

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
Divisió III  
Facultat de Biologia

**MEDIADORES VASOACTIVOS PRODUCIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEALES DE  
PACIENTES CIRRÓTICOS. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS.**

Memoria presentada por  
**MARÍA DEL PILAR CEJUDO MARTÍN**  
para optar al título de Doctora en Bioquímica

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**, en el Laboratorio  
Hormonal del Hospital Clínic de Barcelona

M<sup>a</sup> del Pilar Cejudo Martín

Dr. Wladimiro Jiménez Povedano  
Director

Dra. María Dolores López Tejero  
Tutora

Tesis inscrita en el programa de doctorado *Bioquímica i Biología Molecular*, del  
departamento de Bioquímica i Biología Molecular, Divisió III, bienio 1997-1999

## ABREVIATURAS

ADM	Adrenomedulina
AMP	Adenosin monofosfato
BCLC-9	<i>Barcelona cancer liver cells-9</i>
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRLR	<i>Calcitonin-receptor-like receptor</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DPBS	Tampón salino fosfatado de <i>Dulbecco</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ET-1	Endotelina-1
FAK	<i>Focal adhesión kinase</i>
Flt-1	<i>fms-like tyrosine kinase 1</i>
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIF-1( $\alpha,\beta$ )	Factor inducible por hipoxia-1( $\alpha,\beta$ )
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
IL1 $\beta$	Interleuquina 1 $\beta$
IL6	Interleuquina 6
JNK	<i>c-Jun N-terminal protein kinase</i>
kDa	kiloDalton
KDR	<i>Kinase Domain Region</i>
LPS	lipopolisacárido
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
MTT	<i>3-[dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NO	Óxido nítrico
eNOS	Sintasa endotelial del óxido nítrico
NP	Neuropilina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBE	Peritonitis Bacteriana Espontánea
PBS	Tampón fosfato salino
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PSA	Persulfato de amonio
pVHL	Proteína <i>Von Hippel-Lindau</i>
RAMP	<i>Receptor-activity-modifying protein</i>
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Retrotranscripción
SHR	Síndrome hepatorenal
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	<i>N, N, N', N'-tetra methylethylenediamine</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPA	12-O-tetradecanoilforbol ester
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. CIRROSIS HEPÁTICA</b>	3
1.1. Definición. Clasificación.	3
1.2. Alteraciones hemodinámicas de la cirrosis.	5
1.2.1. Hipertensión portal.	5
1.2.2. Circulación hiperdinámica.	7
1.3. Ascitis.	8
1.3.1. Definición. Características.	8
1.3.2. Retención de sodio y agua.	9
1.3.3. Alteración de la función renal: síndrome hepatorenal.	10
1.4. Peritonitis bacteriana espontánea (PBE).	11
1.5. Hipoxia y cirrosis hepática.	13
1.6. Cirrosis hepática y sistema inmune.	14
<b>2. FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)</b>	16
2.1. Introducción.	16
2.2. Estructura y síntesis de VEGF.	16
2.3. Expresión de VEGF.	18
2.4. Regulación de la expresión de VEGF	18
2.4.1. Hipoxia.	18
2.4.1.1. Factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1).	18
2.4.2. Hormonas y citoquinas.	20
2.4.3. Diferenciación y transformación	22
2.5. Receptores de VEGF.	23
2.5.1. Receptores tirosina quinasa VEGFR1 y VEGFR2.	23
2.5.2. Neuropilinas (NP).	25
2.6. Funciones del VEGF.	26
2.6.1. Efectos biológicos del VEGF en células endoteliales.	26
2.6.1.1. Supervivencia y anti-apoptosis.	27
2.6.1.2. Proliferación.	28
2.6.1.3. Migración.	28
2.6.1.4. Producción de óxido nítrico (NO).	29
2.6.1.5. Regulación génica, y expresión de proteínas y otros factores	29
2.6.2. Angiogénesis.	30
2.6.2.1. Vasculogénesis y angiogénesis fisiológica	30
2.6.2.2. Angiogénesis patológica	31
2.6.3. Permeabilidad	32

2.6.4. Vasodilatación.	34
2.6.5. Otras funciones del VEGF.	35
2.7. VEGF y fagocitos mononucleares.	35
2.8. VEGF y cirrosis hepática.	37
3. ADRENOMEDULINA (ADM)	39
3.1. Introducción.	39
3.2. Estructura y síntesis de la ADM	39
3.3. Expresión de la ADM.	40
3.4. Regulación de la expresión de ADM.	41
3.4.1. <i>In vivo</i> .	41
3.4.2. <i>In vitro</i> .	42
3.5. Receptores y transducción de señal.	43
3.6. Efectos biológicos.	45
3.6.1. Vasodilatación.	45
3.6.2. Crecimiento y desarrollo celular.	46
3.6.3. Efectos endocrinos.	46
3.6.4. Efectos renales.	47
3.6.5. Otras funciones de la ADM.	47
3.7. ADM y fagocitos mononucleares.	48
3.8. ADM y cirrosis hepática.	49
<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	57
1.1. Obtención de líquido ascítico.	57
1.2. Obtención de sangre.	57
1.2.1. Obtención de sangre para aislamiento de monocitos.	57
1.2.2. Obtención de plasma.	57
1.2.3. Obtención de suero.	58
1.3. Biopsias.	58
1.4. Lavados peritoneales de individuos sanos.	58
2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS.	58
2.1. Obtención de macrófagos peritoneales mediante adhesión.	58
2.2. Obtención de macrófagos peritoneales/monocitos mediante centrifugación en gradiente.	59

3. CULTIVOS CELULARES.	61
3.1. Contaje de células.	62
3.2. Cultivo de macrófagos peritoneales y de monocitos humanos.	62
3.2.1. Cultivo basal de macrófagos peritoneales y de monocitos humanos	62
3.2.2. Diferenciación con TPA.	63
3.2.3. Cultivo con citoquinas y LPS.	63
3.2.4. Cultivo con cicloheximida.	64
3.2.5. Cultivo con actinomicina D.	64
3.2.6. Cultivo en hipoxia.	64
3.3. Mantenimiento de HUVEC, BAEC y células BCLC-9.	65
3.3.1. Gelatinización.	65
3.3.2. Descongelación.	65
3.3.3. Congelación.	66
4. RNA	66
4.1. Tratamiento de agua destilada con DEPC.	66
4.2. Extracción de RNA mediante gradiente de cloruro de cesio.	67
4.3. Extracción de RNA con kit comercial.	68
4.4. Digestión con DNAasa.	68
4.5. Valoración de RNA.	68
4.6. <i>Northern blot</i> .	68
4.7. Retrotranscripción (RT).	72
4.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	73
4.9. Electroforesis en gel de agarosa.	76
4.10. Secuenciación de DNA.	77
5. PROTEINAS	77
5.1. Extracción de proteínas nucleares.	77
5.2. Valoración de proteínas.	78
5.3. <i>Western blot</i> .	78
6. TINCIONES E INMUNOCITOQUÍMICA	81
6.1. Preparaciones celulares por citocentrifugación.	81
6.2. Sembrado de macrófagos peritoneales para inmunocitoquímica.	81
6.3. Tinción Giemsa.	82
6.4. Inmunocitoquímica VEGF.	82
7. ENSAYOS CON CÉLULAS ENDOTELIALES	85
7.1. Ensayo de proliferación endotelial.	85

7.2. Ensayo de liberación de óxido nítrico (NO) por células endoteliales.	86
<b>8. DETERMINACIONES</b>	<b>87</b>
8.1. Determinación de ADM.	87
8.2. Determinación de ET-1.	87
8.3. Determinación de VEGF.	88
8.4. Determinación de óxido nítrico (NO).	88
8.5. Determinación de la concentración de oxígeno de la ascitis.	89
8.6. Determinación de parámetros bioquímicos.	89
<b>9. ESTADÍSTICA</b>	<b>89</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>91</b>
Artículo 1: Producción de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos: regulación por citoquinas y lipopolisacárido bacteriano.	93
<i>Vascular Endothelial Growth Factor Production in Peritoneal Macrophages of Cirrhotic Patients: Regulation by Cytokines and Bacterial Lipopolysaccharide</i>	97
Artículo 2: Los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con peritonitis bacteriana espontánea presentan un incremento en la producción de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.	105
<i>Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor in Peritoneal Macrophages of Cirrhotic Patients With Spontaneous Bacterial Peritonitis</i>	109
Artículo 3: La hipoxia induce la síntesis de agentes vasodilatadores en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos.	117
<i>Hypoxia Is an Inducer of Vasodilator Agents in Peritoneal Macrophages of Cirrhotic Patients</i>	123
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>145</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Factores estimuladores de la síntesis de VEGF <i>in vitro</i>	21
Tabla 2: Factores estimuladores de la expresión de VEGF <i>in vitro</i> por fagocitos Mononucleares o líneas celulares derivadas.	37
Tabla 3: Citoquinas, hormonas y otros factores que estimulan la síntesis de ADM <i>in vitro</i> .	42
Tabla 4: Características de los cebadores y de las PCR utilizados.	74

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Cambios histológicos que experimenta el hígado en el proceso de formación de cirrosis.	4
Figura 2: Patogénesis de la peritonitis bacteriana espontánea en la cirrosis.	12
Figura 3: Estructura exónica del mRNA de VEGF.	17
Figura 4: Regulación de HIF1 por la tensión de oxígeno.	20
Figura 5: Características de los receptores de VEGF.	24
Figura 6: Esquema de las funciones del VEGF.	27
Figura 7: Procesamiento del mRNA de ADM y de la preproADM.	40
Figura 8: Papel de las proteínas RAMP1 y 2 y CRLR como generadores de los receptores de CGRP y de ADM.	44

## 1. CIRROSIS HEPÁTICA.

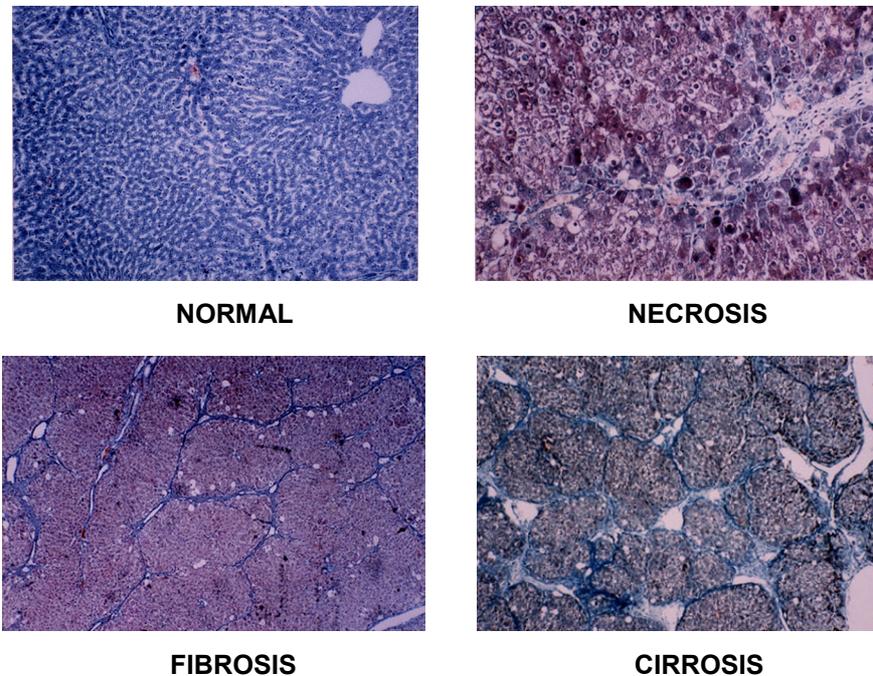
### 1.1. Definición. Clasificación.

Según la Organización Mundial de la Salud, la cirrosis hepática se define como un proceso difuso caracterizado por fibrosis y la conversión de la arquitectura normal del hígado en nódulos estructuralmente anómalos (Anthony et al., 1977). La cirrosis hepática representa el estadio final de varias enfermedades crónicas del hígado de diversa etiología, entre las cuales las más frecuentes son las de naturaleza tóxico-nutricional – hepatitis por abuso del alcohol - o de naturaleza viral -infección por los virus de la hepatitis B o C-. Otras causas menos frecuentes son la enfermedad de Wilson, la hemocromatosis idiopática, la deficiencia en la  $\alpha$ 1 antitripsina, la hepatitis autoinmune y la esteatohepatitis no alcohólica. Además, existe un cierto número de casos en los que se desconoce la etiología. En este caso se denomina cirrosis criptogénica (Erlinger and Benhamou, 1999).

En la figura 1 aparece un esquema de los cambios histológicos que experimenta el hígado durante el proceso de formación de cirrosis. La primera fase del proceso es la consecuencia de un daño hepático persistente que causa necrosis hepatocelular. La necrosis da lugar a un proceso de inflamación seguido de regeneración hepática. Si el daño continúa, el proceso de regeneración deriva en cambios en la formación, composición y degradación de la matriz extracelular del hígado, que se traducen en una excesiva formación de matriz extracelular, en un fenómeno denominado fibrosis. El exceso de matriz se acumula en la zona perisinusoidal, y provoca el desarrollo de una membrana basal subendotelial en los sinusoides. Esto da lugar a la aparición de barreras de difusión al oxígeno y los nutrientes, y, por tanto, causa malnutrición y muerte de los hepatocitos. Esta necrosis hepatocelular, a su vez, actúa de estímulo para la formación de más matriz extracelular, estableciéndose un círculo vicioso que en último término origina la aparición generalizada de pseudolóbulos, que alteran la arquitectura normal lobular y vascular del hígado. Esta fase final es la conocida como cirrosis (Erlinger and Benhamou, 1999).

La cirrosis hepática se puede clasificar siguiendo criterios morfológicos, etiológicos, según el grado de evolución y actividad de la enfermedad y de acuerdo a las complicaciones clínicas que presenta. Según este último punto, la cirrosis se puede clasificar en compensada y descompensada. Se habla de cirrosis compensada cuando se desarrolla sin originar ningún síntoma. En este caso puede ser descubierta mediante un examen clínico o bioquímico rutinario, durante alguna operación

quirúrgica del área abdominal o en la autopsia. Se estima que alrededor del 30-40% de los casos de cirrosis son asintomáticos (Conn HO and Atterbury CE, 1987). En cambio, tras la aparición de ictericia, encefalopatía, ascitis o hemorragias digestivas, la cirrosis pasa a denominarse descompensada.



**Figura 1: Cambios histológicos que experimenta el hígado en el proceso de formación de cirrosis.** En presencia de determinados hepatotóxicos como el alcohol o la infección por el virus de la hepatitis B o C se origina un daño hepático que da lugar a necrosis hepatocelular. Si el agente dañante persiste, hay un exceso de producción de matriz extracelular que da lugar a la aparición de fibrosis, y en último término, a la formación de nódulos que alteran la estructura normal hepática en la fase denominada cirrosis. (Tricrómico de Masson) (Giménez, 1992)

En los últimos años, el incremento del transplante de hígado como opción en el tratamiento de enfermedades hepáticas graves ha hecho necesario el uso de criterios con objeto de clasificar a los pacientes de acuerdo a su pronóstico de la manera más exacta posible. El primer intento de clasificación fue propuesto por Child y Turcotte (Child and Turcotte, 1964), y posteriormente fue revisado por Campbell (Campbell et al., 1973). Esta clasificación es útil para el pronóstico a corto plazo y clasifica en tres grupos –A, B y C- a los enfermos cirróticos según tengan un pronóstico bueno, intermedio o malo, respectivamente. Los enfermos se clasifican teniendo en cuenta el estado de cinco variables: albúmina, bilirrubina, presencia y grado de ascitis, presencia y grado de encefalopatía y estado nutricional. La modificación más relevante que ha tenido esta clasificación es la de Pugh (Pugh et al., 1973), que sustituyó el estado nutricional por el tiempo de protrombina, de valoración más objetiva. Esta clasificación valora de 1 a 3 cada variable según el grado de alteración de las mismas, y la suma de

que pertenece el enfermo. De acuerdo a esta clasificación, los pacientes cirróticos pertenecen al grupo A si tienen una puntuación 5 o 6, al grupo B si tienen 7, 8 o 9 puntos, y al grupo C si tienen entre 10 y 15 puntos.

## **1.2. Alteraciones hemodinámicas de la cirrosis.**

Una de las consecuencias más relevantes de la desaparición de la estructura normal hepática que tiene lugar en la cirrosis es la aparición de anomalías circulatorias. Las alteraciones más características son la hipertensión portal y el síndrome de circulación hiperdinámica.

### **1.2.1. Hipertensión portal.**

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente en la cirrosis hepática. Se define como el aumento patológico de la presión hidrostática en el territorio venoso portal. Como consecuencia, el gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava aumenta por encima de los valores normales (1-5 mm Hg). Cuando el gradiente de presión portal alcanza valores de 10-12 mm Hg pueden aparecer complicaciones, como son las varices gastroesofágicas o la ascitis, por lo que a partir de este valor se considera que la hipertensión portal es clínicamente significativa. (Bosch and García-Pagán, 1999).

El aumento de la presión portal en cualquier circunstancia puede deberse a dos factores: el aumento de la resistencia vascular intrahepática y el aumento del flujo sanguíneo hepático. En la cirrosis hepática, la causa inicial del aumento de la presión portal es el incremento en la resistencia vascular intrahepática.

El aumento de la resistencia vascular intrahepática en la cirrosis es debido a dos factores (Rockey, 2003):

- a) Mecánico o pasivo. Causado por el exceso de matriz extracelular y la formación de nódulos, que obstruyen y comprimen las estructuras vasculares intrahepáticas. Este factor es responsable del 70-80% del incremento en la resistencia vascular intrahepática.
- b) Activo. Debido a la acción predominante de factores vasoconstrictores sobre vasodilatadores en las vénulas portales terminales, en las vénulas hepáticas y, sobre todo, en los sinusoides. Este punto es responsable del 20-30% del incremento en la resistencia vascular intrahepática (Bhathal and Grossman, 1985).

En estos dos puntos, las células de Ito (también denominadas células estrelladas o lipocitos) parecen tener un papel clave. Estas células son pericitos sinusoidales localizados en el espacio de Disse y que tienen extensiones que rodean las células endoteliales sinusoidales. Su función es regular el tono del sinusoides en respuesta a factores vasoconstrictores o vasodilatadores liberados, sobre todo, por las células endoteliales sinusoidales. En condiciones normales, las células de Ito se encuentran en un estado quiescente. Sin embargo, en la cirrosis este tipo celular se activa y experimenta una serie de cambios: prolifera, incrementa sus propiedades contráctiles (Rockey and Weisiger, 1996), aumenta la expresión de  $\alpha$  actina y otras proteínas características de células del músculo liso vascular. Con un fenotipo activado, las células de Ito incrementan la síntesis de sustancias vasoconstrictoras y profibrogénicas, que actúan de manera autocrina sobre ellas, contrayéndose y aumentando la síntesis de matriz extracelular (Pinzani et al., 1996).

La aparición de hipertensión portal en la cirrosis origina la aparición de vasos colaterales que derivan la sangre portal a la circulación sistémica evitando el paso a través del hígado. Las colaterales portosistémicas más relevantes clínicamente son las varices gastroesofágicas, ya que las hemorragias ocasionadas por su ruptura son una de las causas principales de muerte en la cirrosis (García-Pagán and Bosch, 1999).

Aunque la causa inicial de la hipertensión portal en la cirrosis sea el aumento de la resistencia vascular intrahepática, en la cirrosis avanzada se produce un aumento del flujo sanguíneo en el sistema venoso portal que mantiene y agrava la hipertensión portal (Vorobioff et al., 1984). Este aumento del flujo portal es consecuencia de una marcada vasodilatación arteriolar que tiene lugar en los órganos del área esplácnica que drenan a la vena porta.

La vasodilatación arteriolar esplácnica es un fenómeno secundario a la hipertensión portal. Los mecanismos que llevan a su aparición no están bien definidos, pero se cree que en su aparición estarían implicados factores vasodilatadores endocrinos que actuarían de manera selectiva en la circulación esplácnica, además de la síntesis local de factores vasodilatadores paracrinos y una disminución de la respuesta a factores vasoconstrictores en esta zona.

Entre los factores endocrinos que podrían estar implicados en la vasodilatación arteriolar están el glucagón, el péptido vasoactivo intestinal (McNicol et al., 1993), la sustancia P, el CGRP (*calcitonin gene related peptide*) (Bendtsen et al., 1991; Gupta et al., 1992; Moller et al., 1996b), la adrenomedulina (Guevara et al., 1998) y la anandamida (Ros et al., 2002).

Entre los factores paracrinos, cabe destacar el efecto del NO (óxido nítrico) en el área esplácnica. En la cirrosis, existe un incremento en la vasodilatación inducida

por NO respecto a la encontrada en individuos sanos (Albillos et al., 1995; Claria et al., 1994). Estudios en modelos experimentales han demostrado un incremento de las síntesis del óxido nítrico inducible y endotelial en arterias mesentéricas durante la cirrosis (Martin et al., 1996; Morales-Ruiz et al., 1996). Además, la administración de inhibidores de la síntesis de NO en diferentes modelos de ratas con hipertensión portal da lugar a una vasoconstricción sistémica y esplácnica significativa, atenuando el síndrome de circulación hiperdinámica (Ver punto 1.2.2.) de estos animales (Niederberger et al., 1995; Pizcueta et al., 1992). También se ha encontrado un aumento en los niveles de prostaciclina y de CO (monóxido de carbono) en las venas portales, y en la circulación esplácnica de ratas con hipertensión portal (Fernandez et al., 2001; Hamilton et al., 1982).

Finalmente, en la cirrosis, el aumento de la síntesis de vasodilatadores, sobre todo NO, está implicado en la hiporespuesta de los vasos a la acción de vasoconstrictores. (Castro et al., 1993; Sieber et al., 1993).

### **1.2.2. Circulación hiperdinámica.**

Los pacientes cirróticos presentan una disfunción circulatoria denominada síndrome de circulación hiperdinámica, caracterizada por disminución de las resistencias vasculares periféricas, hipervolemia, aumento del gasto cardíaco, e hipotensión. Este síndrome aparece en las fases iniciales de la cirrosis, y aumenta de intensidad a medida que avanza la enfermedad hepática (Blendis and Wong, 2001; Moller and Henriksen, 1999).

La causa inicial de este síndrome es la vasodilatación de las arteriolas del área esplácnica, secundaria a la hipertensión portal. Como consecuencia de la vasodilatación en la zona esplácnica, aparece una hipovolemia arterial efectiva, ya que el volumen sanguíneo no es capaz de llenar el árbol vascular. Para intentar corregir este fenómeno y mantener la presión arterial dentro de los valores normales, tiene lugar la retención renal de sodio y agua (indetectable clínicamente al principio y más marcada a medida que avanza la enfermedad), que causan un aumento del volumen sanguíneo y del gasto cardíaco.

En fases más avanzadas de la enfermedad, cuando los pacientes ya han desarrollado ascitis (ver punto 1.3), la vasodilatación arterial esplácnica es tan importante que la hipervolemia y el aumento del gasto cardíaco no bastan para normalizar la presión arterial. En esta fase la homeostasia circulatoria se mantiene por la estimulación de los sistemas renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nervioso simpático y la hipersecreción no osmótica de aldosterona, con acción vasoconstrictora.

Sin embargo, la activación de estos sistemas causa la retención continuada de sodio y agua por el riñón que causan a su vez la formación de ascitis.

La expresión más extrema del trastorno circulatorio arterial se observa en los pacientes cirróticos con síndrome hepatorenal (punto 1.3.3). Estos pacientes presentan hipotensión arterial y frecuencia cardíaca alta a pesar de tener hipervolemia, elevado gasto cardíaco, concentraciones elevadas de renina, noradrenalina y ADH e intensa vasoconstricción renal, cutánea y muscular.

### **1.3. Ascitis.**

#### **1.3.1. Definición. Características.**

La ascitis se define como la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal. La aparición de ascitis es una de las complicaciones más frecuentes de la cirrosis hepática, y está asociada a un mal pronóstico. En pacientes cirróticos compensados, la tasa acumulativa de aparición de ascitis en 5 años es del 30%. Una vez ha aparecido la ascitis, la tasa de supervivencia a un año es del 50%, mientras que en pacientes con cirrosis compensada es superior al 90% (Gines et al., 1987). El pronóstico es especialmente malo para los pacientes que desarrollan ascitis refractaria o síndrome hepatorenal (Garcia-Tsao, 2001).

Aunque no hay trabajos concluyentes, existen diferentes estudios que sugieren que en la cirrosis hepática, el líquido ascítico procede de un exceso de líquido intersticial extravasado del hígado y de los capilares espláncnicos, que no puede ser drenado por los capilares linfáticos. En la cirrosis, la ascitis es un líquido de color amarillo-ámbar, cuyo volumen puede variar entre 500 ml y varios litros. El líquido ascítico en la cirrosis tiene menor cantidad de proteínas que el líquido peritoneal presente en sujetos sanos (menos de 2,5 g/dl respecto a 4,2 g/dl), aunque puede variar de 0.5 g/dl a 6 g/dl según las características individuales de cada paciente. En la ascitis también se encuentran presentes células procedentes de la sangre y células mesoteliales descamadas de la superficie peritoneal. La concentración de leucocitos del líquido ascítico de los pacientes cirróticos se sitúa entre 300 y 500 células/ $\mu$ l, sin embargo se calcula que entre un 10 y un 15 por ciento de los pacientes pueden tener más de 500 células/ $\mu$ l, y un 5% más de 1000 células/ $\mu$ l. De estos leucocitos, más del 70% son leucocitos mononucleares. En cambio, durante un episodio de peritonitis bacteriana espontánea (ver punto 1.4) la concentración de leucocitos es mayor de 500 células/ $\mu$ l, y con frecuencia mayor de 2000 células/ $\mu$ l, y más del 70% son neutrófilos (Arroyo et al., 1999b).

Los factores implicados en la formación de ascitis en la cirrosis hepática comprenden trastornos de la función renal, las alteraciones en la hemodinámica sistémica y factores locales de la circulación hepática y esplácnica relacionados con la existencia de hipertensión portal. De estos, los trastornos de la función renal aparecen de manera progresiva y son, por orden de aparición, la retención de sodio, la retención de agua y la reducción del filtrado glomerular.

### **1.3.2. Retención de sodio y agua.**

La retención de sodio es la alteración renal más frecuente en los pacientes cirróticos con ascitis. Cuando la cirrosis es compensada, se pueden detectar pequeños episodios de retención de sodio, que se hacen más acusados a medida que la enfermedad progresa, hasta que se llega a un punto en que los pacientes son incapaces de excretar la cantidad de sodio consumida. En pacientes cirróticos se desconoce la relación cronológica entre el deterioro de la excreción renal de sodio y la aparición de ascitis. Sin embargo, en animales de experimentación quedó demostrado que la retención de sodio precede de forma constante la aparición de ascitis (Jimenez et al., 1985; Lopez-Novoa et al., 1980), y, por tanto, es causa y no consecuencia de la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal.

En la mayoría de pacientes cirróticos, la retención de sodio se debe a un aumento en la reabsorción tubular de este ión, en presencia de un filtrado glomerular normal o ligeramente reducido (Arroyo et al., 1999a).

A pesar de que se han hecho numerosos estudios para determinar los mecanismos implicados en la patogenia de la retención de sodio en la cirrosis, estos aún no se conocen completamente. Probablemente la causa de esta situación esté en que el mecanismo que causa un incremento en la reabsorción tubular de sodio es multifactorial. Entre los sistemas más estudiados se encuentran los sistemas vasoconstrictores y antinatriuréticos sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema nervioso simpático, que promueven la reabsorción tubular de sodio (Bernardi et al., 1994; Henriksen and Ring-Larsen, 1994).

La alteración de la capacidad renal de excretar agua también es frecuente en la cirrosis. Aparece siempre con posterioridad a la retención de sodio y está relacionada con una hipersecreción de la hormona antidiurética (Arroyo et al., 1994; Bichet et al., 1982).

### **1.3.3. Alteración de la función renal: síndrome hepatorenal.**

El trastorno renal más grave de los pacientes cirróticos con ascitis es el síndrome hepatorenal (SHR). Aparece cuando la enfermedad está muy avanzada y se caracteriza por un aumento de las concentraciones séricas de BUN (*blood urea nitrogen*) y creatinina y oliguria en ausencia de causas conocidas que justifiquen el desarrollo de insuficiencia renal. La causa inmediata de este síndrome es una vasoconstricción renal de origen multifactorial que determina un descenso del flujo sanguíneo renal y del filtrado glomerular (Arroyo et al., 2002).

