quan s'estudia l'eficàcia dels antioxidants<sup>106,107</sup>. A més es va demostrar per espectrometria de masses que la MitoQ s'acumulava principalment a fetge, cor, i ronyó<sup>105</sup>.



**Figura 14: Fórmula química de la mitoquinona (MitoQ) i del seu catió lipofílic (DecylTPP). Extret de Mitchell T., et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2011**

# JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---





## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---

Tot i que en els últims anys hi ha hagut una gran millora en el coneixement de la malaltia hepàtica, encara afecta al voltant de 29 milions de persones a la Unió Europea, i la hipertensió portal, una de les principals complicacions associades, és la primera causa de mort en pacients cirròtics<sup>108</sup>.

Per al desenvolupament de la hipertensió portal hi ha de tenir lloc el fenomen fisiològic necessari, que en aquest cas és l'augment de resistència vascular intrahepàtica. Per tant, les teràpies dirigides a disminuir aquesta resistència vascular intrahepàtica serà positiva per a la disminució de la pressió portal en malalts de cirrosi. Aquesta disminució en la pressió portal és molt important per a l'evolució de la malaltia: està descrit que una disminució major del 20% o que la pressió portal estigui per sota de 12 mmHg, redueix el risc de patir complicacions derivades de la hipertensió portal<sup>109</sup>.

Avui dia s'estan estudiant diverses estratègies farmacològiques per a pacients amb hipertensió portal, tot i que el d'elecció segueix sent l'ús de betabloquejants, com ara el propranolol o el carvedilol. Aquests fàrmacs aconseguen reduir la pressió portal mitjançant la reducció del flux venós portal degut a un descens de la despesa cardíaca i a una menor vasoconstricció esplàncnica<sup>3</sup>. Tot i això, existeixen pacients no responedors a aquesta teràpia, ja que no assolixen una disminució de la pressió portal. És important destacar que aquests betabloquejants tenen un efecte només sobre el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica. Per això, és important trobar noves dianes terapèutiques que millorin també el component estructural de la resistència vascular intrahepàtica i que, per tant, puguin funcionar en una gran majoria de pacients.

Diferents teràpies farmacològiques dirigides a disminuir la resistència vascular intrahepàtica en fetges cirròtics s'han desenvolupat en els últims temps. Actualment s'està estudiant la possible aplicació terapèutica dels anticoagulants en pacients cirròtics. S'ha vist que aquests pacients cirròtics tenen un augment en la síntesi de trombina a nivell hepàtic que facilita la formació de microtrombes als sinusoides hepàtics. A part dels inconvenients que té la presència de microtrombosi a nivell de rec sanguini del teixit, la trombina, juntament amb el factor Xa, és un potent activador de les CHE, cèl·lules que promouen la síntesi de col·lagen i que, per tant, afavoreixen la fibrosi hepàtica i la hipertensió portal.

D'altra banda, també s'han estudiat els efectes beneficiosos dels antioxidants en la hipertensió portal, ja que disminueixen l'estrès oxidatiu que es troba augmentat en els fetges cirròtics i augmenten la biodisponibilitat del NO, millorant així la vasodilatació intrahepàtica i, per tant, disminuint la pressió portal<sup>52,110,111</sup>.

Els treballs de recerca de la present tesi estan orientats a:

1. Ampliar el coneixement dels mecanismes involucrats en els efectes dels anticoagulants, enoxaparina i rivaroxaban, sobre el component dinàmic i estructural de la resistència vascular intrahepàtica en fetges cirròtics.
2. Avaluar els efectes de l'antioxidant dirigit a mitocondri, mitoquinona, sobre el component dinàmic i estructural de la resistència vascular intrahepàtica en fetges cirròtics.

### **Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

L'augment de la resistència vascular intrahepàtica al flux portal constitueix el fenomen primari en la hipertensió portal. Es sap que aquest augment ve donat tant per un augment en la fibrosi hepàtica i per un augment del to vascular hepàtic. De fet, està àmpliament acceptat que les CHE són les principals cèl·lules, que un cop activades, estan implicades en l'excessiva síntesi dels components de la matriu extracel·lular i en l'augment de la contracció dels vasos hepàtics. Una de les principals vies d'activació de les CHE és a través de l'estimulació dels receptors de proteasa activada (PAR)<sup>75,77-79,112</sup>. Aquests receptors es troben augmentats en dany hepàtic, tant agut com crònic<sup>85</sup>, i la seva inhibició resulta en una millora significativa en el fenotip de les CHE i en la progressió de la fibrosi hepàtica<sup>86,87</sup>. La generació de trombina es duu a terme de manera molt eficient pel factor X activat (factor Xa). A més, tant la trombina com el factor Xa són potents activadors dels receptors PAR i per tant potencien l'activació de les CHE<sup>77,79-82</sup>. A tot això se li afegeix que la formació de coàguls derivats de trombina poden crear perturbacions del flux sanguini i l'obturació de petites venes i petits sinusoides hepàtics, afavorint-ne l'alteració del parènquima hepàtic<sup>113</sup>.

La **hipòtesi** de l'estudi va ser que l'administració de l'anticoagulant enoxaparina a rates amb cirrosi milloraria el fenotip de la CHE, disminuiria la fibrosi hepàtica i, conseqüentment, reduiria la hipertensió portal.

Per tant, els **objectius** de l'estudi van ser avaluar els efectes de l'administració aguda, curta, llarga i preventiva amb l'anticoagulant enoxaparina en l'hemodinàmica hepàtica i sistèmica, en la fibrosi hepàtica i en la biodisponibilitat de l'òxid nítric en rates cirròtiques.

## **Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells**

Tal i com s'ha descrit prèviament, una de les principals vies d'activació de les CHE és a través dels receptors PAR, per part de la trombina i el factor Xa, components de la cascada de coagulació. Aquests components poden comportar un empitjorament de la malaltia, tant per l'efecte que tenen sobre l'activació de la CHE com per l'augment de la microtrombosi en fetges cirròtics. Per altra banda, se sap que els pacients cirròtics tenen uns nivells disminuïts d'antitrombina que es relacionen directament amb la disfunció hepàtica<sup>114,115</sup>. L'anticoagulant oral Rivaroxaban, al contrari que l'enoxaparina, és un inhibidor selectiu del factor Xa independent dels nivells d'antitrombina, de manera que el seu efecte no està relacionat amb els nivells d'antitrombina.

La **hipòtesi** de l'estudi va ser que l'administració crònica de l'anticoagulant oral Rivaroxaban reduiria la microtrombosi hepàtica i milloraria el fenotip de la cèl·lula estrellada hepàtica, per tant, disminuint la fibrosi hepàtica i reduiria els nivells d'hipertensió portal en rates cirròtiques.

Els **objectius** del present estudi van ser avaluar els efectes de l'administració de l'anticoagulant oral, Rivaroxaban, en l'hemodinàmica hepàtica i sistèmica, en el nivell d'activació de les CHE, en la via del NO, en la disfunció endotelial i en la fibrosi hepàtica en rates cirròtiques.

### **Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

L'estrès oxidatiu és un dels principals factors implicats en l'activació de les CHE i, conseqüentment està implicat en la progressió de la fibrosi hepàtica i en la hipertensió portal. La cadena respiratòria dels mitocondris és un dels llocs clau on es produeixen les espècies reactives d'oxigen. Degut a això, hi ha hagut molt interès en desenvolupar teràpies dirigides als mitocondris. Avui dia, una de molècules més ben caracteritzades és la mitoquinona. S'han descrit efectes beneficiosos de la mitoquinona en estudis de dany hepàtic com l'esteatosi<sup>116</sup>, en dany per isquèmia-reperfussió<sup>117</sup> i en estudis amb pacients amb hepatitis C<sup>118</sup>.

La **hipòtesi** de l'estudi va ser que el tractament amb l'antioxidant dirigit a mitocondri mitoquinona disminuiria estrès oxidatiu creat dins el mitocondri, que aquesta disminució d'estrès oxidatiu disminuiria el nivell d'activació de les CHE i, per tant, la fibrosi hepàtica. Conseqüentment, el tractament amb mitoquinona disminuiria la resistència vascular intrahepàtica i els nivells de pressió portal en rates cirròtiques.

Els **objectius** del present estudi van ser determinar si l'estrès oxidatiu mitocondrial està augmentat en cirrosi i quins tipus cel·lulars hi estan involucrats. Alhora, s'avaluen els efectes de l'administració de l'antioxidant dirigit a mitocondri, mitoquinona, en l'hemodinàmica hepàtica i sistèmica, en el fenotip de les CHE, fibrosi i inflamació hepàtica.



# **CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS**

---





## CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS

---

**Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

Cerini F\*, **Vilaseca M\***, Lafoz E, García-Irigoyen O, García-Calderó H, Tripathi DM, Avila M, Reverter JC, Bosch J, Gracia-Sancho J, García-Pagán JC.

Journal of Hepatology 2016;64:834-842

IF:11.336

(\* co-primeres autores)



## Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats

Federica Cerini<sup>1,†</sup>, Marina Vilaseca<sup>1,3,5,†</sup>, Erica Lafoz<sup>1,5</sup>, Oihane García-Irigoyen<sup>2,3</sup>, Héctor García-Calderó<sup>1,3,5</sup>, Dinesh M. Tripathi<sup>1,5</sup>, Matias Avila<sup>2,3</sup>, Juan Carlos Reverter<sup>4,5</sup>, Jaime Bosch<sup>1,3,5</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>1,3,5</sup>, Juan Carlos García-Pagán<sup>1,3,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Spain; <sup>4</sup>Hemotherapy and Hemostasis Department, Hospital Clínic, Spain; <sup>5</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Background & Aims:** Increased hepatic vascular resistance due to fibrosis and elevated hepatic vascular tone is the primary factor in the development of portal hypertension. Heparin may decrease fibrosis by inhibiting intrahepatic microthrombosis and thrombin-mediated hepatic stellate cell activation. In addition, heparin enhances eNOS activity, which may reduce hepatic vascular tone. Our study aimed at evaluating the effects of acute, short-, long-term and preventive enoxaparin administration on hepatic and systemic hemodynamics, liver fibrosis and nitric oxide availability in cirrhotic rats.

**Methods:** Enoxaparin (1.8 mg/kg subcutaneously), or its vehicle, was administered to CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats 24 h and 1 h before the study (acute), daily for 1 week (short-term) or daily for 3 weeks (long-term) and to thioacetamide-cirrhotic rats daily for 3 weeks with/without thioacetamide (preventive/long-term, respectively). Mean arterial pressure, portal pressure, portal blood flow, hepatic vascular resistance and molecular/cellular mechanisms were evaluated.

**Results:** No significant changes in hemodynamic parameters were observed in acute administration. However, one-week, three-week and preventive treatments significantly decreased portal pressure mainly due to a decrease in hepatic vascular resistance without significant changes in mean arterial pressure.

These findings were associated with significant reductions in liver fibrosis, hepatic stellate cell activation, and desmin expression. Moreover, a reduction in fibrin deposition was observed in enoxaparin-treated rats, suggesting reduced intrahepatic microthrombosis.

**Conclusion:** Enoxaparin reduces portal pressure in cirrhotic rats by improving the structural component of increased liver resistance. These findings describe the potentially beneficial effects of enoxaparin beyond the treatment/prevention of portal vein thrombosis in cirrhosis, which deserve further investigation.

© 2015 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Increased resistance to portal blood flow, derived from architectural alterations of the liver parenchyma and a dynamic increment in the hepatic vascular tone, is the primary factor in the development of portal hypertension [1,2]. Architectural distortion of the cirrhotic liver is partly due to excessive synthesis of extracellular matrix components performed by dys-regulated fibrogenic cells such as hepatic stellate cells (HSC) and portal myofibroblasts [3]. Several evidences suggest that liver fibrogenesis is positively influenced by inflammation and thrombosis [4]. Indeed, it has been demonstrated that different pro-coagulation factors, such as the serine protease thrombin, dysregulate HSC phenotype through the stimulation of their protease activated receptors (PARs) [5–9]. Moreover, PARs expression is highly upregulated in human livers undergoing acute and chronic injury [10], and their inhibition results in a significant amelioration in HSC phenotype and hepatic fibrosis progression in experimental models of mild liver damage [11,12]. Generation of thrombin, from its precursor prothrombin, is efficiently performed by the activated coagulation molecule factor Xa. It is nowadays recognized that either thrombin or factor Xa are agonists of PARs and PAR signaling represents one of the main pathways of HSC activation and collagen deposition [7,8,13–15].

**Keywords:** Portal hypertension; Anticoagulation; Low molecular weight heparin; Cirrhosis; Hepatic stellate cells.

Received 2 March 2015; received in revised form 30 November 2015; accepted 11 December 2015; available online 11 December 2015

\* Corresponding author. Address: Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab – Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x2824; fax: +34 932279856.

E-mail address: jcgarcia@clinic.cat (J.C. García-Pagán).

<sup>†</sup> These authors contributed equally as joint first authors.

**Abbreviations:** HSC, hepatic stellate cells; PAR, protease activated receptor; LMWH, low molecular weight heparin; PVT, portal vein thrombosis; NO, nitric oxide; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; MAP, mean arterial pressure; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; HVR, hepatic vascular resistance; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide;  $\alpha$ -SMA, alpha-smooth muscle actin; PDGFRb, platelet derived growth factor receptor b; eNOS, endothelial NO synthase; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite.



ELSEVIER

In addition, thrombin-derived clot formation may promote flow disturbances and occlusion of small-sized intrahepatic veins and sinusoids, representing another triggering factor of liver tissue remodelling [16]. This mechanism, named parenchymal extinction, includes progressive vascular obliteration due to thrombosis or inflammation leading to both apoptosis and atrophy of the liver [17].

Heparins, through their interaction with antithrombin, which induces a conformational change in antithrombin molecule, greatly facilitates the interactions between antithrombin and serine protease targets such as thrombin, and also factor Xa, IXa, XIa and XIIa [18]. Potential beneficial effects of the low molecular weight heparin (LMWH)-induced inhibition of the coagulation cascade have been evaluated in liver fibrosis [19,20]. Previous translational studies, performed in experimental models of mild liver damage induced by CCl<sub>4</sub> and common bile duct ligation, have proposed that LMWH may improve hepatic regeneration, by the inhibition of HSC proliferation and/or by inducing a marked reduction in the hepatic cytonecrosis index respectively [19,21]. Whether the anti-fibrotic effects of the drug is directly due to its anticoagulative effect preventing thrombosis or to the inactivation of cell-mediated fibrogenic mechanisms remains unknown. In addition, it has not yet been evaluated whether these beneficial effects are also observed in more severe liver damage (ie. established cirrhosis). Indeed, a possible beneficial role of LMWH in the treatment of advanced liver disease was recently suggested by a randomised controlled trial investigating the effect of continuous use of the LMWH enoxaparin to prevent portal vein thrombosis (PVT) in patients with cirrhosis. In this study, enoxaparin reduced the incidence of PVT and, although the underlying mechanisms remain largely unknown, also reduced the incidence of liver decompensation and improved survival [22].

In addition, heparins may also have beneficial effects on the vasculature via endothelium-dependent mechanisms. Indeed, LMWH has been shown to upregulate nitric oxide (NO) levels by activation of its synthesis [23–25].

The present study aimed to characterize the effects, and underlying mechanisms, of acute, short, long-term and preventive administration of the LMWH enoxaparin on the hepatic and systemic hemodynamics and on liver fibrosis in two experimental models of cirrhosis (CCl<sub>4</sub> and thioacetamide).

## Materials and methods

### *In vivo experiments*

#### *Induction of cirrhosis by CCl<sub>4</sub> and LMWH administration*

Cirrhosis was induced in male Wistar rats (50–75 g) with CCl<sub>4</sub> inhalation three times a week. Phenobarbital (0.3 g/L) was added to drinking water as previously described [26]. When animals developed ascites, after approximately 12–15 weeks of CCl<sub>4</sub> inhalation, phenobarbital and CCl<sub>4</sub> administration was discontinued. Rats were then randomized to receive either enoxaparin (1.8 mg/kg body weight, subcutaneously; Clexane, Sanofi-Aventis), or its vehicle (saline 0.9%), according to three different protocols of study:

- Acute: Enoxaparin or vehicle (n = 10 per group) were administered 24 h and 1 h before the study.
- Short-term: Enoxaparin or vehicle (n = 13 per group) were given daily for 1 week.
- Long-term: Enoxaparin or vehicle (n = 8 per group) were administered daily for 3 weeks.

Experiments were performed 1 h after the last administration. The selected dose of enoxaparin was based on previous reports [19,27], and validated in our laboratory in preliminary studies in cirrhotic animals where prophylactic levels of anti-Xa in blood were measured 4 h after of its administration (0.2 ± 0.1 vs. 1.12 ± 0.2 UI/ml, vehicle-treated cirrhotic rats vs. enoxaparin-treated cirrhotic rats). Treatment was prepared by a third person not administering the drug/vehicle or performing the study.

Animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with European Community guidelines for the protection of animals used for experimental or other scientific purposes (EEC Directive 86/609).

#### *Induction of cirrhosis by thioacetamide (TAA) and LMWH administration*

Cirrhosis was induced in male Sprague Dawley rats (150–200 g) with intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA, Sigma-Aldrich) dissolved in saline, twice a week at a dose of 250 mg/kg for 12 weeks. In this model, 2 different treatment strategies were used:

- Long-term: Enoxaparin or vehicle (n = 5–7 per group) were administered daily for 3 weeks after completion of TAA intoxication period.
- Preventive: Enoxaparin or vehicle (n = 10–12 per group) were administered daily for 3 weeks since week 10 until week 12 of TAA administration.

#### *In vivo hemodynamic study*

*In vivo* measurement of hepatic and systemic hemodynamic parameters and assessment of liver microvascular function was performed as described in the [Supplementary materials and methods](#). At the end of the study, blood samples and liver tissue were collected for biochemical, histological and molecular assays. Livers were washed with 20 ml of saline prior to collection. Aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured in serum by standard techniques.

#### *Measurement of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels*

cGMP, a marker of NO bioavailability, was determined in liver homogenates as previously described [28] using an enzyme immunoassay (Cayman Chemical Co.).

#### *Measurement of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) content in liver tissue*

*In situ* O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels were evaluated with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) [29]. 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).

#### *Quantification of hepatic fibrosis*

Cirrhotic rat livers were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with 0.1% Sirius Red and Masson's Trichromic, photographed, and analyzed using a microscope equipped with a digital camera. The red-stained (Sirius Red) or the blue-stained (Masson's Trichromic) area was measured using Axiovision software [26]. Values are expressed as the mean of 8 fields per sample.

#### *Western blot*

Expression of  $\alpha$ -SMA, Pdgfr $\beta$ , phosphorylated Moesin at Thr<sup>558</sup> (p-Moesin; as a marker of Rho kinase activity), nitrotyrosinated proteins, fibrinogen, and TNF- $\alpha$  was determined by western blot in hepatic samples as described [30,31] using the following antibodies:  $\alpha$ -SMA (Sigma-Aldrich), Pdgfr $\beta$  (Santa Cruz), p-Moesin (Santa Cruz), nitrotyrosine (Cayman Chemical Co.), fibrinogen (Nordic-MUBio), and TNF- $\alpha$  (Abcam).

Hepatic fibrin deposits were determined by western blot using an anti-fibrinogen antibody, which detects fibrinogen epitopes preserved in the insoluble fibrin deposits, as previously described [32,33]. Blots were stained with Ponceau or anti-GAPDH antibodies to show equal loading.

#### *Immunohistochemistry*

Immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with a mouse anti- $\alpha$ -SMA antibody (Sigma), a mouse anti-desmin antibody (Dako), a rabbit anti-fibrinogen antibody (Dako) and a mouse anti-CD68 antibody (Biorad) [31,34]. Antibodies were visualized with Dako Real Envision detection system peroxidase/DAB+. Slides were counterstained with haematoxylin. For quantification, a point grid was placed over the slide-pictures and the number of positive

## Research Article

cells that collocate with the dots of the grid was counted. This value was expressed as a percentage of the total grid dots of the slide [26]. Counting was done by 2 researchers in a coded fashion (without knowing the treatment group of the liver sections). The code was open afterwards. Fourteen slide-pictures were counted in each liver. Negative controls using PBS (for  $\alpha$ -SMA and Desmin) or a rabbit immunoglobulin fraction (for Fibrinogen) were included.

### Immunofluorescence

OCT sections were fixed with methanol and blocked in 10% goat serum. Immunostaining was performed with mouse anti- $\alpha$ -SMA antibody (Sigma), 555 Alexa anti-mouse antibody (Life Technologies) was used as a secondary antibody. Imaging was done in fluorescent microscope (Olympus). Fourteen fields were counted in each liver with ImageJ 1.33u software.

### In vitro experiments

#### Hepatic stellate cells (HSC) isolation and characterization

Primary HSC were isolated from enoxaparin and vehicle-treated cirrhotic rats as previously described [35]. Effects of enoxaparin on HSC phenotype was determined through gene expression analysis of  $\alpha$ -SMA, pro-collagen I and Pdgfr $\beta$  [35].

Please see [Supplementary methods](#) for complete description. Results using primary cirrhotic HSC were derived from three independent isolations and three replicates.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 19.0 for Windows. All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed with the Student *t* test for unpaired data or with Mann-Whitney *U* test when assumptions of normality could not be verified. *p* value <0.05 was considered significant.

## Results

### Acute enoxaparin treatment in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats

Acute administration of enoxaparin did not affect any systemic or hepatic hemodynamic parameters evaluated (Table 1A). Moreover, acute enoxaparin did not modify hepatic cGMP levels or hepatic oxidative stress content (data not shown).

### Short-term enoxaparin administration in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats

One-week enoxaparin-treated rats had significantly lower portal pressure (PP) than vehicle-treated rats (Table 1B) without significant changes in portal blood flow (PBF). However, probably due to high variability, we were unable to identify significant changes in hepatic vascular resistance (HVR). No significant differences in mean arterial pressure (MAP), superior mesenteric arterial blood flow (SMABF), heart rate, or biochemical parameters were observed (Table 1B).

To understand the molecular mechanisms partly responsible for the decrease in PP, we characterized the NO-pathway, liver fibrosis, the presence of microthrombosis and inflammatory markers in livers from enoxaparin and vehicle-treated cirrhotic rats.

One-week treatment with enoxaparin produced a marked reduction in hepatic superoxide levels, that were associated with a significant reduction in nitrotyrosines and a 3-fold increase in hepatic cGMP levels (Fig. 1A-C), suggesting a reduction in O<sub>2</sub><sup>-</sup>-mediated NO scavenging. Liver tissue immunohistochemistry for CD68, a macrophage inflammation marker, did not show significant differences between enoxaparin and vehicle-treated rats (Supplementary Fig. 2).

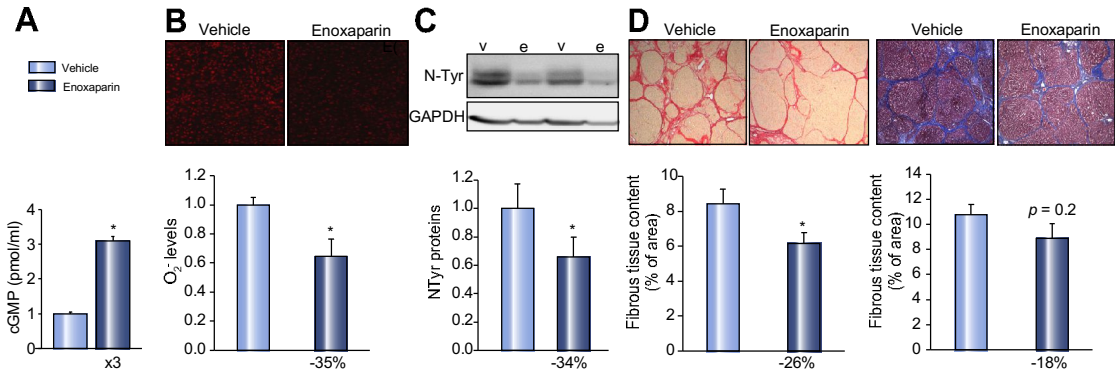
**Table 1. Effects of acute, short-term and chronic administration of enoxaparin on hepatic, systemic hemodynamics and biochemical parameters in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.**

A			
Acute treatment			
Variable	Vehicle n = 10	Enoxaparin n = 10	<i>p</i> value
PP (mmHg)	14.3 $\pm$ 2.5	14.5 $\pm$ 3.5	0.8
MAP (mmHg)	83 $\pm$ 27	88 $\pm$ 20	0.5
PBF (ml/min)	15.2 $\pm$ 5.4	10.6 $\pm$ 5.2	0.1
SMABF (ml/min)	13.8 $\pm$ 6.5	12.9 $\pm$ 2.9	0.7
HVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.7	0.1
HR (beats/min)	325 $\pm$ 32	339 $\pm$ 48	0.7
B			
Short-term treatment			
Variable	Vehicle n = 13	Enoxaparin n = 13	<i>p</i> value
PP (mmHg)	13.9 $\pm$ 1.9	12.2 $\pm$ 1.8	0.02
MAP (mmHg)	86 $\pm$ 15	80 $\pm$ 17	0.2
PBF (ml/min)	10.7 $\pm$ 4.3	9.8 $\pm$ 2.2	0.9
SMABF (ml/min)	15.8 $\pm$ 7.3	12.8 $\pm$ 4.2	0.4
HR (beats/min)	338 $\pm$ 30	342 $\pm$ 42	0.9
HVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.4 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.4	0.7
AST (U/L)	173 $\pm$ 35	124 $\pm$ 38	0.3
ALT (U/L)	85 $\pm$ 20	53 $\pm$ 12	0.3
C			
Long-term treatment			
Variable	Vehicle n = 8	Enoxaparin n = 8	<i>p</i> value
PP (mmHg)	11.4 $\pm$ 1.6	9.5 $\pm$ 1.5	0.02
MAP (mmHg)	89 $\pm$ 17	97 $\pm$ 21	0.4
PBF (ml/min)	12.2 $\pm$ 3.3	15.9 $\pm$ 5	0.2
SMABF (ml/min)	8.1 $\pm$ 1.4	9.1 $\pm$ 3.1	0.5
HVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.05
HR (beats/min)	360 $\pm$ 46	337 $\pm$ 42	0.5
AST (U/L)	107 $\pm$ 26	55 $\pm$ 31	0.07
ALT (U/L)	50 $\pm$ 13	22 $\pm$ 13	0.1

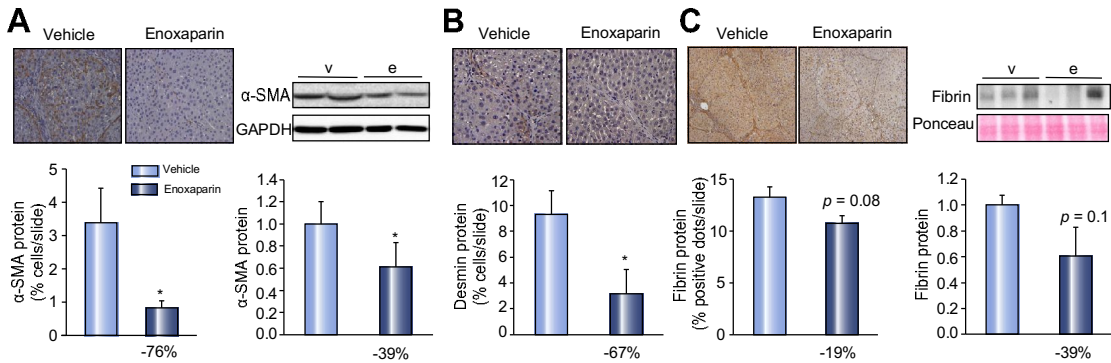
PP, portal pressure; MAP, mean arterial pressure; PBF, portal blood flow; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; HVR, hepatic vascular resistance; HR, heart rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean  $\pm$  SD.

Vehicle-treated cirrhotic rats exhibited marked architectural distortion, with abundant fibrosis and HSC proliferation. Nevertheless, enoxaparin-treated cirrhotic rats showed a 26% reduction in the fibrosis area with thinner septa and with larger regenerative nodules. Reduction in liver fibrosis was confirmed with Masson's Trichromic staining ( $-18\%$  decrease) (Fig. 1E). This was associated with a significant improvement in HSC phenotype, proved by decreased  $\alpha$ -SMA expression and liver desmin content (Fig. 2A-B). In addition, a diminished expression of Pdgfr $\beta$  ( $-19\%$ ) and p-Moesin ( $-32\%$ ) were observed; although the difference did not reach statistical significance (data not shown).

One-week enoxaparin-treated cirrhotic rats exhibited lower fibrin deposition, in comparison to vehicle-treated rats (Fig. 2C), although the difference did not reach statistical significance.



**Fig. 1. Effects of short-term enoxaparin on NO-pathway and liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.** (A) NO bioavailability measured as cGMP in 1 week vehicle-treated (left) or enoxaparin-treated (right) livers (both n = 13). (B) Superoxide content measured with dihydroethidium staining in livers described above (both n = 3). (C) Peroxynitrite levels in livers described above measured as nitrotyrosinated proteins (both n = 13). (D) Liver fibrosis quantification by Sirius Red (left) and Masson's Trichrome (right) in cirrhotic rats described above. Quantifications derived from 8 pictures per slide (10 ×). Values represent mean ± SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle.



**Fig. 2. Effects of short-term enoxaparin on HSC activation and microthrombosis in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.** (A) Representative α-SMA immunohistochemistry and western blot with quantifications from livers described in Fig. 1 (both n = 13). (B) Representative desmin detection and quantification in livers described above. (C) Fibrin determination by immunohistochemistry and western blot in livers described above. Quantifications derived from 14 pictures per slide. Values represent mean ± SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle.

*Long-Term enoxaparin treatment in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats*

Three-week administration of enoxaparin determined a 17% decrease in PP that was associated with a significant reduction in HVR without significant changes in MAP, PBF, SMABF, heart rate or biochemical parameters (Table 1C).

Livers from enoxaparin-treated rats had lower oxidative stress levels, measured as O<sub>2</sub><sup>-</sup> and ONOO<sup>-</sup>. Nevertheless, hepatic cGMP levels were similar in vehicle or enoxaparin-treated animals (Fig. 3A–C). There were also no significant differences between vehicle and enoxaparin-treated cirrhotic rats in the response of the portal perfusion pressure to incremental doses of acetylcholine (Supplementary Fig. 1A) nor in the inflammatory markers CD68 and TNF-α (Supplementary Fig. 2).

Enoxaparin-treated rats showed a 25% reduction in fibrosis deposition (Sirius Red) in comparison to vehicle-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats, also confirmed with Masson's Trichrome staining (Fig. 3D). Fibrosis reduction was associated with a

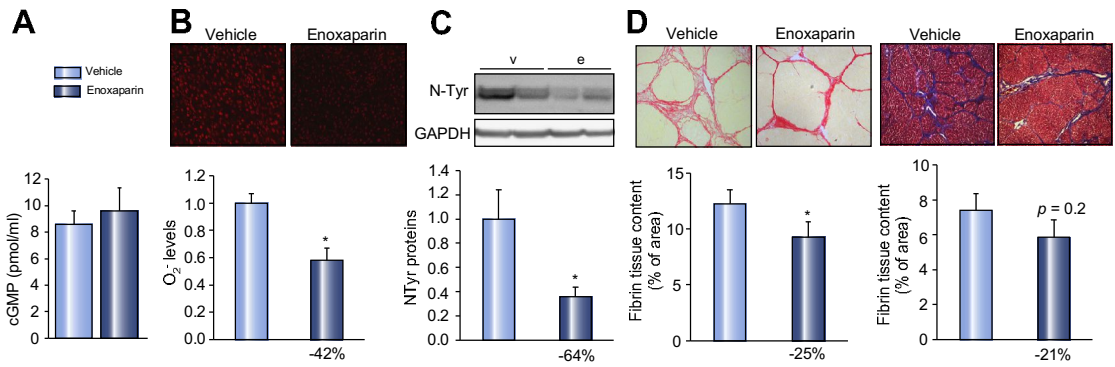
significant improvement in HSC phenotype, as proved by a significant decrease in α-SMA, Pdgfrβ and p-Moesin, and by a marked reduction in HSC content, measured using desmin (Fig. 4A–D). There was a significant reduction in the expression of α-SMA, pro-collagen 1 and Pdgfrβ in primary HSC isolated from enoxaparin-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats compared with HSC from vehicle-treated cirrhotic rats confirming HSC deactivation by enoxaparin (Fig. 5).