De acuerdo a la intensidad y forma de presentación del fallo renal, el SHR se clasifica en dos tipos. El SHR de tipo 1 se caracteriza por la aparición de fallo renal severo y progresivo, que ha sido definido por el aumento de la concentración sérica de creatinina por encima de 2.5 mg/dl en menos de dos semanas. Aunque puede aparecer de manera espontánea, la aparición de este tipo de SHR está relacionada con algún factor desencadenante como pueden ser una infección bacteriana severa, hemorragia gastrointestinal, procedimientos quirúrgicos severos, o una hepatitis aguda. Además, ha sido relacionado con la PBE (punto 1.4) (Follo et al., 1994; Navasa et al., 1998; Toledo et al., 1993). El SHR de tipo 1 aparece en el 30% de pacientes con PBE, a pesar de que la infección haya sido rápidamente resuelta por el uso de antibióticos no nefrotóxicos. Los pacientes con una respuesta inflamatoria elevada (altos niveles de neutrófilos) y concentraciones elevadas de citoquinas en plasma y ascitis son especialmente sensibles a desarrollar SHR de tipo 1. Además del fallo renal, los pacientes con SHR de tipo 1 post-PBE tienen insuficiencia hepática severa y disfunción circulatoria marcada (hipotensión arterial, niveles plasmáticos muy elevados de renina y norepinefrina) que están asociados a un empeoramiento de la insuficiencia renal (Navasa et al., 1998). En la cirrosis hepática, el SHR de tipo 1 es la complicación con peor pronóstico, con una mediana de supervivencia tras su aparición de 2 semanas (Llach et al., 1988).

El SHR de tipo 2 se caracteriza por una disminución moderada y estable de la función renal, con una concentración de creatinina sérica inferior a 2.5 mg/dl. Los pacientes con este tipo de síndrome muestran signos de fallo hepático e hipotensión arterial pero de menor grado que los pacientes cirróticos con SHR de tipo 1. Los pacientes con SHR de tipo 2 son especialmente sensible a desarrollar el SHR de tipo 1 tras un factor desencadenante. La mediana de supervivencia de estos pacientes es mejor que la de los de los afectados de SHR de tipo 1 (6 meses), pero más baja que la de pacientes cirróticos con ascitis sin SHR (Rodes et al., 1975).

#### **1.4. Peritonitis bacteriana espontánea (PBE).**

La peritonitis bacteriana espontánea se define como la infección del líquido ascítico en ausencia de focos de infección intra-abdominales aparentes. La PBE es la complicación infecciosa más característica de la cirrosis hepática. Su prevalencia en pacientes cirróticos con ascitis admitidos en centros hospitalarios se sitúa entre el 10 y el 30% (Rimola and Navasa, 1999). Además, la prevalencia de PBE es especialmente alta en enfermos que han superado un episodio anterior de PBE (Altman et al., 1995; Tito et al., 1988). La tasa de resolución de la PBE se sitúa entre el 70% y el 90%, y la supervivencia hospitalaria de estos enfermos está entre el 50 y el 70% de los casos (Rimola and Navasa, 1999).

El diagnóstico de la PBE se establece cuando la concentración de neutrófilos en líquido ascítico es superior a 250/ $\mu$ l. Aproximadamente en un 60-70% de los casos la bacteria responsable de la PBE es identificada mediante el cultivo de líquido ascítico o de sangre. El resto de casos se consideran variantes de la PBE y se tratan de la misma manera que cuando el cultivo es positivo (Fernandez et al., 2000).

La patogénesis de la PBE no está clara. La hipótesis más aceptada es la de la colonización del líquido ascítico tras un episodio de bacteremia (Figura 2) (Rimola and Navasa, 1999; Runyon et al., 1994). Aunque no se ha demostrado nunca el paso de microorganismos de la sangre al líquido ascítico, se asume que una vez las bacterias han pasado a la circulación podrían acceder fácilmente a la cavidad peritoneal debido al constante intercambio de fluidos que hay entre los dos compartimentos. Una vez las bacterias pasan de la sangre al líquido ascítico, el desarrollo de la PBE depende de la capacidad de defensa de la ascitis.

La gran mayoría de microorganismos causantes de PBE son bacterias gram negativas de origen entérico. Debido a este motivo se han propuesto diversos mecanismos patogénicos para explicar el paso de bacterias del lumen intestinal a la circulación sanguínea:

- a) El sobrecrecimiento de bacilos gram negativos de la flora yeyunal y alteraciones en la permeabilidad intestinal que tienen lugar en los pacientes cirróticos favorecerían el paso de los microorganismos entéricos a la sangre (Casafont et al., 1996; Perez-Paramo MP et al., 2000).
- b) La depresión del sistema retículo-endotelial hepático en los pacientes cirróticos hace que tenga menor capacidad fagocítica, permitiendo el paso de bacterias intestinales a la circulación sistémica a través de la vena porta (Bolognesi et al., 1994; Rimola et al., 1984).

- c) El incremento en la translocación bacteriana, mediante la cual las bacterias presentes en la luz intestinal cruzan la mucosa e infectan los nódulos linfáticos mesentéricos, de donde pasan a la circulación linfática intestinal y de aquí a la sangre (Cirera et al., 2001; Garcia-Tsao et al., 1995; Llovet et al., 1994; Perez-Paramo MP et al., 2000).

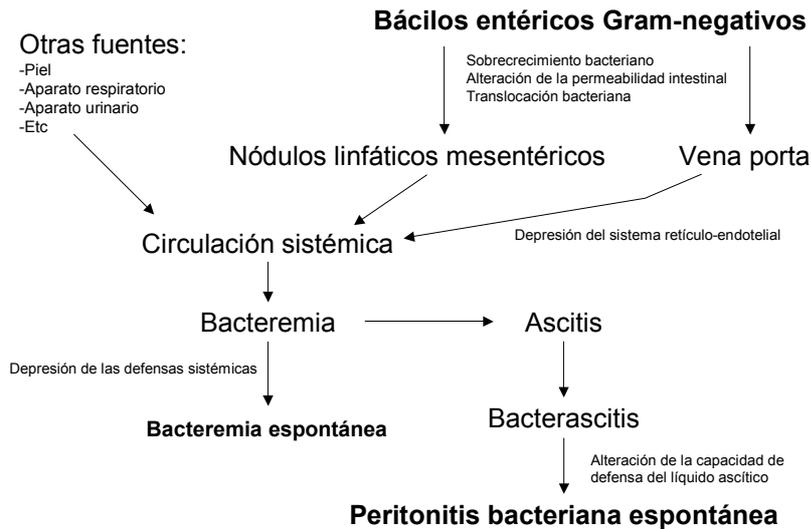


Figura 2: Patogénesis de la peritonitis bacteriana espontánea en la cirrosis (Fernández et al, 2000).

En cuanto a las PBE originadas por bacterias no entéricas se cree que la piel, el tracto urinario y el tracto respiratorio superior son las principales vías de entrada (Fernandez et al., 2000).

El pronóstico de la PBE ha mejorado considerablemente en los últimos 30 años. En 1970 la mortalidad debida a la PBE alcanzaba el 80-90% de los casos. La estandarización de los criterios diagnósticos, la práctica rutinaria de la paracentesis diagnóstica, y el uso de cefalosporinas de tercera generación han sido factores claves en esta mejora. Sin embargo, aunque la mayoría de los casos tratados de PBE son resueltos satisfactoriamente, un número significativo de pacientes desarrollan complicaciones asociadas a la infección, como encefalopatía hepática, choque séptico o fallo renal, que desemboca en algunos casos en síndrome hepatorenal y en la muerte. Alrededor de un tercio de pacientes con PBE desarrolla insuficiencia renal, de los cuales es transitoria, estable y progresiva en un 25%, 33% y 42% de los casos,

respectivamente (Follo et al., 1994). Además, este estudio demostró que la presencia de fallo renal fue un potente factor pronóstico de supervivencia, ya que el 42% de los pacientes con fallo renal fallecieron (el 100% con fallo renal progresivo), frente al 7% de pacientes que no desarrollaron insuficiencia renal. Aunque se desconocen las causas exactas que desencadenan el fallo renal tras un episodio de PBE, se ha encontrado asociación entre el grado de respuesta inflamatoria, reflejado en la concentración de  $TNF\alpha$  e IL6 en plasma y ascitis, de estos pacientes en el momento de diagnóstico de la PBE, y la aparición de fallo renal y la mortalidad tras la resolución de la PBE (Navasa et al., 1998).

### **1.5. Hipoxia y cirrosis hepática.**

Desde hace más de 100 años la cirrosis hepática ha sido relacionada con alteraciones en la actividad pulmonar (Fluckiger, 1884). El origen de las anomalías de la función pulmonar en pacientes con enfermedad hepática avanzada puede estar asociado a la patogenia de enfermedades hepáticas específicas (deficiencia en  $\alpha$ 1 antitripsina, cirrosis biliar primaria), a anomalías en la vasculatura pulmonar o a la retención de fluidos (ascitis y/o hidrotorax) que tiene lugar en las cirrosis descompensadas (Fallon and Abrams, 2000).

La alteración de la función pulmonar más frecuente en los enfermos cirróticos es la limitación de la difusión del oxígeno del interior del alveolo a la sangre del capilar debido a la vasodilatación anormal de los capilares pulmonares. Esta vasodilatación impide que el oxígeno procedente de los alveolos pulmonares oxigene totalmente las moléculas de hemoglobina que pasan por los capilares pulmonares, originando la aparición de hipoxemia. Las causas de la vasodilatación pulmonar que aparece en la cirrosis no están bien establecidas, pero estudios en pacientes y en modelos animales han sugerido que el NO podría estar implicado (Fallon et al., 1997; Matsumoto et al., 1995; Rolla et al., 1997). A su vez, estudios con un modelo experimental de cirrosis sugieren que la endotelina-1 también podría tener un papel en este fenómeno, estimulando la síntesis de NO por la eNOS mediante su unión a los receptores  $ET_B$  presentes en el endotelio de los capilares pulmonares (Fallon and Abrams, 2000; Zhang et al., 1999).

El estudio de estas alteraciones ha revelado que tienen lugar únicamente en el contexto de la enfermedad hepática y han llevado a la definición de síndrome hepatopulmonar. Este síndrome está caracterizado por la presencia de enfermedad hepática, vasodilatación intrapulmonar e incremento en el gradiente de oxígeno entre

el alveolo y la sangre arterial en ausencia de enfermedad cardiopulmonar (Krowka and Cortese, 1990; Rodriguez-Roisin et al., 1992; Rodriguez-Roisin and Roca, 1997).

A pesar de los estudios realizados en este campo, las alteraciones en la función pulmonar y en la oxigenación en la cirrosis todavía no están bien establecidas. Solamente entre el 8% y el 14% de los pacientes cirróticos presentan síndrome hepatopulmonar. En cambio, se calcula que hasta un tercio de los mismos presentan hipoxemia (Agusti et al., 1990; Moller et al., 1998; Vachiery et al., 1997). Todos estos trabajos coinciden en que la presencia de hipoxemia es más frecuente, y más acusada, a medida que la cirrosis es más severa.

La disminución de los niveles de oxígeno sanguíneos en los pacientes cirróticos tienen consecuencias a nivel tisular y hemodinámico. Por ejemplo, los pacientes con cirrosis avanzada (Child-Pugh B y C) presentan incremento en los niveles de lactato arteriales y una oxigenación tisular anormal debido a una disminución en la captación de oxígeno por los tejidos (Moreau et al., 1988; Tietge et al., 2001). A nivel hemodinámico, la inhalación de 100% oxígeno en pacientes con cirrosis causó disminución del gasto cardíaco y de las catecolaminas circulantes, y un incremento en las resistencias vasculares periféricas (Moller et al., 1996a).

La presencia de líquido ascítico en la cavidad abdominal contribuye a las alteraciones de la función pulmonar presentes en la cirrosis. Un gran volumen de ascitis puede ejercer una presión hacia arriba en el diafragma, dificultando la función ventilatoria y causando alteraciones en el intercambio gaseoso pulmonar. Por tanto, la eliminación de la ascitis mediante el uso de diuréticos o por paracentesis mejora la función pulmonar de los enfermos cirróticos (Chang et al., 1997; Chao et al., 1994).

## **1.6. Cirrosis hepática y sistema inmune.**

El desarrollo de la cirrosis hepática está asociado a la activación y/o alteración del sistema inmune, que a su vez puede participar en la progresión de la enfermedad.

En términos generales, los pacientes cirróticos presentan una depresión de la capacidad fagocítica del sistema retículo endotelial (Bolognesi et al., 1994; Rimola et al., 1984), de los neutrófilos (Garcia-Gonzalez et al., 1993; Lebrun et al., 1992) y de los macrófagos (Guarner and Runyon, 1995), disminución de la capacidad opsónica del líquido ascítico (Runyon, 1988), pero una activación crónica de la respuesta inmune que se refleja en la presencia de hipergammaglobulinemia (Prytz and Bjorneboe, 1973; Rong et al., 1984; Triger and Wright, 1973) y en un incremento en los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias (Albillos et al., 2003b; Byl et al., 1993; Lee et al., 1996; Navasa et al., 1998).

Las causas de la activación crónica del sistema inmune en la cirrosis hepática parecen estar en la acción de citoquinas proinflamatorias y mediadores de fase aguda liberados por los hepatocitos y células hepáticas no parenquimales (Baumann and Gauldie, 1994; Volpes et al., 1992), así como en la presión ejercida por el incremento en los niveles circulantes de endotoxina bacteriana procedente de bacterias entéricas (Albillos et al., 2003b; Garcia-Tsao et al., 1995).

En la cirrosis hepática, los monocitos y macrófagos han sido objeto continuo de estudio, debido al aumento de la susceptibilidad de los pacientes cirróticos a infecciones bacterianas y a que éstas son las principales células diana para la acción de la endotoxina. Los monocitos de pacientes cirróticos presentan indicios de estar en un estado de activación constante, como se refleja en el hecho de estar en mayor número en estos pacientes que en sujetos sanos, en tener un mayor número de moléculas presentadoras de antígeno y de coestimulación (Albillos et al., 2003a), mayor producción espontánea de  $\text{TNF}\alpha$  (Albillos et al., 2003a; Sato et al., 1996), mayor expresión génica de receptores para el  $\text{TNF}\alpha$  (Hanck et al., 2000), y de LFA-3 (*lymphocyte adhesion molecule-3*) (Luna-Casado et al., 1997). Además, tanto los monocitos de ratas con hipertensión portal como los de pacientes cirróticos presentan una mayor sensibilidad a la endotoxina que los de individuos control, y sintetizan una mayor cantidad de  $\text{TNF}\alpha$  tras la incubación con LPS (Albillos et al., 2003a; Deviere et al., 1990; Perez et al., 2000; Schafer et al., 1995), así como de  $\text{IL1}\beta$  e  $\text{IL6}$  (Deviere et al., 1990). Este fenómeno también se observó en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos (Jimenez et al., 1999).

El hecho de que los fagocitos mononucleares sean las principales células diana de la respuesta al LPS sugiere que, en el contexto de la cirrosis hepática, estas células podrían estar produciendo mediadores vasoactivos que podrían estar implicados en las complicaciones circulatorias de estos pacientes. Esta hipótesis se vería apoyada por el incremento de la síntesis óxido nítrico por monocitos de pacientes cirróticos (Laffi et al., 1995) y macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con PBE (Jimenez et al., 1999); y otras sustancias vasoactivas como factor de crecimiento derivado de plaquetas (Peterson and Isbrucker, 1992), leucotrienos (Alric et al., 1996), o anandamida (Ros et al., 2002).

## 2. FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

### 2.1. Introducción.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fue descubierto en 1983 por Senger et al. Este grupo describió la purificación parcial de una proteína que causaba permeabilidad vascular tras su inyección en la piel de cobayas. Debido a esta propiedad el factor fue llamado factor de permeabilidad vascular (VPF) y se creyó que su principal función era regular de manera específica la permeabilidad de la vasculatura tumoral. En 1989 Ferrara y Ploüet (Ferrara and Henzel, 1989; Plouet et al., 1989), de manera independiente, describieron el descubrimiento de una sustancia mitógena específica para células endoteliales a la que llamaron, respectivamente, factor de crecimiento endotelial vascular y vasculotropina. El clonaje y la expresión del VEGF y el VPF revelaron que estas dos moléculas eran en realidad la misma (Keck et al., 1989; Leung et al., 1989).

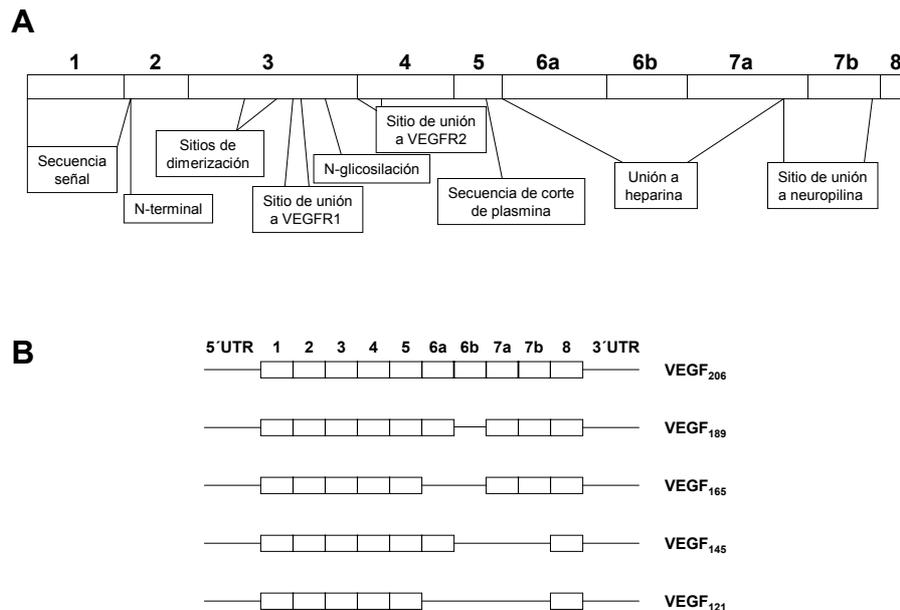
A lo largo de los últimos años han sido identificados otros miembros de la familia del VEGF, que incluye el factor de crecimiento placentario (PlGF), el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D, el VEGF-E y el EG-VEGF (Ferrara et al., 2003). La nomenclatura de estos miembros más recientes ha hecho que el primer factor descubierto se denomine VEGF-A, aunque en la mayoría de trabajos, así como en esta tesis, simplemente se le denomina VEGF.

### 2.2. Estructura y síntesis del VEGF.

La localización cromosómica del gen del VEGF humano es 6p21.3 (Vincenti et al., 1996). Este gen está compuesto por ocho exones y siete intrones, con una región codificante de una longitud aproximada de 14 kb. A partir de este gen se generan 5 isoformas por *splicing* alternativo, que tienen un tamaño de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos (Figura 3) (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991).

Las propiedades bioquímicas de las diferentes isoformas dependen en gran parte de su capacidad o no de unión a heparina, y esto está determinado por la presencia de los exones 6 y 7. A la isoforma VEGF<sub>121</sub> le faltan estos dos exones, por lo que no puede unirse a la matriz extracelular y es una proteína totalmente difundible. La isoforma VEGF<sub>145</sub> carece de un fragmento del exón 6 y de la totalidad del exón 7, y a la isoforma VEGF<sub>165</sub> le falta el exón 6, por lo que una vez secretadas una parte queda retenida en la matriz extracelular y otra difunde libremente. VEGF<sub>189</sub> sólo carece de una parte del exón 6 y VEGF<sub>206</sub> contiene todos los exones, por lo que estas isoformas

quedan totalmente secuestradas en la matriz extracelular. No obstante, tras la acción de diferentes enzimas como la heparinasa, la uroquinasa o la plasmina se puede liberar un fragmento de 110 amino ácidos con actividad biológica. Esto sugiere que las diferentes isoformas del VEGF podrían estar biodisponibles mediante difusión libre o tras la acción de proteasas sobre las isoformas más grandes (Dvorak, 2002; Ferrara, 1999).



**Figura 3: Estructura exónica del mRNA de VEGF.** A) Estructura del mRNA codificante de VEGF<sub>206</sub>. En la parte inferior aparecen los dominios funcionales correspondientes a cada exón. B) Las diferentes isoformas del VEGF aparecen por *splicing* alternativo de un único transcrito, y tienen diferentes propiedades químicas y funcionales de acuerdo a su secuencia (Bates et al., 2002).

El VEGF nativo (VEGF<sub>165</sub>) es una glicoproteína (Asn75) de 45 kDa, básica, homodimérica con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. Los dos monómeros se asocian de forma antiparalela, y su reducción implica la pérdida total de su actividad biológica. La isoforma VEGF<sub>121</sub> es un péptido con propiedades de ácido débil, mientras que las isoformas VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son las más básicas. (Dvorak, 2002; Ferrara, 1999; Zachary and Gliki, 2001).

La mayoría de tipos celulares que expresan VEGF, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, expresan las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub>. VEGF<sub>189</sub> también es detectado en muchos tipos celulares. Por el contrario, VEGF<sub>145</sub> parece ser expresada únicamente en células derivadas de órganos reproductores, y VEGF<sub>206</sub> en mastocitos. (Ferrara, 1999).

### **2.3. Expresión del VEGF.**

Durante la embriogénesis la expresión del VEGF es más amplia, detectándose en pulmón, glándula adrenal, testículo, riñón y cerebro (Breier et al., 1992). En el adulto, en condiciones normales, la expresión de VEGF es baja o inexistente en la mayoría de tejidos, y está limitada a órganos que presentan capilares con endotelio fenestrado como son el plexo coroidal y los glomérulos renales (Breier et al., 1992; Millauer et al., 1993), y en situaciones de angiogénesis fisiológica como la que tiene lugar cíclicamente en el tracto reproductor femenino (Ferrara et al., 1998; Geva and Jaffe, 2000). En cambio, como se explica a continuación, la expresión de VEGF puede ser activada por diferentes factores en otros territorios.

### **2.4. Regulación de la Expresión del VEGF.**

#### **2.4.1. Hipoxia.**

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo* (Ferrara, 1999; Marti and Risau, 1998). El significado fisiológico de la inducción de la expresión de VEGF en respuesta a hipoxia sería el mejorar el aporte de oxígeno a zonas en las que la perfusión tisular ha sido interrumpida por algún motivo.

Dentro de la célula, la regulación de VEGF por hipoxia tiene lugar a diferentes niveles. En primer lugar, la disminución de la tensión de oxígeno causa un aumento de la transcripción del gen de VEGF a través del factor de transcripción HIF1 (*Hypoxia inducible factor 1*), que es explicado en detalle en el siguiente punto. En situación de hipoxia, HIF1 es estabilizado y se une a un elemento de respuesta a hipoxia situado a 1 kb *upstream* del sitio de inicio de transcripción (Forsythe et al., 1996; Liu et al., 1995). Una vez sintetizado el RNA mensajero de VEGF, este se une a la proteína HuR y otras proteínas que inhiben la degradación del transcrito en condiciones de hipoxia (Levy et al., 1998). Además, el transporte de VEGF del retículo endoplasmático al complejo de Golgi está controlado por la chaperona ORP150, que es inducible por hipoxia (Ozawa et al., 2001).

##### **2.4.1.1. Factor inducible por hipoxia-1 (HIF1).**

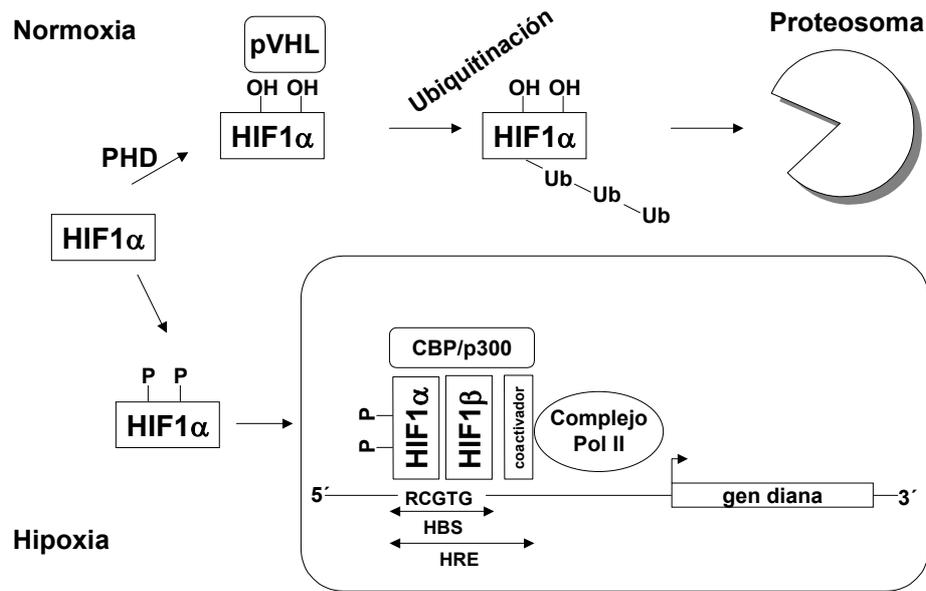
HIF-1 es el principal responsable de la respuesta celular, local y sistémica a la hipoxia. Fue descubierto en el año 1992 por Semenza y Wang (Semenza and Wang, 1992) como un factor nuclear que se unía al promotor del gen de la eritropoyetina

únicamente en condiciones de hipoxia. HIF1 es un heterodímero compuesto por una subunidad de 120 kDa, HIF-1 $\alpha$ , y otra subunidad de 91-94 kDa llamada HIF-1 $\beta$  o ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*). Las dos subunidades pertenecen a la familia de proteínas con capacidad de unión a DNA *basic helix-loop-helix* PAS.

HIF1 $\beta$  se expresa de manera ubicua en las células de mamíferos y no está regulado por hipoxia. Además, puede dimerizar con otros miembros de la familia de proteínas bHLHPAS, como AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) y formar parte de otros complejos proteicos (Hoffman et al., 1991). Por el contrario, la expresión de HIF1 $\alpha$  está finamente regulada por la concentración de oxígeno (Figura 4). Habitualmente en condiciones de normoxia HIF1 $\alpha$  es indetectable, a pesar de que hay expresión constitutiva tanto del gen como de la proteína. Esto es debido a que en condiciones normales de O<sub>2</sub> HIF1 $\alpha$  es hidroxilado en dos residuos de prolina (Pro402 y Pro564) por una HIF-prolil hidroxilasa dependiente de oxígeno (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Esta modificación hace que sea reconocido por la proteína *Von Hippel-Lindau* (pVHL), que forma parte de un complejo ubiquitina-ligasa, y que causa la ubiquitinación de HIF1 $\alpha$  y su degradación por el proteasoma (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999; Pugh et al., 1997; Salceda and Caro, 1997; Sutter et al., 2000).

Cuando disminuye la tensión de oxígeno, HIF1 $\alpha$  no es hidroxilado y, por tanto, ya no es degradado por el proteasoma. En esta situación HIF1 $\alpha$  es activado mediante fosforilación por ERK1/2 (Richard et al., 1999), es translocado al núcleo donde dimeriza con HIF1 $\beta$  y se une a la secuencia consenso de unión a HIF  $\Lambda_{(G)}$ CGTG (HBS, *HIF-1 binding site*), que se encuentra en los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) presentes en los promotores de los genes diana de este factor de transcripción. Entre estos últimos se encuentran varios genes vasoactivos como son el VEGF, la adrenomedulina (ver punto 2.5.2.), o la endotelina (Hu et al., 1998; Minchenko and Caro, 2000).

Finalmente, para poder activar la transcripción, la secuencia consenso no debe estar metilada, HIF1 debe unirse a coactivadores (por ejemplo CBP/p300, SRC-1 o TIF-1)(Carrero et al., 2000; Ebert and Bunn, 1998; Ema et al., 1999; Kallio et al., 1998) y a otros factores de transcripción, como AP1, HNF4 o ATF1/CREB1 (Damert et al., 1997; Ebert and Bunn, 1998; Firth et al., 1994; Galson et al., 1995) para formar un complejo transcripcional totalmente funcional (Wenger, 2002).



**Figura 4: Regulación de HIF-1 por la tensión de oxígeno.** En normoxia, el dominio dependiente de oxígeno de HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por prolil hidroxilasas dependientes de oxígeno (PHD). Tras esta modificación es reconocido por la proteína *von Hippel-Lindau* (pVHL), que conduce a HIF-1 $\alpha$  a la degradación mediante la vía ubiquitina-proteosoma. En condiciones de hipoxia, HIF-1 $\alpha$  no es hidroxilado, por lo que se estabiliza en el citoplasma, es fosforilado, transloca al núcleo donde dimeriza con HIF-1 $\beta$ , se une a cofactores y activa la expresión génica de genes diana que poseen elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en su región promotora (Wenger, 2002).

Además de HIF1 $\alpha$ , se han identificado otras dos proteínas de la familia, HIF2 $\alpha$  o EPAS (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997) e HIF3 $\alpha$  (Gu et al., 1998), que también son reguladas por la tensión de oxígeno. La expresión de estas dos subunidades está más restringida y tienen similitudes estructurales y funcionales con HIF1 $\alpha$  así que es posible que tengan funciones redundantes. Por otro lado, también se han encontrado antagonistas naturales de HIF1 $\alpha$ : IPAS, una variante de HIF3 $\alpha$  (Makino et al., 2001); aHIF, un RNA antisentido complementario a la región 3' no traducida de HIF1 $\alpha$  (Thrash-Bingham and Tartof, 1999); HIF1 $\alpha$ :Z, una isoforma carente del exón 12 inducible por zinc (Chun et al., 2001); y una isoforma de HIF1 $\alpha$  carente de los exones 11 y 12 que actúa como dominante negativo (Chun et al., 2002). El hallazgo de estos antagonistas es reciente por lo que aún se desconoce su relevancia fisiológica.

#### 2.4.2. Hormonas y citoquinas.

Existen numerosos trabajos que describen la inducción de VEGF, tanto a nivel de mRNA como de proteína, por efecto de diferentes factores de crecimiento, citoquinas,

hormonas y otros agentes en diferentes tipos celulares. En la tabla 1 aparece un listado de los factores más representativos.