In addition, livers from enoxaparin-treated rats showed a marked and significant decrease in fibrin deposition in comparison to livers from vehicle-treated rats (Fig. 4E). These findings further support a reduction of thrombotic events within the liver in rats receiving enoxaparin.

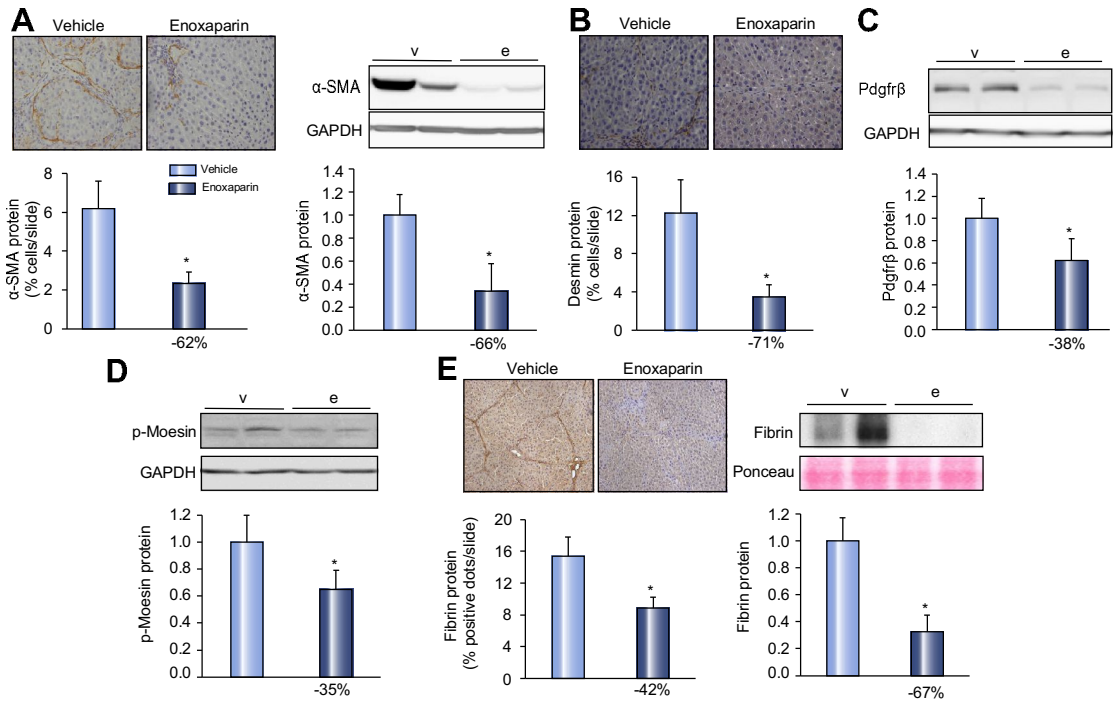
*Long-Term enoxaparin treatment in TAA-cirrhotic rats*

Similar to CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats, TAA-cirrhotic enoxaparin-treated rats exhibited a 16% decrease in PP (Table 2A). This was

Research Article



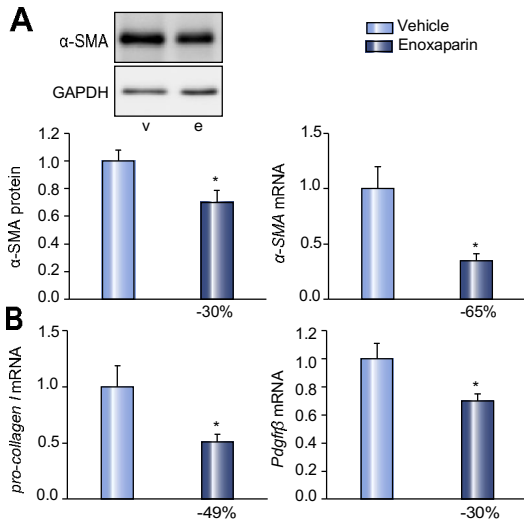
**Fig. 3.** Effects of chronic enoxaparin on NO-pathway and liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. (A) NO bioavailability measured as cGMP in 3 week vehicle-treated (left) or enoxaparin-treated (right) livers (both n = 8). (B) Superoxide content measured with dihydroethidium staining in livers described above (both n = 3). (C) Peroxynitrite levels in livers described above measured as nitrotyrosinated proteins (both n = 8). (D). Liver fibrosis quantification by Sirius Red (left) and Masson's Trichrome (right) in cirrhotic rats described above. Quantifications derived from 8 pictures per slide (10 ×). Values represent mean ± SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle.



**Fig. 4.** Effects of chronic enoxaparin on HSC activation and microthrombosis in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. (A) Representative α-SMA immunohistochemistry, western blot and quantifications of 3 week vehicle-treated (left) or enoxaparin-treated (right) livers (both n = 8). (B) Desmin detection and quantification in livers described above. (C) Representative western blot and quantification of Pdgfrβ in livers described above. (D) Phosphorylated Moesin expression determined in livers described above. (E) Fibrin determination by immunohistochemistry and western blot in livers described above. Quantifications derived from 14 pictures per slide. Values represent mean ± SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle.

associated with a significant increase in PBF reflecting a marked and significant reduction in HVR. No changes in MAP, heart rate or biochemical parameters were observed (Table 2A). O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels were significantly decreased in enoxaparin-treated rats

(Fig. 6A). Moreover, in TAA-cirrhotic rats there was a 41% decrease in liver fibrosis analyzed by Sirius Red (Fig. 6B) confirming the effect of enoxaparin on the structural component of the HVR. Similarly to what we observed in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats, no



**Fig. 5. Effects of chronic enoxaparin in HSC activation.** (A) Representative α-SMA western blot and mRNA expression from primary HSC isolated from 3 week vehicle-treated (left) or enoxaparin-treated (right) CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers (both n = 3). (B) mRNA expression of HSC activation markers *pro-collagen-I* and *Pdgfra/beta* from groups described above. Values represent mean ± SEM, \**p* < 0.05 vs. vehicle.

**Table 2. Effects of chronic and preventive administration of enoxaparin on hepatic, systemic hemodynamics and biochemical parameters in thioacetamide-cirrhotic rats.**

A Long-term treatment			
Variable	Vehicle n = 7	Enoxaparin n = 5	<i>p</i> value
PP (mmHg)	12.1 ± 1.8	10.2 ± 0.5	0.04
MAP (mmHg)	105 ± 15	110 ± 31	0.7
PBF (ml/min)	11.9 ± 2.9	16.9 ± 4.7	0.04
HVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.02
HR (beats/min)	347 ± 40	394 ± 54	0.11
AST (U/L)	92 ± 25	83 ± 13	0.47
ALT (U/L)	48 ± 9	42 ± 7	0.27
B Preventive treatment			
Variable	Vehicle n = 10	Enoxaparin n = 12	<i>p</i> value
PP (mmHg)	14.7 ± 2.6	12.8 ± 1.3	0.04
MAP (mmHg)	103 ± 15	96.6 ± 20	0.4
PBF (ml/min)	14.6 ± 3.3	21.5 ± 7.9	0.03
HVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.6	0.01
HR (beats/min)	377 ± 35	349 ± 44	0.12
AST (U/L)	75 ± 14	78 ± 12	0.62
ALT (U/L)	42 ± 12	50 ± 11	0.15

PP, portal pressure; MAP, mean arterial pressure; PBF, portal blood flow; HVR, hepatic vascular resistance; HR, heart rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean ± SD.

significant effect on the response of the hepatic vasculature to incremental doses of acetylcholine was observed (Supplementary Fig.1B).

*Preventive treatment of enoxaparin in TAA-cirrhotic rats*

TAA-cirrhotic rats receiving preventive enoxaparin treatment had a PP significantly lower than those receiving vehicle (12% reduction, Table 2B). Again the lower PP was associated with significantly higher PBF reflecting a marked and significant reduction in HVR (Table 2B). No significant changes in MAP, heart rate or biochemical parameters were observed (Table 2B). Enoxaparin-treated rats showed 28% reduction in fibrosis deposition in comparison to vehicle-treated rats (Fig. 6C) and a marked improvement in HSC phenotype, as proved by a decrease in α-SMA by Western blot and immunofluorescence (-31% and -39% respectively) (Fig. 6D).

**Discussion**

Previous studies examining the natural history of liver disease in cohorts of HCV infected patients suggested a role of the coagulation cascade in hepatic fibrogenesis [36,37]. This hypothesis has gained much more attention after the demonstration that patients with cirrhosis exhibit more frequently a prothrombotic state with increased generation of thrombin than an hypocoagulative state [38,39]. Indeed, either by activating HSC with the ensuing increase in collagen secretion, and/or by facilitating the development of intrahepatic microvascular thrombi leading to tissue hypoxia and parenchymal extinction, pro-coagulant factors may favour fibrosis progression. Interestingly, a recent randomised controlled trial [22] demonstrated a benefit by the continuous use of LMWH in patients with advanced cirrhosis, not only preventing the development of PVT but also portal hypertension-related complications. However, the potential mechanism for such a beneficial effect has not been clearly delineated.

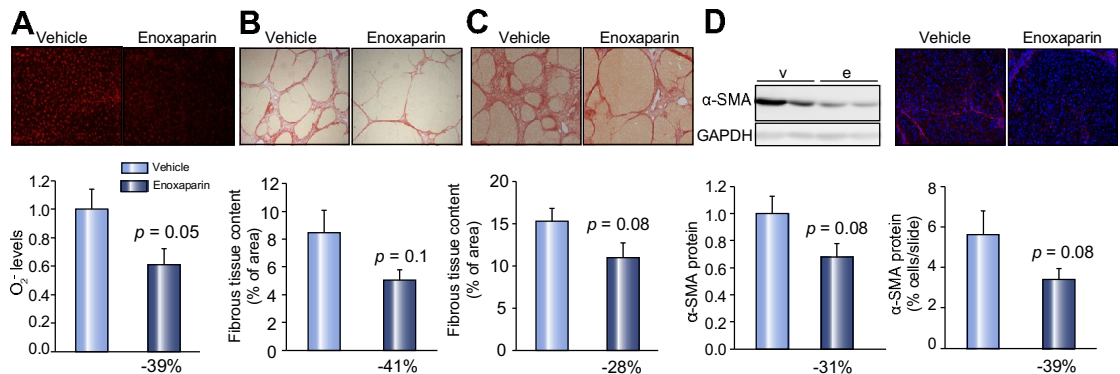
Our study clearly demonstrates that enoxaparin is able to reduce PP in rats with established cirrhosis and portal hypertension. The reduction in PP was shown in 2 different models of cirrhosis (CCl<sub>4</sub> and TAA) and our data supports that it was mainly caused by reducing HVR as a consequence of an improvement in liver fibrosis.

Indeed, PP was reduced without reductions in PBF reflecting a reduction in HVR. The lack of effect of the acute administration of enoxaparin on PP, systemic hemodynamic parameters, hepatic superoxide content or cGMP, argues against a possible direct vascular effect of enoxaparin on the dynamic component of the increased HVR. Moreover, to further study potential effects of enoxaparin on hepatic vascular tone, we examined the endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine and no significant differences were observed between vehicle and enoxaparin-treated rats either in the CCl<sub>4</sub> or TAA-cirrhotic rat models.

Nevertheless, after prolonged enoxaparin treatment, hepatic O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels of CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats were diminished, nitrotyrosinated proteins reduced, and hepatic cGMP increased. Changes in these parameters may be suggestive of a definite effect of enoxaparin



## Research Article



**Fig. 6.** Effects of chronic and preventive enoxaparin in TAA-cirrhotic rats. (A) Superoxide content measured with dihydroethidium in 3 week vehicle-treated (left) or enoxaparin-treated (right) livers (both  $n = 3$ ). (B) Liver fibrosis quantification by Sirius Red from cirrhotic rats vehicle (left) or enoxaparin-treated (right) in preventive model ( $n = 10$ –12 per group). Quantifications derive from 8 pictures per slide ( $10 \times$ ). (D) Representative  $\alpha$ -SMA western blot, immunofluorescence and quantification in livers described above. Values represent mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. vehicle.

on hepatic vascular tone. However, according to unpublished data from our laboratory, these parameters may also recover as a consequence of an improvement in the architectural alterations observed in liver cirrhosis (see below). Our study also showed that CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats treated with enoxaparin during 3, but not 1 week, had significantly lower ratio of p-Moesin/Moesin, indicating that relaxation of HSC may also play some role reducing intrahepatic vascular resistance at least on long-term. However, although improving hepatic vascular tone may play some role, our results support that the main mechanism leading to the decrease in HVR after enoxaparin is a marked amelioration of the liver architecture.

Enoxaparin has been previously shown to reduce liver fibrosis in experimental models of “mild” liver injury [19–21]. Our study further extends those observations to models with established cirrhosis (CCl<sub>4</sub> or TAA). Enoxaparin or vehicle were initiated when CCl<sub>4</sub> or TAA was stopped (regression models) or concomitantly with TAA (TAA preventive model). This allows us to analyze the effects of enoxaparin in two different settings. In the CCl<sub>4</sub>-regression model, rats receiving 3 weeks of treatment had more time for a potential spontaneous regression of fibrosis after stopping the toxic than those rats receiving 1 week of treatment. Indeed, severity of portal hypertension and of hepatic fibrosis was greater in vehicle-treated rats studied at 1 week than in those studied at 3 weeks after stopping CCl<sub>4</sub>. After either 1 or 3 weeks of enoxaparin treatment, there was a significant and marked (around 25%) reduction in Sirius Red staining. This was associated also with a reduction in Masson's Trichrome although in this case it did not reach statistical significance. Additionally, TAA-cirrhotic rats treated with enoxaparin had a 28% less Sirius Red staining in the TAA preventive model and 41% in the TAA long-term model. Such reductions were even higher than that observed in the CCl<sub>4</sub> models. Nevertheless, and probably due to larger variability in the TAA model, these reductions did not achieve statistical significance  $p = 0.1$  and  $p = 0.08$ , respectively. Altogether, the size of the reduction, the similar direction in all models and treatment strategies suggest that reduction in fibrosis is one of the main factors involved in the decrease of intrahepatic vascular resistance produced by enoxaparin. Further supporting the effect of enoxaparin on fibrosis, rats treated with enoxaparin had a significant reduction in the expression of

$\alpha$ -SMA, a marker of HSC activation. In addition, primary HSC isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with enoxaparin for 3 weeks showed a reduction in mRNA and protein expression in the HSC activation markers pro-collagen-1,  $\alpha$ -SMA and Pdgfr $\beta$ .

Enoxaparin may also influence HVR by preventing thrombotic events within the liver microcirculation. Indeed, development of thrombi at the hepatic microcirculation has also been suggested to play a role in liver fibrosis progression [16,17]. To explore this concept we evaluated fibrin deposition within the hepatic parenchyma as a surrogate of microthrombi formation [40–43]. Livers from enoxaparin-treated rats exhibited a reduction in intrahepatic fibrin deposition, which was already observed after 1 week of treatment but was more important and reached statistical significance after 3 weeks of treatment. These findings confirm the robust connection between thrombosis and liver fibrosis, and consolidate the concept that prevention/dissolution of hepatic microthrombi by the use of anticoagulant treatments may also contribute to improve liver fibrosis [8,17]. By contrast, we were unable to identify significant changes in the number of CD68+ cells or TNF- $\alpha$  expression in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic enoxaparin or vehicle-treated rats. Therefore, although we cannot completely discard a potential effect of enoxaparin reducing inflammation, this seems not to be the main mechanism of enoxaparin improving the architectural alterations of liver cirrhosis.

It is important to remark that the beneficial effect of enoxaparin reducing PP, HVR and liver fibrosis was also confirmed in the TAA-cirrhotic model either when it was administered after stopping the CCl<sub>4</sub> treatment or while it was still present.

Importantly, enoxaparin administration did not cause apparent deleterious effects in cirrhotic animals. No differences in liver enzymes were observed comparing both groups. In addition, no bleeding manifestations during the treatment period or the hemodynamic study were observed, which is in accordance with its excellent safety profile when administered to patients with thrombophilic disorders and to cirrhotic patients with thrombotic complications [22,44,45].

In conclusion, our study shows for the first time that prolonged administration of enoxaparin improves portal hypertension and liver cirrhosis, probably by potentiating fibrosis regression, leading to a reduction of PP without worsening systemic hemodynamics or promoting bleeding. These beneficial

effects may explain the observed favourable effects of enoxaparin treatment recently reported in patients with liver cirrhosis [22], showing reduced incidence of portal vein thrombosis, improved liver function and reduced portal-hypertensive complications, and supports further exploring the use of anticoagulants as a potential treatment for patients with cirrhosis and portal hypertension.

### Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

### Financial support

This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, SAF (2013-44723-R) and Fondo Investigaciones Sanitarias (PI14/00029 and PI13/00341), and the European Union (Fondos FEDER, "una manera de hacer Europa"). FC and DMT have a Sheila Sherlock Fellowship from the European Association for the Study of the Liver. JG-S has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

### Authors' contributions

FC and MV designed the study, performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript; HG, DMT, EL and OG-I performed experiments and analyzed data; MA analyzed data and wrote the manuscript; JB conceived ideas, critically reviewed the manuscript and obtained funding; JG-S designed the study, conceived ideas, wrote the manuscript and obtained funding; JCG-P designed the study, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and directed the study.

### Acknowledgments

Authors are indebted to Montse Monclús and Sergi Vila for their excellent technical assistance.

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.12.003>.

### References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141–156.
- [2] Garcia-Pagan JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;57:458–461.
- [3] 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;19:397–410.
- [4] Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:4–12.
- [5] Chambers RC. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* 1998;333:121–127.
- [6] Chambers RC. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 2000;275:35584–35591.
- [7] Duplantier JG. A role for thrombin in liver fibrosis. *Gut* 2004;53:1682–1687.
- [8] Anstee QM, Wright M, Goldin R, Thursz MR. Parenchymal extinction: coagulation and hepatic fibrogenesis. *Clin Liver Dis* 2009;13:117–126.
- [9] Borensztajn K, von der Thusen JH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The coagulation factor Xa/protease activated receptor-2 axis in the progression of liver fibrosis: a multifaceted paradigm. *J Cell Mol Med* 2010;14:143–153.
- [10] Marra F. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology* 1998;27:462–471.
- [11] Fiorucci S. PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology* 2004;39:365–375.
- [12] Rullier A. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G226–G235.
- [13] Gaca MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002;36:362–369.
- [14] Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol* 2008;172:309–320.
- [15] Knight V, Tchongue J, Lourens D, Tipping P, Sievert W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2012;55:879–887.
- [16] Wanless IR, Liu JJ, Butany J. Role of thrombosis in the pathogenesis of congestive hepatic fibrosis (cardiac cirrhosis). *Hepatology* 1995;21:1232–1237.
- [17] Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995;21:1238–1247.
- [18] Laux V, Perzborn E, Heitmeier S, Von Degenfeld G, Dittrich-Wengenroth E, Buchmuller A, et al. Direct inhibitors of coagulation proteins – The end of the heparin and low-molecular-weight heparin era for anticoagulant therapy? *Thromb Haemost* 2009;102:892–899.
- [19] Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, Ameen A, Hassan NS. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. *Pharmacol Res* 2005;51:59–67.
- [20] Assy N, Hussein O, Khalil A, Luder A, Szvalb S, Paizi M, et al. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2007;52:1187–1193.
- [21] Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007;46:286–294.
- [22] Villa E, Camma M, Marietta M, Luongo M, Critelli R, Colopi S, et al. Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:1253–1260.
- [23] Tasatargil A, Ogutman C, Golbasi I, Karasu E, Dalaklioglu S. Comparison of the vasodilatory effect of nadroparin, enoxaparin, dalteparin, and unfractionated heparin in human internal mammary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:550–554.
- [24] Yague S, Alvarez AV, Castilla A, Gonzalez Pacheco FR, Llamas P, Caramelo C. Modulation of the effect of vascular endothelial growth factor on endothelial cells by heparin: critical role of nitric oxide-mediated mechanisms. *J Nephrol* 2005;18:234–242.
- [25] Paredes-Gamero EJ, Medeiros VP, Farias EH, Justo GZ, Trindade ES, Andrade-Lopes AL, et al. Heparin induces rat aorta relaxation via integrin-dependent activation of muscarinic M3 receptors. *Hypertension* 2010;56:713–721.
- [26] Di Pascoli M, Divi M, Rodriguez-Vilarupla A, Rosado E, Gracia-Sancho J, Vilaseca M, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2013;58:904–910.
- [27] Frizelle S, Schwarz J, Huber SA, Leslie K. Evaluation of the effects of low molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in

## Research Article

- chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice. *Am J Pathol* 1992;141:203–209.
- [28] 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;15:1040–1046.
- [29] **Gracia-Sancho J, Lavina B**, Rodriguez-Vilarupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248–1256.
- [30] Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, Garcia-Cardena G, Bosch J. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* 2011;60:517–524.
- [31] **Garcia-Irigoyen O, Carotti S**, Latasa MU, Uriarte I, Fernandez-Barrena MG, Elizalde M, et al. Matrix metalloproteinase-10 expression is induced during hepatic injury and plays a fundamental role in liver tissue repair. *Liver Int* 2014;34:e257–e270.
- [32] Luyendyk JP, Cantor GH, Kirchhofer D, Mackman N, Copple BL, Wang R. Tissue factor-dependent coagulation contributes to alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G840–G849.
- [33] Sasaki T, Kuzuya M, Cheng XW, Nakamura K, Tamaya-Mori N, Maeda K, et al. A novel model of occlusive thrombus formation in mice. *Lab Invest* 2004;84:1526–1532.
- [34] **Guillaume M, Rodriguez-Vilarrupla A**, Gracia-Sancho J, Rosado E, Mancini A, Bosch J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4-cirrhotic rats. *J Hepatol* 2013;58:240–246.
- [35] Marrone G, Maeso-Diaz R, Garcia-Cardena G, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Gracia-Sancho J. KLF2 exerts anti-fibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* 2015;64:1434–1443.
- [36] Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825–832.
- [37] Wright M, Goldin R, HELLIER S, Knapp S, Frodsham A, Hennig B, et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2003;52:1206–1210.
- [38] Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:2105–2111.
- [39] Lisman T, Leebeek FW. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Dig Surg* 2007;24:250–258.
- [40] **Kume M, Hayashi T**, Yuasa H, Tanaka H, Nishioka J, Ido M, et al. Bacterial lipopolysaccharide decreases thrombomodulin expression in the sinusoidal endothelial cells of rats – A possible mechanism of intrasinusoidal microthrombus formation and liver dysfunction. *J Hepatol* 2003;38:9–17.
- [41] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Boersma H, van der Laarse A., Wagenaar GT. Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. *Respir Res* 2009;10:30.
- [42] Sullivan BP, Kassel KM, Jone A, Flick MJ, Luyendyk JP. Fibrin(ogen)-independent role of plasminogen activators in acetaminophen-induced liver injury. *Am J Pathol* 2012;180:2321–2329.
- [43] Simonetto DA, Yang HY, Yin M, de Assuncao TM, Kwon JH, Hilscher M, et al. Chronic passive venous congestion drives hepatic fibrogenesis via sinusoidal thrombosis and mechanical forces. *Hepatology* 2015;61:648–659.
- [44] Amitrano L, Guardascione MA, Menchise A, Martino R, Scaglione M, Giovine S, et al. Safety and efficacy of anticoagulation therapy with low molecular weight heparin for portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:448–451.
- [45] Delgado MG, Seijo S, Yepes I, Achezar L, Catalina MV, Garcia-Criado A, et al. Efficacy and safety of anticoagulation on patients with cirrhosis and portal vein thrombosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:776–783.

## **Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats**

Federica Cerini, **Marina Vilaseca**, Erica Lafoz, Oihane García-Irigoyen, Héctor García-Calderó, Dinesh M Tripathi, Matias Avila, Juan Carlos Reverter, Jaime Bosch, Jordi Gracia-Sancho & Juan Carlos García-Pagán

### **Table of contents:**

1. Supplementary methods
2. Supplementary figure 1

## **1. Supplementary methods**

### ***In vivo* hemodynamic study**

Rats were anesthetised with ketamine hydrochloride (100 mg/Kg; Merial Laboratories) plus midazolam (5 mg/kg; Laboratorios Reig Jofré) intraperitoneally. A tracheostomy was performed and a polyethylene tube PE-240 was inserted into the trachea to ensure a patent airway. PE-50 catheters were introduced into the femoral artery to measure mean arterial pressure (MAP; mmHg) and into ileocolic vein to measure portal pressure (PP; mmHg). A perivascular ultrasonic flow probe (Transonic System) placed around the portal vein, as close as possible to the liver to avoid portal-collateral blood flow, in order to measure portal blood flow (PBF; ml·min<sup>-1</sup>) going through the liver, and at the superior mesenteric artery to measure superior mesenteric artery blood flow (SMABF; ml·min<sup>-1</sup>). Hepatic vascular resistance (HVR; mmHg/ml·min<sup>-1</sup>) was calculated as: PP/PBF. Blood pressures and flows were registered on a multichannel computer based recorder (Power Lab; AD Instruments). Temperature of the animals was maintained at 37±0.5°C and hemodynamic data were collected after 20 minutes stabilization [1-3].

### **Evaluation of endothelial function**

After the *in vivo* hemodynamic measurements, livers were quickly isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as previously described [4]. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilize for 20 min before vasoactive substances were added. The intrahepatic microcirculation was precontracted by adding the  $\alpha_1$ -adrenergic agonist methoxamine (Mtx; 10<sup>-4</sup> mol/L; Sigma) to the reservoir. After 5 min, concentration-response curves to cumulative doses of acetylcholine (Ach; 10<sup>-7</sup>; 10<sup>-6</sup>, and 10<sup>-5</sup> mol/L; Sigma) were evaluated. The concentration of Ach was

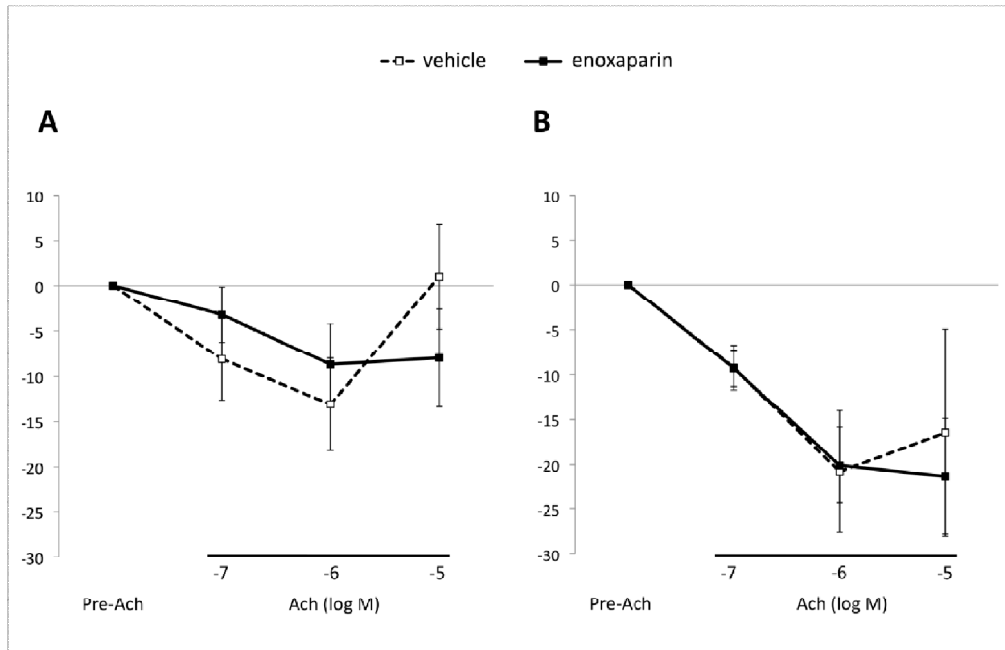
increased by 1log unit every 1.5 min interval. Responses to Ach were calculated as the percentage change in portal perfusion pressure.

### HSC isolation

Livers were perfused at a flow rate of 20 ml/min at 37°C with Gey's balanced salt solution (GBSS) with 0.6% heparin and then at a flow rate of 5 ml/min at a 37°C with 0.02% collagenase A, 0.0065% Dnase, and 0.16% pronase. The resultant digested liver was excised, an in vitro digestion was performed at 37°C with 0.01% collagenase, 0.01% Dnase, and 0.004% pronase GBSS. The cells were passed through nylon filters (100 µm) and centrifuged. The pellet was washed twice with RPMI medium. Cells were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium, and experiments were performed [4].

### Reference List

- [1] 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 Jan 9;133(3):959-966.
- [2] Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, Garcia-Cardena G, Bosch J. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* 2011 Apr;60(4):517-524.
- [3] Di Pascoli M., Divi M, Rodriguez-Vilarrupla A, Rosado E, Gracia-Sancho J, Vilaseca M, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2013 May;58(5):904-910.
- [4] Marrone G, Maeso-Díaz R, Garcia-Cardena G, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Gracia-Sancho J. KLF2 exerts anti-fibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* 2015 Aug;64(9):1434-1443.

**2. Supplementary Figure 1**

Endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine (Ach) in isolated and perfused livers from **(A)**  $\text{CCl}_4$ -cirrhotic rats and **(B)** TAA-cirrhotic rats in animals treated with enoxaparin or vehicle during 3 weeks ( $n=6$  per group). Results are expressed as the percentage of PP in response to Ach and presented as  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ .

**Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells**

**Marina Vilaseca**, Héctor García-Calderó, Erica Lafoz, Oihane García-Irigoyen, Matías Ávila, Juan Carlos Reverter, Jaume Bosch, Virginia Hernández-Gea, Jordi Gracia-Sancho, Joan-Carles García-Pagán

Hepatology, Jan 2017

IF:11.711



**The anticoagulant Rivaroxaban lowers portal hypertension in cirrhotic rats mainly by deactivating hepatic stellate cells**

Marina Vilaseca<sup>1,2</sup>, Héctor García-Calderó<sup>1,3</sup>, Erica Lafoz<sup>1,2</sup>, Oihane García-Irigoyen<sup>3,4</sup>, Matías Avila<sup>3,4</sup>, Joan Carles Reverter<sup>5</sup>, Jaume Bosch<sup>1,2,3,6</sup>, Virginia Hernández-Gea<sup>1,3</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>1,2,3</sup>, Joan Carles García-Pagán<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab, Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).*

<sup>2</sup>*University of Barcelona Medical School, Barcelona, Spain.*

<sup>3</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD)*

<sup>4</sup>*Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Division of Hepatology and Gene Therapy, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain.*

<sup>5</sup>*Hemotherapy and Hemostasis Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.*

<sup>6</sup>*Swiss Liver Centre, Inselspital, Bern University, Switzerland.*

**Corresponding author:** Juan Carlos García-Pagán, MD, PhD. Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab. Villarroel 170. 08036, Barcelona. Tel:+34932275707 ext:2824. Email: jcgarcia@clinic.cat

**Word count:** 5742

**Number of figures:** 6 + 2 tables

**Abbreviations list:** HSC, hepatic stellate cells; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide; NO, nitric oxide; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; TAA, thioacetamide; eNOS, endothelial nitric

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/hep.29084

oxide synthase; PAR, protease activated receptors; LMWH, Low molecular weight heparins.