Tabla 1: Factores estimuladores de la síntesis de VEGF *in vitro*.

Factores de crecimiento	Citoquinas	Hormonas	Otros
EGF <sup>1</sup>	TNF $\alpha$ <sup>7</sup>	TSH <sup>16</sup>	LPS <sup>22</sup>
TGF $\beta$ <sup>2</sup>	IL1 $\beta$ <sup>8</sup>	ACTH <sup>17</sup>	PGE <sub>1</sub> <sup>23</sup>
KGF <sup>3</sup>	IL6 <sup>9</sup>	Hormonas	PGE <sub>2</sub> <sup>24</sup>
IGF1 <sup>4</sup>	IL1 $\alpha$ <sup>10</sup>	Esteroides <sup>18</sup>	Gestación <sup>25</sup>
FGF2 <sup>5</sup>	IL13 <sup>11</sup>	Insulina <sup>19</sup>	Ésteres de forbol <sup>26</sup>
HGF <sup>6</sup>	GMCSF <sup>12</sup>	Angiotensina II <sup>20</sup>	Dibutiril-cAMP <sup>27</sup>
	IL5 <sup>13</sup>	Tamoxifeno <sup>21</sup>	IgG enfermedad de Graves <sup>28</sup>
	IL12 <sup>14</sup>		Trombina <sup>29</sup>
	MCP1 <sup>15</sup>		Agregación Plaquetaria <sup>30</sup>
			Estrés de Cizallamiento <sup>31</sup>
			Acidosis <sup>32</sup>
			Ácido lisofosfatídico <sup>33</sup>
			Adenosina <sup>34</sup>
			Cord factor <sup>35</sup>
			OxLDL <sup>36</sup>
			Ligandos PPAR $\gamma$ <sup>37</sup>
			Histamina <sup>38</sup>
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>39</sup>
			Lactato <sup>40</sup>
			Trombopoyetina <sup>41</sup>
			Relaxina <sup>42</sup>

(1): (Goldman et al., 1993); (Frank et al., 1995); (2): (Frank et al., 1995; Pertovaara et al., 1994); (3): (Frank et al., 1995); (4): (Warren et al., 1996); (5): (Stavri et al., 1995); (Claffey et al., 2001); (6): (Wojta et al., 1999); (7): (Gaudry et al., 1997); (8): (Jackson et al., 1997; Li et al., 1995); (9): (Cohen et al., 1996); (10): (Ben Av et al., 1995); (11): (Corne et al., 2000); (12) (13): (Horiuchi and Weller, 1997); (14): (Dias et al., 1998); (15): (Goede et al., 1999); (16): (Sato et al., 1995; Soh et al., 1996); (17): (Shifren et al., 1998); (18): (Hyder et al., 1996; McLaren et al., 1996); (19): (Sato et al., 1995); (20): (Williams et al., 1995); (21): (Hyder et al., 1996); (22): (McLaren et al., 1996; Salven et al., 2001; Xiong et al., 1998); (23): (Bamba et al., 2000a); (24): (Mukutmoni et al., 2001); (25): (Shifren et al., 1998); (26) (27) (28): (Sato et al., 1995); (29): (Tsopanoglou and Maragoudakis, 1999); (30): (Kronemann et al., 1999); (31): (Chen et al., 1999b; Gruden et al., 1997; Li et al., 1997); (32): (Fukumura et al., 2001); (33): (Hu et al., 2001); (34): (Gu et al., 1999); (35): (Sakaguchi et al., 2000); (36): (Inoue et al., 2001b; Ramos et al., 1998); (37): (Jozkowicz et al., 2000); (38): (Ghosh et al., 2001); (39): (Cho et al., 2001); (40): (Constant et al., 2000; Xiong et al., 1998); (41): (Bobik et al., 1998); (42): (Unemori et al., 2000).

Con relación a esta tesis, cabe destacar el efecto del LPS, del TNF $\alpha$  y de la IL1 $\beta$  como inductores de la síntesis del VEGF. El LPS aumenta la síntesis de VEGF en macrófagos (ver punto 2.7) a nivel de mRNA y proteína, en miocitos ventriculares de rata (Sugishita et al., 2000), células endoteliales (Marx et al., 1999), células epiteliales

(Koyama et al., 2002), y células de la pulpa dental (Matsushita et al., 1999). El LPS puede aumentar la transcripción del gen de VEGF a través de la unión de los factores de transcripción AP1 (Itaya et al., 2001; Matsushita et al., 1999), SP1 (Sakuta et al., 2001), y NF $\kappa$ B (Kiriakidis et al., 2003). Además, estarían implicadas la activación de las vías p38 MAPK, ERK 1 / 2 y PI3-K (Itaya et al., 2001; Kiriakidis et al., 2003). El LPS también causa un incremento en la estabilidad del mRNA de VEGF (Sakuta et al., 2001).

El TNF $\alpha$  induce la síntesis de VEGF en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide (Bottomley et al., 1999), en células mesoteliales (Mandl-Weber et al., 2002), y en células de glioma humano (Ryuto et al., 1996). En este último trabajo, el TNF $\alpha$  indujo la transcripción del gen de VEGF a través de la unión de SP1.

Por último, la IL1 $\beta$  aumenta la síntesis de VEGF en miocitos cardíacos (Maruyama et al., 1999; Tanaka et al., 2000), células endoteliales (Maruyama et al., 1999), fibroblastos (Inoue et al., 2001a; Jackson et al., 1997), células del túbulo proximal (El Awad et al., 2000), y en células de cáncer de colon (Akagi et al., 1999). Tanaka et al (2000) demostró que en la inducción de VEGF por IL1 $\beta$  participa la vía de p38 MAPK y JNK, pero no la activación de MEK1, proteína quinasa C o receptores con actividad tirosina quinasa. Además, IL1 $\beta$  causó un aumento de la transcripción génica mediante la unión de SP1 y SP3, y de la estabilidad del transcrito de VEGF.

También se ha descrito la existencia de sustancias que regulan negativamente la síntesis de VEGF. Entre estas se encuentran los corticosteroides (Nauck et al., 1998) y la IL1 $\alpha$  (Salven et al., 2001), la cual también puede actuar como estimulante de la síntesis de VEGF en algunos tipos celulares (tabla 1).

#### **2.4.3. Diferenciación y transformación.**

Se han detectado incremento de la expresión de VEGF en situaciones de diferenciación y transformación celular. Por ejemplo, se ha detectado un incremento en la expresión de mRNA de VEGF durante la conversión de células 3T3 del estado de preadipocito al de adipocito, y durante la diferenciación miogénica de células C2C12 (Claffey et al., 1992).

En cuanto a la transformación, se ha demostrado que mutaciones o la amplificación de *ras* causan un incremento en la síntesis de VEGF (Grugel et al., 1995; Okada et al., 1998; Rak et al., 1995). También se ha detectado un aumento en la expresión génica del VEGF por mutaciones inactivadoras del gen supresor de tumores

von Hippel-Lindau (Gnarra et al., 1996; Iliopoulos et al., 1996; Siemeister et al., 1996), y de *p53* (Mukhopadhyay et al., 1995; Pal et al., 2001; Zhang et al., 2000).

## **2.5. Receptores de VEGF.**

Hasta el momento se han identificado 4 receptores diferentes a los que se pueden unir los miembros de la familia del VEGF. Tres de ellos, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 son receptores del tipo tirosina quinasa. El cuarto, neuropilina-1, es una proteína transmembrana sin actividad tirosina quinasa. Aparte, algunos miembros de la familia del VEGF pueden unirse a los heparán sulfatos de la matriz extracelular.

El receptor VEGFR3 (también denominado Flt-4) se expresa en vasos linfáticos. Sus ligandos son VEGF-C y VEGF-D y no reconoce a ninguna de las isoformas de VEGF-A. (Neufeld et al., 1999).

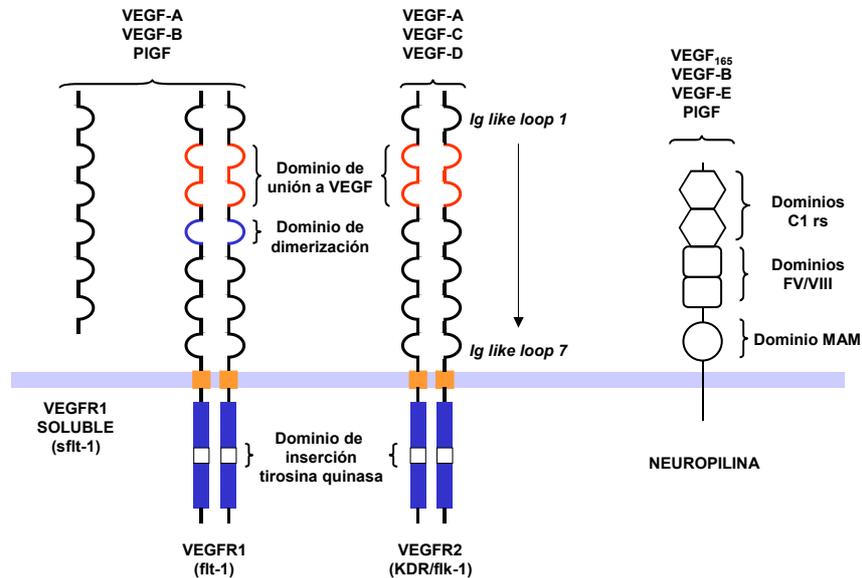
### **2.5.1. Receptores tirosina quinasa VEGFR1 y VEGFR2.**

En 1990 Vaisman et al y Plouet et al descubrieron de manera independiente la existencia de receptores específicos para el VEGF mediante experimentos de *binding* y *cross-linking* (Plouet and Moukadiri, 1990; Vaisman et al., 1990). Posteriormente fueron identificados los genes VEGFR1 (o Flt-1) y VEGFR2 (también Flk-1 y KDR), que codifican receptores específicos para VEGF (de Vries et al., 1992; Terman et al., 1992). Los dos receptores comparten un 44% de homología en su secuencia aminoacídica y conjuntamente con el receptor VEGFR3 están relacionados estructuralmente con la familia de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

VEGFR1 y VEGFR2 son proteínas de membrana con siete dominios de similitud a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una única región transmembrana hidrofóbica y una secuencia consenso tirosina quinasa en su parte citoplasmática, que a su vez presenta la inserción de un dominio sin actividad catalítica (Figura 5) (Neufeld et al., 1999).

Estudios de mutagénesis puntual, delección de dominios Ig y de receptores quimera han revelado que el segundo dominio con similitud a inmunoglobulina de ambos receptores es el responsable de la unión a VEGF, mientras que el tercer dominio ayuda a mantener la estructura necesaria para la unión a VEGF. (Fuh et al., 1998; Keyt et al., 1996; Muller et al., 1997; Wiesmann et al., 1997). El cuarto dominio del receptor VEGFR1 contiene un dominio para la dimerización del receptor

(Wiesmann et al., 1997), y se cree que en el receptor VEGFR2 tendría la misma función, aunque no existen datos experimentales que apoyen esta idea.



**Figura 5: Características de los receptores del VEGF.** Los receptores tirosina quinasa VEGFR1 (Flt1) y VEGFR2 (KDR o flk1) están formados por un dominio extracelular con 7 dominios de similitud a inmunoglobulina, un único dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático con un único dominio catalítico interrumpido por la inserción de un dominio no catalítico, denominado dominio de inserción tirosina quinasa. Existe una isoforma del receptor VEGFR1 soluble, que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático. Neuropilina es un receptor transmembrana sin actividad tirosina quinasa formado 5 dominios extracelulares, 2 de ellos con homología a los componentes del complemento C1r y C1s, 2 dominios con homología a los dominios C1 y C2 de los factores de coagulación V y VIII, y un dominio con homología MAM, además de un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto. (Adaptado de Neufeld *et al.*, 1999; y Zachary *et al.*, 2001).

Los dos receptores pueden unir todas las isoformas de VEGF-A. El receptor VEGFR1 presenta una mayor afinidad por el VEGF ( $K_d$  16-114 pM) (de Vries et al., 1992) que el receptor VEGFR2 ( $K_d$  de 0.4-1 nM) (Terman et al., 1992). El VEGF se une preferentemente a homodímeros de receptor. También puede unirse a monómeros de receptor, pero la afinidad es 100 veces menor (Fuh et al., 1998).

Existen dos isoformas del receptor VEGFR1, formadas por *splicing* alternativo de un único gen. Una de ellas da lugar al receptor VEGFR1, mientras que la segunda isoforma da lugar a una molécula soluble que carece del séptimo dominio con similitud a inmunoglobulina, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático. Esta isoforma fue identificada en células HUVEC (Kendall et al., 1996; Kendall and Thomas, 1993), y es capaz de unirse al VEGF con gran afinidad ( $K_d$  de 10-20 pM) y de inhibir la mitogénesis inducida por VEGF.

Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 se expresan constitutivamente y de manera característica en el endotelio vascular, aunque hay otros tipos celulares que

pueden expresarlos. Ambos receptores son expresados por diversos tipos de células tumorales y por células progenitoras hematopoyéticas. VEGFR1 se expresa también en monocitos, trofoblastos y células mesangiales, y VEGFR2 en megacariocitos y células progenitoras retinales (Neufeld et al., 1999).

Estudios con ratones *knock out* han demostrado que tanto VEGFR1 como VEGFR2 son imprescindibles para la formación vascular del embrión (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995). En el organismo adulto, la unión de VEGF a uno u otro receptor da lugar a respuestas diferentes. Mientras que la mayoría de las respuestas funcionales del VEGF, en células endoteliales especialmente, son mediadas por el receptor VEGFR2, no está claro si el receptor VEGFR1 es capaz de transmitir señales biológicamente significativas en este tipo celular.

Hay evidencias que apuntan a que la principal función del receptor VEGFR1 en el adulto es la de ser un regulador negativo de VEGFR2. Por ejemplo, la existencia de una isoforma soluble de VEGFR1 que inhibe la migración y la proliferación endoteliales inducidas por VEGF a través de VEGFR2 (Kendall and Thomas, 1993; Roeckl et al., 1998), o la presencia de un motivo corto (ANGG) en la zona yuxtamembrana de VEGFR1 que puede suprimir la señalización y la migración celular inducidas por la activación del receptor VEGFR2 (Gille et al., 2000). Sin embargo, VEGFR1 es capaz de transmitir señales en respuesta a VEGF en otros tipos celulares diferentes a células endoteliales. La respuesta biológica mejor caracterizada de este receptor es la estimulación de la migración en monocitos (Barleon et al., 1996; Clauss et al., 1996).

La mayoría de respuestas biológicas del VEGF tienen lugar tras la unión a VEGFR2. Tras la unión a VEGF, este receptor dimeriza y se activa mediante transfosforilación de los residuos Y951, Y996, Y1054 e Y1059, situados en el dominio citoplasmático quinasa. Tras su activación se asocia a diferentes proteínas con dominios SH2, como son Grb2, Nck, Shc y las proteínas fosfatasa SHP1 y SHP2 (Zachary and Glikli, 2001). Es a través de este receptor que el VEGF estimula la producción de NO, el incremento de la expresión del mRNA y proteína de eNOS, movilización de  $Ca^{++}$ , proliferación, migración, activación de PLC $\gamma$  y ERK, de la vía PI3 quinasa/Akt y c-Src en células endoteliales.

### **2.5.2. Neuropilinas (NP).**

Las neuropilinas (NP1 y NP2) son proteínas transmembrana sin actividad tirosina quinasa originalmente identificadas como receptores de los miembros de la familia de polipéptidos semaforina/colapsina, que están implicados en la inhibición del crecimiento de los conos nerviosos (Luo et al., 1993). Posteriormente fueron

identificadas en células endoteliales, y en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata, así como su capacidad de unión a la isoforma VEGF<sub>165</sub> ( $K_d$  0.3 nM). NP 1 también pueden unirse a otros miembros de la familia del VEGF, como VEGF-B y PlGF-2 (Neufeld et al., 1999; Neufeld et al., 2002), y NP 2 a la isoforma VEGF<sub>145</sub> (Gluzman-Poltorak et al., 2000).

En la parte extracelular las NP tienen dos dominios de unión a complemento, dos dominios de homología al factor de coagulación V/VIII, y un dominio meprina (MAM) que es importante para la dimerización de las neuropilinas. Además tienen un fragmento transmembrana, y un dominio citoplasmático corto de 40 amino ácidos sin actividad tirosina quinasa (Figura 5) (Neufeld et al., 2002).

Al igual que los receptores VEGFR1 y VEGFR2, estudios en ratones *knock out* han demostrado que NP1 es un regulador esencial en la formación de la vasculatura embrionaria (Kitsukawa et al., 1997). La acción de las neuropilinas sería la de actuar como correceptores de VEGF<sub>165</sub>, formando un complejo con los receptores tirosina quinasa del VEGF y potenciando así la actividad de estos (Neufeld et al., 1999; Neufeld et al., 2002).

## **2.6. Funciones del VEGF.**

El VEGF es una citoquina multifuncional que ejerce la mayoría de sus funciones en el endotelio vascular (Figura 6). Entre estas funciones se encuentran ser el principal inductor de angiogénesis, promover permeabilidad vascular, actuar como vasodilatador, y otras funciones que se detallan a continuación.

### **2.6.1. Efectos biológicos del VEGF en células endoteliales.**

Las células endoteliales constituyen la diana preferencial del VEGF para la mayoría de sus efectos biológicos (Ferrara, 1999; Zachary and Gliki, 2001). En estas células, el VEGF actúa como factor de supervivencia y como inhibidor de la apoptosis, es un potente mitógeno, induce migración y cambia la expresión génica dando lugar al aumento de expresión de diferentes proteínas como las metaloproteasas, proteínas implicadas en la vía fibrinolítica, o la sintasa endotelial del óxido nítrico. Los cambios que causa el VEGF en las células endoteliales están implicados en la acción del VEGF como promotor de angiogénesis, de permeabilidad vascular o como agente vasodilatador.

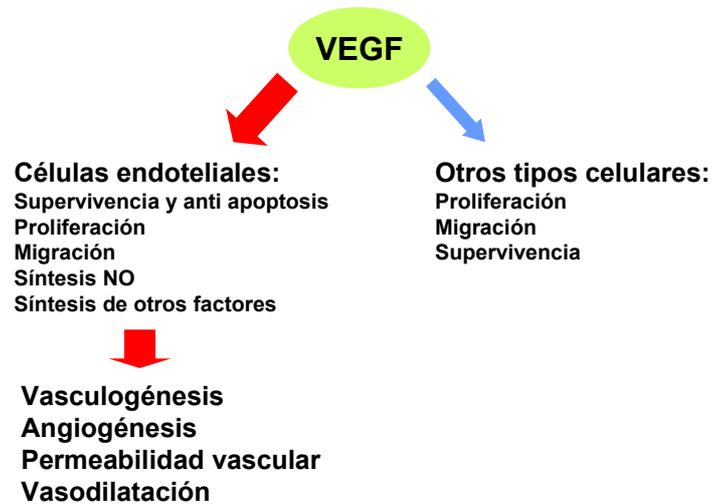


Figura 6: Esquema de las funciones del VEGF.

#### 2.6.1.1. Supervivencia y anti-apoptosis.

El VEGF es un factor de supervivencia para células endoteliales *in vitro* e *in vivo*. La eliminación de VEGF causa regresión de la vasculatura en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha postulado que el recubrimiento por pericitos es el factor crítico que determina la dependencia de las células endoteliales por el VEGF (Benjamin et al., 1998).

Un mecanismo importante mediante el cual VEGF promueve supervivencia en células endoteliales es la activación de la vía antiapoptótica fosfatidil inositol 3 quinasa/Akt (Gerber et al., 1998b; Thakker et al., 1999). La activación de esta vía causa la inhibición de la apoptosis a través de su interacción con Bad, caspasa 9, factores de transcripción pertenecientes a la familia Forkhead y reguladores de NF $\kappa$ B. Aparte, el VEGF induce la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y A1 (Gerber et al., 1998a), e incrementa la expresión de survivina y XIAP (*x-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis*), cuya acción es inhibir la activación de diferentes caspasas (Tran et al., 1999).

En células endoteliales, así como en otros tipos celulares dependientes de adhesión, FAK (*focal adhesión kinase*) es una quinasa localizada en los contactos focales que se establecen entre la membrana plasmática y el sustrato, y que es importante en promover señales de supervivencia. Se ha demostrado que VEGF

causa la fosforilación de FAK así como su asociación y la de paxilina, que es una proteína asociada a FAK, a las adhesiones focales en HUVEC (Abedi and Zachary, 1997; Rousseau et al., 2000; Wu et al., 2000).

En vasos en formación, se ha demostrado que la integrina  $\alpha_v\beta_3$  es un importante factor de supervivencia (Brooks et al., 1994). VEGFR2 se asocia a  $\alpha_v\beta_3$  en vasos nacientes, y la unión de esta integrina a su ligando, vitronectina, potencia la mitogenicidad y actividad del VEGFR2, así que su asociación también podría estar implicada en la promoción de supervivencia en células endoteliales.

#### **2.6.1.2. Proliferación.**

El VEGF es un mitógeno altamente selectivo para células endoteliales, ya sean procedentes de vasos arteriales, venosos, linfáticos y de diferente calibre (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Zachary and Gliko, 2001).

El VEGF causa una potente activación de ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) (Abedi and Zachary, 1997; Wheeler-Jones et al., 1997) y de JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*), y probablemente la respuesta mitogénica al VEGF implique la interacción de estas dos vías de señalización (Pedram et al., 1998). Otros estudios han demostrado que la activación de las isoformas  $\alpha$  y  $\zeta$  de la PKC (proteína quinasa C) (Takahashi et al., 1999; Wellner et al., 1999; Xia et al., 1996), así como la inhibición de la actividad de la isoforma  $\delta$  dependiente de la síntesis de NO (Shizukuda et al., 1999), tienen un papel crucial en la señalización pro-mitogénica del VEGF.

También se ha demostrado que VEGF induce la vía *Raf*-MEK-ERK de manera independiente a *Ras* y dependiente de PKC (Doanes et al., 1999; Gliko et al., 2001; Shizukuda et al., 1999), lo que sugiere que el VEGF debe ser único entre los factores con receptores tirosina quinasa activando la vía ERK.

#### **2.6.1.3. Migración.**

VEGF es un potente agente quimiotáctico para células endoteliales.

Una de los mecanismos responsables de los efectos migratorios de VEGF en células endoteliales es a través de la activación de la vía PI3K/Akt. La activación de esta vía por VEGF induce la reorganización de los filamentos de actina dando lugar a fibras de estrés y lamelipodios, que son estructuras necesarias para el proceso de

migración (Morales-Ruiz et al., 2000). Asimismo, la activación de PI3K/Akt activa la producción de NO mediante fosforilación de eNOS. El NO regula la fosforilación de FAK y la integridad de las adhesiones focales en células endoteliales (Goligorsky et al., 1999; Noiri et al., 1997), por lo que la producción de NO estaría implicada en la migración celular inducida por VEGF.

FAK es importante regulando el recambio de las adhesiones focales, la organización de los filamentos de actina y la migración celular (Abedi and Zachary, 1995), y su activación es importante en la migración inducida por VEGF. VEGF induce la fosforilación de FAK y paxilina y promueve la atracción de FAK a nuevas adhesiones focales (Abedi and Zachary, 1997). En la activación de FAK por VEGF estaría implicada la chaperona Hsp90 (Rousseau et al., 2000).

Otros mecanismos por los que el VEGF promueve migración en células endoteliales es a través de la activación de p38 MAP quinasa (Rousseau et al., 1997; Rousseau et al., 2000), y de la activación de la PLC $\gamma$  (Landgren et al., 1998).

#### **2.6.1.4. Producción de óxido nítrico (NO).**

El VEGF estimula la síntesis endotelial de NO. Este mediador ha sido implicado en casi todos los efectos biológicos del VEGF como son la angiogénesis, la inducción de permeabilidad o la inducción de vasodilatación.

El VEGF induce la síntesis de NO a corto y largo término a través de la activación de diferentes mecanismos. A corto término, y de manera independiente de calcio, VEGF estimula la síntesis de NO mediante la activación de la vía PI3k-Akt. Una vez activada, Akt causa la activación de eNOS a través de la fosforilación en el residuo serina 1179 de este enzima (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). VEGF también activa eNOS a través de la activación de la PLC $\gamma$ , que causa la formación de inositol 1,4,5-trifosfato, que a su vez provoca movilización del calcio intracelular y estimulación de la eNOS a través de su unión a calmodulina (He et al., 1999). Otro mecanismo de activación de la eNOS por VEGF es a través de la proteína Hsp90 (Garcia-Cardena et al., 1998). A largo término, VEGF induce la síntesis de eNOS a nivel de mRNA y de proteína (Bouloumie et al., 1999; Hood et al., 1998; Shen et al., 1999).

#### **2.6.1.5. Regulación génica, y expresión de proteínas y otros factores.**

El VEGF regula la expresión de diferentes genes en células endoteliales. Se ha demostrado que este factor activa varios factores de transcripción, como Ets-1 (Chen et al., 1997), Egr-1 (Mechtcheriakova et al., 1999), NFAT (*nuclear factor of activated T-*

cells) (Armesilla et al., 1999), y Stat 3 y 5 (*Signal transducers and activators of transcription*) (Korpelainen et al., 1999).

Entre los genes diana, el VEGF induce la expresión de los activadores del plasminógeno de tipo tisular y uroquinasa, del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (Pepper et al., 1991), y de metaloproteasas degradadoras de matriz extracelular (Lamoreaux et al., 1998; Unemori et al., 1992). Además, aumenta la expresión de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (Melder et al., 1996), y la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Murohara et al., 1998; Wheeler-Jones et al., 1997).

## **2.6.2. Angiogénesis.**

### **2.6.2.1. Vasculogénesis y angiogénesis fisiológica.**

El VEGF es esencial para la formación vascular del embrión así como en el desarrollo vascular postnatal. Estudios en ratones han demostrado que la carencia de un único alelo del gen del VEGF provoca graves alteraciones en el desarrollo vascular del embrión, causando su inviabilidad entre los días 11 y 12 del desarrollo (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996).

Debido a este motivo, se han utilizado estrategias como la inhibición selectiva del gen de VEGF mediante el sistema *Cre-loxP*, o la administración del inhibidor selectivo de VEGF mFlt(1-3)-IgG, para estudiar las funciones del VEGF en el desarrollo postnatal. La inhibición de la expresión del gen de VEGF por el sistema *Cre-loxP* incrementa la tasa de mortalidad, con crecimiento corporal atrofiado y alteraciones del desarrollo de los órganos, sobre todo del hígado (Gerber et al., 1999a). Por otro lado, la inhibición del VEGF mediante la administración de mFlt(1-3)-IgG causa mortalidad y parada del crecimiento, disminución de la tasa de proliferación y alteraciones ultraestructurales de células endoteliales y otros tipos celulares, y cambios histológicos y morfológicos indicativos de fallo renal y hepático. Las células endoteliales del hígado presentaron además un incremento del índice apoptótico (Gerber et al., 1999a). Otro papel del VEGF en el desarrollo postnatal es la regulación de la formación y crecimiento del hueso, ya que el VEGF promueve la formación de vasos que son esenciales para acoplar la desaparición del cartílago a la formación del hueso maduro (Gerber et al., 1999b).

La inhibición del VEGF causa menos alteraciones a medida que el desarrollo del animal avanza, y se pierde la dependencia del VEGF en algún momento en la cuarta semana de desarrollo (Gerber et al., 1999a).

En el animal adulto, la angiogénesis inducida por VEGF es esencial para el desarrollo del cuerpo lúteo y su función endocrina (Ferrara et al., 1998). También es importante en la angiogénesis que tiene lugar en la cicatrización de las heridas.(Tonnesen et al., 2000).

#### **2.6.2.2. Angiogénesis patológica.**

Uno de los campos donde la acción del VEGF ha sido más estudiada ha sido en la angiogénesis tumoral. La expresión de VEGF es necesaria para la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios a su vez para que el tumor siga creciendo una vez ha alcanzado un tamaño crítico (2-3 mm<sup>3</sup>). Por ejemplo, la administración *in vivo* de anticuerpos anti VEGF, así como de inhibidores del receptor VEGFR2 o la sobre expresión del receptor sFlt-1, provocó una marcada inhibición del crecimiento en ratones atímicos a los que se les había implantado diferentes tipos de tumores (Borgstrom et al., 1998; Kim et al., 1993; Melnyk et al., 1996; Warren et al., 1995). Además, la implantación de células pluripotenciales embrionarias carentes del gen de VEGF en ratones atímicos no causó la formación de tumores, mientras que las células no mutadas dan lugar a teratocarcinomas muy vascularizados (Ferrara et al., 1996).

El VEGF es expresado por numerosas líneas celulares tumorales *in vitro* así como por la mayoría de tumores sólidos *in vivo* (Dvorak, 2002; Ferrara, 1999). En los tumores, la expresión de VEGF está localizada sobre todo en las células tumorales, pero también es expresado por células estromales y las células endoteliales de los nuevos vasos en formación. La expresión de VEGF es especialmente elevada en zonas hipóxicas adyacentes a las áreas necróticas.