**Keywords:** anti Factor-Xa, anticoagulation, HSC, microthrombosis, portal hypertension

**Conflict of interest:** J.C.R is consulter in Bayer, Boehringer, Bristol, Sanofi, Rovi and El Sai, and received grants/contracts for research from Boehringer, Sanofi and El Sai. J.B is a consultant for Gilead Science, Conatus Pharma, Exalenz and Chiasma, and is a member of Advisory Board for Intercept Pharma. J.C.G-P received speaker fees from Gore and research grants from Novartis and Exalenz.

**Financial Support:**

This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2013-44723-R) and from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/00341), and the European Union (Fondos FEDER, “una manera de hacer Europa”). CIBEREHD is funded by Instituto de Salud Carlos III. JG-S has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad.

**Authors contributions:**

M.V. designed the research, conceived ideas, performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. H.G.-C. and E.L. conceived ideas, performed experiments and analyzed data. O.G.-I. performed experiments and analyzed data. M.A. and J.C.R. provided advice on experimental design and revised the

manuscript. J.B critically revised the manuscript and obtained funding. V.H-G. and J.G.-S. conceived ideas and critically revised the manuscript. J.C.G.-P. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and directed the study. All authors edited and reviewed the final manuscript.

Accepted Article

## Abstract

**Background & aims:** In cirrhosis, increased intrahepatic vascular resistance (IHVR) is the primary factor for portal hypertension development. Hepatic Stellate Cells (HSC) play a major role increasing IHVR as when activated are contractile and promote fibrogenesis. Protease activated receptors (PARs) can activate HSC, through thrombin and factor Xa which are known PARs agonists, and cause microthrombosis in liver microcirculation. This study investigates the effects of the oral anticoagulant rivaroxaban, a direct anti-factor Xa, on HSC phenotype, liver fibrosis, liver microthrombosis and portal hypertension in cirrhotic rats.

**Methods:** Hepatic and systemic hemodynamic, NO bioavailability, liver fibrosis, HSC activation and microthrombosis were evaluated in CCl<sub>4</sub> and thioacetamide-cirrhotic rats treated with rivaroxaban (20 mg/kg/day) or its vehicle for two weeks.

**Results:** Rivaroxaban significantly decreased portal pressure in both models of cirrhosis without changes in portal blood flow, suggesting a reduction in IHVR. Rivaroxaban reduced oxidative stress, improved NO bioavailability and ameliorated endothelial dysfunction. Rivaroxaban deactivated HSC, with decreased  $\alpha$ -SMA and mRNA expression of other HSC activation markers. Despite this marked improvement in HSC phenotype, no significant changes in liver fibrosis were identified. Rivaroxaban markedly reduced fibrin deposition suggesting reduced intrahepatic microthrombosis.

**Summary and conclusion:** Rivaroxaban decreases portal pressure in two rat models of cirrhosis. This effect is mostly associated to decreased IHVR, enhanced NO bioavailability, HSC deactivation and reduced intrahepatic microthrombosis. Our findings suggest that rivaroxaban deserves further evaluation as a potential treatment for cirrhotic portal hypertension.

**Abstract word count:** 234

Accepted Article

## Introduction

Portal hypertension is one of the main complications of cirrhosis. The increase in portal pressure is mainly due to an increased resistance to portal blood flow (PBF), derived from both augmented hepatic vascular tone and architectural alterations of the liver microcirculation<sup>1,2</sup>. Hepatic stellate cells (HSC) activation plays a major role in both pathophysiological abnormalities. Indeed, activated HSC are key players increasing hepatic vascular tone and also synthesizing excessive extracellular matrix components<sup>3</sup>. Protease activated receptors (PARs)<sup>4-8</sup> are a group of G-protein-coupled receptors. Molecular cloning has identified four different PARs: PAR1, PAR3 and PAR4, which can be activated by thrombin and PAR2 that can be activated by factor Xa and trypsin. In the healthy liver, PARs are expressed in several cells such as HSC, endothelial cells and Kupffer cells<sup>9</sup>, represent one of the main activation pathways of HSC and increase inflammatory cell recruitment in cirrhosis.

Interestingly, human livers undergoing acute and chronic injury have increased PARs expression. Furthermore, thrombin and Factor Xa are also increased in cirrhosis<sup>10-12</sup>, and it has been suggested that increased levels of thrombin may lead to clot formation and occlusion of small intrahepatic veins and sinusoids further aggravating the increased intrahepatic vascular resistance by causing parenchymal extinction and vascular distortion<sup>13,14</sup>.

Several studies have recently shown beneficial effects of PARs inhibition<sup>15</sup> and inhibition of the coagulation cascade in liver fibrosis<sup>16,17</sup>, including upregulation of NO levels via endothelium-dependent mechanisms<sup>18</sup>. Moreover, we have recently shown beneficial effects of enoxaparin, a Low Molecular Weight

Heparin (LMWH) with anti-Xa and anti-thrombin effect, in two different models of cirrhosis<sup>18</sup>.

Rivaroxaban is an oral direct inhibitor of factor Xa, a key coagulation factor in thrombin generation and clot formation. In thromboembolic disease, randomized phase III clinical trials have demonstrated that oral factor Xa inhibitors had similar efficacy to standard therapy and were associated with significantly reduced risk of major bleeding<sup>19</sup>. The current study aimed at evaluating the effects of the direct oral anticoagulant rivaroxaban in the hepatic and systemic hemodynamic, NO-pathway, liver fibrosis and microthrombosis in two different rat models of cirrhosis.

## Materials and Methods

### Induction of cirrhosis by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and by thioacetamide (TAA)

a) CCl<sub>4</sub>: Wistar rats (50-75g) received CCl<sub>4</sub> by inhalation three times a week to induce cirrhosis. Phenobarbital (0.3 g/L) was added to the drinking water as previously described<sup>20</sup>. When animals developed ascites, after approximately 14-18 weeks of CCl<sub>4</sub> inhalation, phenobarbital and CCl<sub>4</sub> administration was stopped.

b) TAA: Sprague Dawley rats (150-200g) received TAA (Sigma) dissolved in normal saline by intraperitoneal injection twice a week at a dose of 250 mg/kg for 12 weeks.

Animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with European Community guidelines for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EEC Directive 86/609).

### Rivaroxaban treatment

Cirrhotic rats were randomized to receive rivaroxaban (RVXB; 20mg/kg/day) or its vehicle (Veh) administered orally by *gavage* once a day for 2 weeks. Treatment started one week after the development of ascites in CCl<sub>4</sub> model and immediately after stopping the IP injection of TAA in the second model. Experiments were performed 1 hour after the last RVXB dose or its vehicle.



Treatments were prepared by a third person and experimental studies were performed blindly.

### ***In vivo* hemodynamic study**

Rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight, Imalgene 1000; Merial) plus midazolam (5 mg/kg body weight, Laboratorio Reig Jofré, S.A.) intraperitoneally, fastened to a surgical board and maintained at a constant temperature of  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (continuously monitored throughout the experiment). A tracheotomy and cannulation with a PE-240 catheter (Portex) was performed in order to maintain adequate respiration during the anesthesia. Indwelling catheters made of polyethylene tubing (PE-50; Portex) were placed into the femoral artery to measure mean arterial pressure (MAP: mmHg) and heart rate (HR: bpm), and to the ileocolic vein to measure portal pressure (PP: mmHg). Portal blood flow (PBF: ml/min) was measured with a non-constrictive perivascular ultrasonic transit-time flow probe (2PR, 2-mm diameter, Transonic Systems Inc.) placed around the portal vein just before its entrance in the liver avoiding the measurement of most portal-collateral blood flow. The flow probe and the pressure transducers were connected to a Powerlab (4SP) linked to a computer using Chart v5.5.6 for Windows software (AD Instruments). Intrahepatic vascular resistance (IHVR) was calculated as  $\text{PP}/\text{PBF}$ . Hemodynamic data were collected after a 20-min stabilization period. At the end of the *in vivo* hemodynamic study, serum samples from cirrhotic rats were collected to subsequently evaluate alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), bilirubin and albumin, all by standard protocols. Experiments and data collection were performed blindly.

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

*In situ*  $O_2^-$  levels were evaluated as previously described<sup>21</sup>. Briefly, the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) was used in fresh liver cryosections (10  $\mu$ m) obtained from  $CCl_4$ -cirrhotic rats treated with RVXB (n=3) or vehicle (n=3). Six fields from each slide at 20x were randomly selected. Fluorescent images were obtained with a fluorescent microscope (Olympus) and quantitative analysis was performed with Image J 1.33u software (National Institutes of Health)<sup>18</sup>.

### cGMP levels

Measurements of cGMP, a secondary marker of NO bioavailability, were performed in liver homogenates from vehicle or RVXB-treated  $CCl_4$ -cirrhotic rats by enzyme immunoassay (Cayman Chem. CO) as previously described<sup>22</sup>.

### Evaluation of endothelial function

In  $CCl_4$ -cirrhotic rats, after the *in vivo* hemodynamic measurements, livers were quickly isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as previously described<sup>23</sup>. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilize for 20 min before vasoactive substances were added. The intrahepatic microcirculation was precontracted by adding the  $\alpha_1$ -adrenergic agonist methoxamine (Mtx:  $10^{-4}$  mol/L; Sigma) to the reservoir. After 5 min, concentration-response curves to cumulative doses of acetylcholine (Ach; Sigma) were evaluated. The concentration of Ach was increased by 1log unit every 1.5 min interval. Responses to Ach were calculated as the percentage change in portal perfusion pressure<sup>24</sup>. The gross appearance of the liver, stable

perfusion pressure, bile production over 0,4  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  of liver and a stable buffer pH ( $7.4 \pm 0.3$ ) were monitored during this period. IHVR was also calculated in this portal flow-controlled perfusion system.

### **Sirius Red staining**

All livers from cirrhotic rats were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with 0.1% Sirius red, photographed using a microscope equipped with a digital camera, and analyzed. Ten fields from each slide at 5x were randomly selected, and the red-stained area per total area was measured using AxioVision software<sup>25</sup>. Values are expressed as the mean of ten fields taken from vehicle- and RVXB-treated rats.

### **Hepatic hydroxyproline content**

Hydroxyproline content was assessed with Hydroxyproline Colorimetric Assay Kit (Biovision) following manufacturer's instruction. Briefly, liver tissues were homogenized in  $\text{dH}_2\text{O}$ . HCl (12M) was added to the homogenate and samples were incubated at  $120^\circ\text{C}$  for 3 hours. Kit reagents were added and absorbance at 560nm was read in plate reader and expressed as  $\mu\text{g}$  of hydroxyproline/mg liver.

### **Western Blot (WB)**

Expression of  $\alpha$ -SMA, desmin, 3-nitrotyrosinated proteins, collagen, fibrinogen, eNOS-phosphorylation (eNOS-P), eNOS total, RhoA, moesin and phosphorylated-moesin was determined by western blot in hepatic samples as previously described<sup>26,27</sup>. Briefly, snap-frozen liver samples were used and

processed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and nitrocellulose membranes. The following antibodies were used:  $\alpha$ -SMA (Sigma;1/1000), desmin (Dako;1/1000), 3-nitrotyrosine (Cayman Chemical;1/1000) collagen (Millipore;1/1000), fibrinogen (Nordic-MUbio;1/1000), phosphorylated eNOS at Ser<sup>1176</sup> (Cell Signaling Technology;1/1000), eNOS (BD Transduction Laboratories;1/1000), RhoA (Santa Cruz;1/1000) moesin (Santa Cruz;1/200) and phosphorylated moesin (Santa Cruz;1/200). Thereafter, the membranes were incubated with the corresponding secondary peroxidase-coupled antibody (Santa Cruz). Blots were developed with enhanced chemiluminescence (ECL, Millipore). Intensities of the digital detected bands were evaluated densitometrically using Multi Gauge V2.1 (Fujifilm).

Hepatic fibrin deposits were determined by western blot using an anti-fibrinogen antibody, which detects fibrinogen epitopes preserved in the insoluble fibrin deposits, as previously described<sup>28,29</sup>. Blots were stained with Ponceau or anti-GAPDH (Santa Cruz;1/1000) antibodies to show equal loading.

### **Immunohistochemistry (IHC)**

Immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with anti- $\alpha$ -SMA (Dako;1/1200), anti-desmin (Dako;1/50), anti-fibrinogen (Dako;1/1200), anti-CD68 (Serotec;1/100) or phosphate-buffered saline as a negative control.

Bound antibodies were visualized using with Dako Real Envision Detection System Peroxidase/DAB+, and slides were counterstained with hematoxylin.

For  $\alpha$ -SMA, desmin and fibrinogen quantification, a point grid was placed over the slide-pictures and the number of positive cells that collocate with the dots of

the grid was counted. This value is expressed as a percentage of the total grid dots of the slide<sup>18,20</sup>. Counting was done by 2 researchers blindly. Fifteen slide-pictures were counted in each liver. For CD68, positive cells were counted per slide.

### **Immunofluorescence (IF)**

OCT sections were fixed with methanol and blocked in 10% goat serum. Immunostaining was performed with anti-von Willebrand factor (Dako;1/400), anti- $\alpha$ -SMA (Sigma;1/1200) and anti-fibrinogen (Dako;1/800). 555 Alexa antibody (Life Technologies;1/300) was used as a secondary antibody. Imaging was done using a fluorescent microscope (Olympus). Fourteen fields were quantified in each liver with Image J 1.33u software.

### **Isolation of total RNA and Real time RT-PCR**

Total RNA was isolated from liver tissues using Trizol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Hepatic mRNA expression of  *$\alpha$ -sma*, *col1 $\alpha$ 1*, *col1 $\alpha$ 2*, *pdgfr $\beta$* , *timp1*, *timp2* and *tgf $\beta$*  was analyzed by real-time PCR using predesigned gene expression assays and reported relative to endogenous control *gapdh* (Applied Biosystems). All PCR reactions were performed in duplicate, using nuclease-free water as no template control.

### **Isolation of hepatic stellate cells (HSC) and characterization**

Primary CCl<sub>4</sub>-cirrhotic HSC were isolated from cirrhotic rats as previously described<sup>30</sup>. Briefly, livers were perfused for 10 min at a flow rate of 20 ml/min at 37°C with Gey's balanced salt solution (GBSS) with 0.6% heparin and then

30 min at a flow rate of 5 ml/min at a 37°C with 0.02% collagenase A, 0.005% DNase, and 0.16% pronase in GBSS. The resultant digested liver was excised and *in vitro* digestion was performed at 37°C with 0.013% collagenase, 0.01% DNase, and 0.004% pronase in GBSS. Cells were passed through nylon filters (100µm) and centrifuged at 50 g for 5 min. The dispersed cells were fractionated by density gradient centrifugation using Histodenz (Sigma). Cells were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B. Results using primary cirrhotic HSC were derived from triplicates from three independent isolations. Effects of RVXB on HSC phenotype were determined through gene expression analysis of *α-sma*, *col1α1* and *pdgfrβ*, and HSC apoptosis was analyzed by cleaved caspase-3 protein expression (Cell signaling; 1/1000) by western blot.

#### **HSC activation by thrombin and Rivaroxaban**

HSC isolated from control rats were treated *in vitro* with thrombin (1 and 5 U/ml for 24h; Sigma) or vehicle, and with Rivaroxaban (25, 50 or 100ng/ml; Bayer) or vehicle for 24h and HSC activation markers were analyzed (*α-sma*, *col1α1* and *pdgfrβ*) by Real Time RT-PCR.

#### **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

In a subgroup of TAA-cirrhotic rats treated with vehicle (n=4) or RVXB (n=4), after the *in vivo* hemodynamic measurements, livers were perfused through portal vein with fixation solution containing 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.02 g/ml sucrose and 0.02M CaCl<sub>2</sub> in 0.2M cacodylate

buffer. Liver sections were fixed with 1% osmium in cacodylate buffer and, after dehydration in acetone gradients, embedded in Spurr resin. Ultrathin sections (50 nm) were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Twenty representative micrographs per animal were taken at 6000x and 3000x using a JEOL J1010 microscope and an ORIUS camera (Gatan Inc., Roper Technologies). The presence of basal membrane in space of Disse and the presence of hepatocyte projections in liver sinusoids were evaluated as indicators of correct liver sinusoidal architectural assembly in 6000x micrographs. These parameters were represented as a percentage of all the liver sinusoids analyzed. The number of HSC per micrograph and the collagen content analyzed in a semiquantitative manner were evaluated in 3000x micrographs.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with SPSS 19.0 for Windows statistical package (SPSS Inc.). All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test for unpaired data, one sample *t*-test or with Mann-Whitney when adequate. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### **RVXB improves IHVR and decreases PP in two different experimental models of cirrhosis in the rat**

RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats had a significant lower PP value than vehicle-treated rats (RVXB: 11.1 ± 2.2 vs. Veh: 13.2 ± 2.5 mmHg; -16%; p=0.04), without significant changes in PBF, suggesting an improvement in IHVR (Table 1). Similar results were obtained in TAA-cirrhotic rats, where RVXB-treated rats had significantly lower PP values (RVXB: 12.8 ± 1.5 vs. Veh: 16.7 ± 1.9 mmHg; -24%; p=0.001) without significant changes in PBF, again suggesting decreased IHVR (Table 2). Further supporting the effect of RVXB on IHVR, we observed a significantly lower IHVR in RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats than vehicle-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (RVXB: 1.95 ± 0.14 vs. Veh: 2.97 ± 0.12 mmHg/ml·min<sup>-1</sup>·g.; p=0.04; -35%) in a portal flow-controlled perfusion system. RVXB did not modify MAP or HR in CCl<sub>4</sub> or TAA-cirrhotic rats suggesting that RVXB does not affect systemic hemodynamics. Liver biochemistry was almost significantly improved by RVXB in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats (Table 1), but not in TAA-cirrhotic rats (Table 2).

### **RVXB decreases O<sub>2</sub><sup>-</sup> and improves NO bioavailability in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats**

RVXB significantly decreased DHE staining and nitrotyrosinated proteins reflecting decreased O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Fig 1A-B). Since O<sub>2</sub><sup>-</sup> can decrease NO bioavailability, we evaluated cGMP as a marker of NO bioavailability. cGMP levels were increased markedly in RVXB-treated cirrhotic rats (Fig 1C). Interestingly, there were no differences in eNOS and eNOS phosphorylation at Ser<sup>1176</sup> between groups (Fig 1D), suggesting that RVXB



increases NO bioavailability mainly by decreasing  $O_2^-$  levels. As one of the main cells producing  $O_2^-$  within the liver are Kupffer cells, we analyzed CD68-positive cells within liver tissue and observed that RVXB-treated rats had less CD68-positive cells both in  $CCl_4$  (-19%) and TAA-cirrhotic rats (-23%, Fig 1E).

#### **Effect of RVXB on liver sinusoidal endothelial dysfunction in cirrhotic rats**

$CCl_4$ -cirrhotic rats treated with RVXB have greater vasodilatory response to acetylcholine, suggesting an improvement in endothelial dysfunction. However, probably due to the high variability observed among animals, this improvement was not statistically significant (Fig 2A;  $p=0.2$ ). To further study the potential beneficial effects of RVXB on endothelial function, von Willebrand factor, a marker of endothelial capillarization and dysfunction, was analyzed. RVXB-treated cirrhotic rats had significantly lower von Willebrand factor expression in both cirrhotic models (-62% in  $CCl_4$  and -70% in TAA-cirrhotic rats, Fig 2B) further pointing to improved endothelial phenotype.

#### **Effect of RVXB on liver sinusoid architecture in cirrhotic rats**

The effect of RVXB on liver sinusoidal architecture was evaluated by transmission electron microscopy in TAA-cirrhotic rats. We analyzed the absence of basal membrane in the space of Disse and the presence of hepatocyte projections in liver sinusoids. RVXB-treated TAA-cirrhotic rats had less formation of basal membrane and increased presence of projections in hepatocytes within liver sinusoids than vehicle-treated TAA-cirrhotic rats (Fig 2C). These data suggest that RVXB may improve liver sinusoidal architecture assembly.

### Effect of RVXB on liver fibrosis in cirrhotic rats

As expected, CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats had a marked distortion of the liver parenchyma with abundant fibrosis. Rats receiving RVXB had no (CCl<sub>4</sub> model) or just a mild (-14%; TAA model) and non-significant decrease in hepatic fibrosis evaluated by Sirius Red staining (Fig 3A). In addition, lower hydroxyproline (Fig 3B) and collagen content (by WB: Fig 3C and TEM: Fig 3D) was observed either in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats. However, this reduction was only significant for collagen protein measured by WB in TAA-cirrhotic rats (Fig 3C, right). Altogether these data suggest that the beneficial effect of rivaroxaban was not mainly due to a reduced collagen deposition.

### RVXB decreases and deactivates HSC in cirrhotic rats

Treatment with RVXB caused a decrease in desmin expression, a marker of hepatic stellate cell (-40% by IHC and -29% by WB in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; Fig 4A). This decrease in HSC number was accompanied with a significant reduction in  $\alpha$ -SMA protein levels (-42% by IHC and -60% by WB in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; Fig 4B). To confirm that decrease in  $\alpha$ -SMA was not mainly caused by a reduction in the number of HSC, we isolated HSC from vehicle- and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. Moreover, there was a significant reduction in gene expression of  *$\alpha$ -sma* (-40%), *col1 $\alpha$ 1* (-80%) and *pdgfr $\beta$*  (-52%) in primary HSC isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with RVXB (Fig 4C). Furthermore, we assessed HSC contractility by means of phosphorylated-moesin, moesin and RhoA protein expression and observed that RVXB-treated rats had lower expression in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Fig 4D). No differences in HSC

apoptosis were observed by analyzing cleaved capsase-3 protein expression in isolated HSC from vehicle and rivaroxaban-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Fig 4E). Same results were observed in TAA-cirrhotic rats. The number of HSC was decreased in RVXB-treated TAA-cirrhotic rats when analyzed in transmission electron microscopy (-46%; Supplementary Fig 1A) and  $\alpha$ -SMA protein expression was also reduced (Veh:  $1.9 \pm 0.5$  vs. RVXB:  $1.0 \pm 0.2$  % of area;  $p=0.07$ ; Fig 5A). Furthermore, RVXB-treated TAA-cirrhotic rats had significantly lower expression of HSC activation markers  $\alpha$ -sma (-54%), *col1a1* (-45%), *col1a2* (-42%), *pdgfr $\beta$*  (-70%), *timp1* (-35%), *timp2* (-39%) and *tgf $\beta$*  (-35%) (Fig 5B). These results strongly suggest that RVXB deactivates HSC.

#### **RVXB has no direct effects on HSC**

To further study the mechanism of action of RVXB, we evaluated the effects of RVXB and thrombin on HSC activation in isolated HSC from non-cirrhotic rats. First, we observed HSC activation by thrombin (1 and 5U/ml; 24h) by analyzing several HSC activation markers (Supplementary Figure 1). However, when we evaluated the direct effects of RVXB, there were no direct effects (Supplementary Figure 2), further suggesting that improvement in HSC phenotype due to RVXB is mainly due to inhibition of the coagulation cascade and inhibiting PAR-mediated activation, rather than a direct effect of RVXB on HSC.

#### **RVXB decreases liver microthrombosis in cirrhotic rats**

RVXB treatment showed a marked and significant decrease in fibrin deposition, a surrogate marker of liver microthrombosis. In fact, RVXB treatment effectively

decreased fibrin deposition in CCl<sub>4</sub> (Fig 6A) and TAA-cirrhotic rats (Fig 6B) without causing bleeding events. These findings support a reduction of thrombotic events within the liver of rats treated with RVXB without increased bleeding risk.

Accepted Article

## Discussion

Current data clearly shows that patients with cirrhosis have an hypercoagulative state that may increase the thrombotic risk and contribute to the progression of the disease. The increased thrombin generation present in patients with cirrhosis has the potential to keep HSC activated with the ensuing increase in its capability to secrete extracellular matrix deposition and also to increase hepatic vascular tone<sup>31,32</sup>. These are two major mechanisms increasing hepatic vascular resistance to portal blood flow in cirrhosis and, as consequence, portal hypertension. In addition, several factors such as blood rheology or increased hypercoagulability would further increase resistance to portal blood flow. In fact, the later has been suggested to favor microthrombotic events in the liver microcirculation that, as a consequence of local hepatic ischemia, cause areas of parenchymal extinction leading to tissue collapse and additional microcirculatory dysfunction<sup>13,14</sup>. Altogether these findings have lead to propose that preventing thrombin action by means of anticoagulants may be a new and effective therapeutic strategy in cirrhosis.

Several studies have shown beneficial effects inhibiting the coagulation cascade in liver fibrosis<sup>16,17</sup>. Indeed, we have recently shown beneficial effects of enoxaparin, a Low Molecular Weight Heparin (LMWH) with anti-Xa and anti-thrombin effect, in two different models of cirrhosis. In this study, enoxaparin reduced liver fibrosis, deactivated HSC and decreased hepatic microthrombosis, thereby reducing intrahepatic vascular resistance and portal pressure<sup>18</sup>, confirming positive effects of anticoagulants in severe cirrhosis in pre-clinical studies. Moreover, a recent randomized trial suggested that long-

term LMWH administration not only prevents portal vein thrombosis but also improves survival in patients with advanced cirrhosis<sup>33</sup>.

It is known that patients with cirrhosis have a reduction in antithrombin levels directly related to the degree of liver dysfunction<sup>34,35</sup>. Rivaroxaban, in contrast to LMWH such as enoxaparin, is an antithrombin-independent inhibitor with highly selective inhibitory action against Factor Xa (inhibits both free Factor Xa and Factor Xa bound in the prothrombinase complex) and therefore its effect is not related to antithrombin levels. Moreover, rivaroxaban has the advantage of oral bioavailability and rapid onset of action<sup>36,37</sup>. Altogether, these properties make rivaroxaban a more predictable and potentially more efficient anticoagulant compared with heparins. However, the beneficial effect of rivaroxaban in liver cirrhosis has not been investigated so far.

The present study further confirms the beneficial effect of the use of anticoagulants in cirrhosis with portal hypertension. Indeed, our study clearly shows that oral administration of rivaroxaban decreases liver oxidative stress, improves NO bioavailability, deactivates HSC and reduces portal hypertension in 2 experimental models of cirrhosis.

Reduction in portal pressure caused by rivaroxaban was not associated, in any of the two models of cirrhosis, with significant changes in portal blood flow, suggesting an effective reduction in IHVR. Moreover, when IHVR was evaluated *ex vivo* in a portal flow-controlled perfusion system, rivaroxaban-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats had a significantly reduced IHVR, confirming rivaroxaban effect decreasing IHVR. Increased IHVR in cirrhosis results from both increased hepatic vascular tone and architectural alterations of the liver. The results of our study suggest that rivaroxaban is probably modifying both components of IHVR.

On one hand, cirrhotic rats receiving rivaroxaban had decreased  $O_2^-$  levels, probably due to lower inflammatory cell recruitment and lower amounts of HSC, leading to increased cGMP levels, a surrogate of NO bioavailability, and improved response to incremental doses of acetylcholine. The latter, however, and probably due to the high variability, did not reach statistical significance. Nevertheless, von Willebrand factor expression was much decreased in the liver vasculature of rivaroxaban-treated cirrhotic rats. Altogether pointing to an important effect of rivaroxaban improving liver endothelial dysfunction.

On the other hand, HSC isolated from rivaroxaban-treated cirrhotic rats showed lower amounts of HSC and a marked downregulation of well recognized molecular markers of HSC activation and proliferation that correlate with their contractile and extracellular matrix secretion capability, namely  *$\alpha$ -sma*, *col1*, *pdgfr $\beta$* , *tgf $\beta$* , *timp1* and *timp2*. Moreover we confirmed that the decreased number of HSC observed in rivaroxaban-treated rats was not due to increased apoptosis but for reduced proliferation. As rivaroxaban promoted HSC deactivation, lead to HSC relaxation and consequent reduction in IHVR, we evaluated phosphorilated-moesin/moesin and RhoA protein expression in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats and observed that rivaroxaban-treated rats had lower phospho-moesin/moesin ratio and lower RhoA protein expression further supporting the effects of rivaroxaban decreasing IHVR.

This effect of rivaroxaban on HSC was associated to a mild decrease in collagen content in liver tissue, analyzed by hydroxyproline content and collagen protein expression. Nevertheless, we were unable to identify a significant reduction in liver fibrosis evaluated by Sirius red staining.

It is tempting to speculate that perhaps longer rivaroxaban treatment may reduce, in a more significant way, liver fibrosis, in view of the marked reduction in HSC activation achieved. This is further supported by our finding that rivaroxaban had clear beneficial effects on other architectural disturbances of cirrhosis. Analysis by transmission electron microscopy of the liver showed that rivaroxaban-treated cirrhotic rats had less formation of basal membrane in the sinusoids and hepatocytes had more projections than vehicle-treated cirrhotic rats, reflecting improved liver sinusoid assembly. Moreover, in both cirrhotic models, livers from rivaroxaban-treated rats had decreased intrahepatic fibrin deposition.

Remarkably, the beneficial effect of rivaroxaban on portal pressure occurred in the absence of deleterious effects on systemic hemodynamic, as shown by the absence of significant changes in mean arterial pressure or heart rate. Similarly, no changes in hematocrit and no bleeding manifestations were detected during treatment.

In conclusion, this study shows that rivaroxaban administration is able to decrease portal hypertension in two pre-clinical models of cirrhosis. This was mainly achieved by improving hepatic vascular resistance by means of a combination of improved liver sinusoid dysfunction, increased NO bioavailability, HSC deactivation, and decreased liver microthrombosis. The net result of these effects lead to a reduction in portal pressure without negative effects on systemic hemodynamic or bleeding.



### Acknowledgements

Most of this work was carried out at the Centre Esther Koplowitz, Barcelona, Spain. The CIBERehd is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. We are indebted to Cristina Isabel López Sanjurjo, Montse Monclús and Sergi Vila for their excellent technical assistance.

Accepted Article

## Figure Legends

**Figure 1. Rivaroxaban reduces oxidative stress and improves NO-pathway in cirrhotic rats.** Cellular superoxide content measured with dihydroethidium staining in livers from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (**A**). Peroxynitrite levels measured as nitrotyrosinated proteins in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with RVXB or vehicle (**B**). NO bioavailability measured as cGMP in vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (**C**). Phosphorylated eNOS and total eNOS expression ratio determined in livers described above (**D**). CD68 positive cells in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (**E**). Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Figure 2. Rivaroxaban improves endothelial dysfunction and liver sinusoidal architecture in cirrhotic rats.** Endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine (Ach) in isolated and perfused livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats in animals treated with RVXB or vehicle. Results are expressed as the percentage of PP in response to Ach (**A**). Representative images and von Willebrand quantification in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (**B**). Representative images and quantification of Space of Disse and hepatocytes projections in liver sinusoids in TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB. Space of Disse is visualized in RVXB-treated rats (arrow head) but lacks in vehicle-treated rats (arrow). Hepatocyte projections are only observed in RVXB-treated rats (p) (**C**). Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3. Rivaroxaban mildly promotes regression of liver fibrosis in cirrhotic rats.** Representative images and liver fibrosis quantification by Sirius

Red in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (A), hydroxyproline content in livers described above (B), collagen protein expression in livers described above (C) and semiquantitative quantification of collagen deposition analyzed in TEM micrographs (D). Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Figure 4. Rivaroxaban decreases and deactivates HSC in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.**

Representative images and desmin protein quantification in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB by IHC and WB (A). Representative images and  $\alpha$ -SMA protein quantification of livers described above by IHC and WB (B). Expression of the HSC phenotype markers  *$\alpha$ -sma*, *col1 $\alpha$ 1* and *pdgfr $\beta$*  in HSC isolated from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (C). RhoA and phospho-moesin/moesin protein expression were analyzed in livers described above (D). Expression of the apoptosis marker cleaved caspase-3 was analyzed in HSC isolated from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (E) Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5. Rivaroxaban decreases and deactivates HSC in TAA-cirrhotic rats.**

HSC (arrows) quantification and representative images in TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB x3000 (A).  $\alpha$ -SMA immunofluorescence in vehicle- and RVXB-treated TAA-cirrhotic rats and quantification (B). Expression of the HSC phenotype markers  *$\alpha$ -sma*, *col1 $\alpha$ 1*, *col1 $\alpha$ 2*, *pdgfr $\beta$* , *timp1*, *timp2* and *tgf $\beta$*  in

TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (**C**). Values represent mean  $\pm$  SEM.

**Figure 6. Rivaroxaban decreases liver microthrombosis in cirrhotic rats.**

Liver microthrombosis was assessed by IHC (left) and IF (right) in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (**A**) and by Western blot (left) and IF (right) in TAA-cirrhotic rats (**B**) treated with vehicle or RVXB. Values represent mean  $\pm$  SEM.

Accepted Article

## References

1. Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):141-156. doi:10.1016/S0168-8278(00)80422-5.
2. García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;57(2):458-461. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.007.
3. 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. doi:10.1055/s-2007-1007128.
4. Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, et al. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J*. 1998;333 ( Pt 1):121-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639571>.
5. Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, et al. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35584-35591. doi:10.1074/jbc.M003188200.
6. Duplantier JG, Dubuisson L, Senant N, et al. A role for thrombin in liver fibrosis. *Gut*. 2004;53(11):1682-1687. doi:10.1136/gut.2003.032136.
7. Anstee QM, Wright M, Goldin R, et al. Parenchymal extinction: coagulation and hepatic fibrogenesis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):117-126. doi:10.1016/j.cld.2008.09.013.

8. Borensztajn K, von der Thusen JH, Peppelenbosch MP, et al. The coagulation factor Xa/protease activated receptor-2 axis in the progression of liver fibrosis: a multifaceted paradigm. *J Cell Mol Med.* 2010;14(1-2):143-153. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00980.x.
9. Knight V, Tchongue J, Lourensz D, et al. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2012;55(3):879-887. doi:10.1002/hep.24784.
10. Delahousse B, Labat-Debelleix V, Decalonne L, et al. Comparative study of coagulation and thrombin generation in the portal and jugular plasma of patients with cirrhosis. *Thromb Haemost.* 2010;104(4):741-749. doi:10.1160/TH10-01-0040.
11. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An Imbalance of Pro- vs Anti-Coagulation Factors in Plasma From Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2009;137(6):2105-2111. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.045.
12. Lisman T, Leebeek FWG. Hemostatic alterations in liver disease: A review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Dig Surg.* 2007;24(4):250-258. doi:10.1159/000103655.
13. Wanless IR, Liu JJ, Butany J. Role of thrombosis in the pathogenesis of congestive hepatic fibrosis (cardiac cirrhosis). *Hepatology.* 1995;21(5):1232-1237.
14. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, et al. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology.* 1995;21:1238-1247.

15. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, et al. PAR1 Antagonism Protects Against Experimental Liver Fibrosis. Role of Proteinase Receptors in Stellate Cell Activation. *Hepatology*. 2004;39(2):365-375. doi:10.1002/hep.20054.
16. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, Ameen A, et al. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. *Pharmacol Res*. 2005;51(1):59-67. doi:10.1016/j.phrs.2004.04.009.
17. Assy N, Hussein O, Khalil A, et al. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2007;52(5):1187-1193. doi:10.1007/s10620-006-9595-1.
18. **Cerini F, Vilaseca M**, Lafoz E, et al. Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2016;ajpgi.00010.2015. doi:10.1152/ajpgi.00010.2015.
19. Robertson L, Kesteven P. Oral direct thrombin inhibitors or oral factor Xa inhibitors for the treatment of deep vein thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2). doi:10.1002/14651858.CD010956.
20. **Di Pascoli M, Diví M**, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58:904-910. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.012.
21. **Gracia-Sancho J, Laviña B**, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing

- to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47:1248-1256. doi:10.1002/hep.22166.
22. **García-Calderó H, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J**, et al. Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2011;54:660-665. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.034.
23. Graupera M, García-Pagán J-C, Titos E, et al. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*. 2002;122:387-393. doi:10.1053/gast.2002.31040.
24. Graupera M, García-Pagán JC, Parés M, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2003;39:515-521. doi:10.1016/S0168-8278(03)00347-7.
25. Rodríguez-Vilarrupla A, Laviña B, García-Calderó H, et al. PPAR $\alpha$  activation improves endothelial dysfunction and reduces fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2012;56:1033-1039. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.008.
26. Gracia-Sancho J, Russo L, García-Calderó H, et al. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut*. 2011;60(4):517-524. doi:10.1136/gut.2010.220913.
27. **Garcia-Irigoyen O, Carotti S, Latasa MU**, et al. Matrix metalloproteinase-10 expression is induced during hepatic injury and plays a fundamental role in liver tissue repair. *Liver Int*. 2014;34(7):e257-70.



- doi:10.1111/liv.12337.
28. Luyendyk JP, Cantor GH, Kirchhofer D, et al. Tissue factor-dependent coagulation contributes to alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(4):G840-9. doi:10.1152/ajpgi.90639.2008.
29. Sasaki T, Kuzuya M, Cheng X-W, et al. A novel model of occlusive thrombus formation in mice. *Lab Invest*. 2004;84(11):1526-1532. doi:10.1038/labinvest.3700171.
30. Graupera M, March S, Engel P, et al. 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. doi:10.1152/ajpgi.00300.2004.
31. Gaça MDA, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol*. 2002;36(3):362-369.
32. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-172. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
33. Villa E, Cammà C, Marietta M, et al. Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1253-1260.e4. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.018.
34. Tang W, Wang Y, Zhao X, et al. Procoagulant imbalance aggravated with falling liver function reserve, but not associated with the presence of

portal vein thrombosis in cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015;27(6):672-678. doi:10.1097/MEG.0000000000000352.

35. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. The coagulopathy of cirrhosis assessed by thromboelastometry and its correlation with conventional coagulation parameters. *Thromb Res.* 2009;124(1):132-136. doi:10.1016/j.thromres.2008.11.008.
36. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, et al. Rivaroxaban: A new oral factor xa inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):376-381. doi:10.1161/ATVBAHA.110.202978.
37. Laux V, Perzborn E, Heitmeier S, et al. Direct inhibitors of coagulation proteins - the end of the heparin and low-molecular-weight heparin era for anticoagulant therapy? *Thromb Haemost.* 2009;102(5):892-899. doi:10.1160/TH09-02-0134.

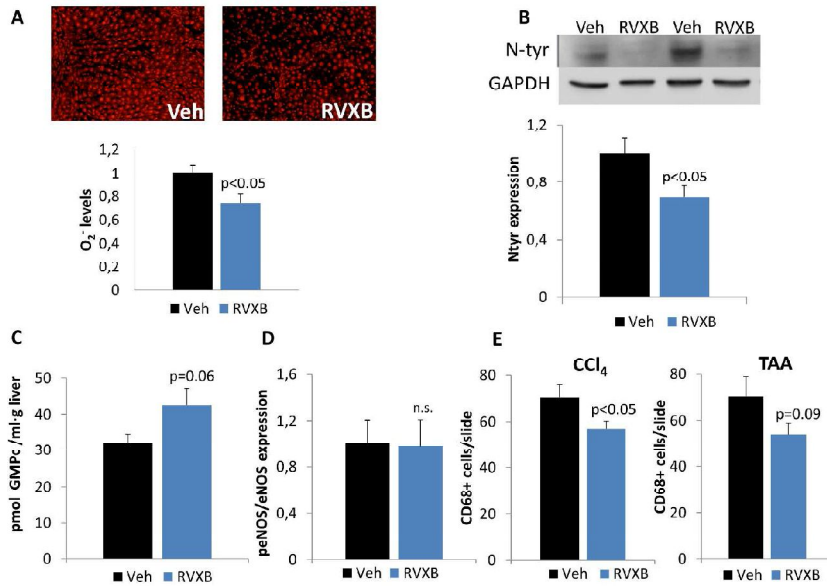


Figure 1. Rivaroxaban reduces oxidative stress and improves NO-pathway in cirrhotic rats. Cellular superoxide content measured with dihydroethidium staining in livers from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (A). Peroxynitrite levels measured as nitrotyrosinated proteins in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with RVXB or vehicle (B). NO bioavailability measured as cGMP in vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (C). Phosphorylated eNOS and total eNOS expression ratio determined in livers described above (D). CD68 positive cells in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (E). Values represent mean  $\pm$  SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Acce]

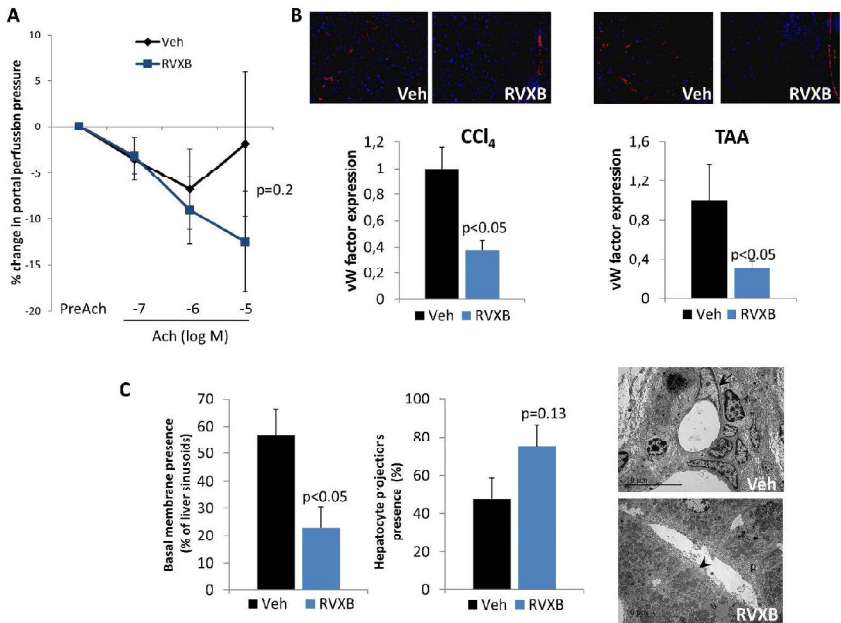


Figure 2. Rivaroxaban improves endothelial dysfunction and liver sinusoidal architecture in cirrhotic rats. Endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine (Ach) in isolated and perfused livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats in animals treated with RVXB or vehicle. Results are expressed as the percentage of PP in response to Ach (A). Representative images and von Willebrand quantification in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (B). Representative images and quantification of Space of Disse and hepatocytes projections in liver sinusoids in TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB. Space of Disse is visualized in RVXB-treated rats (arrow head) but lacks in vehicle-treated rats (arrow). Hepatocyte projections are only observed in RVXB-treated rats (p) (C). Values represent mean ± SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Acce

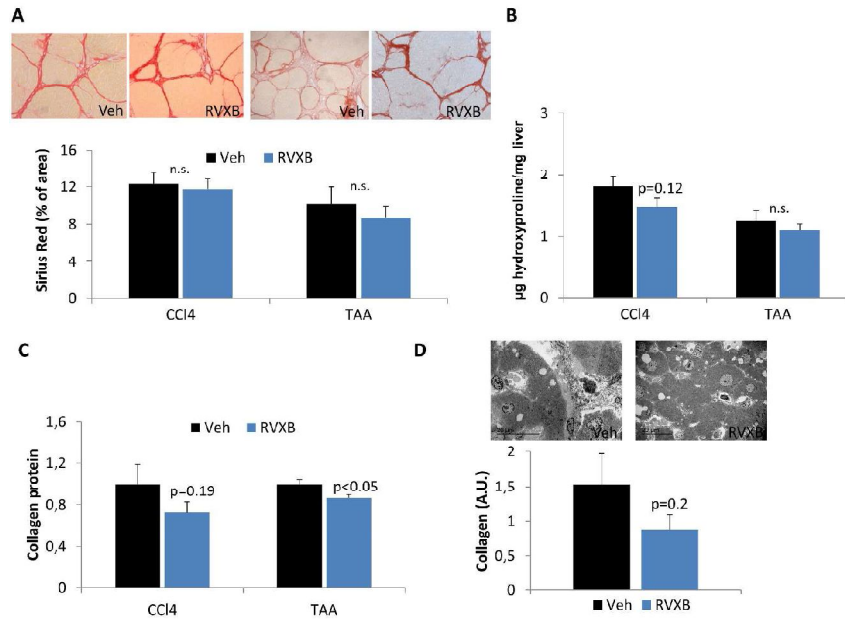


Figure 3. Rivaroxaban mildly promotes regression of liver fibrosis in cirrhotic rats. Representative images and liver fibrosis quantification by Sirius Red in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (A), hydroxyproline content in livers described above (B), collagen protein expression in livers described above (C) and semiquantitative quantification of collagen deposition analyzed in TEM micrographs (D). Values represent mean  $\pm$  SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Accel

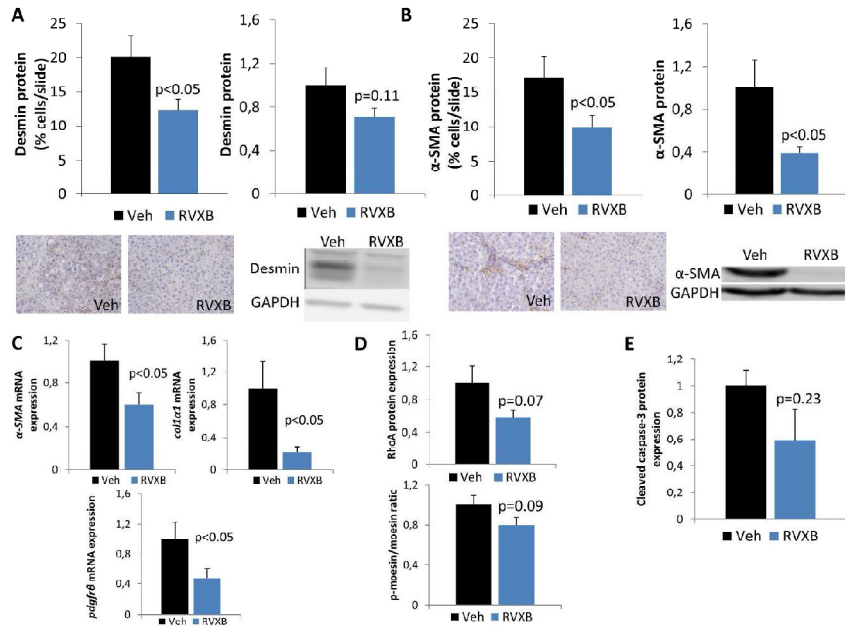


Figure 4. Rivaroxaban decreases and deactivates HSC in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. Representative images and desmin protein quantification in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB by IHC and WB (A). Representative images and  $\alpha$ -SMA protein quantification of livers described above by IHC and WB (B). Expression of the HSC phenotype markers  $\alpha$ -sma, col1a1 and pdgfr $\beta$  in HSC isolated from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (C). RhoA and phospho-moesin/moesin protein expression were analyzed in livers described above (D). Expression of the apoptosis marker cleaved caspase-3 was analyzed in HSC isolated from vehicle and RVXB-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (E) Values represent mean  $\pm$  SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

ACCE

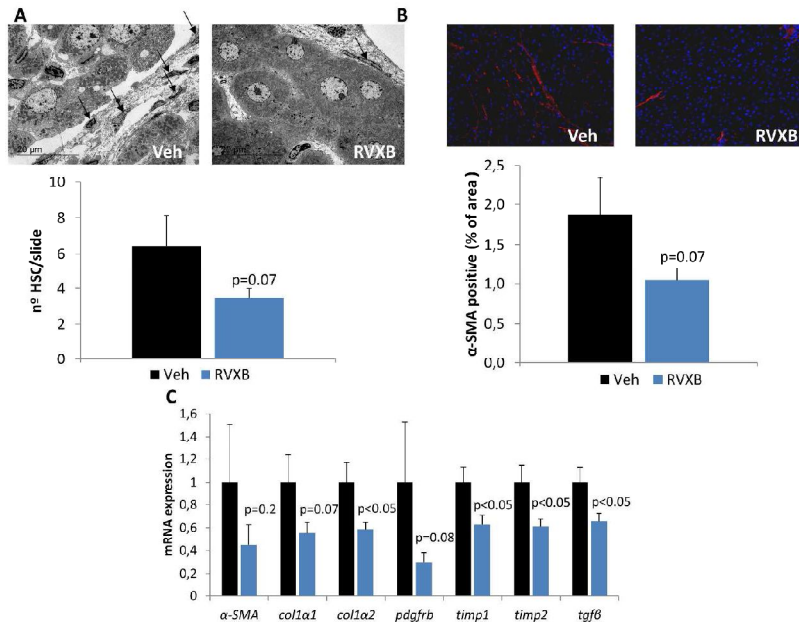


Figure 5. Rivaroxaban decreases and deactivates HSC in TAA-cirrhotic rats. HSC (arrows) quantification and representative images in TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB x3000 (A).  $\alpha$ -SMA immunofluorescence in vehicle- and RVXB-treated TAA-cirrhotic rats and quantification (B). Expression of the HSC phenotype markers  $\alpha$ -sma, *col1a1*, *col1a2*, *pdgfrb*, *timp1*, *timp2* and *tgf $\beta$*  in TAA-cirrhotic rats treated with vehicle or RVXB (C). Values represent mean  $\pm$  SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Accel

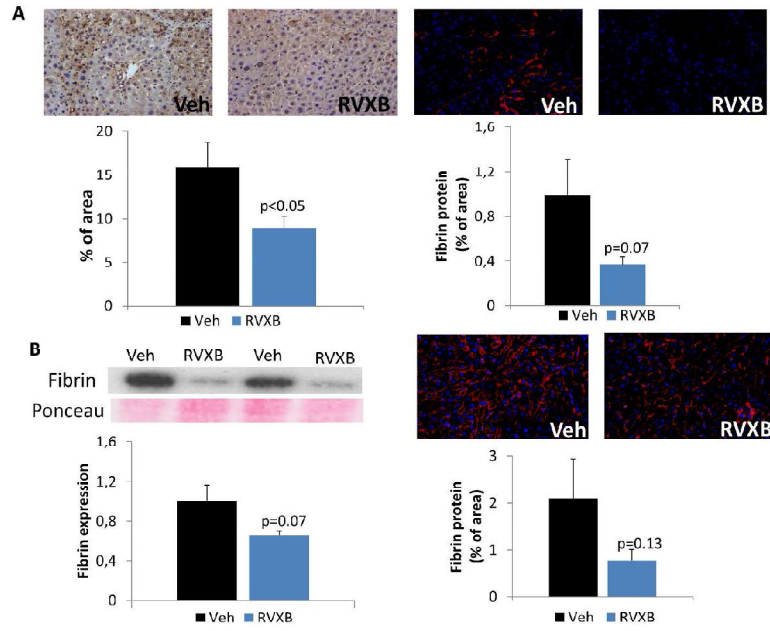


Figure 6. Rivaroxaban decreases liver microthrombosis in cirrhotic rats. Liver microthrombosis was assessed by IHC (left) and IF (right) in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (A) and by Western blot (left) and IF (right) in TAA-cirrhotic rats (B) treated with vehicle or RVXB. Values represent mean  $\pm$  SEM.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Accep



## Tables

Table 1

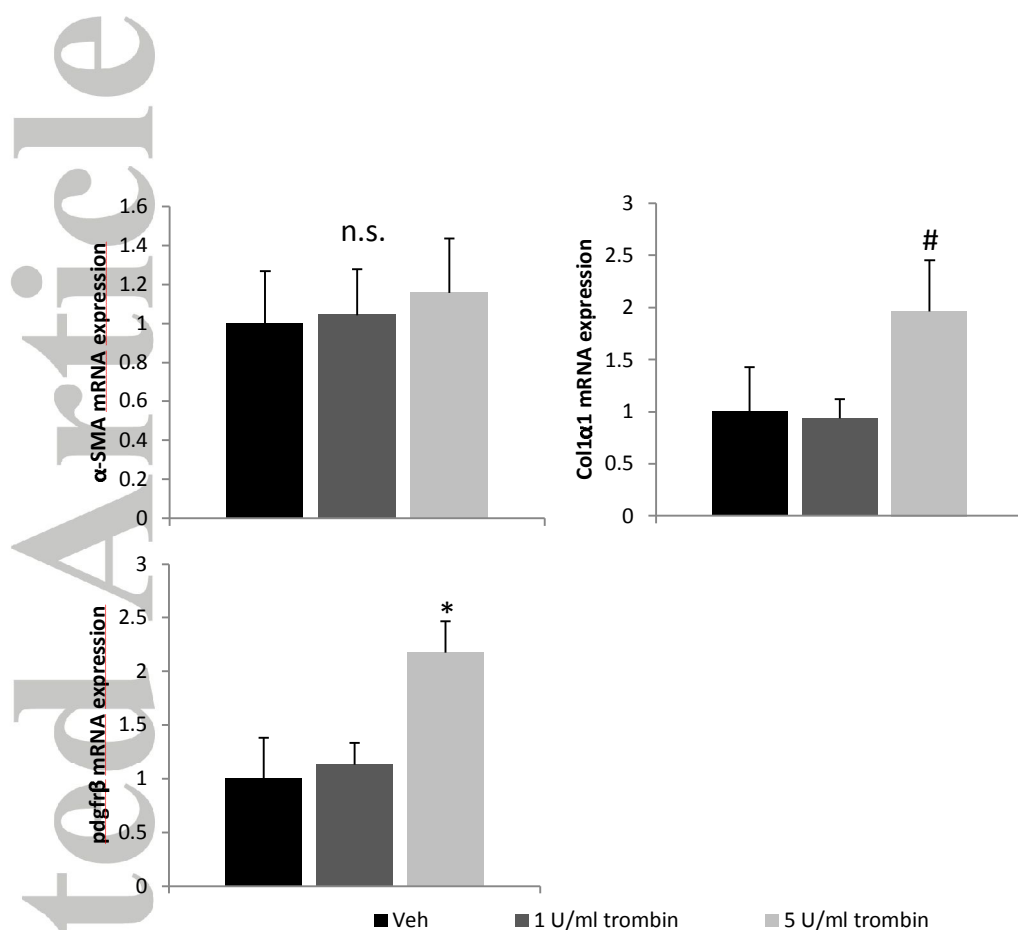
	Vehicle n=11	Rivaroxaban n=12	p value
PP (mmHg)	13.2 ± 2.5	11.1 ± 2.2	.04
PBF (ml/min)	14.0 ± 5.0	15.6 ± 5.5	.49
IHVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.5	0.8 ± 0.2	.13
MAP (mmHg)	101 ± 21	103 ± 18	.75
HR (beats/min)	344 ± 41	338 ± 36	.71
AST (U/L)	194 ± 163	115 ± 40	.13
ALT (U/L)	82 ± 46	57 ± 21	.11
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.1	0.02 ± 0.04	.06
Albumin (g/L)	26.4 ± 2.4	27.2 ± 2.0	.46

**Table 1. Effects of rivaroxaban on hepatic and systemic hemodynamics, and biochemical parameters in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.** MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; IHVR, intrahepatic vascular resistance; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean ± SEM.

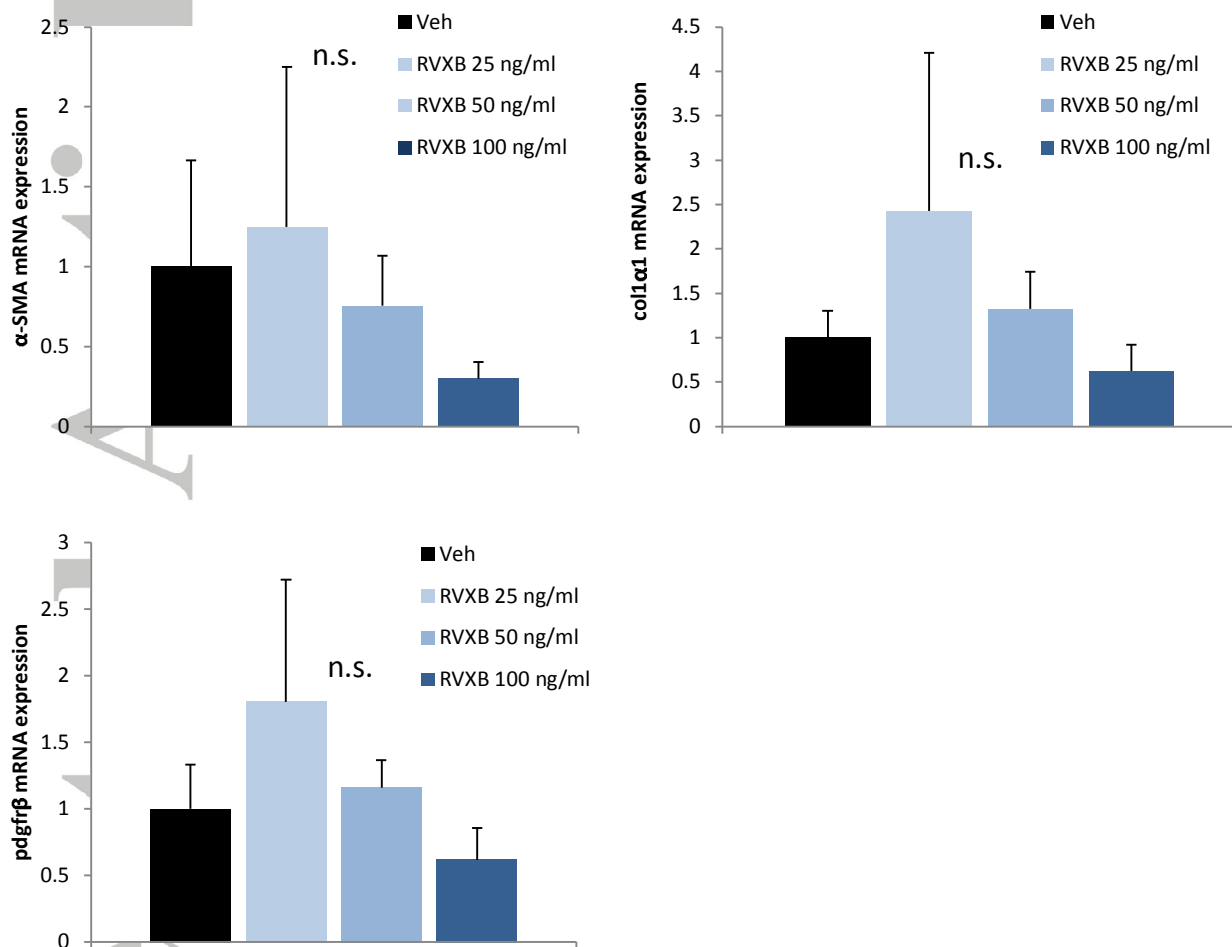
Table 2

	Vehicle n=6	Rivaroxaban n=8	p value
PP (mmHg)	16.7 ± 1.9	12.8 ± 1.5	.001
PBF (ml/min)	17.1 ± 7.4	15.5 ± 3.6	.59
IHVR (mmHg/ml/min <sup>-1</sup> )	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.3	.21
MAP (mmHg)	117 ± 6	115 ± 12	.76
HR (beats/min)	390 ± 46	382 ± 63	.79
AST (U/L)	71 ± 12	84 ± 19	.15
ALT (U/L)	37 ± 12	42 ± 9	.33
Total bilirubin (mg/dl)	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.05	.69
Albumin (g/L)	25.5 ± 1.9	25.2 ± 1.8	.77

**Table 2. Effects of rivaroxaban on hepatic and systemic hemodynamics, and biochemical parameters in TAA-cirrhotic rats.** MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; IHVR, intrahepatic vascular resistance; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean ± SEM.



**Supplementary Figure 1. Thrombin-induced HSC activation *in vitro*.** HSC isolated from control rats were treated *in vitro* with 1 or 5 U/ml thrombin for 24h or with its vehicle (Veh). Different HSC activation markers were analyzed (n=3-4 per group). \* $p < 0.05$ , # $p < 0.1$  vs. vehicle. Values represent mean  $\pm$  SEM



**Supplementary Figure 2. Rivaroxaban direct effect on HSC activation *in vitro*.** HSC were isolated from non-cirrhotic rats and treated *in vitro* with different Rivaroxaban doses (25, 50 and 100 ng/ml) or vehicle (Veh) for 24h (n=3-4 per group). mRNA HSC activation markers were therefore analyzed. Values represent mean  $\pm$  SEM



**Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

**Marina Vilaseca**, Héctor García-Calderó, Erica Lafoz, María Ruat, Cristina Isabel López Sanjurjo, Michael. P. Murphy, Ramon Deulofeu, Jaume Bosch, Virginia Hernández-Gea, Jordi Gracia-Sancho, Juan Carlos García-Pagán

Liver International, 2017

IF:4.47

## **Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

Marina Vilaseca<sup>1</sup>, Héctor García-Calderó<sup>1,2</sup>, Erica Lafoz<sup>1</sup>, Maria Ruart<sup>1</sup>, Cristina Isabel López-Sanjurjo<sup>1,2</sup>, Michael. P. Murphy<sup>3</sup>, Ramon Deulofeu<sup>2,4</sup>, Jaume Bosch<sup>1,2</sup>, Virginia Hernández-Gea<sup>1,2</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>1,2</sup>, Juan Carlos García-Pagán<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Hospital Clínic de Barcelona. University of Barcelona Medical School, Barcelona, Spain.*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Spain*

<sup>3</sup>*MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK.*

<sup>4</sup>*Department of Biochemistry and Chromatography, Hospital Clinic de Barcelona, Spain*

**Corresponding author:** Juan Carlos García-Pagán, MD, PhD. Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab. Villarroel 170. 08036, Barcelona. Tel: +34932275707 ext: 2824. E-mail: [jcgarcia@clinic.cat](mailto:jcgarcia@clinic.cat)

**List of abbreviation:** HSC, hepatic stellate cells; LSEC; liver sinusoidal endothelial cells; KC, Kupffer cells; ROS, reactive oxygen species; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide; hPCLS, human precision cut liver slices; hHSC, human hepatic stellate cells; rHSC, rat hepatic stellate cells; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; TAA, thioacetamide; DHE, dihydroethidium; DAB, 3, 3'-Diaminobenzidine; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; IHVR, intrahepatic vascular resistance; MAP, mean arterial pressure; HR, hearth rate; ICG, indocyanine green; Mtx, methoxamine; Ach, acetylcholine; α-SMA, alpha-smooth cell actin;

pdgfr $\beta$ , platelet derived growth factor beta; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha; iNOS, induced nitric oxide synthase; IL-6, interleukin 6; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 $\beta$

**Financial support:**

This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2013-44723-R) and Instituto de Salud Carlos III, FIS (PI13/00341), and the European Union (Fondos FEDER, “una manera de hacer Europa”). M.R. has a contract from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-44723-R). JG-S has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

**Word count:** 5051**Number of figures:** 6+2 tables**Conflict of interest:** Nothing to report**Author's contributions:**

M.V. designed the research, conceived ideas, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. H.G.-C., E.L., M.R. and C.I.L.-S. performed experiments. M.P.M. provided essential reagents, advice on experimental design and revised the manuscript. R.D provided advice and critically revised the manuscript, J.B. critically revised the manuscript and



obtained funding. V.H.-G. and J.G.-S. conceived ideas and critically revised the manuscript. J.C.G.-P. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and directed the study. All authors edited and reviewed the final manuscript.