Existen otras patologías en las que existe relación entre la expresión de VEGF y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, el VEGF tiene un papel en la neovascularización intraocular que tiene lugar en la diabetes *mellitus*, tras la oclusión de la vena central del ojo, en los recién nacidos prematuros tras una hiperoxigenación en la incubadora, o en la degeneración macular (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1995; Aiello and Wong, 2000; Ferrara, 1999; Malecaze et al., 1994; Miller et al., 1994); así como en otras patologías como la artritis reumatoide (Fava et al., 1994; Koch et al., 1994), la psoriasis (Detmar, 2000) o la endometriosis (Brenner et al., 2002).

### **2.6.3. Permeabilidad.**

Como se ha indicado al comienzo del punto 2 de la introducción, el VEGF fue identificado en primer lugar como un factor secretado por células de hepatocarcinoma que era capaz de inducir permeabilidad vascular en la piel de cobayas por el ensayo de Miles (Senger et al., 1983).

Estudios posteriores han confirmado la capacidad del VEGF de inducir permeabilidad vascular utilizando este mismo ensayo. El ensayo de Miles permite evaluar la potencia permeabilizante de una determinada sustancia aplicada de manera tópica en función de la cantidad de colorante (previamente inyectado vía intravenosa) que pasa a la zona tratada de la piel (Miles et al., 1952). Sin embargo, este ensayo solamente detecta la cantidad de colorante extravasado, y no evalúa el posible efecto de las sustancias probadas en la hemodinámica local, o la activación de células inflamatorias, que podrían liberar otros factores permeabilizantes. Tratando de evitar estos problemas, otros grupos han utilizado la técnica de microoclusión de Landis (Michel et al., 1974; Wu et al., 1996) para demostrar el efecto directo del VEGF en la conductividad hidráulica y en la permeabilidad a la albúmina en monocapas de células endoteliales *in vitro* (Hippenstiel et al., 1998; Lakshminarayanan et al., 2000) y en microvasos aislados de la circulación mesentérica de rana y rata *in situ* (Bates, 1998; Bates and Curry, 1996; Neal CR and Michel, 1997; Wu et al., 1996) Utilizando esta técnica, se ha demostrado que el VEGF provoca una respuesta bifásica en la conductividad hidráulica, causando un incremento agudo de unos pocos minutos de duración seguido de un aumento crónico que dura 24 horas (Bates and Curry, 1996).

A nivel ultraestructural, existen cuatro vías mayoritarias por las que tiene lugar la extravasación de fluido y solutos a través del endotelio: orgánulos vesículo-vacuolares (VVO), fenestraciones, poros transendoteliales y la aparición de espacios o grietas interendoteliales (Bates et al., 2002). Los orgánulos vesículo-vacuolares son una serie de pequeñas vesículas (50-100 nm) conectadas entre ellas mediante fenestraciones que forman una cadena continua que va desde el polo luminal de la células al polo basal. Las fenestraciones son discontinuidades circulares de unos 60 nm de diámetro, que suelen aparecer en agrupaciones en los extremos de las células endoteliales. Los poros transendoteliales son aberturas celulares que, al abrirse, comunican el espacio apical con el basal. Los espacios o grietas interendoteliales aparecen como roturas parciales de las uniones de tipo estrecho *tight* que existen entre células endoteliales adyacentes.

Se ha demostrado que la exposición a VEGF induce la formación de orgánulos vesículo-vacuolares *in vivo* (Feng et al., 1996; Neal CR and Michel, 1998a), de

fenestraciones *in vitro* (Esser et al., 1998) e *in vivo* (Neal CR and Michel, 1998a; Roberts and Palade, 1995), y de poros transendoteliales *in vivo* (Feng et al., 1997; Neal CR and Michel, 1998a). De estas estructuras, la más estudiada ha sido la formación de fenestraciones. En adultos, se ha demostrado correlación entre los tejidos con alta expresión de VEGF y la presencia de endotelio fenestrado en los mismos (Breier et al., 1992). Asimismo, la inyección de VEGF *in vivo* es capaz de inducir la aparición de fenestraciones en capilares de tipo continuo (Roberts and Palade, 1995) y la neovasculatura que aparece en diferentes tipos de tumores que expresan altos niveles de VEGF tiene un gran número de fenestraciones (Roberts and Palade, 1997). Por otro lado, experimentos *in vitro* con células endoteliales han revelado que la formación de fenestraciones en respuesta al VEGF requiere una matriz extracelular de idéntica composición a la membrana basal (Esser et al., 1998). En este mismo estudio, la formación de fenestraciones aparece asociada a caveolas. La formación de VVO parece un efecto específico de la exposición a VEGF, ya que no se observan la formación de estas estructuras en el incremento de permeabilidad tras la exposición a histamina o al ionoforo de calcio A23187 (Neal CR and Michel, 1998b). En cuanto a los espacios interendoteliales, no se ha observado la aparición de estas ultraestructuras en respuesta a VEGF, aunque se ha demostrado que el VEGF causa la fosforilación en células endoteliales de las proteínas VE-cadherina (Esser et al., 1998) y  $\beta$ -catenina (Cohen et al., 1999) componentes de las uniones *adherens*, y de ocludina y zona ocluden 1 (Antonetti et al., 1999), componentes de las uniones estrechas. Estos datos sugieren que el VEGF también podría regular la permeabilidad interendotelial.

El efecto permeabilizante del VEGF está implicado en la formación de ascitis o edema que tiene lugar en diversas patologías. Estas incluyen el infarto de miocardio (Mack et al., 1998), el infarto cerebral (van Bruggen et al., 1999), la aterosclerosis (Couffinhal et al., 1997b), diferentes tipos de cancer (Brown et al., 1993; Nagy et al., 1995; Sherer et al., 2000), la diabetes (Aiello and Wong, 2000) y la psoriasis (Creamer et al., 2002).

Los mecanismos de señalización intracelular que median el incremento de la permeabilidad en respuesta al VEGF no han sido tan estudiados como los que promueven la respuesta angiogénica. Según la hipótesis propuesta por Dvorak et al (Dvorak, 1986) el incremento en la permeabilidad vascular promovido por VEGF sería un paso más de la respuesta angiogénica, de manera que en primer lugar el VEGF causaría extravasación de proteínas plasmáticas que formarían un gel extravascular de fibrina que actuaría de soporte para el crecimiento y migración de las células endoteliales. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que apuntan a que la

respuesta angiogénica y el aumento de permeabilidad vascular en respuesta a VEGF son independientes y tienen lugar a través de vías diferentes de señalización. Por ejemplo, ratones *knockout* para el gen *src* o *yes*, proteínas efectoras de la respuesta a VEGF, presentan una formación vascular normal pero no tienen inducción de permeabilidad vascular en respuesta al VEGF (Eliceiri et al., 1999). Estudios más recientes indican que existen diferentes mediadores moleculares que actúan como interruptores moleculares dirigiendo la respuesta al VEGF en pro-angiogénica o pro-permeabilizante. Entre estas moléculas se cuentan la proteína quinasa C (Spyridopoulos et al., 2002), p38 MAPK (Issbrucker et al., 2003) y la proteína GTPasa Rac (Eriksson et al., 2003). Otras moléculas implicadas en la respuesta pro-permeabilidad del VEGF son las proteínas fosfolipasa C- $\gamma$  (Pocock and Bates, 2001), Akt (Six et al., 2002), ERK1/2 (Breslin et al., 2003), así como el incremento de calcio intracelular (Bates et al., 2002) y la síntesis de óxido nítrico (Bates, 1998; Breslin et al., 2003; Spyridopoulos et al., 2002).

#### **2.6.4. Vasodilatación.**

El VEGF es un agente con propiedades vasorelajantes en secciones de vasos y con efecto hipotensor *in vivo*. La primera evidencia obtenida de la acción vasorelajante del VEGF fue obtenida por Ku et al en 1993 (Ku et al., 1993) en arterias coronarias caninas. Anteriormente, Brock et al (Brock et al., 1991) había demostrado en cultivos de células HUVEC que la incubación con VEGF causa la acumulación de inositol 1,4,5-trifosfato y un aumento en la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular, siendo ambos factores inductores de la síntesis de óxido nítrico por células endoteliales. Basándose en este trabajo, Ku et al. investigó el efecto del VEGF en el tono vascular de secciones de arterias coronarias previamente contraídas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . En este estudio, el VEGF causó vasorelajación de manera dosis-dependiente, dependiente de endotelio y de la síntesis de óxido nítrico. Este efecto fue confirmado en trabajos posteriores en secciones de aorta torácica, vena cava inferior y arteria pulmonar de conejo (van der Zee R. et al., 1997), y en corazones porcinos *in vitro* (Hariawala et al., 1996).

También se ha demostrado el efecto hipotensor de la infusión de VEGF *in vivo* en rata (Malavaud et al., 1997; Yang et al., 1996), conejo (Horowitz et al., 1997), cerdo (Hariawala et al., 1996; Horowitz et al., 1997) y humano (Eppler et al., 2002). La administración *in vivo* de diferentes inhibidores de la sintasa del óxido nítrico en los modelos experimentales utilizados han confirmado que el descenso en la presión

sanguínea causado por el VEGF es dependiente de la síntesis de óxido nítrico (Hariawala et al., 1996; Horowitz et al., 1997; Malavaud et al., 1997).

Hay pocos estudios, y contradictorios, respecto a que receptor es el responsable del efecto hipotensor del VEGF. Malavaud et al (1997) demostraron que la administración intravenosa de un agonista específico del receptor VEGFR2 no causó efectos hemodinámicos en ratas, deduciendo que la disminución de la presión arterial media causada por el VEGF se debía a otro receptor. En cambio, un estudio más reciente realizado en ratas demuestra que, aunque ambos receptores median la respuesta hipotensora del VEGF, VEGFR2 tendría un mayor protagonismo en esta respuesta (Li et al., 2002).

#### **2.6.5. Otras funciones del VEGF.**

Aparte de las células endoteliales, se ha demostrado que el VEGF puede promover proliferación *in vitro* en músculo liso de útero (Brown et al., 1997), células epiteliales de pigmento retinal (Guerrin et al., 1995), células de conducto pancreático (Oberg-Welsh et al., 1997) y células de Schwann (Sondell et al., 1999). También puede tener efectos indirectos en otros tipos celulares, como proliferación y protección de hepatocitos frente a la administración de CCl<sub>4</sub> (LeCouter et al., 2003), o proliferación y migración de células musculares lisas (Cucina et al., 2003) de manera indirecta tras su unión a células endoteliales, haciendo que éstas secreten otros factores que actúan en las células diana. En el trabajo de LeCouter et al se demuestra que este efecto del VEGF está mediado por su unión a receptores VEGFR1.

El VEGF es un agente quimiotáctico para monocitos y macrófagos (Barleon et al., 1996; Clauss et al., 1996), a través de su unión al receptor VEGFR1. También se ha descubierto que puede promover linfangiogénesis (Nagy et al., 2002), y actuar como un agente autocrino promoviendo supervivencia o motilidad en ciertos tipos de células tumorales (Bachelder et al., 2001; Soker et al., 2001). Además, es un agente estimulante de la hematopoyesis postnatal (Hattori et al., 2001), y causa la movilización de células *stem* hematopoyéticas, atrayéndolas hacia lugares en los que tiene lugar revascularización (Rabbany et al., 2003).

#### **2.7. VEGF y fagocitos mononucleares.**

La síntesis de VEGF por fagocitos mononucleares es un tema de especial interés, debido a la existencia de diversas situaciones fisiopatológicas en las que se asocian

un incremento en el número y en la activación de estas células y un aumento en la permeabilidad vascular y/o número de vasos en la zona dañada.

De manera basal o en condiciones fisiológicas de salud, la producción de VEGF por monocitos, macrófagos, o líneas celulares derivadas es muy baja o nula (Griga et al., 1999). Sin embargo, estas células son capaces de sintetizar VEGF tras la activación por diferentes factores *in vitro* (tabla 2) o *in vivo*.

*In vitro*, se ha demostrado que la hipoxia y el TGF $\beta$  estimulan la liberación de VEGF por macrófagos derivados de monocitos circulantes humanos (Harmey et al., 1998). En macrófagos peritoneales de ratón y en la línea celular RAW 264.7, derivada de macrófagos murinos, la exposición a la hipoxia causó un incremento en la cantidad proteica de VEGF debido a la inhibición de la ADP ribosilación que tiene lugar en condiciones de normoxia (Xiong et al., 1998). El lactato, producto de la glucólisis anaeróbica que tiene lugar en las células hipóxicas, también estimula la síntesis de VEGF (Constant et al., 2000; Xiong et al., 1998). Otro potente activador de la síntesis de VEGF en macrófagos humanos y murinos es el lipopolisacárido bacteriano (Itaya et al., 2001; McLaren et al., 1996; Xiong et al., 1998). Otros factores aparecen en la tabla 2.

*In vivo*, se ha demostrado que los macrófagos tumorales y los infiltrados en heridas expresan mRNA de VEGF, y mediante inmunohistoquímica se ha detectado VEGF en macrófagos presentes en placas ateroscleróticas (Chen et al., 1999c), en macrófagos alveolares de pulmón en pacientes con tuberculosis (Matsuyama et al., 2000) y mesotelioma pleural maligno (Konig et al., 1999), en macrófagos coroidales durante la degeneración macular del ojo (Grossniklaus et al., 2002) y en macrófagos del humor vítreo en la retinopatía inducida por oxígeno (Naug et al., 2000).

Una de las consecuencias de la síntesis de VEGF por los macrófagos en situaciones de activación es la promoción de angiogénesis en situaciones como el proceso de cicatrización de las heridas (Haroon et al., 2000; Kvanta et al., 2000; Swift et al., 1999), la neovascularización coroidal del ojo en la degeneración macular (Grossniklaus et al., 2002) o en determinados tipos de tumores como el carcinoma endometrial (Salvesen and Akslen, 1999), el mesotelioma pleural maligno (Konig et al., 1999) o tumores de mama (Leek et al., 2000). En estos últimos, los macrófagos infiltrados en el tumor pueden llegar a constituir la única fuente de VEGF (Crowther et al., 2001; Haroon et al., 2000). En la aterosclerosis, la expresión de VEGF por macrófagos está asociada a neovascularización y progresión de la placa aterosclerótica (Celletti et al., 2001).

Tabla 2: Factores estimuladores de la expresión de VEGF *in vitro* por fagocitos mononucleares o líneas celulares derivadas.

Factor	Tipo celular	Referencia
Hipoxia	Monocitos humanos madurados a macrófagos <i>in vitro</i> Macrófagos murinos y RAW 264.7	(Harmey et al., 1998) (Xiong et al., 1998)
LPS	Macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis Macrófagos murinos y RAW 264.7	(McLaren et al., 1996) (Xiong et al., 1998) (Itaya et al., 2001)
Lactato	Macrófagos murinos y RAW 264.7	(Xiong et al., 1998) (Constant et al., 2000)
17 $\beta$ -estradiol y progesterona	Macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis	(McLaren et al., 1996)
OxLDL	RAW 264 THP1, U937	(Ramos et al., 1998) (Inoue et al., 2001b)
TGF $\beta$	Monocitos humanos madurados a macrófagos <i>in vitro</i>	(Harmey et al., 1998)
Prostaglandinas	U937 Macrófagos murinos	(Bamba et al., 2000b) (Mukutmoni et al., 2001)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	U937	(Cho et al., 2001)
Agonistas del receptor A <sub>2A</sub> de adenosina	Macrófagos peritoneales murinos	(Leibovich et al., 2002)
<i>Cord factor</i>	Macrófagos murinos	(Sakaguchi et al., 2000)

Además de ser productores de VEGF, los macrófagos también pueden ser células efectoras bajo la estimulación de VEGF. Por ejemplo, el VEGF es un agente quimiotáctico para monocitos (Barleon et al., 1996; Clauss et al., 1996). Recientemente se ha descrito que el VEGF induce la expresión de la metaloproteasa 9 en macrófagos pulmonares de manera previa a la formación de metástasis pulmonares (Hiratsuka et al., 2002). En ambos casos los efectos tienen lugar a través de la estimulación del receptor VEGFR1.

## 2.8. VEGF y cirrosis hepática.

Existen pocos estudios que hayan analizado la expresión de VEGF en la cirrosis hepática. Cuando se han analizado los niveles de VEGF en suero (Akiyoshi et al., 1998; Kraft et al., 1999) se ha encontrado que no difieren o son ligeramente inferiores a los niveles de VEGF en sujetos sanos.

A nivel tisular, se ha estudiado la expresión del VEGF en carcinomas hepatocelulares y en hígado. Mediante inmunohistoquímica se ha detectado expresión de VEGF en biopsias de hepatocarcinomas humanos y de hígado sano (Chow et al., 1997). En este último, la presencia de VEGF se encuentra limitada a la matriz extracelular y a los tractos portales. No hay ningún artículo que haya estudiado la expresión en hígado de pacientes cirróticos. Sin embargo, si que se ha analizado en un modelo experimental de cirrosis biliar en ratas (Corpechot et al., 2002; Rosmorduc et al., 1999). En estos estudios se muestra que en el modelo utilizado la aparición de cirrosis está asociada a la aparición de hipoxia en el parénquima hepático y a la expresión generalizada de VEGF por los hepatocitos.

### 3. ADRENOMEDULINA (ADM).

#### 3.1. Introducción.

En 1993 Kitamura et al descubrieron un nuevo péptido a partir de extractos de feocromocitoma que tenía la capacidad de elevar los niveles de AMP cíclico en plaquetas. El péptido fue purificado, secuenciado y llamado adrenomedulina, ya que los feocromocitomas son tumores derivados de la médula adrenal. (Kitamura et al., 1993a).

La ADM tiene homología con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), por lo que ha sido integrada en la familia de péptidos de la calcitonina, que está compuesta, además de por estos dos, por la amilina y dos péptidos relacionados con el gen de la calcitonina ( $\alpha$ CGRP y  $\beta$ CGRP). Los miembros de esta familia tienen poca homología a nivel de su estructura primaria, pero tienen importantes similitudes a nivel de las estructuras secundarias: todos tienen un anillo de 6 amino ácidos cercano al extremo N terminal, formado por un puente disulfuro, seguido por una hélice  $\alpha$  anfipática y amidación del extremo C terminal (Poyner et al., 2002).

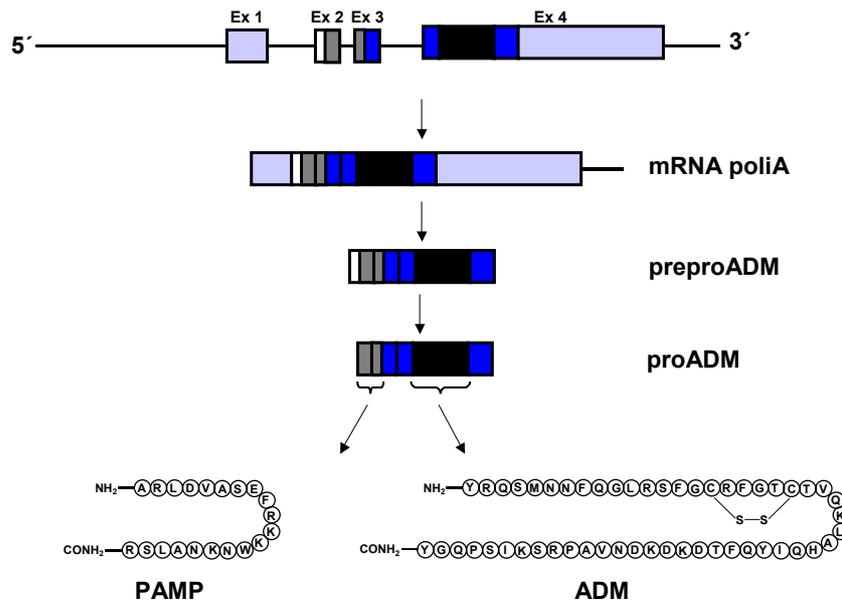
#### 3.2. Estructura y síntesis de la ADM.

El gen de la adrenomedulina está localizado en un solo locus en el cromosoma 11 (Ishimitsu et al., 1994). El gen de la adrenomedulina humana está compuesto por 4 exones y 3 intrones, con cajas TATA, CAAT y GC en la zona 5'. Además, se conoce que su promotor contiene varios sitios de unión para AP-1 y AP-2 (*Activator protein-1/2*), CREB (*cAMP-regulated enhancer element*), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor - $\kappa$ B*) (Ishimitsu et al., 1994), NF-IL6 (*nuclear factor IL6*) (Ishimitsu et al., 1998) e HIF-1 (*Hypoxia inducible factor-1*) (Cormier-Regard et al., 1998; Garayoa et al., 2000).

La adrenomedulina es sintetizada a partir de un precursor de mayor tamaño denominado preadrenomedulina (Figura 7). Este precursor tiene un tamaño de 185 aminoácidos. En posición N terminal, este péptido tiene un péptido señal de 21 amino ácidos que precede a un péptido amidado de 20 amino ácidos, llamado péptido N-terminal preadrenomedulina (PAMP). El PAMP también posee actividad biológica como la de inhibir de las fibras adrenérgicas del músculo liso (Shimosawa et al., 1995) o la de inhibir la secreción de catecolaminas en la médula adrenal (Takano et al., 1996).

El procesamiento del precursor tiene lugar en el interior de la célula. En primer lugar tiene lugar el corte y separación del péptido señal, originando una prohormona

de 164 amino ácidos. A continuación el PAMP es liberado mediante un corte entre la posición 43 y 44. La última modificación post-traducciona da lugar a la ADM, mediante un corte entre los amino ácidos 93 y 148. La ADM es un péptido de 52 aminoácidos, con un puente disulfuro entre los residuos 16 y 21 y una tirosina amidada en posición C terminal.



**Figura 7: Procesamiento del mRNA de ADM y de la preproADM.** La transcripción del gen de la ADM da lugar a un mRNA que contiene los 4 exones que componen el gen. La traducción de este transcrito da lugar al preproADM, de 185 amino ácidos, que tras la eliminación del péptido señal se convierte en la proADM. El procesamiento de este péptido origina dos péptidos bioactivos: el PAMP y la ADM. Ex: Exón. (Adaptado de Samson, 1999).

Hay diferentes experimentos que apuntan a que la adrenomedulina es secretada de manera constitutiva y, a diferencia de lo que ocurre con otros péptidos reguladores, no hay depósitos intracitoplasmáticos que la liberen en respuesta a un estímulo (Isumi et al., 1998; Takahashi K et al., 1998).

### 3.3. Expresión de la ADM.

El gen de la adrenomedulina se expresa en gran número de tejidos. Aunque los primeros estudios apuntaban a que los tejidos con mayor expresión de adrenomedulina eran la médula adrenal, el ventrículo, el pulmón y el riñón (Kitamura et al., 1993b), estudios posteriores han desvelado que la mayor expresión de adrenomedulina tiene lugar en el endotelio (Sugo et al., 1994a). La expresión de

adrenomedulina se ha observado en casi todos los tejidos del organismo, en parte debido a la expresión por parte de la vasculatura de los mismos (células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y macrófagos), aunque también es expresada por otros tipos celulares no vasculares, así como por distintos tipos de células tumorales (Hinson et al., 2000).

### **3.4. Regulación de la expresión de ADM.**

#### **3.4.1. *In vivo*.**

Los mecanismos exactos que regulan la síntesis de ADM *in vivo* son difíciles de describir, debido a que la información respecto a este tema se ha obtenido utilizando diferentes especies y distinta metodología. Sin embargo, hay evidencias que sugieren la existencia de diferentes mecanismos de regulación de síntesis de ADM en cada tejido, de manera que el control de la síntesis de ADM sería local (Hinson et al., 2000). Los hallazgos más consistentes muestran que la síntesis de ADM aumenta durante los estados de sepsis (Fowler et al., 2003; Yang et al., 2001) y la gestación (Di Iorio et al., 1998; Jerat and Kaufman, 1998; Nagata N et al., 1998). Además, se han descrito diferentes estímulos fisiológicos que varían la concentración plasmática de la ADM en humanos y otras especies, como, por ejemplo, el ejercicio (Tanaka et al., 1995), el shock hemorrágico (Fujioka et al., 1999), o el desplazamiento de un lugar de mayor altitud geográfica (Toepfer et al., 1998). El ayuno causa un aumento de la concentración de ADM en el tracto gastrointestinal (Sakata et al., 1998).

También se ha investigado el efecto de cambios de tipo endocrino en la síntesis de adrenomedulina. Se ha demostrado que hay una mayor concentración de ADM plasmática, así como una mayor cantidad de mRNA de ADM en los pulmones de ratas con hipertiroidismo (Murakami et al., 1998). Por otro lado, la infusión de Factor natriurético atrial en humanos causó un aumento en la concentración de ADM plasmática (Vesely et al., 1996). En rata, un incremento en los niveles de arginina-vasopresina y de angiotensina II causaron un incremento en la cantidad de mRNA y de péptido de ADM en corazón (Romppanen et al., 1997). Otras hormonas que se ha demostrado que regulan la síntesis de ADM *in vivo* son los glucocorticoides (Hattori et al., 1998; Letizia et al., 1998) y los andrógenos (Calvo et al., 2002).

La ADM está implicada en la regulación del balance de fluidos y electrolitos en el organismo (Samson, 1999), sin embargo, no está claro que la síntesis de ADM esté regulada por el balance de electrolitos. Hechos a favor de esta regulación serían, por ejemplo, la disminución de la concentración de ADM plasmática encontrada en

pacientes con insuficiencia renal tras ser sometidos a hemodiálisis (Mallamaci et al., 1998), o el incremento de la cantidad de ADM plasmática y en el ventrículo de ratas Dahl sensibles a la sal tras recibir una dieta alta en sal (Shimokubo et al., 1996). Sin embargo, la alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la infusión de ACTH en humanos (Kita et al., 1998), o la ingesta de una dieta rica o pobre en sal por ratas (Jensen et al., 1998) o humanos (Ishimitsu et al., 1996) no causaron cambios en la concentración plasmática de ADM.

### 3.4.2. *In vitro*.

La regulación *in vitro* de la síntesis de ADM a nivel de péptido y de mRNA ha sido estudiada en diferentes tipos celulares (Hinson et al., 2000). En la tabla 3 aparece un listado de los agentes estimulantes de la síntesis de ADM más representativos.

Tabla 3: Citoquinas, hormonas y otros factores que estimulan la síntesis de ADM *in vitro*.

Citoquinas	Hormonas	Otros
IL1 $\alpha$ <sup>1</sup>	Ácido retinoico <sup>6</sup>	Trombina <sup>11</sup>
IL1 $\beta$ <sup>2</sup>	Aldosterona <sup>7</sup>	LPS <sup>12</sup>
TNF $\alpha$ <sup>3</sup>	Cortisol <sup>8</sup>	Ésteres de forbol <sup>13</sup>
TNF $\beta$ <sup>4</sup>	Dexametasona <sup>9</sup>	Tamoxifeno <sup>14</sup>
IFN $\gamma$ <sup>5</sup>	Hormona tiroidea <sup>10</sup>	Estrés oxidativo <sup>15</sup>
		Hipoxia <sup>16</sup>

(1): (Sugo et al., 1995), (2): (Kubo et al., 1998b; Minamino et al., 1995; Sugo et al., 1995), (3): (Kubo et al., 1998b; Minamino et al., 1995; Sugo et al., 1994b; Sugo et al., 1995), (4): (Sugo et al., 1995), (5): (Isumi et al., 1998; Kubo et al., 1998b; Kuchinke et al., 1995), (6): (Kubo et al., 1998b; Minamino et al., 1995), (7): (Minamino et al., 1995), (8): (Imai et al., 1995; Minamino et al., 1995), (9): (Imai et al., 1995; Minamino et al., 1995; Nishimori et al., 1997), (10): (Imai et al., 1995; Isumi et al., 1998; Minamino et al., 1995), (11): (Isumi et al., 1998), (12): (Isumi et al., 1998; Kubo et al., 1998b; Sugo et al., 1995; Zaks-Zilberman et al., 1998), (13): (Isumi et al., 1998; Kubo et al., 1998b), (14): (Zhao et al., 1998), (15): (Ando et al., 1998), (16): (Cormier-Regard et al., 1998; Garayoa et al., 2000)

En relación a esta tesis, hay que comentar el efecto de la hipoxia en la síntesis de ADM. *In vitro*, se ha demostrado que la hipoxia estimula la síntesis de ADM en miocitos de rata (Cormier-Regard et al., 1998), en cardiomiocitos HL-1 (Nguyen and Claycomb, 1999), en células endoteliales humanas (Nakayama et al., 1999b; Ogita et al., 2001), en células epiteliales de pigmento retinal (Udono et al., 2001), y en diferentes tipos de células tumorales (Garayoa et al., 2000; Kitamuro et al., 2000; Kitamuro et al., 2001; Nakayama et al., 1998). Hasta ahora se han descrito dos mecanismos por los cuales la hipoxia aumenta la síntesis de ADM: mediante el

aumento de la actividad transcripcional del gen debido a la unión del factor de transcripción HIF-1 (Cormier-Regard et al., 1998; Garayoa et al., 2000) (los detalles de la actividad de HIF-1 están explicados en el punto 2.4.1.1.), y mediante la estabilización del mRNA de ADM (Garayoa et al., 2000).