## Abstract

**Background & aims:** In cirrhosis, activated hepatic stellate cells (HSC) play a major role increasing intrahepatic vascular resistance and developing portal hypertension. We have shown that cirrhotic livers have increased reactive oxygen species (ROS), and that antioxidant therapy decreases portal pressure. Considering that mitochondria produce many of these ROS, our aim was to assess the effects of the oral mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone on hepatic oxidative stress, HSC phenotype, liver fibrosis and portal hypertension.

**Methods:** *Ex vivo:* HSC phenotype was analyzed in human precision-cut liver slices in response to mitoquinone or vehicle. *In vitro:* Mitochondrial oxidative stress analyzed in different cell type of livers from control and cirrhotic rats. HSC phenotype, proliferation and viability were assessed in LX2, and in primary human and rat HSC treated with mitoquinone or vehicle. *In vivo:* CCl<sub>4</sub>- and thioacetamide-cirrhotic rats were treated with mitoquinone (5mg/kg/day) or the vehicle compound, DecylTPP, for 2 weeks, followed by measurement of oxidative stress, systemic and hepatic hemodynamic, liver fibrosis, HSC phenotype, and liver inflammation.

**Results:** Mitoquinone deactivated human and rat HSC, decreased their proliferation but with no effects on viability. In CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats, mitoquinone decreased hepatic oxidative stress, improved HSC phenotype, reduced intrahepatic vascular resistance and diminished liver fibrosis. These effects were associated with a significant reduction in portal pressure without

changes in arterial pressure. These results were further confirmed in the thioacetamide-cirrhotic model.

**Conclusion:** We propose mitochondria-targeted antioxidants as a novel treatment approach against portal hypertension and cirrhosis.

**Abstract word count:** 240

### **Key points**

- Mitochondrial oxidative stress is increased in cirrhosis.
- Hepatocytes and HSC are the main cells producing mitochondrial oxidative stress in cirrhosis.
- Mitoquinone is a novel oral antioxidant which deactivates human and rat HSC and reduces liver fibrosis decreasing portal pressure in cirrhosis.
- Mitoquinone reduces liver inflammation in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.

**Keywords:** cirrhosis, liver, hepatic stellate cells, hepatic hemodynamic, oxidative stress

## INTRODUCTION

Increased intrahepatic vascular resistance is the primary factor in the development of portal hypertension, the main complication of cirrhosis. This increased resistance to portal blood flow results from both dynamic increase of the hepatic vascular tone and from architectural alterations of the liver parenchyma<sup>1,2</sup>. Architectural distortion of the cirrhotic liver is partly due to increased synthesis of extracellular matrix components secreted by activated hepatic stellate cells (HSC)<sup>3</sup>. Cytokines<sup>4</sup> and reactive oxygen species (ROS)<sup>5,6</sup> play an important role in activating HSC, resulting in an enhanced collagen synthesis and deposition<sup>7-9</sup>.

ROS are molecules derived from oxygen with high chemical reactivity, which include free radicals such as superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl ( $\cdot OH$ ), and non-radical species such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Because of their ability to cause oxidative stress and promote cell damage, ROS production is tightly regulated. In health, ROS generation is counteracted by several enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems that diminish ROS levels, maintaining an adequate redox balance<sup>10</sup>.

In liver diseases ROS levels are markedly elevated<sup>7,11</sup>. This is mainly due to an increased production that may derive from multiple cell types, including endothelial cells, vascular smooth muscle cells, Kupffer cells among others<sup>12</sup>. Numerous enzyme systems can potentially produce ROS. NADPH oxidases, xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide (NO) synthase and mitochondrial enzymatic systems are those more frequently involved<sup>13,14</sup>. Inefficient ROS elimination by antioxidant enzymes such as the various superoxide dismutase (SOD) and peroxidase isoforms also contribute to increased ROS levels.

Because of this, many studies have focused on the potential of antioxidants to treat chronic liver diseases. In fact, studies from our laboratory further reinforced the role of antioxidants reducing oxidative damage improving intrahepatic endothelial function and reducing portal pressure in cirrhotic rats with portal hypertension<sup>15-17</sup>.

The mitochondrial respiratory chain is one of the key sites where ROS are produced<sup>18</sup>. Hence, there is considerable interest in developing strategies to target molecules with therapeutic potential to mitochondria.

The best characterized mitochondria-targeted antioxidant to date is mitoquinone, which has shown beneficial effects in pre-clinical models of liver diseases such as steatosis<sup>19</sup> or ischemia-reperfusion injury<sup>20</sup> and, importantly, decreased hepatic necroinflammation in hepatitis C patients<sup>21</sup>.

We hypothesize that mitoquinone may be a potential new therapeutic strategy to decrease mitochondrial oxidative damage (superoxide levels, nitrotyrosine proteins, Hif1 $\alpha$  expression), and in this way reduce liver fibrosis (Sirius Red, hydroxyproline), decrease HSC activation ( $\alpha$ -SMA, col1 $\alpha$ 1, pdgfr $\beta$  and desmin) and improve portal hypertension in cirrhosis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **1- *Ex vivo* procedures**

#### **Preparation and treatment of human precision cut liver slices (hPCLS)**

Human precision cut liver slices (hPCLS) were obtained using remnant peritumoral histological normal liver tissues obtained after partial hepatectomy. In all cases surgery was recommended to excise tumour metastasis from colon carcinoma and patients signed the informed consent (n=3 patients). None of these patients had previously received adjuvant chemotherapy that is known to promote liver changes. The Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona approved the experimental protocol. Tissues were prepared as described in supplementary material and methods.

### **2- *In vitro* procedures**

#### **Rat liver cells isolation**

Hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), hepatic stellate cells (HSC) and Kupffer cells (KC) were isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic and control rats following a modified protocol previously described<sup>22</sup>. When only HSC were isolated another protocol was performed. Detailed methods are available in the supplementary material and methods.

#### **Human HSC treatments and characterization**

LX2 and human primary HSC (hHSC) were used for *in vitro* experiments as described in supplementary material and methods.

#### **Mitochondrial superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) content in isolated liver cells**

*In situ* mitochondrial  $O_2^-$  levels were evaluated in fresh isolated cells as described in supplementary material and methods.

### **3- *In vivo* experiments**

#### **Induction of cirrhosis by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and by thioacetamide (TAA)**

a) CCl<sub>4</sub>: Male Wistar rats (50-75g) were administered CCl<sub>4</sub> by inhalation three times a week to induce cirrhosis. Phenobarbital (0.3g/l) was added to the drinking water as previously described<sup>23,24</sup>.

b) TAA: Male Sprague Dawley rats (150-200g) were administered TAA (Sigma) dissolved in saline by intraperitoneal injection, twice a week at a dose of 250 mg/kg for 12 weeks.

The animals were kept in an environmentally controlled animal facility at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. All experiments were performed during the light cycle and were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with European Community guidelines for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EEC Directive 86/609).

#### ***In vivo* hemodynamic study and biochemical analysis**

Rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight, Imlagene 1000; Merial) plus midazolam (5 mg/kg body weight, Laboratorio Reig Jofré S.A.) intraperitoneally, fastened to a surgical board and maintained at a constant temperature of  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (continuously monitored during the entire

experiment). A tracheotomy and cannulation with a PE-240 catheter (Portex) was performed in order to maintain adequate respiration during the anaesthesia. Indwelling catheters made of polyethylene tubing (PE-50; Portex) were placed into the femoral artery to measure mean arterial pressure (MAP: mmHg) and heart rate (HR: bpm), and to the ileocolic vein to measure portal pressure (PP: mmHg)<sup>25</sup>. Portal blood flow (PBF: ml/min) was measured with a non-constrictive peri-vascular ultrasonic transit-time flow probe (2PR, 2-mm diameter, Transonic Systems Inc.) placed around the portal vein just before its entrance in the liver avoiding the measurement of most portal-collateral blood flow. 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 (AD Instruments). Intrahepatic vascular resistance (IHVR) was calculated as PP/PBF and corrected by liver weight. Hemodynamic data was collected after a 20-min stabilization period. At the end of the *in vivo* hemodynamic study, serum samples from cirrhotic rats were collected to evaluate alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), bilirubin and albumin, all by standard protocols.

### **Evaluation of endothelial function**

In CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats, after the *in vivo* hemodynamic measurements, livers were quickly isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as previously described<sup>23</sup>. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilize for 20 min before vasoactive substances were added. The intrahepatic microcirculation was precontracted by adding the  $\alpha_1$ -adrenergic agonist methoxamine (Mtx: 100  $\mu$ mol/L; Sigma) to the reservoir. After 5 min,



concentration-response curves to cumulative doses of acetylcholine (Ach; Sigma) were evaluated. The concentration of Ach was increased by 1log unit every 1.5 min interval. Responses to Ach were calculated as the percentage change in portal perfusion pressure<sup>26</sup>. The gross appearance of the liver, stable perfusion pressure, bile production over 0.4 µl/min/g of liver and a stable buffer pH ( $7.4 \pm 0.3$ ) were monitored during this period.

### **Mitoquinone treatment**

Cirrhotic rats were randomized to receive mitoquinone (MIT: MS010 25 mg/kg/day; 20-25% w/w of mitoquinone and 75-80% w/w β-cyclodextrin: 5 mg mitoquinone/kg/day) or the vehicle compound, decyltriphenylphosphonium (DecylTPP) that contains the mitochondria-targeting triphenylphosphonium moiety but with no antioxidant activity, administered orally by *gavage* once a day for 2 weeks. Treatment started one week after the recognition of ascites in CCl<sub>4</sub> model and immediately after stopping TAA, hence drugs were administered to animals with fully developed cirrhosis. A dose of 10 mg/kg/day (20-25% w/w of mitoquinone: 2 mg mitoquinone/kg/day) was tested with no significant changes.

*In vivo* experiments were performed 1 hour after the last dose of mitoquinone or vehicle.

Treatments were prepared by a third person and experimental studies were realized blindly. The dose of mitoquinone used has been previously shown to have antioxidant properties *in vivo*<sup>19</sup>.

### **Evaluation of hepatic fibrosis**

**Sirius Red staining**

Livers from cirrhotic rats were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with 0.1% Sirius red, photographed using a microscope equipped with a digital camera, and analyzed. Ten fields from each slide at 5x were randomly selected, and the red-stained area per total area was measured using AxioVision software<sup>27</sup>. Values are expressed as the mean of 10 fields taken from vehicle and mitoquinone-treated rats.

**Hepatic hydroxyproline content**

Hydroxyproline content was assessed with Hydroxyproline Colorimetric Assay Kit (Biovision) following manufacturer's instructions. Briefly, liver tissues were homogenized in ddH<sub>2</sub>O. HCl (12 M) was added to the homogenate and samples were incubated at 120°C for 3 hours. Kit reagents were added and absorbance at 560 nm was read in plate reader and expressed as µg of hydroxyproline/mg liver.

**Immunohistochemistry**

Immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with anti-desmin (Dako), anti-CD68 (Serotec), and anti-CD163 (Bio Rad) all at a 1/100 dilution, or with phosphate-buffered saline as a negative control. Bound antibodies were visualized as previously described<sup>28</sup>. Fifteen fields from each slide at 20x were randomly selected and positive cells were counted per slide.

**Western Blot**

Expression of  $\alpha$ -SMA, desmin and 3-nitrotyrosinated proteins was determined by western blot of hepatic samples as previously described<sup>29</sup>. The following antibodies were used:  $\alpha$ -SMA (Sigma), desmin (Dako) and 3-nitrotyrosine (Sigma) all at a dilution of 1/1000. Thereafter, the membranes were incubated with the corresponding secondary peroxidase-coupled antibody (Santa Cruz). Blots were developed with enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham). Intensities of the digital bands were evaluated densitometrically using Multi Gauge V.2.1 (Fujifilm). Ponceau S staining assured equal protein loading. GAPDH (Santa Cruz) served as endogenous control.

#### **Isolation of total RNA and Real time RT-PCR**

Total RNA was isolated from liver tissues using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad) and from cells lysates using RNAeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocols. mRNA expression of  $\alpha$ -SMA, *col1a1*, *pdgfr $\beta$* , *hif1 $\alpha$* , *TNF $\alpha$* , *iNOS*, *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *mmp2*, *mmp9*, *mmp13*, *timp1* and *timp2* was analyzed by real-time PCR using predesigned gene expression assays and reported relative to endogenous control *gapdh* in rat samples and *18S* in human samples. All PCR reactions were performed in duplicate, using nuclease-free water as a no template control. Detailed primer references are described in Supplementary Table 1.

#### **Statistical analysis**

Statistics were performed using the SPSS 18.0 for Windows statistical package (SPSS Inc.). All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test, one sample *t*-test or the non-parametric test (Mann-Whitney) when adequate.

Differences between the groups were assessed by one-way ANOVA. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

Additional detailed methods are described in supplementary material and methods.

## RESULTS

### **Mitochondrial oxidative stress is increased in cirrhotic livers**

Mitoxox, which is a fluorogenic indicator for mitochondrial superoxide, showed almost three times more mitochondrial oxidative stress in cirrhotic than control livers (Fig 1A). This increase was mainly seen in hepatocytes and HSC (Fig 1B-C) without significant changes in LSEC and KC (Fig 1D-E).

### **Mitoquinone decreases mitochondrial oxidative stress in liver cells *in vitro***

Mitoquinone dose dependently (0, 1 and 3nM for 24 hours) decreased mitochondrial oxidative stress in all cell types isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat livers (Fig 2A-D).

### **Mitoquinone deactivates rat and human HSC**

To ascertain whether mitoquinone promotes HSC deactivation, three different approaches were analyzed. First, mitoquinone effects were characterized in hPCLS, which represents an *ex vivo* system capable of mimicking the complex natural environment found in the human liver<sup>30</sup>. We exposed hPCLS to mitoquinone or its vehicle for 24h. We observed decreased HSC activation markers upon mitoquinone treatment, indicating that mitoquinone is able to dose-dependently deactivate HSC of human livers (Fig 3A).

Secondly, to further confirm human HSC deactivation by mitoquinone, we analyzed HSC activation markers in LX2, an immortalized human HSC line<sup>31</sup> and in primary human HSC activated *in vitro*.  $\alpha$ -SMA, *col1 $\alpha$ 1* and *pdgfr $\beta$*  were markedly and dose-dependently decreased in mitoquinone-treated human

HSC (Fig 3B-C). Furthermore, mitoquinone treatment decreased LX2 proliferation without affecting cell viability (Supplementary Fig 1A).

Finally, we isolated HSC from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats and subsequently incubated them *in vitro* with mitoquinone or vehicle for 24h. HSC became deactivated as demonstrated by significant lower expressions of  $\alpha$ -SMA, *col1a1* and *pdgfr $\beta$*  in mitoquinone-treated HSC (Fig 3D). Importantly, mitoquinone did not affect primary rat HSC viability when treated *in vitro* (Supplementary Fig 1B), thus confirming the results obtained using LX2.

### **Mitoquinone decreases oxidative stress in cirrhotic rat livers**

Oral mitoquinone administration produced a significant decrease in mitochondrial oxidative stress levels in both cirrhotic models, as shown by mitosox fluorescence (Fig 4A). Similarly, DHE fluorescence showed decreased oxidative stress in mitoquinone-treated cirrhotic rats (Fig 4B). Moreover, 3-nitrotyrosinated proteins were analysed as a marker of oxidative damage. Mitoquinone-treated rats had lower nitrotyrosinated protein levels (Fig 4C). Finally, we assessed *hif1 $\alpha$*  expression, a factor which expression is induced by oxidative stress. *Hif1 $\alpha$*  expression was indeed decreased by mitoquinone treatment (Fig 4D). Altogether strongly suggest an important antioxidant effect of this compound in cirrhotic rat livers.

### **Mitoquinone improves IHVR and decreases PP in two different experimental models of cirrhosis in the rat**

Mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats had a significant lower PP than vehicle-treated animals, without significant changes in PBF, having a significant improvement in IHVR (Table 1).

Similar results were obtained in TAA-cirrhotic rats (Table 2): Mitoquinone-treated rats had an almost significant lower PP ( $p=0.06$ ) without changes in PBF. However, in this case IHVR difference was not statistically significant.

Importantly, no changes in MAP or HR were observed in any model suggesting that mitoquinone treatment does not affect systemic hemodynamics.

Biochemical analysis showed no significant differences between mitoquinone and vehicle-treated rats in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Table 1) or TAA-cirrhotic rats (Table 2). Furthermore, the ICG clearance in TAA model was 33% higher in cirrhotic mitoquinone-treated rats than in vehicle-treated rats. However, the difference was not statistically significant (Table 2).

### **Mitoquinone does not modify hepatic vascular tone in cirrhotic rat livers**

There were no differences in baseline portal perfusion pressure between vehicle and mitoquinone-treated rats. A slight, non-significant improvement in the dose response vasodilatation to Ach was observed (Supplementary Fig 2).

### **Mitoquinone induces liver fibrosis regression**

Rats receiving mitoquinone exhibited a significant reduction in hepatic fibrosis proved by decreased collagen deposition demonstrated by Sirius Red staining (-36% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; Fig 5A left), almost reduced hepatic

hydroxyproline content (-20% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; Fig 5B) and reduced collagen expression (*col1a1*: -68% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; Fig 5C left). However, in TAA-cirrhotic rats the differences were not as marked as observed in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. Mitoquinone-treated TAA-cirrhotic rats had -23% lower collagen deposition by Sirius Red staining (Fig 5A right) and -48% reduced *col1a1* expression (Fig 5C right) but they did not reach significance. Moreover, to ascertain fibrolysis, *mmps* and *timps* expression was analyzed with no significant changes in CCl<sub>4</sub> or TAA-cirrhotic rats (Supplementary Fig 3A-B). However, *timp2* expression was lower in mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (-25%; Supplementary Fig 3A).

#### **Mitoquinone deactivates HSC *in vivo***

Lower collagen synthesis and deposition due to mitoquinone treatment was associated with lower mRNA expression of the profibrogenic genes *pdgfrβ* (-54% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats & -30% in TAA-cirrhotic rats; Fig 5C) and *α-SMA* (-12% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats & -32% in TAA-cirrhotic rats; Fig 5C). To further confirm mitoquinone effects on HSC deactivation, we isolated HSC from vehicle and mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats and analyzed HSC activation markers. Indeed, we observed a marked and significant decrease in *α-SMA* and *col1a1* expression in mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Fig 5D). *α-SMA* protein expression was also decreased (-18% in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats & -42% in TAA-cirrhotic rats; Fig 5E), although protein changes were more evident in TAA-cirrhotic rats.



When desmin, a marker of HSC, was analyzed showed no differences between groups (Fig 5F; Supplementary Fig 4), which was in accordance with the *in vitro* experiments using LX2 and rHSC.

### **Effect of mitoquinone on liver inflammation**

Mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats had a significantly decreased number of CD68 positive cells compared with the vehicle-treated rats, with no differences in hepatic CD163 expression (Fig 6A). Furthermore, mitoquinone decreased the pro-inflammatory markers *TNF*α (-27%), *iNOS* (-74%), *IL-6* (-60%) and *IL-1β* (-57%) in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (Fig 6B). However, this anti-inflammatory effect of mitoquinone was not confirmed in TAA-cirrhotic rats (Supplementary Fig 5).

## DISCUSSION

In chronic liver diseases, increased IHVR is the primary factor contributing to the development of portal hypertension. Activated HSC are the main cells involved in extracellular matrix deposition and increased hepatic vascular tone<sup>32,33</sup>, thereby contributing to increase IHVR. Considering that elevated oxidative stress in cirrhosis is one of the major mechanisms leading to HSC activation and that mitochondria are central sites where ROS are produced<sup>18</sup>, the present study evaluated the effects of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone on oxidative stress (superoxide levels, nitrotyrosine proteins and Hif1a expression), HSC phenotype ( $\alpha$ -SMA, col1 $\alpha$ 1, pdgfr $\beta$  and desmin), liver fibrosis (Sirius red and hydroxyproline), and portal hypertension in pre-clinical models of cirrhosis.

The results of this study clearly show that oral mitoquinone administration decreases liver oxidative stress, deactivates HSC and reduces fibrosis and portal hypertension in cirrhosis.

As previously shown by us and others<sup>7,8,11,12</sup>, liver cirrhosis is associated with increased oxidative stress. Mitoquinone, as it was shown with other antioxidant approaches like tempol<sup>17</sup> and resveratrol<sup>16</sup>, is able to significantly reduce liver oxidative stress. Contrary to previous antioxidant approaches, mitoquinone has the advantage of being orally administrated. Importantly, mitochondrial oxidative stress, which cannot be targeted by traditional antioxidants, results in mitochondrial injury and dysfunction, which may trigger a cascade of deleterious cellular consequences like endothelial and hepatocyte cell death and local inflammation<sup>20</sup>.

Our study confirms that increased oxidative stress observed in cirrhotic livers is generated, at least in part, by the mitochondria either in hepatocytes and HSC. Furthermore, we proved that mitoquinone is able to reduce mitochondrial oxidative stress in all main cirrhotic liver cells. The increased mitochondrial oxidative stress levels in cirrhosis could be, at least in part, due to decreased expression and activity of the mitochondrial isoform of superoxide dismutase that has been described to be decreased in cirrhosis<sup>11</sup>. Importantly, the antioxidant effect of mitoquinone deactivated rat HSC both *in vitro* and *in vivo*, reduced HSC activation markers expression in hPCLS (an *ex vivo* model to study gene regulation in human liver samples), in primary human HSC and in LX2. These effects were evidenced by decreased HSC proliferation but not HSC viability assessed *in vitro* and by desmin expression, a known marker of HSC presence<sup>34,35</sup>.

To further analyze the therapeutic capability of mitoquinone, we evaluated the effects of mitoquinone in two rodent models of cirrhosis: CCl<sub>4</sub> and TAA.

The *in vivo* data showed that mitoquinone reduced portal pressure in two rat models of established cirrhosis and portal hypertension. Mitoquinone did not modify portal blood flow strongly suggesting that reduction in portal pressure was mainly due to decreased IHVR, although no changes were observed in TAA-cirrhotic rats. IHVR results from both hepatic vascular tone and architectural alterations of the liver parenchyma. The results of our study showing a consistent reduction in liver fibrosis by mitoquinone treatment in both models of cirrhosis, suggest that this is the main mechanism by which mitoquinone reduces portal pressure in a model-independent fashion.

As oxidative stress activates HSC leading to increased liver fibrosis<sup>36</sup>, we speculate that mitoquinone exerts its anti-fibrotic effects by reducing oxidative stress, leading to marked HSC deactivation documented in the current study.

The observed reduction in *timp2* by mitoquinone, known inhibitor of *mmps*, suggests that fibrolysis may also play an additional role reducing fibrosis.

Although some improvement was observed in endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine, this was not statistically significant, suggesting that an amelioration of hepatic vascular tone is not playing a major role in reducing portal pressure. However, it could be that a longer treatment period results in improved endothelial function, as this was observed with other antioxidants<sup>15</sup>. Furthermore, as ROS levels are directly linked to inflammation, we analyzed the expression of CD68 and CD163, as markers of liver inflammation. Mitoquinone treatment significantly decreased CD68-positive cells within the liver parenchyma and decreased several pro-inflammatory markers, with no changes in CD163, suggesting that mitoquinone may have also an effect decreasing liver inflammation in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. However, no differences in inflammation were observed in TAA-cirrhotic rats, suggesting that reduction in inflammation may contribute but it is not the main mechanism for liver fibrosis reduction.

Importantly, mitoquinone treatment did not cause any evident deleterious effects in cirrhotic animals. Indeed, no differences in liver enzymes and in mean arterial pressure was observed.

Nevertheless, it is important to highlight that mitoquinone had not the same effect in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats. That could be due to the differences among cirrhosis models. Indeed it has been described that CCl<sub>4</sub>-induced

cirrhosis has more oxidative stress than TAA<sup>37</sup>, making CCl<sub>4</sub> a more susceptible model for antioxidant therapy than TAA.

In conclusion, this study shows for the first time that mitoquinone treatment improves portal hypertension and liver cirrhosis by promoting fibrosis regression, leading to a reduction of portal pressure without worsening systemic hemodynamics, which was probably due to mitoquinone being able to deactivate human and rodent HSC. These results further support the use of mitochondria-targeted antioxidants as a novel therapeutic approach for patients with cirrhosis and portal hypertension.

**Acknowledgements**

Authors are in debt with Drs Garcia-Valdecasas and Fondevila for providing human biopsies, Dr Bataller for providing LX2 cells, Sergi Guixé, Bibiana Rius and Dr Clària for their expertise in hPCLS, Dr Anabel Fernández-Iglesias, Martí Ortega-Ribera and Nicolò Manicardi for providing human HSC, and Sergi Vila and Montse Monclús for excellent technical assistance.

## References

1. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol.* 2010;53:558-567. doi:10.1016/j.jhep.2010.03.021.
2. García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol.* 2012;57(2):458-461. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.007.
3. 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. doi:10.1055/s-2007-1007128.
4. Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol.* 2001;15(10):661-668. doi:10.2169/internalmedicine1962.30.606.
5. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, 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. doi:10.1172/JCI200318212.Introduction.
6. Wu J, Zern M. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 2000;35:665-672. doi:10.1055/s-2001-17558.
7. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int.* 2009;3:526-536. doi:10.1007/s12072-009-9158-6.
8. Rodríguez-Vilarrupla A, Bosch J, García-Pagán JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol.* 2007;46:193-197. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.008.
9. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008;1(1):5. doi:10.1186/1755-1536-1-5.
10. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999;31(4):261-272. doi:10.1080/10715769900300841.

11. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47:1248-1256. doi:10.1002/hep.22166.
12. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol*. 2004;3(3):86-92.
13. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:691-728. doi:10.1089/ars.2006.8.691.
14. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:471-478. doi:10.1016/S0165-6147(03)00233-5.
15. Guillaume M, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4-cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58:240-246. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.010.
16. Di Pascoli M, Divi M, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58(5):904-910.
17. García-Calderó H, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2011;54:660-665. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.034.
18. Murphy MP, Smith RAJ. Drug delivery to mitochondria: The key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41:235-250. doi:10.1016/S0169-409X(99)00069-1.
19. Chacko BK, Srivastava A, Johnson MS, et al. Mitochondria-targeted ubiquinone (MitoQ) decreases ethanol-dependent micro and macro hepatosteatosis. *Hepatology*. 2011;54:153-163. doi:10.1002/hep.24377.



20. Mukhopadhyay P, Horváth B, Zsengeller Z, et al. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemiareperfusion: Therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:1123-1138. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.036.
21. Gane EJ, Weilert F, Orr DW, et al. *The Mitochondria-Targeted Anti-Oxidant Mitoquinone Decreases Liver Damage in a Phase II Study of Hepatitis C Patients.*; 2010. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02250.x.
22. Werner M, Driftmann S, Kleinehr K, et al. All-in-one: Advanced preparation of human parenchymal and non-parenchymal liver cells. *PLoS One*. 2015;10(9):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0138655.
23. Graupera M, García-Pagán J-C, Titos E, et al. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*. 2002;122:387-393. doi:10.1053/gast.2002.31040.
24. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Evidence Against a Role for NADPH Oxidase Modulating Hepatic Vascular Tone in Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007;133:959-966. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.021.
25. La Mura V, Pasarín M, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Liver sinusoidal endothelial dysfunction after LPS administration: A role for inducible-nitric oxide synthase. *J Hepatol*. 2014;61(6):1321-1327. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.014.
26. Graupera M, García-Pagán JC, Parés M, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2003;39:515-521. doi:10.1016/S0168-8278(03)00347-7.
27. Rodríguez-Vilarrupla A, Laviña B, García-Calderó H, et al. PPAR $\alpha$  activation improves endothelial dysfunction and reduces fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2012;56:1033-1039. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.008.
28. Cerini F, Vilaseca M, Lafoz E, et al. Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*.

- 2016;ajpgi.00010.2015. doi:10.1152/ajpgi.00010.2015.
29. Gracia-Sancho J, Russo L, García-Calderó H, et al. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut*. 2011;60(4):517-524. doi:10.1136/gut.2010.220913.
  30. Olinga P, Schuppan D. Precision-cut liver slices: A tool to model the liver ex vivo. *J Hepatol*. 2013;58(6):1252-1253. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.009.
  31. Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005;54:142-151. doi:10.1136/gut.2004.042127.
  32. Gaça MDA, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol*. 2002;36(3):362-369.
  33. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-172. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
  34. Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, et al. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology*. 1984;4(4):709-714. doi:S0270913984001051 [pii].
  35. Geerts A, Eliasson C, Niki T, et al. Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology*. 2001;33(1):177-188. doi:10.1053/jhep.2001.21045.
  36. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-218. doi:10.1172/JCI24282.
  37. Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, et al. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(6):947-957. doi:JGH [pii]r10.1111/j.1440-1746.2006.04231.x.

## Figure Legends

### Figure 1. Increased mitochondrial oxidative stress in cirrhosis.

Mitochondrial superoxide content measured in control and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers (A) and in liver cells isolated from control and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats: Hepatocytes (B), hepatic stellate cells (HSC) (C), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (D) and Kupffer cells (KC) (E). N=3 different isolation \**p* <0.05 vs. control.

### Figure 2. Mitoquinone decreases mitochondrial oxidative stress in cirrhotic liver cells.

Mitochondrial superoxide content measured in cirrhotic liver cells treated *in vitro* for 24 hours with vehicle (Veh; n=3) or mitoquinone (MIT; 1 and 3nM; n=3 different isolation): hepatocytes (A), hepatic stellate cells (HSC) (B), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (C) and Kupffer cells (KC) (D). \**p* <0.05 vs. vehicle.

**Figure 3. Mitoquinone inactivates both human and rat HSC.** *In vitro*, dose-dependent inactivation of hHSC caused by mitoquinone (1, 3 and 10 nM; 24h), assessed in hPCLS (n=3 different donors) (A), LX2 (N=3-5 replicates) (B) and primary hHSC activated *in vitro* (n=3 different donors) (C). Analysis of HSC phenotype in cells isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (rHSC) treated *in vitro* with mitoquinone or vehicle (n=3 per group) (D). Values represent mean ± SEM. \**p* <0.05 vs. vehicle.

### Figure 4. Mitoquinone reduces oxidative stress in cirrhotic rat livers.

Mitochondrial superoxide (A) and cellular superoxide content measured (B) in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats. Nitrotyrosinated protein levels measured in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (C). Expression of the surrogate marker for oxidative stress *hif1α* in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (D). Values represent mean ± SEM. \**p* <0.05 vs. vehicle. (n=9 per group in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; n=12-13 in TAA-cirrhotic rats).