### 3.5. Receptores y transducción de señal.

Existen dos receptores específicos para la adrenomedulina, pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G de tipo II. Estos receptores se caracterizan por poseer 7 dominios transmembrana y un dominio rico en cisteínas en posición N terminal, además de activar la subunidad  $G_s$  (proteína G estimuladora de la adenilato ciclasa) y causar un incremento en los niveles intracelulares de AMP cíclico (Gether, 2000).

Los receptores de la adrenomedulina están constituidos de dos partes: el receptor propiamente dicho, denominado CRLR (*calcitonin-receptor-like receptor*), y una molécula transmembrana denominada RAMP2 o 3 (*receptor-activity-modifying protein2 o 3*) que determina la especificidad del receptor. Existen 3 tipos diferentes de RAMP, y su existencia y función fue identificada en 1998 por McLatchie *et al* (McLatchie et al., 1998) (Figura 8). Estos autores demostraron que CRLR puede formar parte de los receptores de la ADM o del receptor de CGRP (*calcitonin gene related peptide*), y que es la asociación a RAMP1 o a RAMP2 o 3 la que confiere al receptor especificidad por el ligando.

CRLR y RAMP2 o 3 se asocian en el retículo endoplasmático, y permanecen fuertemente asociadas hasta que llegan a la superficie celular (Hilairt et al., 2001a). Además, los dos receptores tienen que estar glicosilados para conseguir unir ADM (Hilairt et al., 2001b).

Aparte de su unión a sus receptores específicos, algunas de las actividades biológicas de ADM están mediadas por el receptor del CGRP. En cambio, los receptores de ADM tienen poca afinidad por el CGRP. Además, se ha sugerido la existencia de otros receptores de ADM aún no identificados (Hinson et al., 2000).

A nivel tisular, estudios de *binding* con  $^{125}$ I-ADM en rata (Owji et al., 1995) han demostrado que hay altos niveles de sitios de unión específicos a ADM en corazón, pulmón, bazo, hígado, músculo esquelético y médula espinal. A nivel celular, el receptor de ADM se ha detectado en células musculares lisas vasculares de rata (Eguchi et al., 1994), células endoteliales de aorta bovina (Shimekake et al., 1995), fibroblastos *swiss 3T3* (Withers et al., 1996) y rat-2 (Coppock et al., 1999), mioblastos L6 (Coppock et al., 1996), queratinocitos orales humanos (Kapas et al., 1997), líneas

celulares de piel humana (Martinez et al., 1997), células de zona glomerulosa de rata (Kapas et al., 1998) y células de Ito humanas (Gorbig et al., 2001).

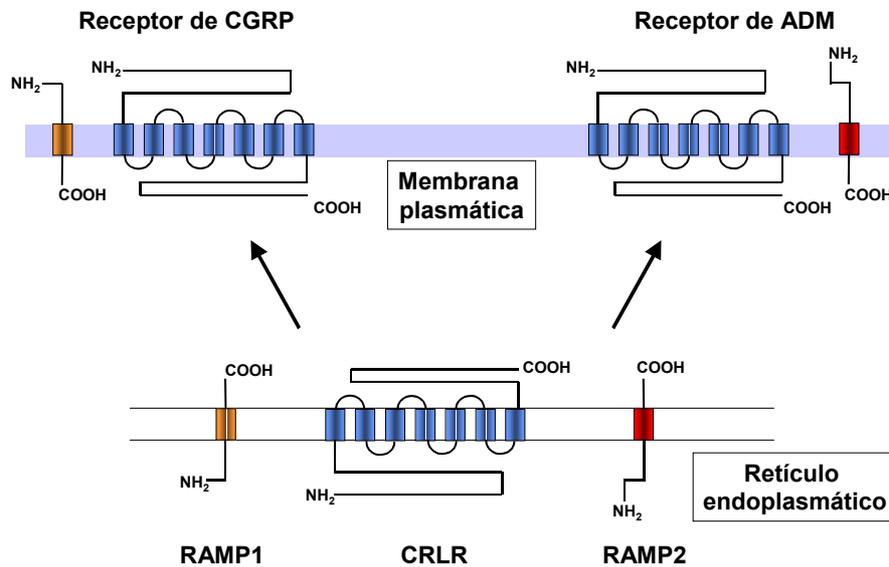


Figura 8: Papel de las proteínas RAMP1 y 2 y CRLR como generadores de los receptores de CGRP y de ADM. (McLatchie et al 1998).

De los estudios de *binding* se concluye que los niveles circulantes de ADM (entre 3-6 pM en humanos) (Kitamura et al., 1994), son insuficientes para mediar la respuesta mediante los receptores de ADM (Kd media de 6 nM), potenciando la hipótesis de que la ADM actúa mayoritariamente como un factor autocrino o paracrino (Hinson et al., 2000).

El principal mecanismo de acción de la ADM, y el más estudiado, tiene lugar a través de la activación de la subunidad Gs acoplada al receptor, que causa una activación de la adenilato ciclasa y de la proteína quinasa A (Coppock et al., 1996; Kapas et al., 1997; Kapas et al., 1998; Shimekake et al., 1995). Además, la ADM también puede aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Kureishi et al., 1995; Shimekake et al., 1995), de canales de K<sup>+</sup>-ATP (Sakai et al., 1998), expresión de c-fos (Moody et al., 1997), y activa la vía PI3 quinasa-Akt (Nishimatsu et al., 2001).

### 3.6. Efectos biológicos.

La ADM es un péptido multifuncional. Debido a que es un péptido secretado en gran cantidad por células endoteliales y células musculares lisas vasculares, su acción principal podría ser el control de manera paracrina de la función vascular. Además, la ADM tiene actividad anti y pro mitótica en diferentes tipos celulares, y efectos en la función endocrina, renal y otros sistemas que se detallan a continuación.

#### 3.6.1. Vasodilatación.

La ADM causa vasodilatación a nivel local y sistémico. *In vivo*, la infusión intravenosa de ADM causa hipotensión prolongada en rata, gato, oveja y humano (Champion et al., 1997; Feng et al., 1994; Nakamura et al., 1997; Parkes and May, 1997), principalmente mediada por la síntesis de NO por la vasculatura. En ratas anestesiadas y conscientes, la administración de ADM de manera aguda o crónica causó una disminución de las resistencias totales periféricas y un caída en la presión arterial, además de un aumento en la frecuencia cardíaca, en el gasto cardíaco y el volumen de eyección (Gardiner et al., 1995; He et al., 1995). El efecto en la presión arterial media no es antagonizado por el CGRP<sub>8-37</sub>, inhibidor del receptor CGRP, sugiriendo que este efecto no es mediado por los receptores CGRP.

Además, se ha estudiado el efecto hipotensor de la ADM en diferentes lechos vasculares regionales de distintas especies. Estos estudios han demostrado que la ADM puede ejercer su efecto hipotensor mediante la unión a los receptores de ADM exclusivamente o por unión a los receptores CGRP (Hinson et al., 2000).

Los estudios llevados a cabo hasta ahora indican que el efecto vasodilatador de la ADM tendría lugar, principalmente, a través de un incremento de AMP cíclico en la musculatura lisa del vaso (Eguchi et al., 1994; Elhawary et al., 1995; Ishizaka et al., 1994), o de un incremento en la síntesis de NO por el endotelio (Berthiaume et al., 1995; Nishimatsu et al., 2001). Sin embargo, también podría activar otros efectores. Por ejemplo, en arteriolas cerebrales, el efecto vasodilatador de la ADM es dependiente de la apertura de canales de K<sup>+</sup> ATP/Ca<sup>++</sup> dependientes (Lang et al., 1997).

### **3.6.2. Crecimiento y desarrollo celular.**

*In vitro*, la ADM puede actuar como un agente inductor o inhibidor de la proliferación celular dependiendo del tipo celular y de las condiciones de experimentación.

En fibroblastos *swiss 3T3*, queratinocitos orales humanos, en células musculares lisas vasculares quiescentes de rata, y en varias líneas celulares derivadas de tumores, la ADM incrementa la síntesis de DNA, y en piel normal y maligna aumenta la captación de timidina tritiada. (Iwasaki et al., 1998; Kapas et al., 1997; Martinez et al., 1997; Withers et al., 1996). En estos casos, la ADM tiene efecto proliferativo mediante la inducción de la síntesis de AMP cíclico. En células musculares lisas vasculares quiescentes, este efecto también puede estar mediado por la vía de las MAP quinasas (Iwasaki et al., 1998). También induce proliferación en HUVEC.

Paradójicamente, la ADM también puede actuar como agente inhibidor de la proliferación en diferentes tipos celulares mediante un aumento del AMP cíclico. Por ejemplo, en células mesangiales (Segawa et al., 1996), células de neuroblastoma humano (Ando et al., 1997) y astrocitos de ratón (Yeung et al., 1996). Además, la ADM inhibe la proliferación en células de la glia humanas normales y tumorales, en astrocitomas de rata y humanos (Takahashi et al., 1997; Yeung et al., 1996) y células musculares lisas vasculares en proliferación (Kano et al., 1996).

La ADM es un agente inhibidor de la apoptosis en células endoteliales. Se ha demostrado que este efecto anti apoptótico puede tener lugar mediante el aumento del factor de transcripción Max (Shichiri et al., 1999), y mediante la estimulación de la síntesis de óxido nítrico (Sata et al., 2000).

### **3.6.3. Efectos endocrinos.**

Se ha demostrado que la ADM tiene efectos sobre la acción de diferentes hormonas. Por ejemplo, diferentes estudios sugieren que una de las funciones de la ADM sería inhibir la liberación de ACTH (hormona adeno corticotropa). Por ejemplo, en la pituitaria la ADM inhibe de manera dosis-dependiente la secreción de ACTH. Además, atenúa la producción de esta hormona en respuesta a CRH (*corticotropin releasing hormone*) (Samson et al., 1995). Además, en oveja, la administración intravenosa de ADM causó una disminución progresiva de los niveles plasmáticos de ACTH (Parkes and May, 1995).

En la glándula adrenal, se ha demostrado que la ADM inhibe la secreción de aldosterona estimulada por diferentes factores, como son una dieta deficiente en

sodio, una nefrectomía bilateral, la angiotensina II, el  $K^+$ , o el ionóforo de calcio A23187; pero no en respuesta a ACTH o  $(Bu)_2cAMP$  (Yamaguchi et al., 1995). Estos datos apoyan el efecto de un agonista que actúe a través de la generación de cAMP. Por otro lado, no está claro que tenga un efecto directo en la secreción de corticosterona en ratas o cortisol en humanos, ni en la secreción de catecolaminas (Hinson et al., 2000).

La ADM está expresada por todo el aparato reproductor femenino, así como en la glándula mamaria. Los niveles plasmáticos de ADM aumentan durante el embarazo en condiciones normales. Además, la ADM se expresa en la placenta y en los tejidos de la fetoplacenta, por lo que podría tener un papel en el control local del tono vascular de la circulación útero-placental (Makino et al., 1999b). También regularía el tono vascular en estados de embarazo patológico como la pre-eclampsia (Makino et al., 1999a).

En páncreas, varios estudios apuntan a que la ADM inhibiría la síntesis de insulina (Zudaire et al., 2003).

#### **3.6.4. Efectos renales.**

Se ha descrito que tanto la ADM circulante como la ADM sintetizada de manera local en el riñón pueden afectar la función renal. Las principales consecuencias de la ADM en el riñón son el aumento de manera dosis dependiente del flujo sanguíneo renal, aumento de la producción de orina y de la excreción urinaria de  $Na^+$ . La producción de NO podría mediar estos efectos de la ADM (Taylor and Samson, 2002).

La ADM también tiene efectos en las células mesangiales. Se ha demostrado que puede modular la contracción de estas células, inhibir la síntesis de ET-1 en respuesta a angiotensina-II, y estimular la síntesis de ácido hialurónico (Chini et al., 1995).

Además, la ADM también causa un incremento en la liberación de renina (Jensen et al., 1997).

#### **3.6.5. Otras funciones de la ADM.**

La presencia de ADM es esencial para el desarrollo embrionario. Los ratones *knock out* homocigotos presentan edema generalizado y un desarrollo cardiovascular anormal, caracterizado por un corazón de tamaño reducido, un miocardio desorganizado, y disminución del grosor de la pared de la aorta y de la arteria carótida, y mueren entre los estadios E13.5 y E14.5 (Caron and Smithies, 2001). Los ratones

*knock out* heterocigotos son viables y fértiles, pero presentan más daño vascular cuando son sometidos a estrés oxidativo (Ando and Fujita, 2003).

También tiene efectos pro angiogénicos *in vivo* mediante el ensayo de la membrana corialantoica de pollo y mediante el ensayo de la esponja subcutánea en ratones. (Oehler et al., 2002; Zhao et al., 1998).

La ADM puede tener efectos en las funciones motoras y secretoras del sistema gastrointestinal, así como en la integridad de la mucosa gástrica. En el hueso, podría actuar como un regulador paracrino del crecimiento del esqueleto a lo largo de la vida. En pulmón, inhibe la broncoconstricción en respuesta a la histamina y a la acetilcolina. En el sistema nervioso central, la ADM tiene efectos en la sed y en el apetito de sal. La administración de ADM intracerebral previene las úlceras gástricas. En la circulación intracerebral, la ADM tiene efectos hipertensivos, y esto último podría ser cardio protector, ya que protegería contra un mayor colapso cardiovascular como el que tiene lugar durante un episodio de sepsis (Hinson et al., 2000).

### **3.7. ADM y fagocitos mononucleares.**

La ADM es un péptido que es sintetizado de forma constitutiva por diferentes tipos de fagocitos mononucleares o líneas celulares derivadas. Se ha demostrado que es secretada por monocitos de individuos sanos (Kubo et al., 1998a; Nakayama et al., 1999a), por macrófagos alveolares humanos (Nakayama et al., 1999c), por macrófagos peritoneales murinos (Kubo et al., 1998b; Zaks-Zilberman et al., 1998), y por las líneas celulares THP1, HL-60 (Kubo et al., 1998a) y RAW 264.7 (Kubo et al., 1998b). Su síntesis, además, puede ser estimulada a nivel de mRNA y proteína por el LPS (Kubo et al., 1998b; Nakayama et al., 1999a; Zaks-Zilberman et al., 1998). En RAW 264.7 la estimulación con TPA, ácido retinoico e interferón  $\gamma$  aumentaron la síntesis de ADM a nivel proteico, mientras que la dexametasona, la hidrocortisona, el estradiol y el TGF $\beta$  la inhibieron (Kubo et al., 1998b). Por otro lado, se ha detectado expresión de ADM en macrófagos de placas ateroscleróticas humanas mediante inmunohistoquímica (Nakayama et al., 1999a).

Los macrófagos también pueden ser células efectoras de la acción de la ADM. En macrófagos alveolares, la ADM inhibe la liberación de factores quimiotácticos para neutrófilos en respuesta a LPS (Kamoi et al., 1995), y en RAW 264.7, y en células de Kupffer de rata, la ADM disminuye la síntesis de TNF $\alpha$  e IL6 estimuladas por LPS (Kubo et al., 1998b; Wu et al., 2003).

### **3.8. ADM y cirrosis hepática.**

Existen muy pocos trabajos en los que se haya estudiado la relación entre adrenomedulina y cirrosis hepática. En todos ellos se han analizado los niveles circulantes de adrenomedulina en pacientes con cirrosis hepática y su relación con la progresión de la enfermedad y/o de las alteraciones hemodinámicas y renales que tienen lugar en la misma (Fabrega et al., 1997; Fernandez-Rodriguez et al., 1998; Guevara et al., 1998; Kojima et al., 1998). Estos trabajos muestran que los niveles circulantes de adrenomedulina son superiores en pacientes cirróticos que en sujetos sanos, y que aumentan progresivamente a medida que aumenta el grado de severidad de la enfermedad, siendo los más altos en pacientes con ascitis y síndrome hepatorenal. En el estudio de Guevara et al, también se demuestra una correlación positiva entre la actividad renina plasmática, la concentración de aldosterona y la de adrenomedulina, y una correlación negativa entre la adrenomedulina y la tasa de filtrado glomerular, el aclaramiento de creatinina y la excreción de sodio, lo que sugiere que la adrenomedulina podría tener un papel en los cambios hemodinámicos que tienen lugar en la cirrosis y que tienen como consecuencia la formación de ascitis.



(Chen et al., 1999a; Couffinhal et al., 1997a; Eilers et al., 1993; Lee et al., 2000)



Con frecuencia, la evolución de la cirrosis hepática está asociada a la aparición de trastornos cardiovasculares. A medida que avanza la enfermedad, los pacientes cirróticos presentan hipertensión portal, aumento del gasto cardíaco, disminución de la presión arterial media, hiperemia y disminución de las resistencias vasculares periféricas. Este último hecho es característico del área esplácnica, ya que estos parámetros en otros territorios vasculares son normales o incluso están aumentados.

La aparición de estas alteraciones vasculares da lugar a la activación de mecanismos vasoactivos compensatorios, los cuales provocan retención de sodio y agua, y que tiene como consecuencia la acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal. La aparición de ascitis en la cirrosis está asociada a un mal pronóstico, debido tanto a que su aparición implica una mayor desestabilización de la hemodinámica esplácnica y sistémica, como a la facilidad con que es colonizada por bacterias en ausencia de fuentes de infección aparentes, dando lugar a peritonitis bacteriana espontánea (PBE).

La PBE es una de las principales causas de mortalidad en la cirrosis. La patogénesis de este fenómeno no es bien conocida, pero una de las hipótesis que la explicaría sería que el incremento en la producción peritoneal de mediadores proinflamatorios causado por la infección podría estimular la síntesis de sustancias vasoactivas, las cuales actuarían de manera local en la circulación esplácnica incrementando la vasodilatación ya presente en esta zona, que a su vez activaría los sistemas vasoconstrictores compensatorios que provocarían fallo renal y el fallecimiento del paciente.

Por otro lado, diversos estudios han descrito la presencia de anomalías en la función pulmonar y en la oxigenación tisular de los pacientes cirróticos. La presencia de un gran volumen de ascitis es un factor a tener en cuenta ya que se ha demostrado que puede interferir con la función pulmonar.

Los macrófagos son células especialmente reactivas a estímulos como la presencia de bacterias y sus derivados, a citoquinas proinflamatorias, o a la hipoxia, en respuesta a los cuales pueden producir sustancias con capacidad vasoactiva. Por esta razón, en el presente trabajo nos planteamos la hipótesis de que los macrófagos residentes en la cavidad esplácnica de los pacientes cirróticos podrían estar produciendo sustancias vasoactivas que actuarían en la vasculatura esplácnica contribuyendo a las alteraciones circulatorias que tienen lugar en esta zona en la cirrosis hepática.

El objetivo de esta tesis ha sido demostrar que los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis son capaces de sintetizar sustancias vasoactivas *in vitro* de manera espontánea y bajo condiciones estimuladoras apropiadas, como son la

presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS), las citoquinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ , o la hipoxia. Este objetivo se llevó a cabo en tres estudios diferentes, cuyos objetivos, a su vez, fueron:

- 1) Determinar si los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis son capaces de sintetizar Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) en respuesta a la estimulación con las citoquinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ , y LPS. (Artículo 1).
- 2) Investigar si los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis y peritonitis bacteriana espontánea producen mayor cantidad de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) que los de pacientes cirróticos con ascitis sin infección. (Artículo 2).
- 3) Investigar el efecto de la hipoxia en la síntesis de las sustancias vasoactivas inducibles por hipoxia Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Adrenomedulina (ADM) y Endotelina (ET) por macrófagos peritoneales y monocitos circulantes de pacientes cirróticos con ascitis. (Artículo 3).





## **1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.**

Todos los estudios de esta tesis se realizaron de acuerdo a los criterios del comité de Ética del Hospital Clínic de Barcelona.

### **1.1. Obtención de líquido ascítico.**

El líquido ascítico de pacientes cirróticos fue extraído mediante paracentesis terapéutica en la unidad de Hepatología del Hospital Clínic, por personal cualificado. El líquido fue recogido en condiciones estériles.

### **1.2. Obtención de sangre.**

Las muestras de sangre de pacientes cirróticos fueron extraídas en la unidad de Hepatología del Hospital Clínic, por personal cualificado de la citada unidad. Las muestras de individuos sanos fueron obtenidas a partir de (entusiastas) voluntarios del laboratorio de Hormonal del Hospital Clínic, y fue el personal de enfermería de este laboratorio el encargado de realizar las extracciones.

#### **1.2.1. Obtención de sangre para aislamiento de monocitos.**

Extraer 50 ml de sangre venosa periférica en una jeringa de 50 ml. Utilizar 6 ml de ACD (ácido cítrico 34.74 mM; citrato sódico tribásico 83.3 mM; glucosa 122.11 mM) como anticoagulante.

#### **1.2.2. Obtención de plasma.**

Protocolo:

1. Recoger 5 ml de sangre venosa periférica en tubos con K<sub>3</sub>-EDTA como anticoagulante (Vacutainer, BD vacutainer systems, Plymouth, UK).

2. Centrifugar a 4000 rpm 10 minutos a 4°C.
3. Alicuotar el plasma y guardar a –20°C.

### **1.2.3. Obtención de suero.**

Protocolo:

4. Recoger 5 ml de sangre venosa periférica en tubos sin anticoagulante (Vacutainer, BD vacutainer systems, Plymouth, UK). Esperar 1 hora a que se forme el coágulo.
5. Centrifugar a 4000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Alicuotar el suero y guardar a –20°C.

### **1.3. Biopsias.**

Las biopsias de tejido peritoneal de pacientes cirróticos se obtuvieron mediante raspado del borde antemesentérico del íleo terminal. Las biopsias fueron obtenidas en quirófano por personal cualificado del departamento de cirugía hepática del Hospital Clínic.

### **1.4. Lavados peritoneales de individuos sanos.**

Con objeto de obtener células peritoneales de individuos sanos, se realizaron lavados peritoneales de individuos sanos, que se estaban sometiendo a una operación de donación de hígado (donantes vivos). Los lavados se realizaron con 4L de salino, tras la laparotomía y antes de cualquier otra manipulación quirúrgica. Tras el lavado, el líquido se recogió en condiciones estériles. Los lavados fueron llevados a cabo por personal cualificado del departamento de cirugía hepática del Hospital Clínic.

## **2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS.**

*Los protocolos que aparecen a continuación se deben realizar en condiciones de esterilidad.*

### **2.1. Obtención de macrófagos peritoneales mediante adhesión.**

Protocolo:

1. Pasar la ascitis a tubos de 50 ml estériles.
2. Centrifugar el líquido ascítico a 200 g 10 minutos a 4°C.
3. Traspasar unos 250 ml de sobrenadante (ascitis libre de células) a tubos limpios. Descartar el resto, dejando unos 3-5 mL en cada tubo para resuspender el *pellet*.  
*Guardar alícuotas de ascitis libre de células para posteriores determinaciones o experimentos.*
4. Resuspender los *pellets* y juntarlos.
5. Centrifugar de nuevo a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante. Dejar unos 3-5 mL en cada tubo para resuspender el *pellet*.
7. Resuspender los pellets y juntarlos todos en un único tubo.
8. Pasar unos 300 µl de suspensión celular a un tubo *Eppendorf* y realizar un conteo diferencial de las células presentes (SE-9000; Sysmex) en el contador hematológico automático del servicio de urgencias del Hospital Clínic.
9. Sembrar en placas adecuadas según el experimento a una concentración de 333333 macrófagos/ml (ver punto tal). Diluir si es necesario y sembrar utilizando líquido ascítico libre de células (punto 3).
10. Incubar en condiciones estándar de cultivo durante 90 minutos.
11. Aspirar la ascitis de las placas. Lavar 3x con DPBS con Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup>.

## **2.2. Obtención de macrófagos peritoneales/monocitos mediante centrifugación en gradiente.**

El protocolo de centrifugaciones en gradiente es el mismo para obtener macrófagos a partir de líquido ascítico que monocitos a partir de sangre periférica.

Reactivos:

- Ficoll-Paque Plus (Amersham-Pharmacia).
- Percoll (Pharmacia).
- DPBS con y sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> (BioWhittaker).
- Albúmina serica bovina (Sigma): preparar una solución al 0.1% en DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup>
- HBSS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> 10x (Gibco).

*Aislamiento de macrófagos a partir de líquido ascítico.*

1. Pasar la ascitis a tubos de 50 ml estériles.
2. Centrifugar el líquido ascítico a 330 g 10 minutos a 4°C.
3. Descartar el sobrenadante. Dejar unos 3-5 mL en cada tubo para resuspender el *pellet*.

*Guardar alícuotas de ascitis libre de células para posteriores determinaciones o experimentos.*

7. Resuspender los *pellets* y juntarlos.
8. Centrifugar de nuevo a 330 g durante 10 minutos a 4°C.
9. Descartar el sobrenadante. Resuspender los *pellets* y juntarlos todos en un único tubo.
10. Añadir DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> hasta llegar a un volumen de 50 mL.

*Aislamiento de monocitos a partir de sangre.*

1. Pasar la sangre a un tubo de 50 ml estéril
2. Centrifugar a 200 g 10 minutos a 4°C.
3. Descartar el plasma. Llenar el tubo con DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> y mezclar.

Protocolo:

1. Preparar dos tubos con 15 mL de *Ficoll* en cada uno de ellos. Dispensar 25 mL de la suspensión de células sobre el *Ficoll*. Hay que hacerlo inclinando un poco el tubo y dejando caer la suspensión por la pared lentamente, evitando que la sangre se mezcle con el *Ficoll*.
2. Centrifugar a 330 g en una centrifuga de rotor basculante, durante 35 minutos a temperatura ambiente.
3. Recoger las células mononucleadas de gradiente de *Ficoll* y pasarlas a un tubo (o varios) de 50 mL. Las células mononucleadas (macrófagos/ monocitos y linfocitos) quedan situadas en un anillo en la interfase entre el *Ficoll* (parte inferior) y el tampón (parte superior).
4. Añadir DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> hasta 50 mL. Mezclar y centrifugar a 330 g 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Juntar todos los *pellets* en un único tubo. Añadir DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup> hasta 50 mL. Mezclar y centrifugar a 330 g 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Descartar el sobrenadante. Resuspender en una solución al 0.1% de BSA en DPBS sin Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup>.

7. Mezclar HBSS 10x con *Percoll*, en una proporción 1.65:10. Dispensar 8 mL de la mezcla en tubos de 15 mL de polipropileno.
8. Añadir 4 mL de la suspensión celular sobre el *Percoll*. Mezclar por inversión.
9. Centrifugar en una centrífuga de rotor de ángulo fijo a 330 g, 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Recoger los monocitos/macrófagos de la parte superior del tubo con una pipeta *Pasteur* o una pipeta P1000 y traspasarlos a un tubo de 50 mL.
11. Llenar con DPBS sin  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$ . Centrifugar a 330 g 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Resuspender en medio completo de macrófagos (ver punto 3.1). Contar las células descartando las que están muertas.

### **3. CULTIVOS CELULARES.**

Todos los protocolos que se detallan a continuación deben llevarse a cabo en condiciones de esterilidad.

Condiciones estándar de cultivo: 95% aire/5%  $\text{CO}_2$ , 37°C, humedad.

Materiales: todo debe ser estéril:

- DPBS con y sin  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$  (BioWhittaker).
- HBSS sin  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$  con rojo fenol (BioWhittaker).
- RPMI 1640 sin rojo fenol (Gibco).
- DMEM (1000 mg/L glucosa, sin piruvato sódico) (Gibco).
- HamF12 (Sigma).
- Tripsina/EDTA (Gibco). Utilizada al 1x en HBSS sin  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$ .
- Suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (Biological Industries). Inactivado (calentar a 56°C durante 30 minutos).
- Suero bovino (BS, *Bovine Serum*) (Sigma). Inactivado (calentar a 56°C durante 30 minutos).
- Nu Serum. (collaborative) Inactivado (calentar a 56°C durante 30 minutos). Al utilizarlo tiene que ser descongelado a 37°C.
- Glutamina 100x (200 mM) (Gibco).
- Antibiótico stock 100x (Penicilina 5000 U/ml, estreptomicina 5000  $\mu\text{g/ml}$ ) (Gibco).
- Fungizona.
- Amino ácidos no esenciales (Biological Industries) 100x.

- Piruvato sódico (Sigma) (0.11 g/ml).
- Heparina sódica (Orbi), (5000 U/ml)
- *Endothelial mitogen* (BTI). Resuspender con 10 ml de DPBS con  $\text{Ca}^{++}$ /  $\text{Mg}^{++}$ . Alicuotar (500  $\mu\text{l}$ ) y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz.
- Medio completo para monocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales humanos: RPMI-1640 sin rojo fenol + glutamina (2 mM) + 2% FBS + antibiótico 1x.
- Medio completo para HUVEC: Medio RPMI-1640 + 15% Nu Serum + 15% Bovine serum + antibiótico + L- glutamina (2 mM) + heparina sódica (10 U/ml) + endothelial mitogen (1 ml/100 ml).
- Medio completo para BAEC: DMEM (1000 mg/L glucosa) + antibiótico 1x + L- glutamina (2 mM) + 10% FBS + heparina (10 U/ml).
- Medio completo para BCLC-9: DMEM (1000 mg/L glucosa): HAM F12 (1:1) + antibiótico 1.5x + L-glutamina (4 mM) + 10% FBS + amino ácidos no esenciales 1% + piruvato sódico (110  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + fungizona (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (opcional).