**Figure 5. Mitoquinone promotes regression of hepatic fibrosis and HSC deactivation in cirrhotic rats.** Representative images and liver fibrosis quantification by Sirius Red in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats **(A)**, hydroxyproline content from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats **(B)**. Expression of the HSC phenotype markers  $\alpha$ -SMA, *col1 $\alpha$ 1* and *pdgfr $\beta$*  in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats **(C)**. and in HSC isolated from vehicle and mitoquinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (n=3 per group) **(D)**.  $\alpha$ -SMA protein expression in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats **(E)**. Desmin protein expression evaluated by immunohistochemistry and Western blot in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats **(F)**. Values represent mean  $\pm$  SEM. \**p* < 0.05 vs. vehicle. #*p* < 0.1 vs. vehicle (n=9 per group in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; n=12-13 in TAA-cirrhotic rats).

**Figure 6. Mitoquinone reduces liver inflammation.** Immunostaining CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers for CD68 and CD163 **(A)**. expression of pro-inflammatory markers *TNF $\alpha$* , *iNOS*, *IL-6* and *IL-1 $\beta$*  in livers described in A **(B)**. Values represent mean  $\pm$  SEM. \**p* < 0.05 vs. vehicle (n=9 per group).

Figure 1

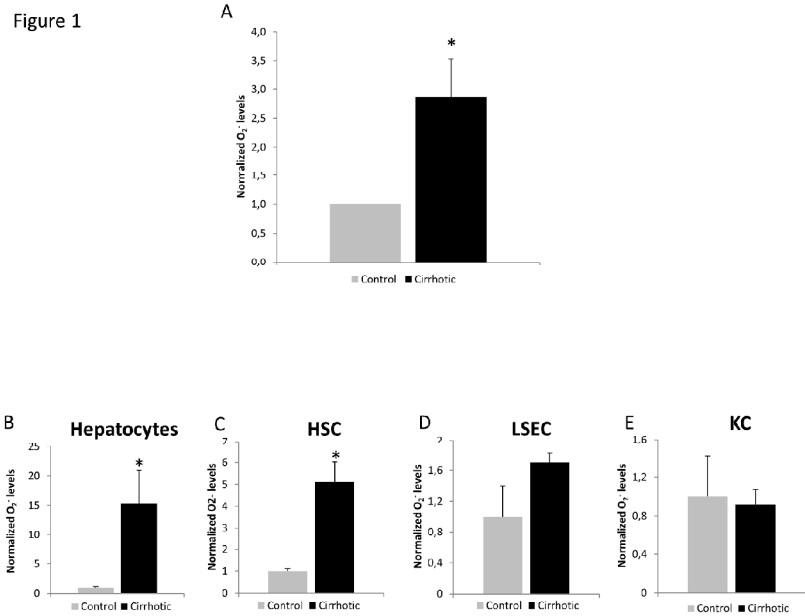


Figure 1. Increased mitochondrial oxidative stress in cirrhosis. Mitochondrial superoxide content measured in control and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers (A) and in liver cells isolated from control and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats: Hepatocytes (B), hepatic stellate cells (HSC) (C), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (D) and Kupffer cells (KC) (E). N=3 different isolation \*p < 0.05 vs. control.

254x190mm (300 x 300 DPI)

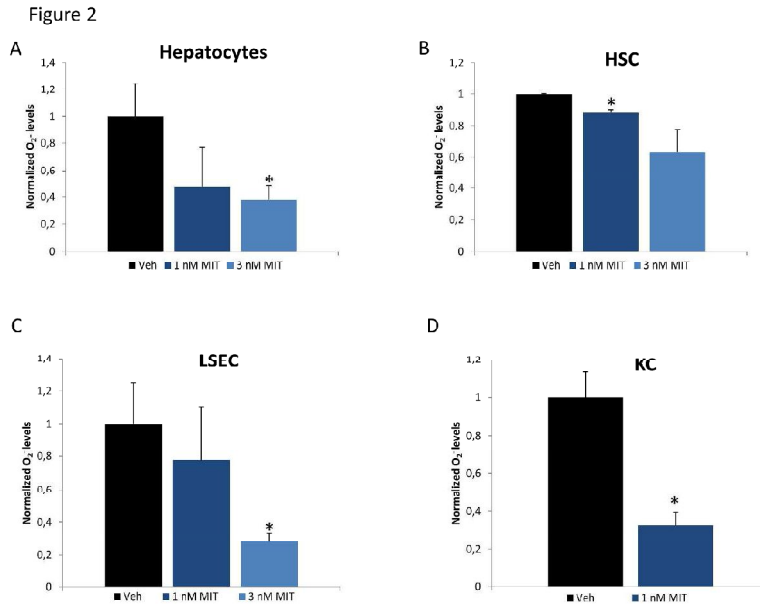


Figure 2. Mitoquinone decreases mitochondrial oxidative stress in cirrhotic liver cells. Mitochondrial superoxide content measured in cirrhotic liver cells treated in vitro for 24 hours with vehicle (Veh;  $n=3$ ) or mitoquinone (MIT; 1 and 3nM;  $n=3$  different isolation): hepatocytes (A), hepatic stellate cells (HSC) (B), liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (C) and Kupffer cells (KC) (D). \* $p < 0.05$  vs. vehicle.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Figure 3

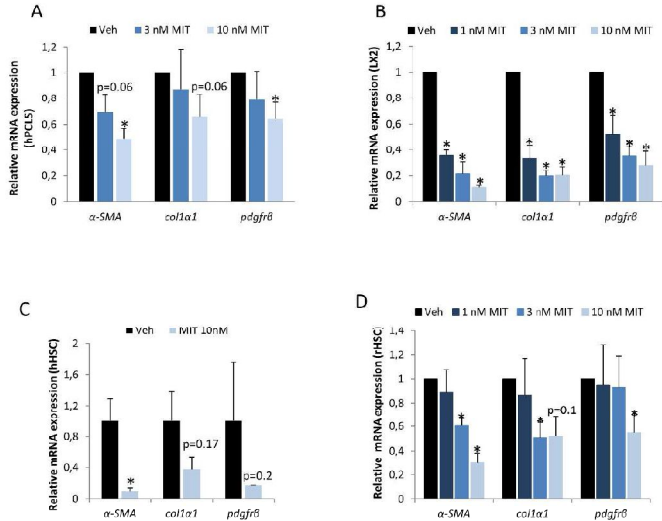


Figure 3. Mitroquinone inactivates both human and rat HSC. In vitro, dose-dependent inactivation of hHSC caused by mitroquinone (1, 3 and 10 nM; 24h), assessed in hPCLS (n=3 different donors) (A), LX2 (N=3-5 replicates) (B) and primary hHSC activated in vitro (n=3 different donors) (C). Analysis of HSC phenotype in cells isolated from CCl4-cirrhotic rats (rHSC) treated in vitro with mitroquinone or vehicle (n=3 per group) (D). Values represent mean  $\pm$  SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle.

254x190mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

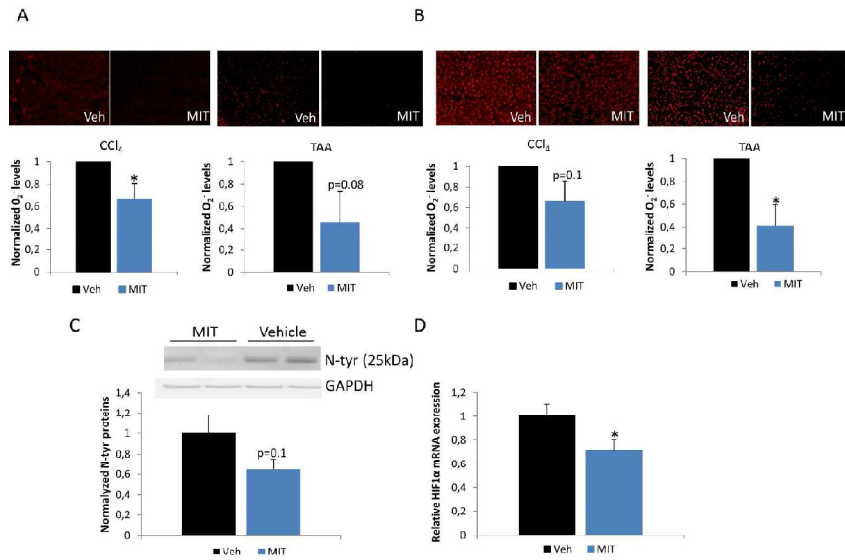


Figure 4. Mitoquinone reduces oxidative stress in cirrhotic rat livers. Mitochondrial superoxide (A) and cellular superoxide content measured (B) in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats. Nitrotyrosinated protein levels measured in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (C). Expression of the surrogate marker for oxidative stress hif1α in livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (D). Values represent mean ± SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle. (n=9 per group in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; n=12-13 in TAA-cirrhotic rats).

254x190mm (300 x 300 DPI)



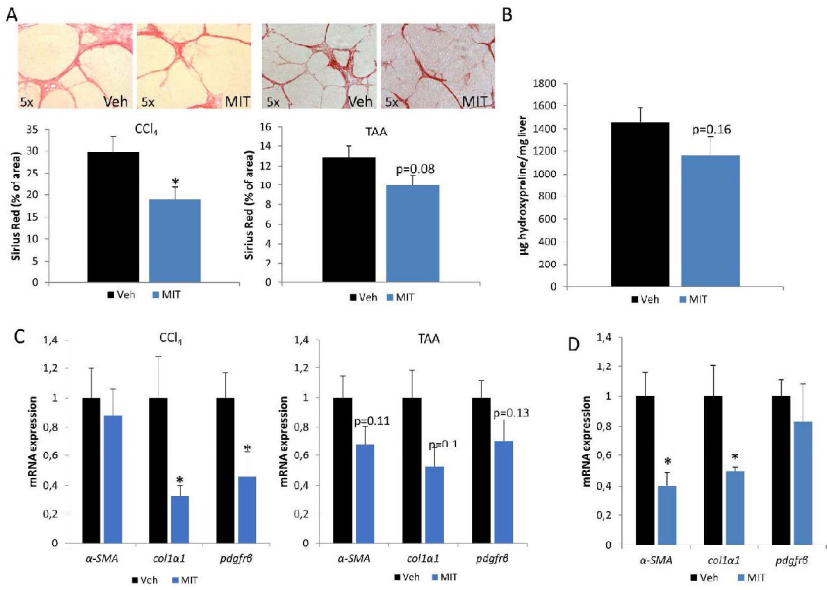


Figure 5

Figure 5. Mitochondrial quinone promotes regression of hepatic fibrosis and HSC deactivation in cirrhotic rats. Representative images and liver fibrosis quantification by Sirius Red in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats (A), hydroxyproline content from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (B). Expression of the HSC phenotype markers  $\alpha$ -SMA, col1a1 and pdgfr $\beta$  in CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats (C), and in HSC isolated from vehicle and mitochondrial quinone-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (n=3 per group) (D).

254x190mm (300 x 300 DPI)

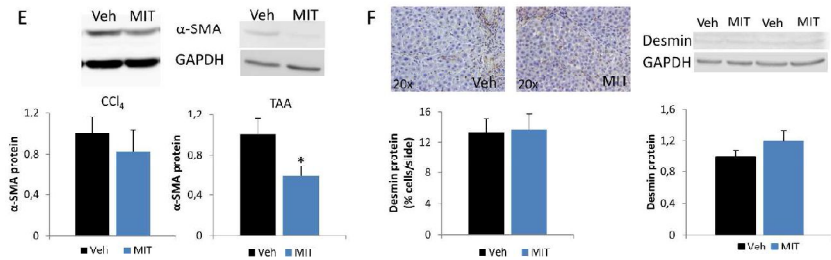


Figure 5

Figure 5. Mitoquinone promotes regression of hepatic fibrosis and HSC deactivation in cirrhotic rats.  $\alpha$ -SMA protein expression in livers from CCl<sub>4</sub> and TAA-cirrhotic rats (E). Desmin protein expression evaluated by immunohistochemistry and Western blot in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (F). Values represent mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. vehicle. # $p < 0.1$  vs. vehicle (n=9 per group in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats; n=12-13 in TAA-cirrhotic rats).

254x190mm (300 x 300 DPI)

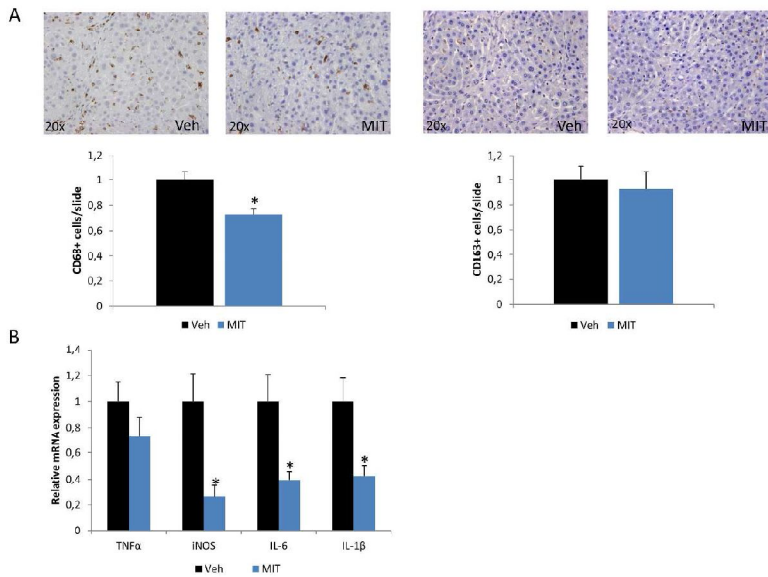


Figure 6

Figure 6. Mitoquinone reduces liver inflammation. Immunostaining CCl4-cirrhotic livers for CD68 and CD163 (A). expression of pro-inflammatory markers TNF $\alpha$ , iNOS, IL-6 and IL-1 $\beta$  in livers described in A (B). Values represent mean  $\pm$  SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle (n=9 per group).

254x190mm (300 x 300 DPI)

**Tables****Table 1**

	DecylTPP n=9	Mitoquinone n=9	p value
MAP (mmHg)	95 ± 13	104 ± 30	.42
HR (bpm)	339 ± 36	343 ± 50	.72
PP (mm Hg)	13.6 ± 2.9	10.8 ± 1.7	.03
PBF (ml/min)	11.2 ± 1.9	10.1 ± 2.1	.59
IHVR (mmHg·g·min·ml <sup>-1</sup> )	15.6 ± 5.6	10.3 ± 4	.04
AST (U/L)	153 ± 26	121 ± 12	.28
ALT (U/L)	76 ± 10	74 ± 9	.86
Albumin (g/L)	29.2 ± 0.8	28.5 ± 1.2	.66
Direct bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.04	0.03 ± 0.01	.17
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.05	0.03 ± 0.01	.18

**Table 1. Effects of mitoquinone on hepatic and systemic hemodynamic, and biochemical parameters in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats.** MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; IHVR, intrahepatic vascular resistance; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean ± Standard Deviation.

**Table 2**

	DecylTPP n=12	Mitoquinone n=13	p value
MAP (mmHg)	123 ± 22	113 ± 15	.22
HR (bpm)	410 ± 46	388 ± 60	.32
PP (mm Hg)	14.2 ± 3.0	12.2 ± 2.4	.06
PBF (ml/min)	17.8 ± 4.6	18.6 ± 8.1	.78
IHVR (mmHg·g·min·ml <sup>-1</sup> )	13.2 ± 5.2	12.0 ± 4.9	.64
Clearance ICG (%/min)	16.2 ± 0.1	21.7 ± 0.3	.23
AST (U/L)	93 ± 47	91 ± 28	.87
ALT (U/L)	37 ± 10	43 ± 15	.25
Albumin (g/L)	28 ± 3	26 ± 4	.16
Direct bilirubin (mg/dl)	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.04	.23
Total bilirubin (mg/dl)	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.04	.1

**Table 2. Effects of mitoquinone on hepatic and systemic hemodynamic, and biochemical parameters in TAA-cirrhotic rats.** MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow; IHVR, intrahepatic vascular resistance; ICG, Indocyanine Green; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Values represent mean ± Standard Deviation.

## **Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

**Marina Vilaseca**, Héctor García-Calderó, Erica Lafoz, Maria Ruart, Cristina Isabel López-Sanjurjo, Michael. P. Murphy, Ramon Deulofeu, Jaume Bosch, Virginia Hernández-Gea, Jordi Gracia-Sancho, Juan Carlos García-Pagán

### **Table of contents:**

- 1. Supplementary material and methods**
- 2. Supplementary table**
- 3. Supplementary figures**
- 4. Supplementary references**

- 1. Supplementary methods**

### ***Ex vivo*: Preparation and treatment of human precision cut liver slices (hPCLS)**

Human tissues were prepared with a surgical biopsy punch, washed in PBS, soaked in 4% agarose solution (Ultrapure LMP Agarose, Invitrogen) for 20 min, and then orientated, mounted and immobilised using cyanoacrylate glue. Finally, tissues were sectioned to 250 µm slices using a Vibratome VT1000S (Leica Microsystems). Tissue slices were placed on organotypic tissue culture plate inserts for up to 24 h (Millicel®-CM, Millipore). Liver slices were incubated in William's E Medium (Gibco, Paisley) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine in 6-well plates at 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 80% O<sub>2</sub>. Duplicate wells were used per donor with 3 liver slices per well. After 1 hour the medium was replaced with fresh William's E Medium in the presence (3 nM and 10 nM) or absence (Veh) of mitoquinone for 24h. hPCLS were lysed for mRNA expression analysis.

***In vitro*: Rat liver cell isolation**

Liver cell suspensions were obtained by digesting liver tissue using collagenase. Two protocols were performed. To obtain hepatocytes, LSEC, KC and HSC the “All-in-one” protocol was performed<sup>1</sup>. Briefly, hepatocytes were pelleted by low-speed centrifugation. Supernatant containing LSEC, KC and HSC were collected, pelleted and used for density gradient centrifugation. In other set of animals, Hepatic Stellate Cells (HSC) were isolated from livers and grown as previously described<sup>3</sup>. Highly pure and viable cells were used.

Primary HSC (rHSC) from mitoquinone and vehicle-treated cirrhotic rats were isolated and cultured as described above. Moreover, in another set of experiments, cirrhotic HSC were incubated *in vitro* with mitoquinone (1, 3 and 10 nM) or PBS (Veh) in subconfluent cultures of HSC for 24 hours.

rHSC viability was assessed using acridine orange as previously described<sup>3</sup>. Briefly, rHSC were incubated with 800 ng/ml acridine orange for 10 min at 37°C. Plates were washed twice with PBS and complete Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium (IMDM) without phenol red was added. Cells were observed with a fluorescent microscope (Olympus). Four fields were randomly selected per well and photos of visible light and green light (488 nm emission) were taken at 200x magnification. Images were merged using ImageJ 1.33 software (National Institutes of Health).

**Hepatocyte, LSEC and KC culture**

Hepatocytes were grown in DMEM F12 (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1uM dexamethasone, 0.02% insulin and 1% amphotericin. LSEC were grown in RPMI medium (Reactiva) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1%

penicillin/streptomycin, 0.1 mg/ml heparin, 0.05mg/ml ECGS and 1% amphotericin. KC were grown in RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin.

### **Human hepatic stellate cells (HSC) treatments and characterization**

a) LX2 cells were seeded onto 12-well plates at a density of 20.000 cells per well in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin, and 1% streptomycin and cultured overnight. LX2 were treated *in vitro* with mitoquinone (1, 3 and 10 nM) or PBS (Veh) to subconfluent cultures for 24 hours.

b) Human primary HSC (hHSC) were isolated from the above mentioned histological normal human liver biopsies, as previously described<sup>4</sup>. Cells were isolated and cultured as described above. hHSC were cultured until passage 3 in IMDM for *in vitro* activation. Mitoquinone (10nM) or PBS (Veh) was added for 24h.

Cell phenotype was determined by mRNA analysis. Cell viability was analysed using trypan blue staining, and proliferation calculated as the ration between initial/final cells<sup>3</sup>

Results from LX2 cells were derived from n=3-5 independent experiments. Results using primary HSC were derived from triplicates from three independent isolations.

### **Mitochondrial superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) content in isolated liver cells**

Mitochondrial superoxide content was analyzed from control and cirrhotic rats treated *in vitro* with mitoquinone (1, 3 and 10 nM) or vehicle for 24h, using the MitoSOX<sup>TM</sup> (Life Technologies) red superoxide mitochondrial indicator, which is oxidized using superoxide and which exhibits red fluorescence in the mitochondria. Six fields from each cell type at 20x were randomly selected. Nuclei were observed with NucBlue<sup>TM</sup>



Live Cell Stain ReadyProbes™ reagent (Life Technologies). Fluorescent images were obtained with a fluorescent microscope (Olympus) and quantitative analysis corrected by number of nuclei (at least 300 nuclei per cell type) was performed with Image J 1.33 software (National Institutes of Health)<sup>5</sup>. For positive control of Mitosox staining we used a known recombinant isoform of human manganese superoxide dismutase (rMnSOD)<sup>6</sup>.

### **Indocyanine green (ICG) clearance**

In a subgroup of TAA-cirrhotic rats (n=7 per group), after the *in vivo* hemodynamic measurements, ICG (0.5 mg/kg) was injected through the femoral vein. Arterial blood samples (0.3ml) were taken at baseline and 2, 4 and 15 min after the injection and centrifuged at 10,000g for 10 min. ICG absorbance was determined spectrophotometrically at a wavelength of 805 nm. Measured ICG absorbance was converted into the corresponding plasma concentration using a standard curve. ICG plasma disappearance rate was defined as the percentage decrease in ICG-plasma concentration per minute (%/min)<sup>7</sup>.

### **Cellular and mitochondrial superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) content in liver tissue**

*In situ* O<sub>2</sub><sup>-</sup> cellular levels were evaluated in fresh cryosections (10 μm) obtained from cirrhotic rats treated with mitoquinone (n=3) or vehicle (n=3) using the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Molecular Probes). Mitochondrial superoxide content was evaluated in control (n=2) and cirrhotic rats treated with mitoquinone (n=3) or vehicle (n=3) using mitosox (Life Technologies). Six fields from each slide at 20x were randomly selected. Fluorescent images were obtained with a fluorescent

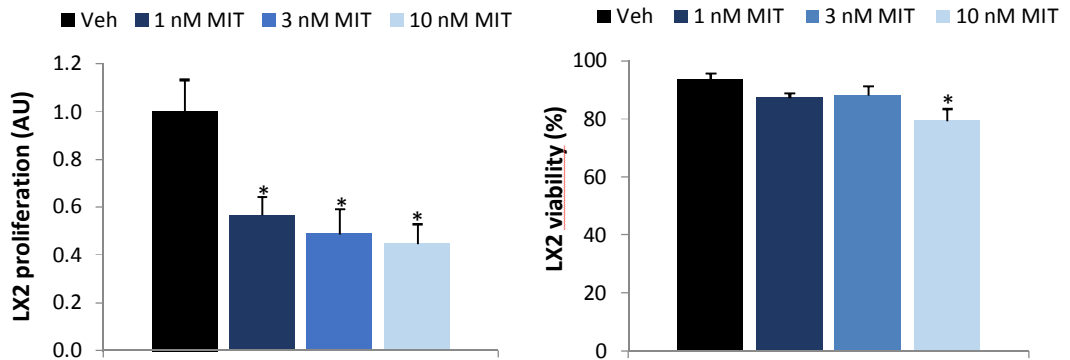
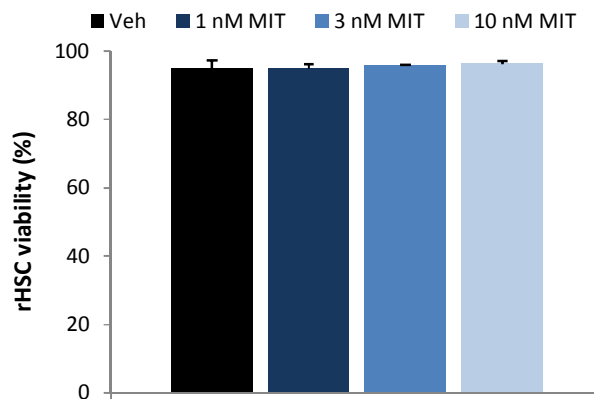
microscope (Olympus) and quantitative analysis was performed with Image J 1.33 software (National Institutes of Health)<sup>8</sup>.

## 2. Supplementary table:

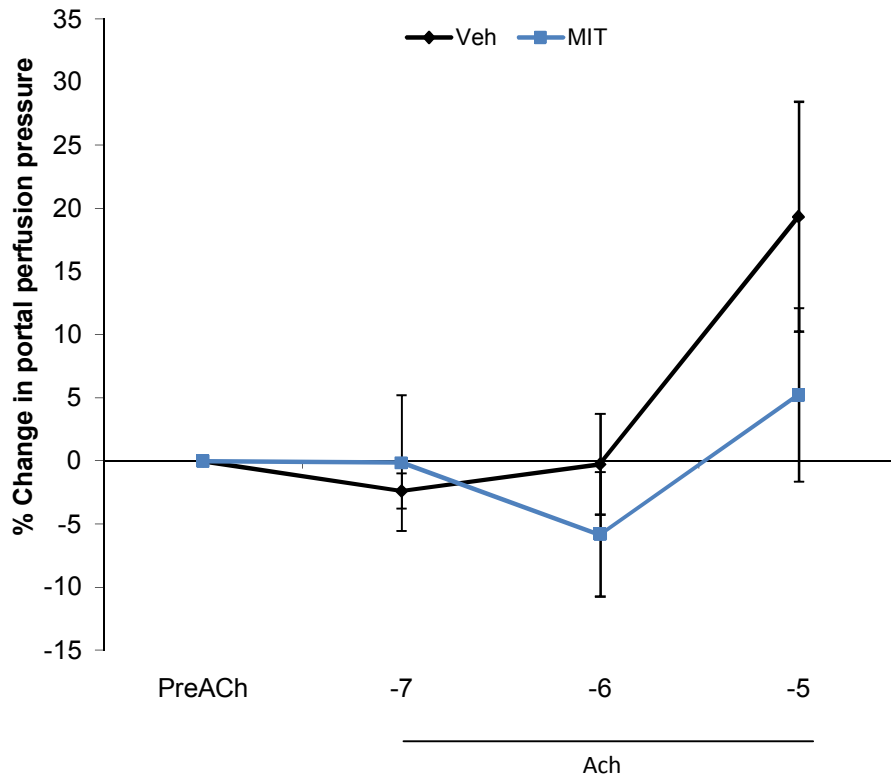
<b>RAT</b>	<b>Reference</b>	<b>Gene</b>
	Rn01759928_g1	$\alpha$ -SMA
	Rn01463848_m1	Col1 $\alpha$ 1
	Rn01775763_g1	GAPDH
	Rn04339144_m1	HiF1 $\alpha$
	Rn00580432_m1	IL-1 $\beta$
	Rn01410330_m1	IL-6
	Rn00561646_m1	iNOS
	Rn01538170_m1	Mmp2
	Rn00579162_m1	Mmp9
	Rn01448194_m1	Mmp13
	Rn01491838_m1	Pdgfr $\beta$
	Rn00587558_m1	Timp1
	Rn00573232_m1	Timp2
	Rn01525859_g1	Tnfa
<b>HUMAN</b>		
	Hs99999901_s1	18S
	Hs00426835_g1	$\alpha$ -SMA
	Hs00164004_m1	Col1 $\alpha$ 1
	Hs01019589_m1	Pdgfr $\beta$

**Supplementary Table 1:** All primers used in rat and human cell and tissues with their references. All obtained from Applied Biosystems.

### 3. Supplementary figures

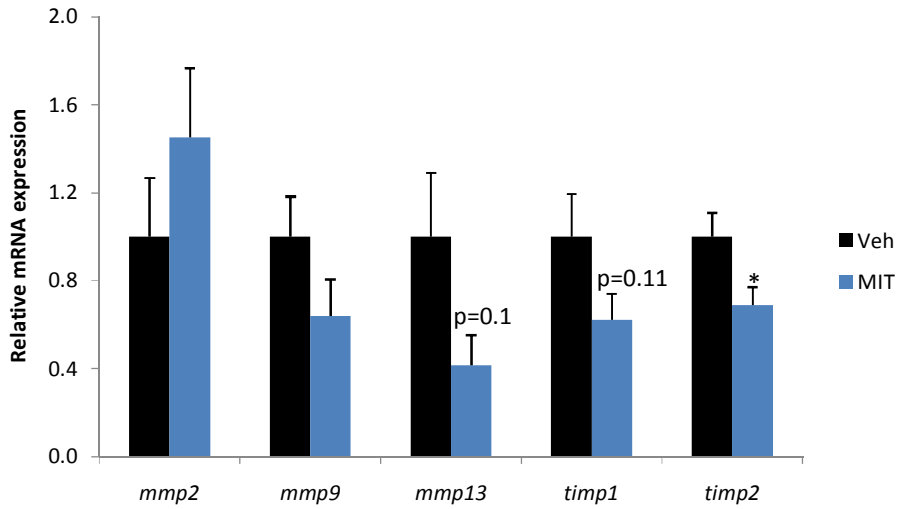
**A****B**

**Supplementary Figure 1. Mitoquinone decreases HSC proliferation without affecting cell viability.** *In vitro*, dose-dependent cell proliferation and viability caused by mitoquinone in LX2 (A) and HSC freshly isolated from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (rHSC) treated *in vitro* with mitoquinone or vehicle (B). \* $p < 0.05$  vs. vehicle.

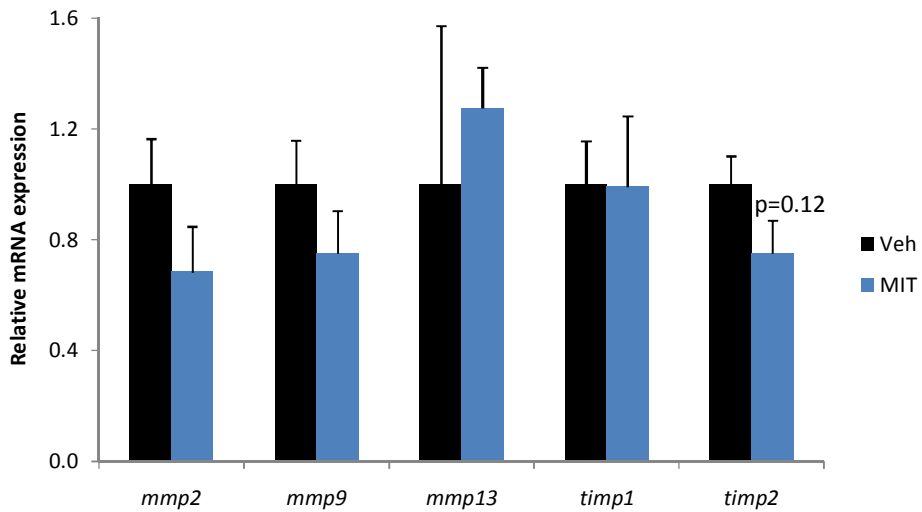


**Supplementary Figure 2: Mitoquinone does not change endothelium-dependent relaxation.** Endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine (Ach) in isolated and perfused livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats in animals treated with mitoquinone or vehicle during 2 weeks (n=9 per group). Results are expressed as the percentage of PP in response to Ach and presented as mean±S.E.M.