### **3.1. Contaje de células.**

1. Diluir el *pellet* 1:20 (5 $\mu\text{L}$  de azul *trypan*, concentración final 0.04%, 470  $\mu\text{L}$  de ácido acético y 25  $\mu\text{L}$  de suspensión celular).
2. Poner 10  $\mu\text{L}$  en una cámara de Neubauer.
3. Contar las células presentes en campos de 16 cuadros. Las células de color azul están muertas.
4. Calcular la concentración celular de la suspensión:

número de células/mL = media de los campos de 16 cuadrados x 10000 x dilución de las células.

### **3.2. Cultivo de macrófagos peritoneales y de monocitos humanos.**

TODOS los experimentos realizados con macrófagos peritoneales o monocitos humanos se realizaron con células de pase 1.

#### **3.2.1. Cultivo basal de macrófagos peritoneales y de monocitos humanos.**

Una vez obtenidos los macrófagos peritoneales o monocitos humanos (punto 2.2 de materiales y métodos), se cuentan y se siembran tal y como se detalla a continuación. para realizar los experimentos pertinentes:

1. Sembrar los monocitos/macrófagos a una concentración de 333333 células/mL:

Cinéticas de producción: Utilizar placas de 96 pozos y/o de 24 pozos. Sembrar 600000 células /1.8 mL de medio por pozo (placa de 24), o bien 100000 células/300  $\mu$ l de medio por pozo (placa de 96).

Extracción de RNA o proteínas: 3.333.333 células/10 mL en placas de  $\varnothing$  6 cm.

2. Dejar toda la noche ( $\cong$  14 horas) en medio completo y condiciones estándar de cultivo.
3. Aspirar el medio. Lavar 2 veces con DPBS con  $Ca^{++}$ /  $Mg^{++}$ . Añadir medio nuevo a las células, de manera que queden a una concentración de 333333 células/1 mL. (Ver punto 1). Cultivar en condiciones estándar, excepto las células cultivadas en hipoxia (ver punto 3.2.6).
4. A los tiempos indicados en cada experimento (48 horas de cultivo como máximo) recoger muestras de medio de cada condición.

### 3.2.2. Diferenciación con TPA.

El TPA induce la diferenciación *in vitro* de monocito a macrófago (Eilers *et al*, 1993).

Reactivo:

TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13 acetato) (Sigma). Guardar a  $-20^{\circ}C$ . Al utilizarlo, diluir si es necesario en etanol absoluto.

Protocolo:

1. Incubar los monocitos con TPA (10 nM) disuelto en medio completo de monocitos durante 72 horas en condiciones estándar de cultivo celular.
2. Aspirar el medio. Lavar las células 3x con DPBS con  $Ca^{++}$ /  $Mg^{++}$ .

3. Añadir medio completo nuevo. Incubar en condiciones estándar durante 24 horas antes de empezar los experimentos.

### 3.2.3. Cultivo con citoquinas y LPS.

La combinación de LPS, TNF $\alpha$  y IL1 $\beta$  será denominada MIX en esta tesis. Sin embargo las concentraciones varían entre el primer y el segundo artículo. En el primer artículo, las concentraciones son: LPS 10  $\mu$ g/ml; TNF $\alpha$  100 ng/ml; IL1 $\beta$  100 U/ml. En el segundo artículo, las concentraciones son: LPS 10  $\mu$ g/ml; TNF $\alpha$  20 ng/ml; IL1 $\beta$  50 U/ml.

#### Reactivos:

- LPS (*Escherichia coli*, serotipo 0127:B89, Sigma). Se prepara una solución de 1 mg/ml en agua estéril. Sonicar 30 minutos, y agitar en *vortex* para ayudar a su disolución. Preparar justo antes de utilizar.
- TNF $\alpha$  (Genzyme, Cambridge, MA) (10  $\mu$ g/ml). Si es necesario, diluir en medio completo justo antes de utilizar. Guardar en alicuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- IL1 $\beta$  (Genzyme, Cambridge, MA). (800 u/ $\mu$ l). Si es necesario, diluir en medio completo justo antes de utilizar. Guardar en alicuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Protocolo:

1. Mezclar el LPS y/o TNF $\alpha$  y/o IL1 $\beta$  con el medio de cultivo antes de ser añadido a las células.
2. Añadir a las células y cultivar en condiciones estándar.

### 3.2.4. Cultivo con cicloheximida.

#### Reactivo:

Cicloheximida (Sigma).

#### Protocolo:

1. Sembrar los macrófagos en placas de  $\varnothing$  6 cm. Añadir medio con MIX. Incubar en condiciones estándar durante 24 horas.
2. Aspirar el medio. Añadir medio nuevo con cicloheximida D (25  $\mu$ g/ml), con o sin MIX. Cultivar durante 0, 4, 8 y 12 horas, para, a continuación, extraer el RNA.

### 3.2.5. Cultivo con actinomicina D.

Reactivo:

Actinomicina D (Sigma).

Protocolo:

1. Sembrar los macrófagos en placas de  $\varnothing$  6 cm. Incubar con MIX durante 24 horas en condiciones estándar.
2. Aspirar el medio. Añadir medio nuevo con actinomicina D (25  $\mu\text{g/ml}$ ), con o sin MIX. Cultivar durante 0, 4, 8 y 12 horas, para, a continuación, extraer el RNA.

### 3.2.6. Cultivo en hipoxia.

Para los cultivos en hipoxia, las células fueron incubadas en un incubador de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (Forma Scientific 3131, Marieta, OH), que regula la tensión de oxígeno de su interior sustituyendo aire por  $\text{N}_2$ , que es captado de una bombona. El incubador fue programado para mantener una tensión de oxígeno en su interior del 5%. Las condiciones de  $\text{CO}_2$ , humedad y temperatura fueron las utilizadas de manera habitual en cultivos celulares.

### 3.3. Mantenimiento de HUVEC, BAEC y células BCLC-9.

Se pasan 1-2 veces por semana, en función de su velocidad de crecimiento, cuando todavía están subconfluentes, El protocolo para pasarlas es el mismo para todos los tipos celulares.

Protocolo:

1. Lavar dos veces las placas con 5-10 ml de DPBS sin  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ .
2. Añadir 1-2 ml de tripsina 1x.
3. Incubar 2 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Golpear el canto de la placa para despegar las células. Comprobar en el microscopio.
4. Parar la reacción de la tripsina con 10 ml de medio completo.
5. Pipetear arriba y abajo la solución de células varias veces para deshacer los agregados y sembrar.

Las BAEC y las células BCLC-9 crecen directamente sobre plástico. Además, BCLC-9 crecen adheridas y en suspensión. Las HUVEC requieren que la superficie donde van a crecer este gelatinizada.

### **3.3.1. Gelatinización.**

Protocolo:

1. Preparar una solución al 0,2% de gelatina (Sigma) en agua estéril (Sigma).
2. Dispensar un volumen adecuado de solución de gelatina en cada placa. 3 mL por placa de 10 cm de diámetro, 200 µl en cada pozo de una placa de 96 pozos. Mover para que la solución cubra toda la superficie de la placa por igual.
3. Aspirar con una pipeta *Pasteur*. Dejar secar unos 30 minutos.

### **3.3.2. Descongelación.**

Protocolo:

1. Colocar 10 mL de medio completo atemperado en un tubo.
2. Descongelar la alícuota de células en un baño a 37°C.
3. Antes de que esté totalmente descongelado, pasar todo el volumen al tubo con medio. Mezclar.
4. Sembrar las células. Repartir por toda la placa.

Las BAEC se adhieren rápidamente al sustrato. Para evitar que no se distribuyan de manera homogénea por la placa, hay que poner un cierto volumen de medio en cada placa/pozo antes de sembrar las células.

### **3.3.3. Congelación.**

Reactivos:

-DMSO para cultivos (Sigma).

Protocolo:

1. Tripsinizar las células. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en medio completo con un 10% de DMSO.

3. Rotular viales de congelación. Dispensar 1 ml de suspensión celular por vial.
4. Congelar progresivamente los viales: Poner sucesivamente en hielo (1h), a –20°C (unas horas), –80°C (toda la noche), y finalmente en nitrógeno líquido.

#### 4. RNA.

A la hora de trabajar con RNA todo el material utilizado, así como los reactivos, deben ser libres de RNAasas. Para conseguir esto, hay que lavar el material fungible (si no se ha adquirido ya libre de RNAasas) con cloroformo o bien con NaOH 2N. Los reactivos deben ser preparados con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

##### **4.1. Tratamiento de agua destilada con DEPC.**

Reactivos:

DEPC (Sigma).

Protocolo:

1. Añadir bajo campana de gases 1 ml de DEPC a 1 L de agua destilada.
2. Agitar durante unas 6 horas.
3. Autoclavar para eliminar el DEPC.

##### **4.2. Extracción de RNA mediante gradiente de cloruro de cesio.**

Reactivos:

- PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ajustar a pH7.3.
- Solución de guanidina (100 ml): Pesar y disolver 164 mg acetato de sodio anhidro y 47.28 g de tiocianato de guanidina en 50 ml de agua. Agitar y calentar a 65°C. Añadir 1.54 mg de DTT y 5 ml de N-lauroilsarcosina al 10%.
- Cloruro de cesio (5.7 M): Disolver el cloruro de cesio en 0.1 M EDTA a pH 8.0 libre de RNAasas.
- Tampón TES: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM EDTA, 1% SDS.
- Acetato sódico 3 M, pH 5.2.
- Etanol 100% frío (guardado a –20°C).
- Agua DEPC.

Protocolo:

1. Lavar las células con 5 ml de PBS a temperatura ambiente. Aspirar y repetir.
2. Añadir 3.5 ml de solución de guanidina por  $<10^8$  células, repartiendo la solución equitativamente entre las diferentes placas. Rascar con un *scraper* para ayudar a lisar las células.
3. Recoger el lisado de todas las placas con la jeringa y la aguja. Hacer pasar 4 o 5 veces el lisado por la aguja para romper el DNA. Transferir a un tubo limpio.
4. Poner 1.5 ml de CICs en cada tubo de ultracentrifuga que se vaya a utilizar.
5. Transferir el lisado a los tubos de ultracentrifuga. Inclinar el tubo y depositar el lisado cuidadosamente por la pared, sin romper el gradiente de CICs.
6. Depositar los tubos en los cabezales de la ultracentrifuga. Equilibrar el peso de los tubos 2 a dos con solución de guanidina. Pesar con los cabezales y los tapones.
7. Centrifugar 18-20 horas a 40000 rpm, 20°C.
8. Poner los tubos en una gradilla. Extraer el sobrenadante con una pipeta *Pasteur*. Dejar un poco de líquido en el fondo y volver sobre un papel de filtro (para evitar tocar el *pellet* con la pipeta).
9. Resuspender el *pellet* con 360  $\mu$ l de TES. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente. Transferir el resuspendido a un tubo *Eppendorf*.
10. Precipitar el RNA añadiendo 40  $\mu$ l de acetato sódico 3 M y 1 ml de etanol 100% frío. Mezclar por inversión. Dejar toda la noche a -20°C.
11. Centrifugar 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.
12. Resuspender el *pellet* en 360  $\mu$ l de agua libre de RNAasas. Precipitar el RNA añadiendo 40  $\mu$ l de acetato sódico 3 M y 1 ml de etanol 100% frío. Mezclar por inversión. Dejar 30 minutos en nieve carbónica.
13. Centrifugar 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante. Hacer un pulso de los tubos para precipitar las gotas que quedan por la pared.
14. Dejar secar el *pellet* 10 minutos. Tiene que eliminarse todo el líquido porque puede interferir posteriormente en la valoración de las muestras.
15. Resuspender el *pellet* con agua libre de RNAasas. El volumen utilizado dependerá de la cantidad de *pellet*.

#### **4.3. Extracción de RNA con kit comercial.**

La extracción de RNA de células y tejidos se realizó con un kit comercial (TRIzol Reagent, Gibco), de acuerdo a las instrucciones del mismo.

#### 4.4. Digestión con DNAasa.

Las muestras de RNA fueron tratadas de acuerdo a las instrucciones de un kit comercial (DNA-free; Ambion) para eliminar el posible DNA contaminante.

#### 4.5. Valoración de RNA.

El RNA se valoró mediante en un espectrofotómetro (absorción a 260 nm de longitud de onda) (Uvikon 922, Kontron instruments). Para valorar las muestras de RNA, se prepararon diluciones (1/40-1/80) de las muestras de RNA en agua destilada libre de RNAsas (volumen final 80  $\mu$ l). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 2 mm de paso de luz.

Tras leer en el espectro, la concentración de RNA se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorción } 260\text{nm} \times \text{Dilución de la muestra} \times 40 / 1000$$

#### 4.6. Northern blot.

Reactivos:

- Tampón MOPS x1: 0.2 M MOPS; 50 mM acetato sódico; 10 mM EDTA. pH: 7.0. Filtrar. Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Azul de carga 10x: 160  $\mu$ l MOPS x10; 100  $\mu$ l glicerol (autoclavado); 1.8 ml agua; un poco de azul de bromofenol en polvo.
- Tampón desnaturizante: 150  $\mu$ l MOPS x10; 240  $\mu$ l formaldehido 37%; 750  $\mu$ l formamida; 150  $\mu$ l azul de carga 10x.
- Tampón SSC x10: 1.5 M de NaCl, 150 mM de citrato trisódico bihidratado. Ajustar a pH 7.0 con HCl.

Protocolo:

1. Preparar un gel desnaturizante para RNA. Para un gel de 50 ml:

- 4.1. Mezclar en un *erlenmeyer* 0.6 g de agarosa y 37 ml de agua.
- 4.2. Calentar en un microondas hasta que se disuelva la agarosa.
- 4.3. Enfriar y añadir en campana 8 ml de formaldehído 37% y 5 ml de MOPS x10. Mezclar.
5. Preparar las muestras de RNA: 6  $\mu$ l de RNA (x  $\mu$ l de RNA +6-x  $\mu$ l de agua)+ 24 $\mu$ l de tampón desnaturalizante. Calentar 10 minutos a 65°C. Poner en hielo. Añadir 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) a cada muestra.
6. Electroforesis. Poner el gel en una cubeta de electroforesis. Añadir tampón MOPS x1 hasta que el gel quede cubierto de MOPS x1 (Preparar 250 ml para una cubeta pequeña o 500 ml para una cubeta grande). Cargar las muestras en los pocillos. Poner los electrodos y realizar la electroforesis a 15 V 12 h.
  7. Transferencia:
    - 7.1. Poner 500 ml de tampón SSC x10 en una cubeta de vidrio de.
    - 7.2. Cortar un trozo de papel *Whatman* (3 mm de grosor) de manera que ocupe todo el vidrio y toque el fondo por los dos lados. Humedecer el papel con tampón SSC x10 y colocarlo sobre el vidrio. Eliminar las burbujas que puedan quedar entre el vidrio y el papel haciendo radar por encima una pipeta *Pasteur* de vidrio u otro objeto similar.
    - 7.3. Colocar el gel sobre el papel, de manera que los pocillos queden hacia abajo. Rodear los lados del gel con cuatro trozos de *Parafilm*. Quitar las burbujas que queden entre el gel y el papel como en el punto anterior.
    - 7.4. Cortar un trozo de membrana de nitrocelulosa y dos de papel *Whatman* de las mismas dimensiones que el gel.
    - 7.5. Humedecer la membrana y los papeles en primer lugar con agua, y posteriormente con tampón SSC x10.
    - 7.6. Marcar con lápiz una esquina de la membrana, para indicar en que cara estará el RNA y donde estaban situados los pocillos. Colocar la membrana encima del gel, poniendo la cara marcada con lápiz en contacto con el gel. Eliminar las burbujas.
    - 7.7. Poner los dos trozos de papel *Whatman*. Eliminar las burbujas.
    - 7.8. Poner 8-10 cm de trozos de papel de filtro –de las mismas dimensiones que el gel- sobre todo el montaje anterior.
    - 7.9. Poner encima un vidrio – u otro objeto similar- y un peso de unos 500 g. Nivelar para que el peso este repartido igualmente por toda la superficie. Dejar 12-24 horas.
    - 7.10. Quitar los papeles de filtro. Con cuidado, quitar el papel *Whatman* y girar la membrana.

- 7.11. Examinar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para comprobar si todo el RNA se ha transferido a la membrana.
- 7.12. Lavar la membrana con tampón SSC 5x 5 minutos en agitación para eliminar el exceso de sales.
8. Fijar el RNA. Poner la membrana entre dos trozos de papel encerado, y éstas entre dos trozos de papel *Whatman*. A continuación mantener a 80°C durante 2 horas.  
Si la membrana no se va a hibridar a continuación se puede guardar a 4°C hasta el momento de hacerlo.
9. Marcaje de la sonda.
  - 9.1. Pipetear en un tubo mini *Eppendorf* 44  $\mu$ l de tampón TE/ agua y 1  $\mu$ l de sonda. Desnaturalizar calentando a 95°C durante 5 minutos. Al acabar poner en hielo.
  - 9.2. Traspasar los 45  $\mu$ l a un tubo *rediprime DNA labelling system* (Amersham) que contiene una solución tamponada de dATP, dGTP, dTTP, *random primers*, y el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I. Mezclar digitalmente.
  - 9.3. Traspasar de nuevo todo el volumen a un tubo mini *Eppendorf*. Añadir 4  $\mu$ l de  $\alpha$ P<sub>32</sub>-dCTP al tubo. Pipetear hasta que todo quede bien mezclado. Incubar a 37°C durante 45 minutos.
  - 9.4. Rotular dos tubos *Eppendorf* (A y B), y añadir 9.5  $\mu$ l de tampón Tris (10 mM pH 8.0) en cada uno de ellos.
  - 9.5. Añadir 0.5  $\mu$ l del contenido del tubo con la sonda marcada al tubo "A". Purificar la sonda marcada del resto de componentes de la reacción por centrifugación en columna. (*Quick spin columns. Boehringer Mannheim*) a 1100 g durante 4 minutos a temperatura ambiente.
  - 9.6. Poner 0.5  $\mu$ l del eluido en el tubo "B". Poner el resto de sonda purificada en un tubo mini *Eppendorf*.
  - 9.7. Desnaturalizar calentando a 95°C durante 5 minutos. Poner en hielo.
  - 9.8. Cálculo de la actividad específica de la sonda:
    - 9.8.1. Preparar dos viales de cintilación con 4 ml de líquido de centelleo. Rotular (A y B).
    - 9.8.2. Poner 1  $\mu$ l de los tubos "A" y "B" en el vial de centelleo correspondiente.
    - 9.8.3. Contar en un contador gamma.
    - 9.8.4. Cálculos:

Porcentaje de incorporación de radioactividad a la sonda:

$$\begin{aligned} & x \text{ cpm} \times \text{dilución de la muestra} \times \text{volumen total} = y \text{ cpm totales} \\ & y \text{ cpm B/ y cpm A} \times 100 = \% \text{ incorporación} \end{aligned}$$

Cantidad de DNA =  $\frac{(\mu\text{Ci añadidos}) (13.2) (\% \text{ incorporación})}{\text{actividad específica } \alpha\text{P}_{32}\text{-dCTP}}$  +molde inicial (ng)

$(\mu\text{Ci añadidos}) (2.2 \times 10^4) (\% \text{ incorporación}) = \text{radioactividad en dpm}$

Actividad Específica =  $\frac{(\text{dpm incorporadas}) \times 10^3}{\text{cantidad de DNA}}$   
(dpm/ $\mu\text{g}$ )

10. Prehibridación de la membrana. Calentar solución de hibridación (Rapid-hyb buffer. Amersham life Science) (proporción 0.125 ml/cm<sup>2</sup> de membrana) y un tubo de hibridación a 65°C. Cuando estén a temperatura, colocar la membrana en el tubo, añadir la solución de prehibridación, y rotar en una estufa a 65°C (equilibrar con otro tubo de hibridación) durante 15 minutos.
11. Hibridar la membrana. Sacar el tubo de hibridación de la estufa, abrir y poner un poco de solución de prehibridación en un tubo de 50 ml. Añadir una cantidad de sonda marcada equivalente a 7x10<sup>5</sup> cpm/ml. Mezclar. Traspasar de nuevo el contenido del tubo al tubo de hibridación. Cerrar bien. Incubar a 65°C en rotación durante un mínimo de 2 h a toda la noche. Controlar que los tubos no pierden líquido.
12. Lavar la membrana.
  - 12.1. Vaciar el contenido del cilindro en un contenedor de residuos radioactivos. Añadir un poco de 2x SSC+0.1% SDS en el cilindro. Cerrar y agitar hasta que la membrana haya bajado a la boca del cilindro. Verter el contenido del cilindro en un *tupper* o u otro objeto similar.
  - 12.2. Sacar con pinzas y mucho cuidado la membrana. Comprobar con el contador *Geiger* que la sonda ha hibridado.
  - 12.3. Poner la membrana en el *tupper*. Agitar a 65°C durante 20 minutos.
  - 12.4. Repetir los lavados aumentando la astringencia del tampón sucesivamente (1x SSC+0.1% SDS; 0.5x SSC+0.1% SDS; 0.1x SSC+0.1% SDS), a 65°C en agitación y duración de 5-15 minutos, para eliminar el exceso de unión así como la unión no específica de la sonda a la membrana. Hay que comprobar después de cada lavado la radioactividad de la membrana con el contador *Geiger*.

## 13. Autorradiografiar.

13.1. Colocar la membrana en un *cassette* de revelado (Hypercassette, Amersham life science), en contacto con una película sensible (Hyperfilm, Amersham life science). *Evitar el contacto con la luz.*

13.2. Dejar a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 12 horas antes de revelar.

**4.7. Retrotranscripción (RT).**

## Materiales:

- Transcriptasa reversa del virus del mieloblastoma de aves (AMV) (Promega)
- Tampón de RT (10x, sin  $\text{MgCl}_2$ ) suministrado con el enzima. (Tris-HCl pH: 8.3 100 mM; KCl 500 mM, Triton X-100 1%).
- Mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) para PCR, 10 mM cada uno. (Promega).
- $\text{MgCl}_2$  (50 mM) suministrado con el enzima.
- Cebadores aleatorios (*Random primers*) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Promega).
- Inhibidor de RNAasas (Promega).
- Agua destilada.

## Protocolo:

1. Preparar el tampón de reacción, mezclando los componentes detallados a continuación en un tubo *Eppendorf* libre de RNAasas. El volumen necesario de cada componente es el indicado multiplicado por n+2 tubos de reacción.

Tampón de RT 10x	2 $\mu\text{l}$
Mezcla de dNTP (10 mM)	2 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	2 $\mu\text{l}$
<i>Random primers</i>	1 $\mu\text{l}$ (0.5 $\mu\text{g}$ )
Inhibidor de RNAasas	1 $\mu\text{l}$ (40 U)
Enzima (RT-AMV)	2 $\mu\text{l}$ (15 U)

2. Rotular tubos de PCR (mini *Eppendorf*). Pipetear en cada uno de ellos un volumen de agua destilada igual a 20  $\mu\text{l}$  – y  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción – z  $\mu\text{l}$  de RNA (=1  $\mu\text{g}$ ).

3. Pipetear en cada tubo un volumen de  $y \mu\text{l}$  de tampón de reacción ( $y = \text{volumen total de tampón de reacción}/n+2 \text{ tubos}$ ).
4. Pipetear en cada tubo  $1 \mu\text{g}$  de RNA ( $z \mu\text{l}$ ). Mezclar bien. Hacer un pulso para bajar todo el volumen al fondo del tubo.
5. Poner los tubos en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MA) y programar las siguientes condiciones:

Reacción de retrotranscripción:  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos.

Desnaturalización final:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Final:  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Nota: Uno de los problemas de las PCR son las contaminaciones por aerosoles formados durante la reacción. Para evitar este problema, hay que tomar precauciones a la hora de realizarlas, como utilizar puntas con filtro, no utilizar las mismas pipetas para preparar la reacción y para pipetear productos amplificados, o incluso trabajar en habitaciones diferentes si se prepara la reacción (pre-PCR) o si se utilizan productos amplificados (post-PCR). De todas maneras, se debe controlar la contaminación potencial de las muestras añadiendo un control negativo (mezcla de reacción sin DNA molde) en cada PCR.

**Tabla : características de los cebadores y de las PCR utilizados.**

Gen	Cebadores	Tamaño amplificado	pmol cebadores	Volumen de RT ( $\mu\text{l}$ )	Anillamiento y extensión	Número de ciclos	Referencia
VEGF	S: 5'-cgaagtggtgaagttcatggatg-3'	403 pb	50	5	62°C 1'	25	Möhle <i>et al</i>
	A: 5'-ttctgtatcagctcttctggtgag-3'	535 pb			72°C 1'		
		607 pb					
KDR	S: 5'-ctggcatggtctctgtgaagca-3'	790 pb	30	5	62°C 1'	40*	Möhle <i>et al</i>
	A: 5'-aataccagtgatgtagcg-3'				72°C 2'		
Flt-1	S: 5'-cagcggcctttgtggaagactcac-3'	735 pb	50	2	56°C 5''	40*	Couffinal <i>et al</i>
	A: 5'-acatctcgggtcactcttgac-3'				72°C 1'		
ADM	S: 5'-gctggttccgtcgcctgatgt-3'	398 pb	30	5	60°C 45''	24	Cejudo-Martín <i>et al</i>
	A: 5'-cgttgctctgtctatctgtg-3'				72°C 1'		
HIF1 $\alpha$	S: 5'-aaccatttctactcagg-3'	444 pb	50	2	58°C 30''	25	Cejudo-Martín <i>et al</i>
	A: 5'-caaagcgacagataacacg-3'				72°C 1'		
HIF1 $\beta$	S: 5'-caggtcggatgatgagcagagca-3'	536 pb	40	2	55°C 1'	27	Lee <i>et al</i>
	A: 5'-gaagtcagcagctctccatgag-3'				72°C 1'		

GAPDH	S: 5'-ccatggagaaggctggg-3' A: 5'-caaagttgcatggatgacc-3'	194 pb	50	5	62°C 1' 72°C 1'	30*	Pérez-Ruiz <i>et al</i>
$\beta$ actina	S: 5'-actctccagcctcctt-3' A: 5'-ctcctctgcatcctgtc-3'	169 bp	25	2	55°C 30'' 72°C 30''	22	Chen <i>et al</i>

### Materiales.

- Taq polimerasa (Gibco)
- Tampón de PCR(10x, sin MgCl<sub>2</sub>) suministrado con el enzima.
- Mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) para PCR, 2 mM cada uno (Promega).

- MgCl<sub>2</sub> (50 mM) suministrado con el enzima.

- Agua destilada.

- Aceite mineral (Sigma).

- Cebadores (20  $\mu$ M). La secuencia de los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar cDNA de ADM, HIF1 $\alpha$  y GAPDH se diseñaron con el programa *Primer select* a partir de la secuencia genómica y/o mRNA obtenidas del *GenBank*.

Las secuencias del resto de cebadores se obtuvieron de las referencias que aparecen en la tabla tal.

Todos los oligonucleótidos cebadores fueron sintetizados en la unidad de DNA del Hospital Clínic (394 DNA/RNA Synthesizer, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores son resuspendidos con 200  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA) y valorados en un espectrofotómetro gracias a su absorción a 260 nm de longitud de onda. (ver punto 4.5).

La concentración del cebador se determina mediante al siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{M}) = A_{260} \times \text{dilución} \times 100 / (1.5 N_A + 0.71 N_C + 1.2 N_G + 0.84 N_T)$$

$N_n$ : número de bases de ese tipo presentes en el cebador.

Se preparan alícuotas de 20  $\mu$ M diluyendo en agua estéril para utilizar en las PCR.

### Protocolo:

1. Preparar el tampón de reacción, mezclando los componentes detallados a continuación en un tubo *Eppendorf*. El volumen necesario de cada componente es el indicado multiplicado por n+2 tubos de reacción.

Tampón de PCR 10x	5 $\mu$ l
Mezcla de dNTP (2 mM)	1.3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 $\mu$ l
*pmol cebador <i>sense</i> (20 $\mu$ M)	x $\mu$ l
*pmol cebador <i>antisense</i> (20 $\mu$ M)	x $\mu$ l
Taq polimerasa	0.5 $\mu$ l

(\*) las cantidades exactas utilizadas en las diferentes amplificaciones hechas en esta tesis aparecen en la tabla tal.

2. Rotular tubos de PCR (mini *Eppendorf*). Pipetear en cada uno de ellos un volumen de agua destilada igual a 50  $\mu$ l – y  $\mu$ l de tampón de reacción – z  $\mu$ l de reacción de retrotranscripción (RT). El volumen exacto de reacción de RT utilizado en cada caso aparece en la tabla tal.
3. Pipetear en cada tubo un volumen de y  $\mu$ l de tampón de reacción (y = volumen total de tampón de reacción/n+2 tubos).
4. Pipetear en cada tubo z  $\mu$ l de reacción de retrotranscripción (RT) (El volumen exacto de reacción de RT utilizado en cada caso aparece en la tabla tal).
5. Mezclar digitalmente los componentes. Hacer un pulso en una minicentrífuga para bajar todo el volumen al fondo del tubo. Añadir un par de gotas de aceite mineral a cada tubo.
6. Colocar en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MA) y programar las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 95°C 5-10 minutos

Desnaturalización: 95°C 30 segundos

n ciclos \*  
Anillamiento: ver tabla tal para la temperatura y el tiempo

Extensión: 72°C, ver tabla tal para el tiempo en cada caso

Extensión final: 72°C 5 minutos.

Final a 4°C

(\*) Muchas de las PCR realizadas en esta tesis son semicuantitativas. Para esto, una vez optimizada la obtención de banda, se tiene que

determinar en cada caso particular el número de ciclos en los que la PCR está en fase exponencial. Una vez hecho esto, se elige un número de ciclos función de la intensidad de la banda, de manera que sea aceptable, pero que aún no esté saturada (fase exponencial). En la tabla aparecen el número de ciclos utilizados en cada amplificación en concreto. Solamente, KDR y Flt-1 no fueron detectados por PCR semicuantitativa.

7. Mediante electroforesis en gel de agarosa analizar 20  $\mu$ l de las muestras paralelamente a un marcador de peso molecular. Comprobar que el tamaño de las bandas corresponde al esperado.

#### **4.9. Electroforesis en gel de agarosa.**

##### Reactivos

- Tampón TAE 50x: 242 g Tris, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Diluir a 1x.
- Bromuro de etidio 1mg/ml.
- Tampón de carga (final: 0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol)
- Gel de agarosa: Según el tamaño de los fragmentos de DNA que se vayan a visualizar, se elige el porcentaje de agarosa más adecuado (Tamaño más grande = menor porcentaje de agarosa).

Para un gel de 50 ml al 1.5% de agarosa (para fragmentos de 400-600 pb):

1. Pesar 0.75 g de agarosa de baja fusión. Disolver en un *erlenmeyer* en 50 ml de TAE 1x.
2. Calentar en un microondas. Agitar de vez en cuando para ayudar a la disolución total de la agarosa.
3. Atemperar a 50°C y añadir 7.5  $\mu$ l de bromuro de etidio (1 mg/ml). Trabajar con cuidado, ya que el bromuro de etidio es cancerígeno.
4. Mezclar y verter sobre un soporte con el peine adecuado. Apartar las posibles burbujas a los lados.

##### Protocolo:

1. Preparar un gel de agarosa del porcentaje adecuado.
2. Introducir el gel en la cubeta de electroforesis y cubrir con TAE 1x.
3. Mezclar las muestras con tampón de carga (un gota por muestra). Pipetear las muestras y el marcador de peso molecular en los pocillos.

4. Conectar la cubeta de electroforesis a una fuente, a un voltaje de 60 V. Controlar la formación de burbujas en el fondo de la cubeta y la migración del azul de bromofenol, como indicativos de que hay corriente y de que las muestras están migrando hacia el polo correcto.
5. Pasado un tiempo visualizar el resultado de la electroforesis, poniendo el gel en un transiluminador de rayos ultravioleta.

#### **4.9. Secuenciación de DNA.**

Al utilizar los cebadores por primera vez, los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados para comprobar que eran realmente los esperados.

Con un bisturí, recortar la zona del gel de agarosa con la banda de interés. *Protegerse de la luz ultravioleta.* El DNA se purifica de la agarosa siguiendo las instrucciones de un kit comercial (*Quiaex II Gel extraction kit*. Qiagen). La secuenciación se realizó de manera automática en la Unidad de DNA del Hospital Clínic. Las muestras se prepararon siguiendo las instrucciones de un kit comercial (*ABI Prism dRhodamine Terminator cycle*; Applied Biosystems).

### **5. PROTEÍNAS.**

#### **5.1. Extracción de Proteínas Nucleares.**

(Dignam's protocol, modificado por GL Semenza y GL Wang- Mol Cel Biol 1992, Vol 12, p5447-5454)

Reactivos:

- Tampón A: 10 mM Tris-HCl, pH7.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl. Guardar a 4°C.
- Tampón C: 0.42 M KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerol. Guardar a 4°C.
  - Tampón D: 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 20% glicerol. Guardar a 4°C.
- vanadato de sodio (*stock* 100 mM): Necesita ser activado. Para ello, en primer lugar se ajusta el pH a 10.0 (HCl), se pone en un baño hirviendo y a continuación se introduce en hielo. Se repite esta operación hasta que sea incoloro. Entonces se vuelve a ajustar el pH a 10.0 (NaCl) y se repite la operación anterior hasta que

la solución vuelve a ser incolora y se estabiliza el pH. Entonces se ajusta a 100 mM, se hacen alícuotas y se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Añadir a los tampones A y C justo antes de usar (para 10 ml): una pastilla de *complete* (Roche), 2.3 mg de *Pefabloc* (Roche), 0.5 mM DTT, 1 mM vanadato de sodio.

Protocolo:

1. Aspirar el medio de las células. *Recordar que hay que guardar alícuotas.*
2. Lavar las células dos veces con DPBS sin  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ .
3. Scrapear las células con 5 mL de DPBS sin  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ .
4. Centrifugar 1500 rpm 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. Lavar el pellet con 4 *packed cell volumes* (PCV) (El volumen que ocupe el *pellet*) de tampón A.
6. Resuspender en 4 PCV de tampón A.
7. Incubar en hielo 10 min.
8. Homogeneizar la suspensión celular en un homogenizador *Dounce* (manual).
9. Centrifugar 3000 rpm 5 min para que bajen los núcleos.
10. Resuspender en 3 PCV de tampón C.
11. Mezclar rotando a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.
12. Centrifugar 30 min a 13500 rpm para bajar los *nuclear debris*.
13. Dializar (VSWP *Standard MF-Millipore membranes*) el SN contra 1 cambio de tampón D de 2-4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .
14. Centrifugar el dializado 10 min a 13500 rpm.
15. Congelar alícuotas en  $\text{N}_2$  líquido y guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **5.2. Valoración de proteínas.**

Las proteínas se valoran según un ensayo comercial basado en el método de Lowry (DC protein Assay, BIORAD). Se elaboró una recta patrón con albúmina sérica bovina (concentraciones de  $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $0.62\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón C (ver punto 5.1). Las muestras y la recta patrón se tratan de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

## **5.3. Western blot.**

Reactivos:

- Anticuerpos anti HIF1 $\alpha$  y anti HIF1 $\beta$  (Transduction laboratories).
- Marcador de peso molecular preteñido (*Kaleidoscope* de BioRad o similar).
- Poliacrilamida (BioRad).
- *Upper buffer* pH 6.8, 4x: 6.05 Tris base, 0.4 g SDS.
- *Lower buffer* pH 8.8, 4x: 91 g de Tris base, 2 g SDS.
- TEMED (BioRad).
- Persulfato de amonio 10%
- ECL (Amersham).
- Tampón de carga 6x: 2% SDS; 100 mM DTT; 60 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.01% azul de bromofenol.
- Tampón de electroforesis 1x: 25 mM Tris-HCl, pH 6.8; 192 mM glicina; 0.1% SDS. Guardar a 4°C.
- Tampón de transferencia 1x: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM glicina; 20% metanol. Se puede preparar una solución *stock* sin el metanol. Guardar a 4°C.
- Solución decolorante: 30% metanol, 10% ácido acético.
- Tampón TBS-T: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.9% NaCl; 0.1% Tween-20.
- Tampón TBS: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.9% NaCl.
- Tampón *stripping* (100 ml): 12.5 ml Tris 0.5M, pH 6.8; 20 ml SDS 10%; 0.7 ml  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Solución azul *Comassie* (1 L): 58.5 ml de ácido perclórico 60%, 0.4 g *Comassie blue G-250*.

Protocolo:

1. Tomar 20  $\mu$ g de proteínas nucleares y mezclarlas con tampón de carga. Calentar a 100°C durante 10 minutos. Poner en hielo al acabar.
2. Preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida, siguiendo las instrucciones detalladas a continuación:

<b>Gel separador</b>	<b>7.5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	
<b>15%</b>				
30% acrilamida/				
0.85 bisacrilamida	1.875 ml	2.51 ml	3.125	ml
3.75 ml				

	<i>lower buffer</i> 4x	1.875 ml	1.875 ml	1.875	ml
1.875ml	Agua		3.75 ml	3.115	ml
2.50 ml	1.875 ml				
	10% PSA	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
	TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	
20 $\mu$ l					

**Gel concentrador:** 650  $\mu$ l de 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida, 1.25 ml de *upper buffer* x4, 3.05 ml agua, 25  $\mu$ l de 10% PSA, 5  $\mu$ l TEMED.

3. Hacer la electroforesis utilizando el equipo Mini PROTEAN III (Bio-Rad). Usar una diferencia de potencial de 100 V. Mantener hasta que la proteína de interés (guiarse por el marcador de peso) esté más o menos por la mitad del gel separador.
4. Cortar una membrana de PVDF de 7x9 cm y dos trozos de papel *Whatman* de 8x10 cm. Hidratar en tampón de transferencia.
5. Preparar la transferencia. Montar el *sándwich* de la siguiente manera:
  1. Cara negra del *cassette*.
  2. *Scotch-brite*.
  3. Papel *Whatman*
  4. Gel (encima del papel). Mojar bien con tampón.
  5. Membrana. Mojar bien con tampón.
  6. Papel *Whatman*.
  7. *Scotch-brite*
  8. Cara blanca del *cassette*. Cerrar.

Eliminar siempre las burbujas entre un elemento y otro del *sándwich*.

6. Colocar el *sándwich* en el aparato de transferencia. Añadir el buffer de transferencia y poner el hielo. Transferir overnight a 80 mA.
7. Separar el gel de la membrana. Comprobar que no ha habido problemas en la transferencia mediante tinción del gel con *Comassie blue* durante 30 minutos (destinción con solución decolorante) y de la membrana con 0.1% Ponceau-S

en 5% de acético durante 5 minutos. Desteñir la membrana con agua destilada antes de continuar con el protocolo.

8. Bloquear la membrana con leche en polvo desnatada al 5% en tampón TBS-T 2 horas a temperatura ambiente, con agitación suave.
9. Incubación con el anticuerpo primario 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

HIF1- $\alpha$ : 1/250 en TBS-T +5% leche

HIF1- $\beta$ : 1/1000 en TBS-T + 5% leche

10. Lavar 3x con TBS-T, 10 minutos, temperatura ambiente, agitación intensa.
11. Incubación con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con HRP (Amersham international). Dilución 1/2000 durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave.
12. Lavar 6x con TBS-T, 10 minutos, temperatura ambiente, agitación intensa.
13. Revelar por quimioluminiscencia (ECL Western blotting analysis system; Amersham international).
14. Al acabar, se puede guardar la membrana en tampón TBS a 4°C para posteriores incubaciones.
15. Si se desea incubar una membrana con otro anticuerpo primario, se puede eliminar el anterior calentando a 50°C durante 30 minutos con el tampón *stripping*, seguido de un lavado de 10 minutos con TBS-T.

## **6. TINCIONES E INMUNOCITOQUÍMICA.**

### ***6.1. Preparaciones celulares por citocentrifugación.***

*A partir de líquido ascítico de pacientes CH. Si no tiene peritonitis se necesitan unos 40 mL. Con peritonitis hay suficiente con 5 mL.*

Material:

- Filtros de citocentrífuga (filter cards Thick white, cat nº 5991022, Shandon).

Protocolo:

1. Centrifugar el líquido ascítico o la suspensión celular a 1800 rpm, 4°C 10´.
2. Descartar el sobrenadante (SN) en otro tubo. Utilizar aproximadamente 0.5-1 mL de SN (según el *pellet* obtenido) para resuspender el *pellet*.
3. Montar los cacharritos del *cytopspin*:

- a) Colocar el porta en el cacharrito con la parte esmerilada hacia arriba.
  - b) Colocar el filtro sobre el porta, la parte lisa en contacto con el porta.
  - c) Colocar el embudo, con la abertura grande hacia arriba y la abertura pequeña coincidiendo con el agujero inferior del filtro.
  - d) Cerrar las pinzas.
4. Poner 80  $\mu$ L de suspensión celular en el fondo del embudo.
  5. Colocar los cabezales en el rotor. Cerrar el rotor y encajarlo en la centrifuga Citocentrifugar (cytospin 3, Shandon) a 500 rpm durante 5 minutos.
  6. Congelar los portas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 6.2. ***Sembrado de macrófagos peritoneales para inmunocitoquímica.***

### Materiales:

- *Piscinas* (LabTek chambers 1 well; n° cat 177372; NUNC).

### Protocolo:

1. Aislar los macrófagos del líquido ascítico por gradiente de Ficoll-Percol (ver punto 2). Contar las células.
2. Ajustar la suspensión celular a una concentración de 600.000 macrófagos / ml con medio de cultivo de macrófagos (ver protocolo). Sembrar 1.200.000 macrófagos (=2ml de suspensión celular) en cada *piscina*. Incubar toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .
3. Aspirar el medio de las piscinas.
4. Lavar dos veces con DPBS con  $\text{Ca}^{++}$  /  $\text{Mg}^{++}$ .
5. Dispensar 3.6 ml de medio de cultivo de macrófagos o de medio con MIX (ver 3.2.3) por piscina (333333 macrófagos/ml).
6. Incubar en condiciones estándar durante 48 horas.
7. Recoger el medio en hielo. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Hacer las alícuotas y guardarlas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de hacer determinaciones.
8. Quitar las paredes de plástico apretando lateralmente y tirando hacia arriba.
9. Quitar la silicona que ha mantenido unida las paredes del plástico con ayuda de una espátula u otro objeto similar.

10. Lavar los portas con PBS.
11. Secar al aire. Congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3. Tinción Giemsa.

Reactivos:

- May-Grünwald (Merck).
- Giemsa (Merck). Antes de utilizar diluir al 20% en agua destilada.

Protocolo:

1. Sumergir los portas en May-Grünwald durante 1 minuto a temperatura ambiente.
2. Sumergir los portas en Giemsa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con agua del grifo.

### 6.4. INMUNOCITOQUÍMICA VEGF.

Reactivos:

- Anticuerpo (Ab) cabra anti VEGF humano (policlonal, n° cat sc-152-G; Santa Cruz Biotechnology). Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Hematoxilina de Mayer (1 L): 50 g  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 1 g Hematoxilina; 0.1 g  $\text{NaIO}_3$ ; 1 g ácido cítrico  $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ ; 50 g *Chloral hydrate*. Disolver en 750 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y enrasar posteriormente a 1 L con agua destilada. Proteger de la luz. Guardar a temperatura ambiente.
- PBS x1 pH=7.4. Preparar un stock de PBS x10 con las siguientes sales:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.01 M	(1.36 g para 1 L de PBS x10).
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.1 M	(17.8 g “ “ “ ).
NaCl	1.37 M	(80.06 g “ “ “ ).
KCl	0.027 M	(2.013g “ “ “ ).

Autoclavar para que dure más. Diluir a x1 con agua destilada.

- $\text{H}_2\text{O}_2$  3% en PBS. Diluir  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% (n° cat 8600; Merck) con PBS.
- Kit de revelado (Vectastain elite ABC kit, n° cat PK-6105; Vector labs.), que contiene:
  - Suero de conejo
  - Anticuerpo secundario biotinilado conejo anti cabra

- Avidina unida a peroxidasa de rábano (HRP) (ABC reagent).
- DAB (Diaminobenzidina tetrahidrocloruro) (Peroxidase substrate kit, nº cat SK-4100; Vector labs.)
- Aquatex (nº cat 1.08562.; Merck).
- Metanol 100% ( grado HPLC; nº cat Me0306, Scharlau)
- Solución de  $\text{KMnO}_4$  al 3% y de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en agua destilada.  $\text{KMnO}_4$  (nº cat 5082; Merck.) está en el servicio de Microbiología.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (nº cat 6392; Merck).

#### Material:

- Cubres de 24 x 60 mm (extensiones de células) o de 24 x 24 mm (*cytospines*).
- Pinzas.
- Cámara húmeda. Se puede hacer con una caja de *porexpan* con tapa. En una tapa se pone agua (suficiente para cubrir el fondo) o papeles humedecidos y un par de gradillas encima, sobre las que se colocaran los portas durante las incubaciones.
- Cubetas de vidrio y cestas para inmunocitoquímica. Mejor grandes (aprox. 24 portas). También se pueden usar jarras de Coplin.
- Portas.
- Pipetas *Pasteur* de plástico.
- Pañuelos de papel.
- Pipetas semiautomáticas p-100, p-5000, p-1000.
- Puntas azules, blancas y amarillas.

#### Protocolo:

1. Fijar las células introduciendo los portas en metanol frío (4°C) al 100% durante 7 minutos.
2. Poner los portas en PBS frío hasta el momento de empezar la inmunocitoquímica.

*A partir de aquí todas las incubaciones y lavados se realizan a temperatura ambiente excepto la del primer anticuerpo, que es a 4°C. Además, las incubaciones se realizan en una cámara húmeda.*

*Los lavados con PBS y la contratinción se realizarán en las cubetas grandes, moviendo de vez en cuando al cesta con las preparaciones.*

*Hay que acordarse de rotular los portas con lápiz con la dilución de Ab usada y el día en que se realiza la inmunotinción.*

3. Incubar las muestras en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% 1x30', para bloquear la peroxidasa interna.
4. Lavar con PBS 3x5'.
5. Incubar en suero de conejo al 1.5% en PBS durante 20'.
6. Eliminar el suero decantando los portas.
7. Incubar con el primer anticuerpo (cabra anti VEGF humano). La incubación se realiza con el Ab diluido 1/300 en suero de conejo al 5%, *overnight* a 4°C.

El **control negativo** se incuba con suero de conejo al 5%, en las mismas condiciones, o en suero con el primer Ab (1/300) bloqueado con un exceso de VEGF. Esto se hace incubando el Ab primario diluido en suero con una cantidad cinco veces superior de VEGF péptido 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se centrifuga a 14000 rpm durante 10' y se incuba la muestra con el sobrenadante.

8. Lavar con PBS 3x5'.
9. Incubar con el anticuerpo secundario (conejo anti cabra biotinilado) 30'.

Se prepara añadiendo a 10 mL de PBS 3 gotas de stock de suero de conejo (150 µL aprox.) y 1 gota de stock de anticuerpo biotinilado. Mezclar.

10. Lavar con PBS 1x5'.
11. Incubar con avidina unida a HRP (*ABC reagent*) 30'. **Preparar 30' antes de usar.** Se prepara con las siguientes proporciones y siguiendo este orden: 5 mL de PBS: 2 gotas de reactivo A: 2 gotas de reactivo B. Mezclar inmediatamente después de añadir cada reactivo.

12. Lavar con PBS 3x5'.
13. Revelar con DAB durante 5'-6'. Se prepara añadiendo a 5 mL de agua destilada (en este orden): 2 gotas de *Buffer stock solution*, 4 gotas de *DAB stock solution* y 2 gotas de *hydrogen peroxide solution*. Mezclar bien después de añadir cada cosa.

El DAB es **cancerígeno** y **teratógeno**. Después de utilizar se debe descartar en un mismo volumen de una solución de KMnO<sub>4</sub> al 3% y de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% para neutralizar el DAB.

14. Lavar en H<sub>2</sub>O del grifo (importante por los iones que lleva el agua).
15. Contrateñir las muestras en hematoxilina de Mayer 1x5'. Con esta tinción los núcleos quedan de color azul.
16. Lavar las muestras en agua del grifo durante 3-4' para que vire la hematoxilina.
17. Secar los portas con un pañuelo de papel. No secar la muestra!! Poner una gotita de *Aquatex* sobre el porta, cerca del borde de la muestra.

18. Limpiar los cubres con un pañuelo de papel. Colocar un borde del cubre en contacto con la gota, tocando el porta. Sujetar la parte opuesta del cubre con una punta amarilla o similar. Dejar caer el cubre poco a poco.
19. Dejar que la resina ocupe toda la superficie entre el cubre y el porta. Dejar secar.
20. Apuntar en una pegatina los datos de la preparación (paciente, día de la paracentesis, dilución del anticuerpo o tipo de control, día de la preparación). Pegar en el borde esmerilado del porta.

## **7. ENSAYOS CON CÉLULAS ENDOTELIALES.**

### **7.1. Ensayo de proliferación endotelial.**

Reactivos:

- Solución de MTT (Sigma): Preparar una solución de 0.5 mg/ml en RPMI1640. Guardar alicuotado a  $-80^{\circ}\text{C}$  1 mes.
- Placas de 96 pocillos gelatinizadas (ver 3.3.1).
- Isopropanol acidificado: 96% isopropanol/4% HCl al 35%.

Protocolo:

1. Tripsinizar HUVEC en cultivo (placas de  $\varnothing 100$  mm) a un porcentaje de confluencia del 80-90%.
2. Traspasar la suspensión celular a un tubo de 15 mL y centrifugar a 1800 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Descartar el sobrenadante. Resuspender el *pellet* celular en 1 mL de medio de cultivo. Contar las células (ver 3.1).
4. Ajustar la suspensión celular a una concentración de 4800 células/200  $\mu\text{l}$ .
5. Sembrar las células en placas de 96 pozos gelatinizadas a una concentración de 4800 células/200  $\mu\text{l}$ /pocillo. Incubar en condiciones estándar durante 24 horas.
6. Lavar dos veces con HBSS con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .
7. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de medio condicionado de cultivos de macrófagos de pacientes con y sin peritonitis bacteriana espontánea, o bien líquido ascítico diluido al 25% con medio de HUVEC sin suero. En los controles se añade 200  $\mu\text{l}$  de

medio de cultivo de HUVEC. *El medio condicionado procede de cultivos de macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con y sin peritonitis bacteriana espontánea cultivados durante 48 horas.*

8. Incubar en condiciones estándar durante 24 horas.
9. Añadir 25  $\mu$ l de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada pocillo. Proteger de la luz e incubar en condiciones estándar durante 4 horas.
10. Aspirar el medio de los pocillos. Lavar 2 veces con HBSS con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  y sin rojo fenol.
11. Añadir a cada pozo 100  $\mu$ l de isopropanol acidificado. Proteger de la luz.
12. Agitar durante 20 minutos (80-90 rpm) a temperatura ambiente.
13. Determinar la absorbancia a 570 nm.

## **7.2. Ensayo de liberación de óxido nítrico (NO) por células endoteliales.**

Protocolo:

1. Sembrar BAEC en placas de 6 pozos. Mantener en medio completo hasta la subconfluencia.
2. Lavar 2x con HBSS con  $Ca^{++}$ /  $Mg^{++}$ . Añadir 2 mL de medio de BAEC sin suero e incubar en condiciones estándar durante 2 horas. En caso de incubación con L-NMMA (2 mM, concentración final), también se añade en este momento.
3. Aspirar el medio. Añadir 1 mL de medio condicionado de cultivo de macrófagos e incubar durante 1 hora.

En este experimento se realizaron varios controles. En ellos, se incubaron las células con 1 mL de medio RPMI con 2% de FBS+ L-Gln (2 mM) + antibiótico y las siguientes sustancias: VEGF (40 ng/ml), ionomicina (3  $\mu$ M), ADM (100 nM).

En los experimentos de neutralización de VEGF, se añadió anticuerpo anti VEGF a una concentración de 1 $\mu$ g/ml al medio condicionado, y se incubó durante dos horas en agitación suave a temperatura ambiente.

Paralelamente a los experimentos con células, y con objeto de saber la formación espontánea de nitritos y nitratos en el medio, se incubaron muestras de 1 ml (por duplicado) de medio condicionado de macrófagos y medio completo de macrófagos sin condicionar en placas de 6 pozos sin células.

4. Recoger el medio. Centrifugar y alicuotar. Guardar a  $-20^{\circ}C$  hasta el momento de la determinación de nitritos.

## **8. DETERMINACIONES.**

### **8.1. *Determinación de adrenomedulina.***

La concentración de ADM en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales, fue analizada mediante radioinmunoensayo con un kit comercial (*Adrenomedullin RIA kit*, DRG), previa extracción del péptido en fase sólida. El RIA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: La duración del RIA es de tres días: el primer día se preparan las muestras y la curva estándar y se añade el primer anticuerpo, el segundo día se añade adrenomedulina marcada radioactivamente con  $I^{125}$ , y el tercero se añade el segundo anticuerpo y se cuenta la radioactividad. Según el manual de instrucciones, la duración del RIA es de dos días, ya que el primer día se añaden a la vez el primer anticuerpo y la adrenomedulina marcada radiactivamente.

Protocolo de extracción:

1. Pipetear 1 mL de sobrenadante celular en tubos de polipropileno. Los tubos tienen que estar en hielo.
2. Acidificar las muestras con 3 mL de ácido acético al 4%.
3. Activar las columnas C-18 *sep-pak* (Waters) pasando en este orden: 5 mL de metanol, 5 mL de agua destilada y 5 mL de ácido acético al 4%.
4. Pasar las muestras dos veces, lentamente, a través de las columnas.
5. Lavar las columnas pasando, por este orden: 3 mL de agua destilada y 3 mL de etanol 25%.
6. Eluir las muestras pasando a través de las columnas 4 mL de una solución al 90% de etanol 86% y 10% de ácido acético glacial. Recoger en tubos de polipropileno.
7. Evaporar en mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*, Savant) durante toda la noche.

### **8.2. *Determinación de endotelina-1.***

La concentración de ET-1 en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales, fue analizada mediante radioinmunoensayo con un kit comercial

(endothelin radioimmunoassay, Euro-Diagnostica), previa extracción en fase sólida. El RIA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Protocolo de extracción:

8. Pipetear 1 mL de muestra en tubos de polipropileno. Los tubos tienen que estar en hielo.
9. Acidificar las muestras con 3 mL de ácido acético al 4%.
10. Activar las columnas C-18 *sep-pak* (Waters) pasando en este orden: 5 mL de metanol, 5 mL de agua destilada y 5 mL de ácido acético al 4%.
11. Pasar las muestras dos veces, lentamente, a través de las columnas.
12. Lavar las columnas pasando, por este orden: 3 mL de agua destilada y 3 mL de etanol 25%.
13. Eluir las muestras pasando a través de las columnas 2 mL de una solución al 96% de etanol 86% y 4% de ácido acético al 4%. Recoger en tubos de polipropileno.
14. Evaporar mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*, Savant) durante toda la noche.

### **8.3. Determinación de VEGF.**

La concentración de VEGF en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales, así como en las muestras de plasma y líquido ascítico de los pacientes cirróticos se determinó mediante ELISA con un kit comercial (Quantikine human VEGF, R&D systems), según el manual de instrucciones del fabricante.

### **8.4. Determinación de óxido nítrico (NO).**

Reactivos:

- yoduro de sodio (Sigma).
- Nitrito de sodio (Sigma).

La determinación se realizó mediante un detector de quimioluminiscencia (Nitric Oxide Analyzer, NOA 280, Sievers Instruments, Boulder, CO) del servicio de Hormonal del Hospital Clínic. Al inyectar las muestras en este aparato (10  $\mu$ l), los nitritos presentes en la muestra reaccionan con ácido acético glacial (5 ml) y

yoduro de sodio (50 mg/400  $\mu$ l) que hay en el interior del mismo y se reducen a NO, que pasa a una cámara donde reacciona con ozono y emite quimioluminiscencia, que a su vez es detectada y cuantificada.

Además de las muestras, hay que pasar una recta patrón preparada con nitrito de sodio y agua desionizada (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 pmol).

#### **8.5. Determinación de la concentración de oxígeno de la ascitis.**

La concentración de oxígeno de la ascitis fue determinada mediante un analizador de gases (Rapidlab 860, Bayer) del servicio de Urgencias del Hospital Clínic. Las muestras de ascitis se extraen y mantienen en jeringas de 3 cuerpos (2 ml, BD Plastipak) tapadas con un tapón de goma hasta el momento del análisis.

#### **8.6. Determinación de parámetros bioquímicos**

La concentración sérica de sodio, potasio, albúmina, bilirrubina total, creatinina, BUN y la actividad de protrombina fueron determinadas en el servicio de Urgencias del Hospital Clínic.

### **9. ESTADÍSTICA.**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de la *t* Student desapareada. Se considera significativo a partir de una probabilidad  $P \leq 0.05$ . Los datos aparecen en las tablas y figuras como la media  $\pm$  error estándar.







## **Artículo 1: Producción de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos: regulación por citoquinas y lipopolisacárido bacteriano.**

Los pacientes cirróticos con ascitis y peritonitis bacteriana espontánea presentan vasodilatación arterial extrema, la cual se caracteriza por oliguria, marcada retención de sodio, hiperactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del sistema nervioso simpático y fallo renal. Los mecanismos que dan lugar a estos fenómenos no están bien caracterizados, pero dado que la vasodilatación arterial tiene lugar principalmente en la zona esplácnica, una posible hipótesis podría ser que durante la PBE tiene lugar la síntesis de factores locales que actuarían preferencialmente sobre este territorio vascular. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un péptido con actividad pro angiogénica y vasodilatadora, además de ser un potente inductor de permeabilidad vascular. El VEGF es sintetizado por varios tipos celulares, entre los que se encuentran los macrófagos. Durante la PBE se produce la activación de las células del sistema inmune de la cavidad peritoneal, por ejemplo, se ha descrito que en esta condición los macrófagos son capaces de sintetizar óxido nítrico. El objetivo del presente estudio ha sido analizar si los macrófagos peritoneales de los pacientes cirróticos con ascitis podrían sintetizar VEGF bajo condiciones estimuladoras apropiadas.