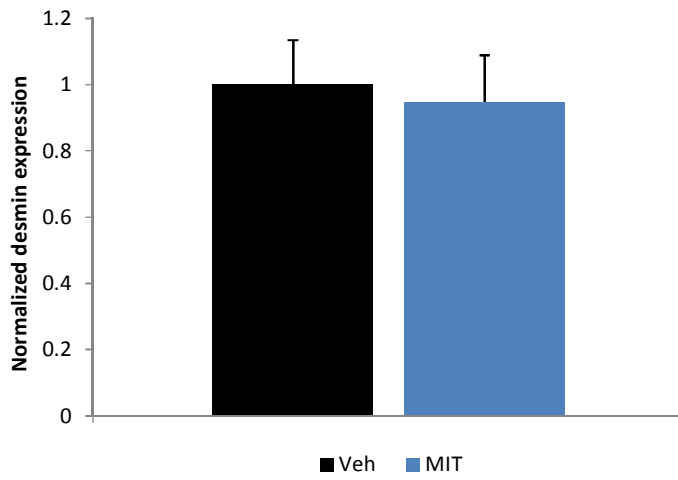
A



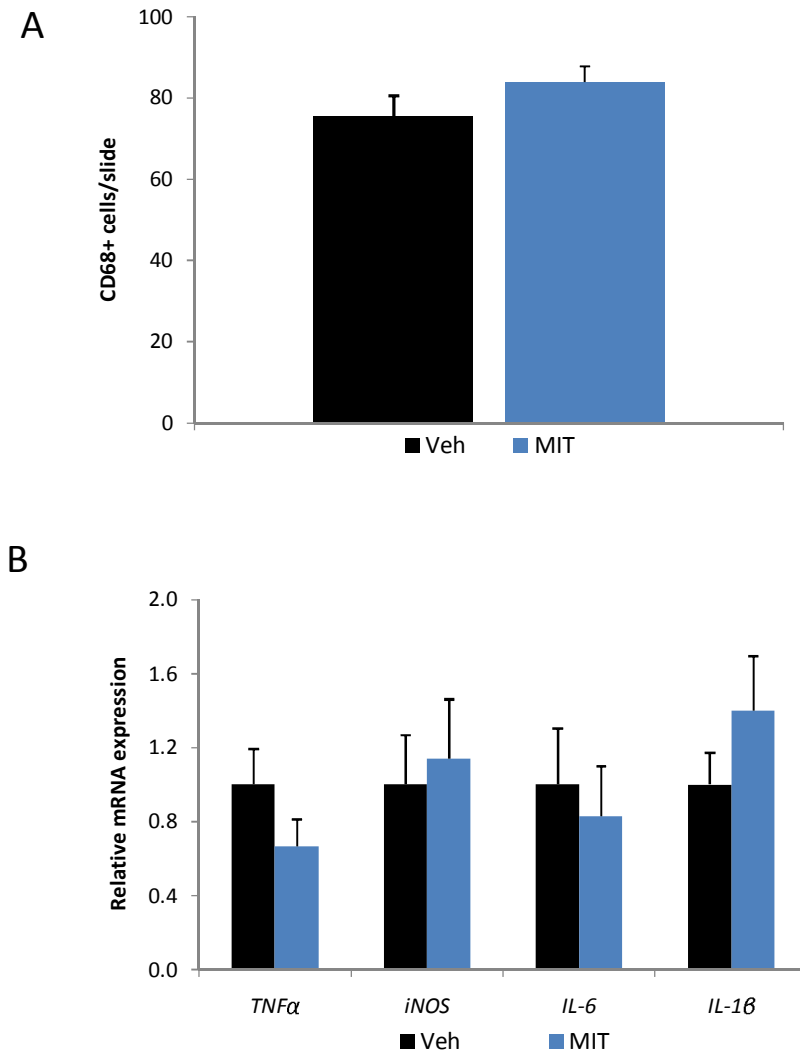
B



**Supplementary Figure 3: Mitoquinone effect on mmps and timps mRNA expression in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats (A) and TAA-cirrhotic rats (B) treated with vehicle or mitoquinone. \**p*<0.05 vs.vehicle.**



**Supplementary Figure 4: Mitoquinone does not change the number of desmin-positive cells in TAA-cirrhotic rats.** Immunofluorescence staining of desmin expression in vehicle and mitoquinone-treated TAA-cirrhotic livers.



**Supplementary Figure 5: Mitoquinone does not change inflammatory profile in TAA-cirrhotic rats.** Immunostaining of vehicle and mitoquinone-treated TAA-cirrhotic livers for CD68 (A) mRNA expression of pro-inflammatory markers *TNFα*, *iNOS*, *IL-6* and *IL-1β* in livers described in A (B).

#### 4. Supplementary references

1. Werner M, Driftmann S, Kleinehr K, et al. All-in-one: Advanced preparation of human parenchymal and non-parenchymal liver cells. *PLoS One*. 2015;10(9):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0138655.
2. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Bosch J, García-Pagán JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2007;47(2):220-227. doi:10.1016/j.jhep.2007.03.014.
3. Marrone G, Maeso-Diaz R, Garcia-Cardena G, et al. KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut*. 2014;1-10. doi:10.1136/gutjnl-2014-308338.
4. Graupera M, March S, Engel P, Rodés J, Bosch J, García-Pagán J-C. 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. doi:10.1152/ajpgi.00300.2004.
5. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Evidence against a role for NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007;133(3):959-966. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.021.
6. Guillaume M, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4-cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58(2):240-246. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.010.
7. La Mura V, Pasarín M, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Liver sinusoidal endothelial dysfunction after LPS administration: A role for inducible-nitric oxide synthase. *J Hepatol*. 2014;61(6):1321-1327. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.014.
8. Cerini F, Vilaseca M, Lafoz E, et al. Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2016;ajpgi.00010.2015. doi:10.1152/ajpgi.00010.2015.





## RESUM DE RESULTATS

---



## RESUM DE RESULTATS

---

### **Estudi 1: Enoxaparín reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

- El tractament agut amb enoxaparina no afecta els paràmetres sistèmics ni hemodinàmics avaluats. Tampoc modifica els nivells de GMPc o el contingut d'estrès oxidatiu hepàtic.
- El tractament de curt termini (1 setmana) amb enoxaparina disminueix de manera significativa la pressió portal de rates cirròtiques per CCl<sub>4</sub> sense modificar el flux venós portal. També va reduir de manera significativa els nivells d'estrès oxidatiu, i va augmentar la biodisponibilitat de NO. A més a més, el tractament amb enoxaparina va reduir un 26% l'àrea de fibrosi. Aquests canvis es van associar a una millora en el fenotip de les CHE. També es va observar una millora en la microtrombosi hepàtica.
- El tractament de llarg termini (3 setmanes) amb enoxaparina disminueix de manera significativa la pressió portal de rates cirròtiques per CCl<sub>4</sub> i tioacetamida (TAA) sense canvis en els altres paràmetres hemodinàmics. En aquest cas també hi havia reducció d'estrès oxidatiu, però sense millora en la biodisponibilitat de NO. El tractament amb enoxaparina va reduir un 25% l'àrea de fibrosi, canvis que també es van associar a una millora en el fenotip de les CHE. El tractament amb l'anticoagulant també va millorar la microtrombosi hepàtica, amb una marcada disminució del contingut de fibrina.

- Els efectes beneficiosos del tractament amb enoxaparina també es van observar en el model de prevenció en rates cirròtiques per TAA. La pressió portal va ser menor en les rates tractades amb enoxaparina al mateix temps que el tòxic (TAA). Tot i que els canvis no van ser tan marcats com en el model de regressió, també es va veure una reducció en l'àrea de fibrosi, una millora en el fenotip de les CHE i una menor microtrombosi hepàtica.

**Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells.**

- El tractament amb rivaroxaban va disminuir la pressió portal en dos models de cirrosi (CCl<sub>4</sub> i TAA). La disminució de la pressió portal no va ser associada a canvis ni en el flux sanguini portal ni a canvis en la pressió arterial mitjana, suggerint una disminució de la resistència vascular intrahepàtica. Aquest fet es va confirmar *ex vivo*, on es va observar una disminució del 35% la resistència vascular intrahepàtica en rates tractades amb rivaroxaban en un sistema de perfusió amb el flux controlat.
- El tractament durant dues setmanes amb l'anticoagulant oral directe rivaroxaban va disminuir els nivells d'estrès oxidatiu. També es va observar una disminució del nombre de cèl·lules de Kupffer, una de les principals cèl·lules implicades en la producció d'estrès oxidatiu. Conseqüentment, la biodisponibilitat de NO es va veure millorada, ja que es va observar un augment del 33% dels nivells del marcador de biodisponibilitat de NO, GMPc.
- Les rates tractades amb rivaroxaban van tenir una millor resposta, tot i que no significativa, al vasodilatador acetilcolina. Per confirmar l'efecte beneficiós de rivaroxaban sobre l'endoteli sinusoidal hepàtic, es va avaluar el fenotip de les

cèl·lules endotelials sinusoïdals. Es va observar una disminució de l'expressió del factor vW i també una menor presència de membrana basal analitzat per microscopia electrònica.

- El tractament amb rivaroxaban va disminuir l'activació i el nombre de CHE. Es va avaluar el nombre de CHE mitjançant el marcador desmina i es va observar una menor nombre de CHE en les rates tractades amb rivaroxaban. També es va veure que diferents marcadors d'activació de les CHE, com ara l' $\alpha$ -sma, col1 $\alpha$ 1 i pdgfr $\beta$ , i marcadors de contracció cel·lular, com RhoA i moesina fosforilada, estaven disminuïts en les rates tractades amb rivaroxaban. Aquests resultats es va observar tant a nivell de teixit com de cèl·lula aïllada. No hi van haver canvis en el l'apoptosi de les CHE suggerint que el menor nombre de CHE observades a les rates tractades amb rivaroxaban vindria d'una menor proliferació i no d'un augment en l'apoptosi de les CHE.
- Es van estudiar els efectes directes de Rivaroxaban sobre les CHE i no es van observar canvis en els nivells d'activació. Suggestint que els efectes beneficiosos del tractament amb rivaroxaban sobre la millora del fenotip de les CHE és mitjançant la inhibició de la cascada de coagulació i inhibint l'activació dels receptors PAR.
- El tractament amb rivaroxaban va disminuir els nivells de microtrombosi observats en les rates cirròtiques avaluat pel contingut de fibrina als sinusoides hepàtics.

### **Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

- Es descriu un augment de l'estrès oxidatiu mitocondrial en el fetge de rata amb cirrosi d'un 300%.
- Les principals cèl·lules productores de l'estrès oxidatiu mitocondrial són els hepatòcits i les cèl·lules hepàtiques estrellades.
- El tractament amb mitoquinona *in vitro* és capaç de millorar el fenotip de tots els tipus cel·lulars hepàtics de rates cirròtiques.
- El tractament *in vitro* amb mitoquinona és capaç de desactivar les CHE tant de rata com humanes en 24 hores. Els efectes es van confirmar en cèl·lules aïllades, en talls ultrafins de biòpsies humanes i en línies cel·lulars.
- El tractament oral durant dues setmanes amb mitoquinona va produir un descens significatiu dels nivells d'estrès oxidatiu, a nivell mitocondrial i a tota la cèl·lula, en rates cirròtiques obtingudes per dos models de cirrosi diferents: CCl<sub>4</sub> i TAA. A més a més, es va veure una disminució en el contingut de proteïnes nitrotirosinades i en l'expressió gènica d'un dels factors induïts per l'estrès oxidatiu, *hif1α*.
- Les rates tractades amb mitoquinona durant dues setmanes van mostrar una pressió portal significativament inferior a les rates tractades amb vehicle. Aquesta disminució es va observar tant en el grup de rates cirròtiques per CCl<sub>4</sub>, com per TAA, i no va estar associada a canvis en el flux sanguini portal, suggerint que la disminució en la pressió portal venia principalment per una reducció de la resistència vascular intrahepàtica.

- Les rates tractades amb mitoquinona van obtenir una disminució significativa de la fibrosi hepàtica, avaluat per Sirius Red, i una disminució dels nivells d'activació de les CHE, avaluant diferents marcadors d'activació.
- El tractament amb mitoquinona va disminuir l'activació de les CHE *in vivo* tant en el model cirròtic per CCl<sub>4</sub> com en el model de TAA. Hi va haver una disminució significativa en la majoria dels marcadors d'activació, tant a nivell de teixit total com en els aïllaments de CHE.
- Finalment, es va observar que el tractament amb mitoquinona disminuïa la inflamació hepàtica ja que es va observar un menor nombre de cèl·lules inflamatòries i una menor expressió de citokines inflamatòries en les rates tractades amb mitoquinona.





## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---



## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

Una de les principals complicacions que presenten els pacients cirròtics és la hipertensió portal, la qual està estretament relacionada amb la presència d'hemorràgies per varius gastroesofàgiques, ascites, encefalopatia i insuficiència renal<sup>2</sup>.

El factor principal que indueix a la hipertensió portal és l'augment de la resistència vascular intrahepàtica. Aquest augment ve donat per dos diferents components: el component estructural, definit com la presència de distorsions estructurals de l'arquitectura parenquimal del fetge causada principalment per l'acumulació de teixit fibròtic, i el component dinàmic que ve causat per la contracció de les cèl·lules hepàtiques estrellades i del resultat del desequilibri entre les forces vasoconstrictores i vasodilatadores intrahepàtiques, com ara el NO<sup>3</sup>.

Tot i això, també s'ha descrit que en la cirrosi apareix una obstrucció per trombosi de les petites venes portals i hepàtiques adjacents. Aquest fet pot afavorir tant l'apoptosi com a l'atròfia del parènquima hepàtic<sup>8</sup>.

La distorsió del parènquima hepàtic durant la cirrosi hepàtica és, en part, deguda a l'augment de la síntesi de components de la matriu extracel·lular secretats per les CHE activades<sup>64</sup>. Diversos mecanismes fisiopatològics estan implicats en l'activació de les CHE, com ara les espècies reactives d'oxigen<sup>119,120</sup> i els factors de coagulació II i Xa via receptors PAR, que juguen un paper principal activant les CHE, resultant en un augment de la síntesi de col·lagen i de la seva acumulació en el fetge.

Conseqüentment, els treballs d'investigació de la present tesis doctoral pretenen avaluar l'ús de noves teràpies per disminuir la resistència vascular intrahepàtica

emprant anticoagulants (tant heparines de baix pes molecular com inhibidors directes de factor Xa) i un antioxidant dirigit a mitocondria.

Els resultats del **primer i segon estudi** aporten noves i important dades fins ara no conegudes sobre el potencial ús dels anticoagulants per al tractament de la hipertensió portal en la cirrosi. Tal i com ja s'ha dit en aquesta tesi, els pacients cirròtics tenen un estat procoagulant amb un augment dels nivells de trombina i de factor Xa. A més, tant la trombina com el factor Xa, factors de la cascada de coagulació, són potents activadors de les CHE. En aquest estudi corroborem els beneficis que aporta l'ús d'heparines de baix pes molecular com l'enoxaparina i l'inhibidor directe de factor Xa, rivaroxaban, tant en la disminució de la microtrombosi intrahepàtica, com en la desactivació de les cèl·lules hepàtiques estrellades donant lloc a una disminució en la fibrosi hepàtica i, per tant, de la pressió portal en rates cirròtiques.

Molts estudis han estudiat la història natural de la malaltia hepàtica i es suggeria que la cascada de coagulació tenia un paper important en la fibrogenesis hepàtica<sup>121,122</sup>. En aquesta tesi demostrem que la inhibició de la coagulació duu a una millora en la pressió portal i en la fibrosi hepàtica, confirmant el paper de la coagulació en la fibrogenesis hepàtica en la cirrosi.

En el **primer estudi** confirmem que el tractament amb enoxaparina es capaç de disminuir la pressió portal en rates amb cirrosi establerta i hipertensió portal. A més, la millora en la pressió portal es va produir sense efectes en el flux sanguini portal, suggerint una disminució en la resistència vascular intrahepàtica. La falta d'efectes de l'administració aguda d'enoxaparina en la pressió portal, en els paràmetres hemodinàmics sistèmics, i en el contingut de superòxid o GMPc, suggereix que l'enoxaparina no té un efecte directe sobre el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica. Per acabar de confirmar aquests resultats, es va examinar la

resposta dependent d'endoteli al vasodilatador acetilcolina i no es van observar diferències entre les rates tractades amb enoxaparina i les rates tractades amb vehicle en cap dels dos models de cirrosi..

A més a més, tot i que en els tractaments de més llarga durada amb enoxaparina es van observar sobretot millores en les alteracions arquitecturals, es van observar també canvis en el to vascular. Es van disminuir els nivells d'estrès oxidatiu, de proteïnes nitròsines i es va augmentar en el contingut de GMPc. A més a més, es va observar una disminució de la ratio p-Moesina/Moesina en les rates tractades amb enoxaparina, suggerint que el tractament amb enoxaparina pot modular el to vascular mitjançant la relaxació de les CHE, almenys a llarg termini. Tot i això, s'ha de tenir en compte que aquest canvis en el to vascular poden ser deguts a la millora de l'alteració estructural observada.

És cert que el tractament amb enoxaparina ja es va descriure com a un bon tractament per a millorar la fibrosi hepàtica en models de dany hepàtic lleu<sup>88,123,124</sup>. El nostre estudi amplia aquestes observacions a models amb cirrosi establerta. El tractament amb enoxaparina va ser iniciat en el moment on es va aturar l'administració del tòxic (tant CCl<sub>4</sub> com TAA) com a model de regressió de malaltia avançada, o es va administrar alhora amb el tòxic, com a model de prevenció de la progressió de la cirrosi, en el model de TAA. Això ens va permetre analitzar els efectes del tractament amb enoxaparina en dos escenaris diferents.

En el model de regressió amb CCl<sub>4</sub>, les rates que van rebre durant 3 setmanes el tractament van tenir més temps de regressió espontània de la fibrosi que les rates que van rebre només una setmana de tractament. Tot i això, tant les d'una setmana de tractament com les de 3 setmanes de tractament van tenir una disminució del 25% del contingut de col·lagen analitzat per tinció de Sirius Red. Això també es va observar en el model de cirrosi de TAA tant en regressió com en prevenció. Tot els resultats van cap a la mateixa direcció i suggereixen el paper de l'enoxaparina en disminució de la

fibrosi hepàtica. A més, es va observar una disminució dels nivells d'activació de les CHE en les rates tractades amb enoxaparina, tant a nivell de teixit com en cèl·lula aïllada de rata tractada.

A part de l'efecte de l'enoxaparina en la fibrosi hepàtica, es va observar la influència de del tractament en la prevenció d'esdeveniments trombòtics en la microcirculació hepàtica. De fet, s'ha suggerit que aquests podrien jugar un paper important en la progressió de la fibrosi hepàtica<sup>8,113</sup>. Per explorar aquest efecte hem avaluat el contingut de fibrina en el parènquima hepàtic com a marcador de la formació de microtrombes<sup>125-128</sup>. Els fetges de rates tractades amb enoxaparina van tenir una menor deposició de fibrina. Aquest fet ja es va observar en les rates tractades durant una setmana, però l'efecte va ser més gran i significatiu en les rates tractades durant 3 setmanes. Aquestes troballes confirmen la connexió que hi ha entre trombosi i fibrosi hepàtica i consolida el concepte de l'ús dels anticoagulants per a la prevenció/dissolució dels microtrombes per a millorar la fibrosi hepàtica<sup>8,79</sup>. Per contra, no es van observar canvis a nivell d'inflamació. Per tant, encara que no podem descartar completament el potencial efecte del tractament amb enoxaparina en la reducció de la inflamació, no sembla que aquests sigui el principal mecanisme responsable de la millora les alteracions arquitecturals en la cirrosi hepàtica.

És important remarcar que els efectes beneficiosos del tractament amb enoxaparina en la reducció de la pressió portal, resistència vascular intrahepàtica i fibrosi hepàtica no es van associar a efectes deleteris en els animals. No es van observar diferències en els enzims hepàtics, ni es va observar sagnats durant el tractament o durant l'estudi hemodinàmic.

En el **segon estudi** es va avaluar l'efecte de l'anticoagulant oral, Rivaroxaban, en la cirrosi hepàtica. Com ja es va veure en el primer estudi, la teràpia anticoagulant pot ser una bona estratègia terapèutica per al tractament de la hipertensió portal en la cirrosi. Tot i això, les heparines de baix pes molecular són dependents dels nivells sanguinis

d'antitrombina, que de fet poden estar disminuïts en els pacients cirròtics<sup>114,115</sup>. Es per això que vam estudiar els efectes de Rivaroxaban, que és un inhibidor directe del factor Xa (tant el Factor Xa lliure com el que es troba unit al complex de protrombinasa) i és independent dels nivells d'antitrombina. A més a més, Rivaroxaban té l'avantatge de ser biodisponible via oral i té una acció ràpida<sup>129,130</sup>. Tot això, fa de rivaroxaban un anticoagulant més previsible i potencialment més eficient comparat amb altres heparines.

En aquest estudi hem confirmat els efectes beneficiosos de l'ús d'anticoagulants per a millora la hipertensió portal en la cirrosi. Hem demostrat que l'administració oral de rivaroxaban disminueix els nivells d'estrès oxidatiu, millora la biodisponibilitat de NO, desactiva les CHE i millora la hipertensió portal en dos models de cirrosi en rata.

La disminució de la pressió portal observada en les rates tractades amb rivaroxaban no es va associar a canvis en el flux sanguini portal en cap dels dos models, suggerint que el principal efecte ve de la disminució en la resistència vascular intrahepàtica. De fet, es va observar una disminució de la resistència vascular intrahepàtica en fetges de rates tractades amb rivaroxaban quan es va avaluar en un sistema de perfusió *ex vivo* amb el flux controlat.

L'estudi dels mecanismes de la millora en la funció microcirculatòria hepàtica van mostrar que rivaroxaban disminuïa els nivells d'estrès oxidatiu, probablement pel menor reclutament de cèl·lules inflamatòries. També augmentava els nivells de GMPc, millorava la resposta a dosis creixents d'acetilcolina i disminuïa l'expressió del marcador d'activació de CES, el factor von Willebrand. Tot això indicava que el tractament amb rivaroxaban té un efecte important en la millora de la disfunció endotelial en el fetge cirròtic.

D'altra banda també es va estudiar l'efecte de rivaroxaban sobre les CHE. Es va observar que el tractament amb rivaroxaban disminuïa els marcadors d'activació i proliferació de les CHE que correlacionen amb la seva capacitat de síntesi de matriu



extracel·lular. Aquest efecte no es va associar a canvis importants en el contingut de fibra en el fetge. Degut als canvis observats en els nivells d'activació de les CHE, es temptador especular que un tractament més llarg amb rivaroxaban s'associaria a una disminució en els nivells de fibrosi hepàtica. Això està recolzat pels efectes beneficiosos observats a sobre les alteracions del parènquima: estudis ultraestructurals realitzats mitjançant microscopia electrònica van confirmar que les rates tractades amb rivaroxaban tenien una menor formació de membrana basal en els sinusoides hepàtics i que els hepatòcits tenen més projeccions, suggerint una millor estructura del sinusoid hepàtic. Finalment, es va confirmar una disminució del contingut de fibrina en les rates tractades amb rivaroxaban, suggerint una disminució de la microtrombosi hepàtica.

Els efectes beneficiosos deguts al tractament amb rivaroxaban no es van associar a efectes deleteris en l'hemodinàmica sistèmica ni en un augment de sagnats durant el tractament.

El **tercer estudi** aporta nova informació, fins ara no coneguda, sobre el potencial dany de l'estès oxidatiu mitocondrial en les cèl·lules hepàtiques durant la cirrosi i sobre l'ús dels antioxidants dirigits a mitocondri com a estratègia terapèutica per a la hipertensió portal i la cirrosi. Tal i com s'ha explicat anteriorment, les CHE són les principals cèl·lules implicades en la síntesi de matriu extracel·lular<sup>1,80</sup> que contribueix en l'augment de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi. Tenint en compte que l'augment de l'estrès oxidatiu en la cirrosi és un dels principals mecanismes que activen les CHE i que els mitocondris són un dels principals productors d'espècies reactives d'oxigen, aquest estudi es va centrar en avaluar els efectes de l'antioxidant dirigit a mitocondri, mitoquinona en l'estrès oxidatiu, fenotip de les CHE, la fibrosi hepàtica i la hipertensió portal en models pre-clínic de cirrosi.

Els resultats del present estudi mostren que el tractament amb mitoquinona disminueix l'estrès oxidatiu hepàtic, desactiva les CHE i disminueix la fibrosi hepàtica i la hipertensió portal en les rates cirròtiques.

Estudis anteriors van demostrar el rol de l'estrès oxidatiu en la fisiopatologia de la cirrosi i la hipertensió portal<sup>36,45,47,131</sup>. En el present estudi demostrem que el tractament amb mitoquinona va aconseguir disminuir els nivells d'estrès oxidatiu, com altres teràpies utilitzades com ara el tempol<sup>52</sup> o el resveratrol<sup>53</sup>, però amb la diferència que la mitoquinona té l'avantatge de ser administrada oralment. A més a més, les altres teràpies antioxidants no poden dirigir-se a l'interior del mitocondri i, per tant, no poden contrarestar l'estrès oxidatiu mitocondrial que pot resultar en dany i disfunció mitocondrial i endegar una cascada de conseqüències deletèries per a la cèl·lula com ara la inflamació o la mort cel·lular<sup>117</sup>.

El nostre estudi demostra que part de l'estrès oxidatiu observat en els fetges cirròtics prové del mitocondris dels hepatòcits i de les CHE. A més, demostrem que la mitoquinona es capaç de disminuir l'estrès oxidatiu mitocondrial en els principals tipus cel·lulars hepàtics. Aquest augment de l'estrès oxidatiu mitocondrial en la cirrosi pot ser causat, almenys en part, per la disminució en l'expressió i l'activitat de la isoforma mitocondrial de la superòxid dismutasa, que s'ha vist disminuïda en la cirrosi<sup>36</sup>. És important destacar que el tractament amb mitoquinona és capaç de disminuir l'activació de les CHE de rata tant *in vitro* com *in vivo*. A més, la desactivació de les CHE es va confirmar tant en CHE aïllades de biòpsies humanes, en la línia cel·lular humana de CHE, LX2, i en el model *ex vivo* per a l'estudi de mostres de fetge humanes, els talls de precisió de fetges humans (hPCLS). Aquests efectes es van evidenciar quan es va veure que la proliferació de les CHE estava disminuïda però no la seva viabilitat.

Per confirmar la capacitat terapèutica de la mitoquinona, es va avaluar els seus efectes en dos models de cirrosi. Les observacions *in vivo* van demostrar que el tractament amb mitoquinona disminuïa la pressió portal, sense canvis en el flux sanguini portal, suggerint una disminució en la resistència vascular intrahepàtica. A més, els animals tractats amb mitoquinona van tenir una disminució del contingut de fibra hepàtica en ambdós models. Suggestint que la disminució de la fibrosi hepàtica és el principal mecanisme amb el que la mitoquinona disminueix la pressió portal, ja que no es van trobar efectes importants de la mitoquinona sobre el to vascular hepàtic almenys durant el temps de tractament estudiat, i que altres antioxidants sí que han demostrat una millora de la disfunció endotelial<sup>111</sup>.

A més, es sap que els nivells de les espècies reactives d'oxigen estan directament lligades a la inflamació. Per això vam analitzar l'expressió dels marcadors CD68 i CD163 com a marcadors d'inflamació. En aquest estudi vam observar una disminució del nombre de cèl·lules positives per CD68, suggerint un efecte de la mitoquinona en la reducció de la inflamació hepàtica. Aquests resultats només es van observar en el model de CCl<sub>4</sub> i no en el de TAA, suggerint que la reducció de la inflamació pot contribuir a la millora de la fibrosi hepàtica però no és el principal mecanisme.

Les diferències observades entre els dos models de cirrosi, pot ser degut a les diferències intrínseques dels dos models. De fet, s'ha descrit que el model induït per CCl<sub>4</sub> acumula més estrès oxidatiu que el model per TAA<sup>132</sup>, fent així el model per CCl<sub>4</sub> més susceptible per a una teràpia antioxidant que no el model de TAA.

Tot i això, cal destacar que tots els beneficis observats pel tractament amb mitoquinona no es van associar a efectes deleteris en els animals cirròtics en cap dels dos models.

## CONCLUSIONS

---



## CONCLUSIONS

---

### **Estudi 1: Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

- El tractament prolongat amb enoxaparina disminueix la pressió portal en dos models pre-clítics de cirrosi sense efectes deleteris en l'hemodinàmica sistèmica i sense promoure sagnats a les dosis emprades.
- La millora de la pressió portal és deguda a una disminució de la resistència vascular intrahepàtica, causada per una disminució de la fibrosi i un augment de la biodisponibilitat de l'òxid nítric.
- El tractament preventiu amb enoxaparina també millora la hipertensió portal evitant la progressió de la fibrosi hepàtica.

### **Estudi 2: The direct oral anticoagulant Rivaroxaban reduces portal hypertension in cirrhotic rats by deactivating hepatic stellate cells**

- El tractament amb l'anticoagulant oral rivaroxaban disminueix la pressió portal en dos models de cirrosi sense efectes deleteris en l'hemodinàmica sistèmica i sense sagnats.
- Aquest efecte està majorment associat a una disminució de la resistència vascular intrahepàtica, a una millora en la biodisponibilitat de l'òxid nítric, a la

desactivació de les cèl·lules hepàtiques estrellades i a una menor microtrombosi hepàtica.

- El tractament amb rivaroxaban millora el parènquima i el sinusoid hepàtic.
- Els efectes observats pel tractament amb rivaroxaban són deguts a la seva interacció amb el factor Xa i posterior inhibició de la via PAR, i no per una acció directa de Rivaroxaban sobre la cèl·lula hepàtica estrellada.

Els resultats dels estudis 1 i 2 de la present tesi doctoral suggereixen que el tractament amb anticoagulants milloren la hipertensió portal i mereixen un estudi més profund com a potencial estratègia terapèutica per al tractament de la hipertensió portal en pacients amb cirrosi.

### **Estudi 3: Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone deactivates human and rat HSC and reduces portal hypertension in cirrhotic rats**

- L'estrès oxidatiu mitocondrial està augmentat en la cirrosi, essent els hepatòcits i les cèl·lules hepàtiques estrellades les principals cèl·lules productores.
- L'antioxidant dirigit a mitocondri, mitoquinona, és un nou tractament antioxidant oral que desactiva tant les cèl·lules hepàtiques estrellades de rata com d'humà, sense afectar-ne la seva viabilitat.
- El tractament amb mitoquinona disminueix la pressió portal en rates cirròtiques, principalment per la disminució de la fibrosi hepàtica i per la desactivació de les cèl·lules hepàtiques estrellades.

- La mitoquinona també disminueix la inflamació hepàtica en el model de cirrosi per CCl<sub>4</sub>.

Els resultats d'aquest estudi suggereixen que els antioxidants dirigits a mitocondri poden ser una potencial via de tractament de la hipertensió portal en pacients cirròtics.





## **ALTRES PUBLICACIONS**

---



## ALTRES PUBLICACIONS

---

- **Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats.**

Di Pascoli M, Diví M, Rodríguez-Vilarrupla A, Rosado E, Gracia-Sancho J,

**Vilaseca M**, Bosch J, García-Pagán JC.

J Hepatol. 2013 58:904-910.

I.F. 11.336

- **Role of Oxidative Stress in Portal Hypertension in Cirrhosis**

Tripathi DM, **Vilaseca M**, Lafoz E, García-Pagán JC.

Gastrointestinal Tissue. Oxidative Stress and Dietary Antioxidants 2017



# REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

1. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125-172. doi:10.1152/physrev.00013.2007.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-218. doi:10.1172/JCI24282.
3. Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol.* 2000;32(1 Suppl):141-156. doi:10.1016/S0168-8278(00)80422-5.
4. García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol.* 2012;57(2):458-461. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.007.
5. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. In: *The Lancet.* Vol 383.; 2014:1749-1761. doi:10.1016/S0140-6736(14)60121-5.
6. Groszmann R, Atterbury C. The Pathophysiology of Portal Hypertension: a basis for classification. *Liver Dis.* 1982;2(3):177-186.
7. Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology.* 1985;5(4):643-648. doi:10.1002/hep.1840050421.
8. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology.* 1995;21:1238-1247.
9. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol.* 2006;45(3):429-438. doi:10.1016/j.jhep.2006.04.014.
10. RC B, JP I. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 2000;46:443-446. doi:10.1136/gut.46.4.443.
11. Rockey DC, Weisiger R a. 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. doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008707268.
12. 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.
13. Graupera M, García-Pagán JC, Abraldes JG, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology.* 2003;37:172-181. doi:10.1053/jhep.2003.50004.



14. Graupera M, García-Pagán J-C, Titos E, et al. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*. 2002;122:387-393. doi:10.1053/gast.2002.31040.
15. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Bosch J, García-Pagán JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2007;47(2):220-227. doi:10.1016/j.jhep.2007.03.014.
16. 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 Pt 1):926-931. doi:10.1002/hep.510280405.
17. Suematsu M, Goda N, Sano T, et al. Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2431-2437. doi:10.1172/JCI118300.
18. Birney Y, Redmond EM, Sitzmann J V., Cahill PA. Eicosanoids in cirrhosis and portal hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2003;72(1-2):3-18. doi:10.1016/S1098-8823(03)00080-7.
19. 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.
20. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, 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. doi:10.1172/JCI119842.
21. 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. doi:10.1016/0168-8278(95)80327-0.
22. 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. doi:10.1016/S0168-8278(00)80302-5.
23. Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int*. 2012;32(2):199-213. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02579.x.
24. Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol*. 2007;46(5):927-934. doi:10.1016/j.jhep.2007.02.006.
25. Moncada SP and H. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-142.

- doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
26. Papapetropoulos a, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):509-520.
  27. 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. doi:10.1016/S0016-5085(98)70487-1.
  28. Matei V, Rodríguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis. *Hepatology*. 2006;44(1):44-52. doi:10.1002/hep.21228.
  29. 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(5):1222-1228. doi:10.1016/S0016-5085(99)70408-7.
  30. Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol*. 1985;1(4):325-337. doi:10.1016/S0168-8278(85)80770-4.
  31. Matei V, Rodríguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, et al. Three-day tetrahydrobiopterin therapy increases in vivo hepatic NOS activity and reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2008;49:192-197. doi:10.1016/j.jhep.2008.04.014.
  32. Abalde JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Graupera M, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2007;46(6):1040-1046. doi:10.1016/j.jhep.2007.01.020.
  33. Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, 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. doi:10.1002/hep.21673.
  34. 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. doi:10.1172/JCI7997.
  35. 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(5):G1023-30. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11053000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11053000).
  36. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric

- oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47:1248-1256. doi:10.1002/hep.22166.
37. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension*. 2003;42(6):1075-1081. doi:10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.
  38. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
  39. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(16):9220-9225.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689061>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC21319>.
  40. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):589-606. doi:10.1113/jphysiol.2003.055913.
  41. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010;459(6):923-939. doi:10.1007/s00424-010-0808-2.
  42. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:33-50. doi:10.1146/annurev.nutr.16.1.33.
  43. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999;31(4):261-272. doi:10.1080/10715769900300841.
  44. Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 5):965-970. doi:10.1042/BST0340965.
  45. Rodríguez-Vilarrupla A, Bosch J, García-Pagán J-C. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2007;46:193-197. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.008.
  46. Bomzon a, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Ther*. 2001;89(3):295-308.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516481>.
  47. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol*. 2004;3(3):86-92.
  48. Fernando B, Marley R, Holt S, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology*. 1998;28(3):689-694. doi:S0270913998003620 [pii]r10.1002/hep.510280314.
  49. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of

- human fibroblasts. *Cell Immunol.* 2000;204(1):19-28. doi:10.1006/cimm.2000.1687.
50. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(5):265-280. doi:10.1042/CS20060242.
51. Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut*. 2009;58:118-125. doi:10.1136/gut.2008.149880.
52. García-Calderó H, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2011;54:660-665. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.034.
53. Di Pascoli M, Diví M, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58(5):904-910.
54. Hernández-Guerra M, García-Pagán JC, Tumes J, et al. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology*. 2006;43(3):485-491. doi:10.1002/hep.21080.
55. Ferlitsch A, Pleiner J, Mittermayer F, 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. doi:00003246-200509000-00020 [pii].
56. Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008;24(3):115-122. doi:10.1111/j.1600-0781.2008.00348.x.
57. Birch-Machin M a, Turnbull DM. Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol*. 2001;65:97-117. doi:10.1016/S0091-679X(01)65006-4.
58. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417:1-13. doi:10.1042/BJ20081386.
59. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210-215. doi:10.1038/nri2725.
60. Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, Bhakat KK, Mitra S, Szczesny B. Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(4):157-168. doi:10.1016/j.mad.2012.01.005.

61. Gioscia-Ryan R a, Larocca TJ, Sindler AL, Zigler MC, Murphy MP, Seals DR. Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. *J Physiol.* 2014;0:1-13. doi:10.1113/jphysiol.2013.268680.
62. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38 Suppl 1:S38-S53. doi:10.1016/S0168-8278(02)00429-4.
63. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(2):G245-G249.
64. 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. doi:10.1055/s-2007-1007128.
65. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(24):8681-8685. doi:10.1073/pnas.82.24.8681.
66. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:1728-1734. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[1728:HSCALF]2.0.CO;2.
67. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol.* 2007;46(5):955-975. doi:10.1016/j.jhep.2007.02.003.
68. Lisman T, Leebeek FWG, De Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *J Hepatol.* 2002;37(2):280-287. doi:10.1016/S0168-8278(02)00199-X.
69. Lisman T, Bakhtiari K, Pereboom ITA, Hendriks HGD, Meijers JCM, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *J Hepatol.* 2010;52(3):355-361. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.001.
70. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: The ups and downs. In: *Journal of Hepatology.* Vol 53.; 2010:362-371. doi:10.1016/j.jhep.2010.01.042.
71. Tripodi A, Anstee QM, Sogaard KK, Primignani M, Valla DC. Hypercoagulability in cirrhosis: Causes and consequences. *J Thromb Haemost.* 2011;9(9):1713-1723. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04429.x.
72. Amitrano L, Guardascione MA, Menchise A, et al. Safety and efficacy of anticoagulation therapy with low molecular weight heparin for portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(6):448-451. doi:10.1097/MCG.0b013e3181b3ab44.

73. Villa E, Cammà C, Marietta M, et al. Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1253-1260.e4. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.018.
74. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;36(1):4-12. doi:10.1007/s12016-008-8091-0.
75. Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, Gray AJ, Blanc-Brude OP, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J*. 1998;333 ( Pt 1):121-127.
76. Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35584-35591. doi:10.1074/jbc.M003188200.
77. Duplantier JG, Dubuisson L, Senant N, et al. A role for thrombin in liver fibrosis. *Gut*. 2004;53(11):1682-1687. doi:10.1136/gut.2003.032136.
78. Borensztajn K, von der Thusen JH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The coagulation factor Xa/protease activated receptor-2 axis in the progression of liver fibrosis: a multifaceted paradigm. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):143-153. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00980.x.
79. Anstee QM, Wright M, Goldin R, Thursz MR. Parenchymal extinction: coagulation and hepatic fibrogenesis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):117-126. doi:10.1016/j.cld.2008.09.013.
80. Gaça MDA, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol*. 2002;36(3):362-369.
81. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol*. 2008;172(2):309-320. doi:10.2353/ajpath.2008.070347.
82. Knight V, Tchongue J, Lourensz D, Tipping P, Sievert W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2012;55(3):879-887. doi:10.1002/hep.24784.
83. Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, Gray AJ, Blanc-Brude OP, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J*. 1998;333 ( Pt 1):121-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639571>.
84. Borensztajn K, von der Thusen JH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The

- coagulation factor Xa/protease activated receptor-2 axis in the progression of liver fibrosis: a multifaceted paradigm. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):143-153. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00980.x.
85. Marra F, DeFranco R, Grappone C, et al. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology*. 1998;27(2):462-471. doi:10.1002/hep.510270221.
  86. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, et al. PAR1 Antagonism Protects Against Experimental Liver Fibrosis. Role of Proteinase Receptors in Stellate Cell Activation. *Hepatology*. 2004;39(2):365-375. doi:10.1002/hep.20054.
  87. Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, et al. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(1):G226-35. doi:10.1152/ajpgi.00444.2007.
  88. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, Ameen A, Hassan NS. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. *Pharmacol Res*. 2005;51(1):59-67. doi:10.1016/j.phrs.2004.04.009.
  89. Assy N, Hussein O, Khalil A, et al. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2007;52(5):1187-1193. doi:10.1007/s10620-006-9595-1.
  90. 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.
  91. Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal-hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1985;248(2 Pt 1):G192-G195.
  92. Turpie AGG. Oral, direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1238-1247. doi:10.1161/ATVBAHA.107.139402.
  93. Robertson L, Kesteven P. Oral direct thrombin inhibitors or oral factor Xa inhibitors for the treatment of deep vein thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2). doi:10.1002/14651858.CD010956.
  94. Halliwell B. Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. *Adv Pharmacol*. 1996;38(C):3-20. doi:10.1016/S1054-3589(08)60976-X.
  95. Uttara B, Singh A V, Zamboni P. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current*. 2009.
  96. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev*. 2013;12(1):376-390.

- doi:10.1016/j.arr.2012.10.004.
97. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-673. doi:10.1097/00004872-200018060-00002.
  98. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-USmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: The emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res*. 2006;99(9):924-932. doi:10.1161/01.RES.0000248212.86638.e9.
  99. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. In: *Journal of the Neurological Sciences*. Vol 233.; 2005:145-162. doi:10.1016/j.jns.2005.03.012.
  100. Jauslin ML, Meier T, Smith R a J, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J*. 2003;17:1972-1974. doi:10.1096/fj.03-0240fje.
  101. Dashdorj A, Jyothi KR, Lim S, et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med*. 2013;11(1):178. doi:10.1186/1741-7015-11-178.
  102. Demura M, Kamo N, Kobatake Y. Determination of membrane potential with lipophilic cations: correction of probe binding. *BBA - Biomembr*. 1985;820(2):207-215. doi:10.1016/0005-2736(85)90114-2.
  103. Murphy MP. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. In: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*.; 2008:575-587. doi:10.1002/9780470372531.ch25.
  104. DiMauro S, Mancuso M. Mitochondrial diseases: Therapeutic approaches. In: *Bioscience Reports*. Vol 27.; 2007:125-137. doi:10.1007/s10540-007-9041-4.
  105. Graham D, Huynh NN, Hamilton CA, et al. Mitochondria-targeted antioxidant mitoq10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2009;54(2):322-328. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130351.
  106. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-219. doi:10.1016/1043-6618(95)86904-2.
  107. Frei B, Kim MC, Ames BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4879-4883. doi:10.1073/pnas.87.12.4879.
  108. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The



- burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.005.
109. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol*. 2008;48(SUPPL. 1). doi:10.1016/j.jhep.2008.01.021.
110. Di Pascoli M, Diví M, Rodríguez-Vilarrupla A, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58:904-910. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.012.
111. Guillaume M, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4-cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2013;58:240-246. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.010.
112. Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35584-35591. doi:10.1074/jbc.M003188200.
113. Wanless IR, Liu JJ, Butany J. Role of thrombosis in the pathogenesis of congestive hepatic fibrosis (cardiac cirrhosis). *Hepatology*. 1995;21(5):1232-1237.
114. Tang W, Wang Y, Zhao X, et al. Procoagulant imbalance aggravated with falling liver function reserve, but not associated with the presence of portal vein thrombosis in cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(6):672-678. doi:10.1097/MEG.0000000000000352.
115. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. The coagulopathy of cirrhosis assessed by thromboelastometry and its correlation with conventional coagulation parameters. *Thromb Res*. 2009;124(1):132-136. doi:10.1016/j.thromres.2008.11.008.
116. Chacko BK, Srivastava A, Johnson MS, et al. Mitochondria-targeted ubiquinone (MitoQ) decreases ethanol-dependent micro and macro hepatosteatosis. *Hepatology*. 2011;54:153-163. doi:10.1002/hep.24377.
117. Mukhopadhyay P, Horváth B, Zsengeller Z, et al. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemiareperfusion: Therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:1123-1138. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.036.
118. Gane EJ, Weilert F, Orr DW, et al. *The Mitochondria-Targeted Anti-Oxidant*

- Mitoquinone Decreases Liver Damage in a Phase II Study of Hepatitis C Patients.*; 2010. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02250.x.
119. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, 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. doi:10.1172/JCI200318212.Introduction.
  120. Wu J, Zern M. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 2000;35:665-672. doi:10.1055/s-2001-17558.
  121. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997;349:825-832. doi:10.1016/S0140-6736(96)07642-8.
  122. Wright M, Goldin R, Hellier S, et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut.* 2003;52(8):1206-1210. doi:10.1136/gut.52.8.1206.
  123. Assy N, Hussein O, Khalil A, et al. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2007;52(5):1187-1193. doi:10.1007/s10620-006-9595-1.
  124. Abe W, Ikejima K, Lang T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol.* 2007;46(2):286-294. doi:10.1016/j.jhep.2006.08.023.
  125. Kume M, Hayashi T, Yuasa H, et al. Bacterial lipopolysaccharide decreases thrombomodulin expression in the sinusoidal endothelial cells of rats -- a possible mechanism of intrasinusoidal microthrombus formation and liver dysfunction. *J Hepatol.* 2003;38(1):9-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480554>.
  126. de Visser YP, Walther FJ, Laghmani EH, Boersma H, van der Laarse A, Wagenaar GT. Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. *Respir Res.* 2009;10:30. doi:10.1186/1465-9921-10-30.
  127. Sullivan BP, Kassel KM, Jone A, Flick MJ, Luyendyk JP. Fibrin(ogen)-independent role of plasminogen activators in acetaminophen-induced liver injury. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2321-2329. doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.011.
  128. Simonetto D a, Yang H-Y, Yin M, et al. Chronic passive venous congestion drives hepatic fibrogenesis via sinusoidal thrombosis and mechanical forces. *Hepatology.* 2014;648-659. doi:10.1002/hep.27387.
  129. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: A new oral factor xa inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):376-381.

- doi:10.1161/ATVBAHA.110.202978.
130. Laux V, Perzborn E, Heitmeier S, et al. Direct inhibitors of coagulation proteins - the end of the heparin and low-molecular-weight heparin era for anticoagulant therapy? *Thromb Haemost.* 2009;102(5):892-899. doi:10.1160/TH09-02-0134.
  131. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int.* 2009;3:526-536. doi:10.1007/s12072-009-9158-6.
  132. Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, et al. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(6):947-957. doi:JGH [pii]\r10.1111/j.1440-1746.2006.04231.x.

# AGRAÏMENTS

---



## AGRAÏMENTS

---

Per fi... Quan vaig començar a escriure aquests agraïments només em va venir al cap poder dir que per fi he arribat fins aquí!. Tothom que em coneix sap el que m'ha costat arribar fins aquest moment. Final d'una etapa i inici d'una altra. La veritat és que em considero molt afortunada (moltíssim!) d'haver anat a parar a un grup tant genial com aquest. Un grup en que de seguida m'hi vaig sentir integrada i en el que he conegut a gent increïble!. No va ser gens fàcil prendre la decisió de deixar un grup sense tenir clar el que faria, però tinc clar que és una de les més bones decisions que he fet mai.

No puc començar aquests agraïments per ningú més que no siguin els meus directors de tesi, en **Joan Carles** i en **Jordi**. Joan Carles, tinc molt clar que si no hagués sigut per la oportunitat que em vas donar, jo no seria la persona que sóc ara, ni tinc massa clar si podria seguir en el món de la investigació. És per això que t'estaré per sempre agraïda, per haver confiat en mi i per donar-me una possibilitat que ja considerava remota. També t'he de donar les gràcies per guiar-me durant tot aquest temps, per aconsellar-me i ensenyar-me tot el que m'has ensenyat! Milions de gràcies!.

D'en Jordi no podria parar de dir coses bones. Has estat sempre al meu costat (literalment, tot i que ara has anat una mica més lluny :P), per aconsellar-me sempre que m'ha fet falta. Has sigut un punt clau per a que pogués tirar endavant la tesi. Quan parlo de tu, sovint em refereixo a tu com a "jefe", però el que et descriu millor és líder. No cal dir que no oblidaré mai el viatge a Londres, va ser un viatge genial amb gent magnífica! I t'ho he d'agrair amb tot el cor. Ets un amic, un company i un suport per a tots els que treballem al laboratori. Moltíssimes gràcies!

Tampoc puc oblidar a totes aquelles persones que han fet possible que estigués aquí. **Jaume**, milions de gràcies per haver-me recolzat i haver-me ensenyat tant. Sempre que he tingut la oportunitat d'estar amb tu, he après moltes coses i m'he considerat una persona molt afortunada.

**Aina**, tot i que vam compartir poc temps juntes, sé que en part és "culpa" teva que estigui a hemodinàmica hepàtica. Moltes gràcies per tot el que vas fer per mi.

**Virginia**, gracias por todos los consejos que me has dado a lo largo de estos años. Sin duda he aprendido muchísimo de ti.

Sens dubte, he d'agrair a tots els companys del laboratori tot el que m'han ensenyat al llarg d'aquests casi 5 anys. En sou molts els que m'heu ensenyat moltes coses però

no puc començar per ningú que no sigui l'Héctor. **Héctor**, como empezar...estuviste conmigo des de el minuto 0. Me has enseñado absolutamente de todo. Hemos pasado días juntos en la sala de animales y gracias a ti se hacían amenas y divertidas! Hasta me adivinabas los días que estaba un poco alicaída, porque ese día no hablaba tanto. Me has ayudado y apoyado siempre que lo he necesitado y nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí. Has sido mi mano derecha durante todo este tiempo y sin duda esta tesis existe gracias en gran parte a ti. Para mí ya no eres un compañero de trabajo más, eres un amigo con el que me siento muy cómoda trabajando y del que puedo confiar completamente. Por todo esto y muchísimo más, millones de gracias!.

Si l'Héctor ha sigut la meva ma dreta, tu, **Montse**, has sigut la meva mà esquerra. Quan vaig començar vaig al·lucinar amb la vitalitat que desprenies (i encara desprenes). Em considero molt afortunada d'haver-te tingut com a companya, que m'ensenyessis tot el que em vas ensenyar (per a mi, ets la reina de cultius i no demanaria mai segones opinions a ningú :P). M'encanten els moments de cafè juntes, comentant qualsevol tonteria del món. I no cal dir, que ets la persona amb millor gust musical del lab! (Arcade Fire for ever!). Ets una gran Montse! Moltes gràcies per tot!.

Mi gallega preferida!!! **Cristinita!** Muchísimas gracias por ayudarme en todo. Por estar allí cuando lo necesitaba y por aconsejarme siempre! Des de luego, eres tremenda! Que no te paren nunca (si se atreven!). **Erica**, moltíssimes gràcies per ajudar-me sempre. Sempre que ho he necessitat has estat allà per ajudar-me sense queixar-te mai. Gràcies, sobretot, per ajudar-me a moure'm pel món d'avui dia, si no fos per tu estaria max perduda i ploraria molt!! Gràcies per ser com ets!! **Dinesh**, thank you for everything you have done for me and for helping me! I really appreciate it.

No puc oblidar tampoc tot el grup del que em sento gairebé adoptada :P. Sense preferències, començaré per donar les gràcies a l'**Anabel** (només per que per ordre alfabètic toca...xD). Mare meva!! Anabel!! Que tia!! Només fa dos anys que ens coneixem i tinc la sensació de que et conec de sempre! Des del principi he tingut molt bon feeling i m'ho he passat genial amb tu. Ets divertida, esporàdica i una gran companya. M'encanta com ets i m'encanta estar al teu costat. Moltes gràcies per tots els cafès i companyia que m'has donat durant aquest temps. Ets única! **Diana**, em sento molt afortunada d'haver-te conegut. Ets una tia genial i espero que tinguis moltíssima sort tant en la vida professional com en la personal. Amb aquest angelet que tens, segur que tot et va rodat! **Giusi**, mi compañera de frente! Siempre recordaré que el día que empecé en el lab, era el día antes de que te fueras a Los Ángeles. Todo el mundo hablaba tan bien de ti, que tenía muchas ganas de que

volvieras para conocerte mejor. La verdad es que no exageraban! Eres genial y aprendí muchísimo de ti! Espero que pueda seguir aprendiendo en breve...:P. **Júlia**, fa poquet que ens coneixem però desitjo que t'estigui agradant l'experiència d'un laboratori, i que sàpigues que has tingut molta sort en el grup que has escollit. Gaudeix i aprèn al màxim. I prenguis la decisió que prenguis, saps que pots comptar amb nosaltres. **Martineti!!** Què dir de tu?? M'encanta la evolució que has tingut al lab. Al principi eres un noi més tirant a tímid, però com has canviat! M'encanten les teves pulles, els teus cuchicheos! Em caus tan bé, que fins i tot puc suportar que vegis Gran Hermano!! Em caus súper bé! No canviïs mai! **Nico**, espero que disfrutes tanto como lo he hecho yo haciendo la tesis, aprende y absorbe todo lo que puedas de este grupo! **Raquel**, ets més veterana que jo! Tindràs una tesi que en podran ser dues! Encara recordo els dies que anaves amb la Giusi... com passa el temps! Gràcies per ser allà sempre que ho he necessitat. **Sergi G**, si hagués d'escriure totes les coses en les que m'has ajudat, hauria de fer un índex i tot... en són tantes!. I no només a mi, sempre que algú necessita ajuda, ets el primer en oferir-se. Ets de les persones més honestes i amables que he conegut mai, i t'agraeixo molt que siguis com ets. N'hi ha pocs com tu però que això no et faci canviar. Espero de tot cor que la teva etapa a Suïssa sigui tan bona com et mereixes i espero veure'ns allà o aquí, però que no deixem mantenir el contacte. Vals molt la pena ;). **Sergi V**, deu ser cosa de "Sergis" però tu també ets únic a l'hora de solucionar coses. Ets un multitasques! I això en homes és raro.. :P Que sàpigues que et trobem molt a faltar! Moltes gràcies per tot.

**Laia**, moltes gràcies per la teva ajuda i per els teus consells científics! **Maria**, endavant amb la tesi. Segur que t'ho trauràs sense problemes! I no deixis mai el Pokémon eh! xD. **Genís**, fa poc que ens coneixem però puc veure que m'agrada treballar amb tu. Ets una persona molt interessant, i considero que puc arribar a aprendre molt de tu. **Núria**, te animo a que te entres en el mundo de la investigación, para mi es apasionante! ☺.

Per últim, agraeixo a la **Mercedes** i al seu grup tot el que han fet per mi. **Laura**, no oblidaré el temps que vam coincidir. Ets una bellíssima persona i me n'alegro que ens haguem trobat, encara que fos per un temps curt. **Javi**, **Ester** i **Marc**, des del principi em veu rebre amb els braços oberts i em veu ensenyar moltes coses. Moltes gràcies pels vostres consells i la vostra simpatia! **Salvador**, **Núria** i **Marta**, espero que us vagi molt bé en tots els vostres reptes personals i científics.

No puc oblidar tampoc els que em van acollir en els meus inicis a l'hemodinàmica. **Marcos**, **Eugenio** y **Fede** muchas gracias por toda vuestra ayuda y simpatia! I encara que quedi friki...també vull agrair als animalets que han donat la vida per aquesta tesi...



Amics meus tots!! Tot va començar amb vosaltres. Els **eBiometges**, tot i que una mica dispersos últimament, hem fet sempre molta pinya i ens hem ajudat sempre que hem pogut. Som una petita família i sé que encara que no ens veiem, puc comptar amb vosaltres sempre que faci falta. **Pablo!** Gracias a ti descubrí Heidelberg y Roma! No pares de moverte, así te venimos a visitar! :P. **Migueliiiiin!!** Cuanto te echo de menos!! Te tengo muy presente aunque no hablemos todo lo que me gustaría. Echo de menos tus bromas malas, salir de fiesta...tantas cosas! Gracias por ser como eres!! **Aida**, hem compartit moltes coses! Encara recordo les classes de spinning al Europolis, que tiempos!! Només tinc paraules d'agraïment per tu, gràcies pel suport que sempre m'has donat, pel pis a Andorra, per la festa de la fil·loxera! **David**, encara recordo que el primer dia, disfressat de tenista, no vas voler sortir a coneixe'ns...↪ No t'ho tindre en compte perquè després ha compensat! Gràcies per ser com ets! **Anna i Tanit**, a vosaltres us ho dic juntes. Sou la canya, de festa sempre. Quins viatges que us monteu! No pareu! Em doneu molta enveja perquè teniu una energia que no us l'acabeu mai!!! Moltes gràcies per ser-hi ;). **Ignasi i Marc**, gràcies per suportar les nostres xerrades científiques i per ser-hi sempre que ho he necessitat! ☺. Per últim, **Pepe!**, ja sabem que tot té una explicació, però a veure si et deixes veure més el pell!! Gràcies per ser-hi i per les frikades varies ;).

I ara els meus **Manyanets!!! Dani**, començaré amb tu perquè ens coneixem des de la guarderia (posa fa uns 29 anys...) i ha donat la casualitat que hem anat a parar sempre a les mateixes escoles/uni. Tot i que ens vam distanciar, Lost (i la Laia) en va re-unir, i crec que és una de les millors coses que m'han passat mai. Por molt que estiguem distanciat, sempre et considero a prop meu. Puc comptar amb tu sempre i sé que sempre hi podré comptar. **Cris**, me alegro muchísimo que Dani preguntara por ti en el Arenal. Eres de las personas más alegres que he conocido en mi vida. Si no te conociera, pensaría que lo has tenido todo muy fácil. Pero, el hecho es que te lo has currado siempre todo, y que eres una currelas. Todo lo que tienes te lo mereces por 1000! Me gusta pensar que, aunque sea solo en parte, gracias a mi os conocisteis y me encanta! Ahora, vosotros sois mis árboles ☺ (en caso de duda preguntar a Dani). **Juanma**, gracias por preocuparte siempre por mí. Sé que aunque no seamos muy cercanos, en los momentos difíciles te he tenido a mi lado. Te lo agradezco muchísimo. Espero que tengas suerte en tu etapa inglesa. **Xoan**, tu aquí també tens molta importància. Saps que aquesta és una etapa molt important de la meua vida, i el que m'ha costat arribar fins aquí. T'agraeixo el suport que em vas donar a l'inici de l'aventura. **Laieta!** Ets l'ànima dels Manyanets. Mantens viva la flama en temps de decaïment! No deixis mai de donar els bons dies! Gràcies per estar sempre al meu costat! I segueix anant de concerts non-stop! **Marta!!** Llevamos mucho tiempo juntas, y nos hemos apoyado siempre en la salud y en la enfermedad. Somos casi como un

matrimonio, :P. Gracias por estar siempre a mi lado, apoyarme y abrazarme cuando lo he necesitado. Te quiero y te mereces lo mejor, aunque tarde en venir... **Laia A**, gràcies pels dilluns de nenes maques! M'encanten les reunions que fem, i m'encanten els pastissos que fas :P Ets una tia genial! Et mereixes el millor del món! (i ja ho tens ;) **Montsita!** Amb tu també tela eh! La de xocolates que hem compartit. Ets una tia genial i t'agraeixo tot el que has fet per mi durant tots aquests anys. Sé que sempre podré comptar amb tu. **Toni**, venint de la Montse, ja sabia jo que el seu xicot no seria un qualsevol. Des de l'Ouzo fins al dia d'avui, cada dia em caus millor. Ets una persona molt interessant (tot i ser de lletres :P) i aprenc coses noves cada dia que ens veiem. Gràcies per estar amb la Montse i estimar-la com es mereix. Sou els dos genials i us estimo. **Gemma**, ens coneixem des de fa molts anys i hem compartit moltes coses juntes. M'alegra molt tenir-te encara com amiga després de tant! T'admiro molt. Sempre has tingut uns objectius molt clars a la teva vida, i sempre has lluitat per aconseguir el que volies. Ets una lluitadora ☺. **Joan i Marta**, sou una parella tremenda i amb la **Blau** formeu una família preciosa. M'encanta poder compartir experiències junts i ara em fa molta il·lusió poder veure créixer la Blau. Gràcies per deixar-me formar part, en més o menys grau, de la vostra vida.

En un raconet especial, em vull dirigir a l'**Angie**. No podré agrair MAI tot el que has fet per a mi. Has estat al meu costat en els moments difícils i vull que sàpigues que estaré al teu costat sempre que em necessitis. T'estimo molt!

Per últim, només em queda agrair a la família tot el suport que m'han donat durant aquests anys. Sempre han confiat en les meves decisions, per molt complicades que fossin, i això m'ha fet créixer la confiança i m'ha fet ser la persona que soc. Ara em posaré tendre...**Mama**, ni jo em podia imaginar el que et trobo a faltar. No em vas veure ni començar la tesi i ja han passat 8 anys i aquí estic. Crec que estaries molt orgullosa de mi i em diries que d'on he sortit, que no m'assemblo a tu. Jo crec que cada cop m'assemblo més a tu. Amb el temps he sabut veure la dona que eres i lo poc que ens vam arribar a entendre. T'estimo. **Papa**, sempre he pensat que m'assemblo bastant a tu i que si sóc com sóc és en part "culpa" teva. T'agraeixo tot el que has fet per a que jo ara sigui com sóc. **David**, sé que encara no soc Honoris Causa però de mica en mica... :P Gràcies per ser el germà que ets i per haver madurat d'una vegada!!. **Avi i laia** sempre heu sigut el meu model a seguir i sempre he fet les coses pensant en que volia que us sentíssiu orgullosos de mi. Espero haver-ho aconseguit ni que sigui una mica. I si de debò ho esteu, penseu que ha sigut gràcies a vosaltres. Només vosaltres sabeu el que heu fet per a mi i estic molt orgullosa de que sigueu els

meus avis. Avi, només dir-te que m'hagués agradat moltíssim que m'haguessis vist aquest any...estaries tan content!

**Jeudiel**, Jeu, bubari!!! Tu ets el millor que m'ha passat. M'has fet adonar de tantes coses...m'has suavitzat el caràcter (tot i que encara falta...), m'has abraçat quan m'ha fet falta, has plorat amb mi quan jo he plorat (potser tu una mica més i tot...:P) i m'has donat l'esperança d'una vida completa al teu costat. Gràcies a tu tinc la il·lusió de fer-me gran...de compartir tota una vida amb tu, de formar una família amb tu. Perquè només tu m'has entès i m'has ajudat com ningú. Gràcies per voler compartir la vida amb mi, gràcies per voler estar al meu costat i per fer-me suport (ese suport!) sempre! T'estimo! Aishiteru!