Este estudio se realizó con macrófagos peritoneales aislados de 10 pacientes cirróticos con ascitis sin infección. Además, se recogieron muestras de plasma y líquido ascítico de 15 pacientes cirróticos con ascitis y PBE. La etiología de la cirrosis fue por abuso del alcohol en 7 casos, por infección por el virus de la hepatitis B o C en 11 casos, por abuso del alcohol y viral en 3 casos, y criptogénica en 4 casos. Todos los pacientes pertenecían a un estadio avanzado de la enfermedad, 9 pertenecían al grado B de la clasificación Child-Pugh y 16 al grado C. La PBE fue diagnosticada en función de la concentración de neutrófilos presentes en el líquido ascítico (superior a 250 neutrófilos/mm<sup>3</sup>) en ausencia de datos que asociaran su aparición a peritonitis secundarias u otros desórdenes abdominales similares a la PBE.

Expresión de mRNA de VEGF y producción de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos.

En primer lugar se analizó el efecto de las citoquinas y el LPS, solos o en combinación, en la síntesis de VEGF por macrófagos humanos. Para ello se aislaron macrófagos peritoneales del líquido ascítico de pacientes cirróticos y monocitos a partir de sangre de

individuos sanos, los cuales fueron diferenciados a macrófagos *in vitro* mediante incubación con TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13 acetato). Las células fueron incubadas durante 30 horas con LPS (10 µg/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) o IL-1 $\beta$  (100 U/ml), solos o los tres juntos (la combinación de estas tres sustancias en las concentraciones indicadas será denominada MIX de aquí en adelante en este artículo). Los macrófagos diferenciados con TPA no sintetizaron VEGF ni de manera espontánea ni tras la incubación con los factores mencionados (datos no mostrados). En cambio, los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos sintetizaron de manera basal VEGF (45  $\pm$  6 pg/ml), y esta síntesis aumentó tras la incubación con LPS (**buscar los datos**), con TNF $\alpha$  (**buscar**), e IL-1 $\beta$  (**buscar**) (Figura 1). Además, la incubación con MIX tuvo efectos aditivos, aumentando trece veces (600 $\pm$ 62 pg/ml) la concentración de VEGF encontrada en condiciones basales.

La figura 2 muestra la cinética de síntesis de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos incubados con TNF $\alpha$  (100 ng/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml), la combinación de estas dos citoquinas junto con LPS (10 µg/ml), o de manera basal (vehículo). La concentración de VEGF en el medio fue superior respecto a la basal tras 24 horas de incubación con TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o la combinación de estas con LPS, y aumentó progresivamente hasta las 48 horas. La combinación TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y LPS fue el mayor estímulo para la síntesis de VEGF, seguido de la IL-1 $\beta$  y del TNF $\alpha$ .

En la figura 3 aparecen los resultados del análisis de la síntesis de VEGF *in vitro* por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos tras la incubación con diferentes concentraciones de TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . A partir de 0.2 ng/ml, el TNF $\alpha$  causó un aumento en la síntesis de VEGF de manera dosis dependiente hasta alcanzar la máxima respuesta con una concentración de 20 ng/ml. A concentraciones mayores de TNF $\alpha$  (100, 150 y 200 ng/ml), el efecto en la síntesis de VEGF fue menor aunque estable y superior al basal. Tras la incubación con IL-1 $\beta$  se observó un patrón de respuesta parecido: la síntesis de VEGF aumentó tras la incubación con 20 U/ml de IL-1 $\beta$ , alcanzando el máximo efecto estimulador a 50 U/ml. A concentraciones mayores de IL-1 $\beta$  el efecto estimulador no fue tan marcado.

Para investigar el efecto de la incubación con MIX en la expresión de mRNA de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos se analizó la cantidad de mRNA de VEGF mediante *northern blot*. El mRNA de la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue analizado como control de expresión. Un resultado representativo aparece en el panel A de la figura 4. Se detectó mRNA de VEGF en macrófagos peritoneales tras 0, 12, 24 y 48 horas de cultivo con y sin MIX. Sin embargo, la expresión en ausencia de MIX fue notablemente inferior a la encontrada en macrófagos cultivados con MIX. Además, la incubación con MIX causó un aumento de la cantidad de mRNA de VEGF, alcanzándose un máximo tras 48 horas de incubación. El efecto estimulador del MIX fue totalmente inhibido al realizar los experimentos en presencia de cicloheximida (datos no mostrados), por lo que se demuestra que la estimulación de la expresión del VEGF por citoquinas requiere la síntesis *de novo* de proteínas.

Dado que la sonda utilizada en el *northern blot* solamente detectó la abundancia de la isoforma VEGF<sub>165</sub>, a continuación quisimos estudiar el patrón de expresión de las diferentes isoformas del VEGF por los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos. Este experimento se realizó mediante RT-PCR, y en el panel B de la figura 4 puede verse un resultado representativo. Tras 48 horas de cultivo sin estimular, los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos expresan tres mRNA correspondientes a las isoformas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> y VEGF<sub>189</sub>. Por otro lado, la incubación con MIX no alteró este patrón de expresión, aunque, confirmando el resultado obtenido en el *northern blot* (Figura 4<sup>a</sup>), incrementó la abundancia del mRNA de las tres isoformas respecto a la encontrada en macrófagos sin estimular. De nuevo, la expresión del mRNA de la GAPDH fue utilizado como control.

Los resultados anteriormente obtenidos demuestran un incremento en la cantidad de mRNA de VEGF, pero no permiten saber si es debido a un aumento en la expresión génica y/o en la estabilidad de los transcritos. Por esta razón, el siguiente experimento fue diseñado con el objetivo de averiguar el efecto del MIX en la estabilidad de mRNA del VEGF. Los macrófagos fueron incubados durante 24 horas en presencia o ausencia de MIX. Tras este tiempo, se añadió actinomicina D (25 µg/ml) y se extrajo el RNA total tras 0, 4, 8 y 12 horas de incubación. La cantidad de mRNA de VEGF se analizó mediante *northern blot* (figura 5). La vida media del mRNA de VEGF aumentó de 4.3 horas a 6.6 horas en células tratadas con MIX.

Concentración de VEGF en pacientes cirróticos.

Con objeto de determinar los valores de VEGF presentes en el plasma y en el líquido ascítico de pacientes cirróticos con ascitis con y sin PBE, se tomaron muestras de 15 pacientes cirróticos con PBE y de 10 pacientes cirróticos con ascitis sin infección. Los resultados aparecen en la figura 6. La concentración de VEGF encontrada en la ascitis de los pacientes con PBE ( $710 \pm 183$  pg/ml) fue significativamente superior a la de los pacientes sin infección (**buscar**,  $P < 0.025$ ). Sin embargo, la concentración plasmática de VEGF fue similar en los dos grupos de pacientes y en sujetos sanos (cirróticos con PBE:  $49 \pm 7$  pg/ml, cirróticos sin PBE:  $35 \pm 5$  pg/ml, sanos:  $32 \pm 8$  pg/ml).

La ascitis induce proliferación en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).

Por último, se estudió el efecto pro proliferativo del líquido ascítico de pacientes cirróticos en HUVEC. El grado de proliferación celular fue analizado mediante el ensayo de captación de MTT. El porcentaje de proliferación endotelial obtenido tras la incubación con ascitis procedente de pacientes con PBE fue significativamente

superior al obtenido cuando tras la incubación con ascitis de pacientes sin infección ( $14.8 \pm 3.8$  vs  $4.6 \pm 2.0$ ,  $P < 0.05$ ). El efecto fue bloqueado tras la incubación con anticuerpo anti VEGF

Los macrófagos son células que tienen un papel crucial en el inicio y en la regulación de la respuesta inmune (Unaue, 1993), como células fagocíticas, presentadoras de antígeno a los linfocitos T y productoras de un gran número de citoquinas y moduladores inflamatorios. Los monocitos y los macrófagos tisulares presentan profundos cambios morfológicos y funcionales en presencia de sustancias proinflamatorias (Adams and Hamilton, 1992) y en presencia de un microambiente adecuado son células con una gran capacidad pro angiogénica (Sunderkotter et al., 1994). Diversos experimentos *in vivo* han demostrado que los macrófagos activados pueden secretar productos angiogénicos en ausencia de inflamación (Polverini, 1997), y que estas células son esenciales en la neovascularización que tiene lugar en el proceso de cicatrización de las heridas (Folkman and Klagsbrun, 1987).

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de la que existen 5 isoformas (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>; el número indica el número de amino ácidos de cada isoforma) formadas por *splicing* alternativo de un único transcrito (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Poltorak et al., 1997). Las isoformas VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> son las más abundantes (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). VEGF<sub>121</sub> es una proteína totalmente difundible, mientras que VEGF<sub>165</sub> una vez secretada, puede difundir en el medio o bien permanecer unida a los heparán sulfatos de la matriz extracelular. El VEGF es un mitógeno altamente específico para células endoteliales *in vitro*, y posee propiedades angiogénicas *in vivo* (Leung et al., 1989). Además, es un agente inductor de permeabilidad vascular, siendo 50000 veces más potente que la histamina (Senger et al., 1983), y un agente vasodilatador tanto en vasos aislados como en animales (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Bajo condiciones estimuladoras adecuadas, el VEGF puede ser producido por diversos tipos de células de mamífero, como células musculares lisas, queratinocitos, fibroblastos, células epiteliales, células mesangiales y células tumorales (Dvorak et al., 1995). El VEGF también es producido por líneas celulares mieloides (Leung et al., 1989) y por macrófagos (Berse et al., 1992; Brown et al., 1992). Además, se ha demostrado la producción de VEGF, así como su estimulación por lipopolisacárido bacteriano y los esteroides ováricos, por macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis (McLaren et al., 1996). Estos hechos sugieren que parte del potencial angiogénico y permeabilizante de los macrófagos podría ser debido a la producción de VEGF.

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es una complicación severa y frecuente de los pacientes cirróticos con ascitis (Guarner and Soriano, 1997). El líquido ascítico de los pacientes cirróticos con PBE contiene una mayor cantidad de citoquinas (TNF $\alpha$  e IL6) que los pacientes cirróticos sin PBE (Navasa et al., 1998). Estos mediadores proinflamatorios probablemente son producidos por los macrófagos

peritoneales y las células mesoteliales, ya que el hecho de que la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  e IL6 en líquido ascítico sea superior a la concentración plasmática sugiere una síntesis local de estos factores (Navasa et al., 1998). Por otro lado, los pacientes con PBE sufren un empeoramiento de la disfunción circulatoria ya presente antes de la infección, que se refleja por una mayor activación de los sistemas endógenos vasoactivos (Follo et al., 1994). La consecuencia de este deterioro de la homeostasis cardiovascular (Navasa et al., 1998; Schrier et al., 1988) es la aparición de insuficiencia renal o síndrome hepatorenal, que en muchos casos puede cursar un rápido y progresivo deterioro de la función renal y que supone el factor pronóstico de supervivencia más importante para los pacientes con PBE (Follo et al., 1994).

Dado que los macrófagos pueden producir grandes cantidades de óxido nítrico bajo la estimulación por LPS y citoquinas (Morris, Jr. and Billiar, 1994), es atractivo especular que estos mediadores proinflamatorios podrían desencadenar el deterioro circulatorio en los pacientes cirróticos con PBE induciendo la liberación de factores vasodilatadores por las células residentes en la zona peritoneal.

En el primer artículo de esta tesis se analizó esta posibilidad examinando el efecto de LPS,  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{IL1}\beta$  en la producción de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos. Los resultados muestran que los macrófagos peritoneales aislados de pacientes cirróticos producen constitutivamente pequeñas cantidades de VEGF. Este hecho coincide con un estudio anterior realizado con macrófagos peritoneales aislados de mujeres con dismenorrea o infertilidad (McLaren et al., 1996). Como en este estudio, en el trabajo de McLaren describen el efecto estimulador del LPS (100% de incremento) en la producción de VEGF por estas células. Esta producción parece ser característica de macrófagos residentes, ya que no se obtuvo respuesta al repetir el experimento con monocitos circulantes o con macrófagos obtenidos *in vitro* tras estimular monocitos con TPA.

En estudios realizados *in vivo*,  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{IL1}\beta$  son potentes inductores de angiogénesis (BenEzra et al., 1990; Leibovich et al., 1987) e, *in vitro*, son capaces de inducir la síntesis de VEGF por fibroblastos, neutrófilos y células musculares lisas (Gaudry et al., 1997; Jackson et al., 1997; Li et al., 1995). Por estas razones, probamos la capacidad de  $\text{TNF}\alpha$  y  $\text{IL1}\beta$  para inducir la secreción de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos. Las dos citoquinas causaron un aumento de la liberación de VEGF de manera dosis-dependiente y tiempo-dependiente. Además, el efecto estimulador de  $\text{TNF}\alpha$  pudo ser detectado a dosis de

0.2 ng/ml, que está dentro del rango de concentración de esta citoquina encontrado en el líquido ascítico de los pacientes cirróticos con PBE (Navasa et al., 1998).

La combinación de  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  y LPS (MIX) tuvo un efecto aditivo sobre la secreción de VEGF, lo que sugiere que estos factores deben actuar a través de vías de señalización diferentes. Además del efecto sobre la liberación de VEGF, la combinación de  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  y LPS causó un incremento en la cantidad de RNA mensajero de VEGF de manera tiempo dependiente, alcanzando un máximo de 10 veces la expresión basal tras 48 horas de incubación. En cambio, la incubación con MIX no causó un cambio en el patrón de expresión de las diferentes isoformas de VEGF por macrófagos peritoneales. Estos resultados son similares a los obtenidos en macacariocitos humanos tras la estimulación con trombina (Mohle et al., 1997).

El incremento en la cantidad de RNA mensajero de VEGF también fue debido a un incremento en la estabilidad del transcrito. Sin embargo, mientras que la cantidad de RNA mensajero de VEGF tras 12 horas de estimulación con MIX fue 7 veces mayor que en células no estimuladas, el incremento en la estabilidad del RNA mensajero en las mismas condiciones fue inferior (2.3 veces superior). Esta diferencia sugiere que probablemente el aumento de la cantidad de RNA de VEGF en respuesta a MIX es debido tanto al incremento en la estabilidad del transcrito como a un incremento en la tasa de transcripción del gen del VEGF.

La determinación de la concentración de VEGF en plasma y ascitis de pacientes cirróticos con y sin PBE proporcionó más evidencias sobre la relevancia clínica de los resultados del artículo 1. Existe muy poca información sobre los niveles circulantes de VEGF en pacientes con cirrosis. Excepto en las cirrosis asociadas a carcinoma hepatocelular, los niveles plasmáticos de VEGF en cirrosis hepáticas de diferentes etiologías son normales o inferiores a los de sujetos sanos (Akiyoshi et al., 1998; Rosmorduc et al., 1996). En este estudio nosotros tampoco encontramos diferencias entre la concentración plasmática de VEGF en sujetos sanos y las de pacientes cirróticos con ascitis con o sin PBE. En cambio, si encontramos concentraciones altas de VEGF en el líquido ascítico de pacientes cirróticos con PBE respecto al líquido ascítico de pacientes cirróticos sin infección. Este hecho apoya la hipótesis de un incremento local de la producción de VEGF en la zona peritoneal de los pacientes cirróticos con peritonitis.

Con objeto de determinar si la ascitis de los pacientes cirróticos con PBE poseía alguno de los efectos biológicos asociados a VEGF, se determinó el efecto proliferativo de este líquido en cultivos de HUVEC. Mientras que la presencia de ascitis de pacientes cirróticos sin PBE en el medio de cultivo no tuvo efectos en la proliferación de HUVEC, se obtuvo un incremento significativo en el número de células

endoteliales tras 24 horas de cultivo con medio que contenía ascitis de pacientes con PBE. Estos resultados, por lo tanto, apoyan el concepto de que un incremento en los niveles de VEGF en la ascitis de los pacientes con PBE podría tener consecuencias fisiopatológicas en la regulación local del tono vascular y la permeabilidad endotelial de la cavidad peritoneal.

El artículo 2 se realizó con objeto de profundizar en la síntesis peritoneal de VEGF en los pacientes cirróticos con peritonitis bacteriana espontánea. En primer lugar se examinó la producción de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis con y sin PBE. En este estudio no se incluyó ningún paciente con carcinoma hepatocelular, ya que su presencia está asociada a la inducción hepática del gen del VEGF (Miura et al., 1997). De los 11 pacientes con PBE que formaron parte del estudio, los macrófagos de 8 de ellos mostraron una mayor tasa espontánea de producción de VEGF con respecto a los macrófagos de pacientes sin PBE. Esto demuestra que a pesar de la heterogeneidad clínica existente entre pacientes (tiempo de evolución de la enfermedad, días de tratamiento con antibióticos, tiempo de diagnóstico de la infección, etc...), la inducción de la síntesis de VEGF es un fenómeno bastante común en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con PBE.

La cantidad de RNA mensajero de VEGF, así como el patrón de expresión de las diferentes isoformas fue analizado mediante RT-PCR semicuantitativa. Los resultados de este experimento indican que, aunque no hay cambios en la expresión de las isoformas de VEGF, existe una mayor abundancia de RNA mensajero en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con PBE. En el artículo 1 se descubrió que la estimulación de los macrófagos de pacientes cirróticos con la combinación de LPS,  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  causa un incremento transcripcional del gen del VEGF y una mayor estabilidad del RNA mensajero. Probablemente, el incremento en la cantidad de RNA mensajero de VEGF en macrófagos peritoneales de pacientes con PBE sea causado por la acción de estos factores proinflamatorios en los macrófagos de la zona peritoneal de estos pacientes.

El VEGF es potente mitógeno para células endoteliales (Ferrara, 2001). Por este motivo, se analizó la actividad biológica del VEGF producido por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos mediante la capacidad de inducir proliferación en cultivos de HUVEC. El medio condicionado de macrófagos de pacientes con PBE indujo más proliferación celular que el de células de pacientes sin infección, y esta propiedad se eliminó mediante la preincubación del medio con anticuerpo anti VEGF. Estos datos indican que el VEGF producido por macrófagos de pacientes cirróticos con PBE puede tener efecto en el endotelio vascular.

Con objeto de definir mejor la especificidad y el origen celular del VEGF presente en el líquido ascítico de los pacientes cirróticos con PBE, se realizaron dos experimentos diferentes. En primer lugar, analizamos la producción de VEGF por monocitos circulantes de pacientes cirróticos con y sin PBE, así como de individuos sanos. Varios estudios anteriores han demostrado que la producción de VEGF por monocitos de sujetos sanos y líneas celulares monocíticas humanas, en ausencia de factores estimuladores, es negligible (Griga et al., 1999; Hojo et al., 2000). Este hecho coincide con los resultados obtenidos por nosotros en este estudio. Además, tampoco los monocitos de pacientes cirróticos con ascitis, con o sin PBE, produjeron cantidades significativas de VEGF. Este contraste entre las células precursoras circulantes y los macrófagos peritoneales sugiere que una maduración local de estas células en la cavidad esplácnica podría causar este cambio en su actividad productora de VEGF. De hecho, estudios en ratones han demostrado la existencia de manchas lechosas (*milky spots*) en el omento, que son zonas donde se produce la maduración de fagocitos mononucleares que pasan a ser macrófagos peritoneales residentes (Krist et al., 1995; Wijffels et al., 1992).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que otros leucocitos, como los neutrófilos y los linfocitos T, también son capaces de sintetizar VEGF (Freeman et al., 1995; Taichman et al., 1997). Por esta razón examinamos la producción de VEGF por los diferentes tipos celulares presentes en el líquido ascítico de pacientes cirróticos mediante inmunocitoquímica. Confirmando los resultados del resto del artículo, los macrófagos mostraron tinción positiva para el VEGF, y además fueron las únicas células presentes en las preparaciones en las que se detectó señal. Este hecho apoya la idea de que los macrófagos peritoneales son una fuente específica de VEGF en los pacientes cirróticos.

El VEGF provoca sus respuestas biológicas mediante la unión a dos receptores tirosina quinasa, Flt-1 (VEGFR1) y KDR (VEGFR2, homólogo humano a Flk-1) (Neufeld et al., 1999). Ambos receptores son característicos de células endoteliales, aunque también pueden ser expresados por algún otro tipo celular (Barleon et al., 1996; Charnock-Jones et al., 1994; Cohen et al., 1995; D'Angelo et al., 1995; Takahashi et al., 1995). En este estudio amplificamos mediante RT-PCR dos bandas correspondientes a Flt-1 y KDR en 3 biopsias peritoneales de pacientes cirróticos, demostrando así la presencia de los dos receptores tirosina quinasa del VEGF en la pared peritoneal de pacientes cirróticos.

El VEGF también es conocido como Factor de Permeabilidad Vascular (VPF) porque induce hiperpermeabilidad de la microvasculatura tumoral a proteínas plasmáticas y otras macromoléculas (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Paleolog, 1997;

Smyth et al., 1997). En base a estas investigaciones, en este estudio consideramos la posibilidad de que la acentuación del síndrome de vasodilatación arterial en los pacientes cirróticos con PBE pudiera ser debido a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos de los tejidos peritoneales (mesenterio, pared peritoneal y diafragma) debido a un incremento en la secreción de VEGF por macrófagos residentes. Este hecho, a su vez, acentuaría la extrema activación de los sistemas vasoconstrictores endógenos que precipitaría el fallo renal. Esta hipótesis estaría apoyada por nuestros resultados, que muestran que hay una mayor expresión de RNA mensajero y una mayor producción de VEGF en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con PBE, y que hay expresión de los receptores de VEGF en la pared peritoneal de pacientes cirróticos. Sin embargo, hay que remarcar que estos estudios no puede establecer una relación directa causa-efecto entre la permeabilidad/tono vascular y el VEGF producido por los macrófagos en pacientes cirróticos con PBE.

En resumen, los resultados del segundo artículo muestran que los macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y PBE producen más cantidad de VEGF que los de pacientes cirróticos sin infección. Esta producción es característica de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal y exclusiva de este tipo celular en el líquido ascítico. Además, el tejido peritoneal de los pacientes cirróticos expresa los receptores KDR y Flt-1 del VEGF. Estos resultados apoyan la idea de que la liberación local de VEGF podría causar un incremento en al permeabilidad vascular de los vasos peritoneales de los pacientes cirróticos con PBE.

Las investigaciones realizadas durante los últimos años apuntan a que las anormalidades del tono vascular que tienen lugar en la cirrosis hepática siguen direcciones opuestas según el territorio vascular. Mientras que existen diversos lechos vasculares que están expuestos a una vasoconstricción activa (por ejemplo, el riñón, el hígado o la piel), existe un gran territorio, la zona esplácnica, que presenta una marcada vasodilatación (Arroyo and Jimenez, 2000). Este fenómeno ha merecido una atención especial, ya que se cree que la vasodilatación arterial esplácnica tiene un papel central en el desarrollo de la mayoría de anormalidades en la homeostasis del volumen de líquido extracelular que tiene lugar en los pacientes cirróticos. Sin embargo, aunque se han buscado factores reguladores locales de manera extensiva, todavía carecemos de una explicación completa de los acontecimientos que ocurren en los diferentes territorios vasculares. En los últimos años, los fagocitos mononucleares han adquirido una mayor atención. Estas células están distribuidas de manera ubicua por todo el organismo, son productoras de un gran número de factores vasoactivos en respuesta a cambios microambientales, y varias investigaciones han

demostrado que tanto los monocitos circulantes como los macrófagos residentes de ratas y pacientes con cirrosis pueden producir sustancias vasoactivas de manera diferencial, como óxido nítrico, anandamida, prostaglandinas (Chiricolo et al., 1989; Jimenez et al., 1999; Laffi et al., 1995; Ros et al., 2002), o como se ha visto en el primer y segundo artículos de esta tesis, VEGF. En el tercer artículo de esta tesis investigamos el posible efecto estimulador de la hipoxia en la producción de factores vasoactivos por monocitos y macrófagos de pacientes con enfermedad hepática avanzada, debido a la existencia de varios genes vasoactivos regulados por la tensión de oxígeno y a que la existencia de alteraciones en la oxigenación son hechos relativamente frecuentes en los pacientes cirróticos.

La endotelina-1 (ET-1), la adrenomedulina (ADM), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son péptidos vasoactivos regulados por la tensión de oxígeno (Faller, 1999; Garayoa et al., 2000). Nosotros medimos la producción de estos factores por monocitos y macrófagos de pacientes cirróticos con ascitis en condiciones de normoxia y de hipoxia. Los monocitos de pacientes cirróticos secretaron cantidades detectables de ET-1 y ADM de manera basal, y esta secreción fue estimulada por efecto de la hipoxia en el primer caso, pero no en el segundo. Nuestro estudio indica que los monocitos circulantes de estos pacientes producen ET-1, y que la disminución de la tensión de oxígeno regula la secreción de ET-1 en estas células. La ET-1 es un péptido vasoconstrictor, sintetizado sobre todo por células endoteliales, y cuya acción ha sido implicada en la patogénesis de la disfunción circulatoria de la cirrosis hepática (Jiménez et al., 1999). Anteriormente, estudios experimentales han demostrado que el hígado es el principal productor de ET-1 en la cirrosis con ascitis (Leivas et al., 1995). Sin embargo, el hallazgo de que los monocitos son capaces de producir ET-1 sugiere que estas células también podrían contribuir al incremento de los niveles plasmáticos de este péptido en la cirrosis.

Sin embargo, en comparación con la secreción por monocitos, es más importante la secreción de los péptidos vasodilatadores ADM y VEGF, pero no de ET-1, por macrófagos peritoneales, y que esta secreción es estimulada por la hipoxia. La diferencia en el comportamiento entre los monocitos y los macrófagos de los pacientes cirróticos ya había sido observada en el artículo 2 de esta tesis, y se considera una evidencia directa de que los macrófagos residentes en la zona peritoneal derivan de las manchas lechosas del omento en lugar de los monocitos circulantes (Krist et al., 1995).

Para caracterizar mejor la inducción por hipoxia de la expresión de VEGF y ADM por macrófagos peritoneales, se realizaron cinéticas de expresión del RNA mensajero de estos dos factores, así como de su liberación al medio de cultivo. La

hipoxia estimula la síntesis de VEGF y ADM en células endoteliales, musculares lisas, macrófagos y líneas celulares tumorales (Brogi et al., 1994; Dor et al., 2001; Garayoa et al., 2000; Namiki et al., 1995; Xiong et al., 1998), sin embargo, se desconoce el efecto de la hipoxia en macrófagos peritoneales humanos. Nuestros resultados indican que la hipoxia causa una rápida inducción del RNA mensajero de la ADM y del VEGF, que se detecta a las 6 horas y que se mantiene tras 24 horas de estimulación, así como de la proteína, ya que esta estimulación fue acompañada de un incremento en la secreción de ambos péptidos.

VEGF y ADM son dos péptidos con propiedades angiogénicas, permeabilizantes, que inducen relajación en vasos aislados y vasodilatación *in vivo*, efectos que son en parte mediados por la producción de óxido nítrico (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Horowitz et al., 1997; Kaufman et al., 2001; Nishimatsu et al., 2001; Senger et al., 1983; Zhao et al., 1998). Así, este estudio apoya la noción de que la liberación de ADM y VEGF por macrófagos peritoneales en respuesta a hipoxia podría contribuir a la vasodilatación arterial esplácnica que tiene lugar en la cirrosis hepática.

Bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, las células de los mamíferos activan una serie de genes para compensar esta deficiencia. La respuesta génica a la hipoxia está mediada principalmente por el factor de transcripción HIF1, que es estabilizado cuando disminuye la concentración de oxígeno celular (Salceda and Caro, 1997). HIF-1 está formado por dos subunidades: HIF1 $\beta$ , que se expresa de manera constitutiva, e HIF1 $\alpha$ , que es rápidamente degradada en condiciones de normoxia. En condiciones de hipoxia, en cambio, la subunidad HIF1 $\alpha$  es estabilizada, y translocada al núcleo donde dimeriza con HIF1 $\beta$  y activa la transcripción de genes con elementos de respuesta a hipoxia en su región promotora (Semenza, 2000). VEGF y ADM tienen elementos de respuesta a hipoxia en su región promotora y se ha descrito que HIF1 media su estimulación por hipoxia (Forsythe et al., 1996; Garayoa et al., 2000). Por esta razón examinamos si HIF1 $\alpha$  es estabilizado en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos en condiciones de hipoxia. Encontramos que, aunque la expresión de los transcritos de HIF1 $\alpha$  e HIF1 $\beta$  no se alteró al incubar estas células en diferentes tensiones de oxígeno, la proteína HIF1 $\alpha$  fue estabilizada en hipoxia. Estos hallazgos apuntan a que HIF1 sea el responsable de la estimulación por hipoxia de VEGF y ADM en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos.

Para examinar la posible función fisiológica de ADM y VEGF secretados por los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos, se analizó la capacidad del medio condicionado de estas células de inducir la producción de óxido nítrico en cultivos de

células endoteliales. El óxido nítrico está implicado en la disfunción pulmonar y circulatoria presente en la cirrosis hepática. El medio condicionado procedente de cultivos de macrófagos causó un incremento en la liberación de NO por células endoteliales, que fue mayor cuando los medios procedían de cultivos de macrófagos en hipoxia. La implicación del VEGF se demostró tras eliminar el efecto estimulador del medio mediante la incubación con anticuerpo anti VEGF. Aunque con este ensayo no observamos estimulación de la síntesis de óxido nítrico en respuesta a la ADM, estos resultados sugieren que la liberación de factores vasodilatadores por macrófagos peritoneales en respuesta a la hipoxia podría causar una respuesta fisiológica en células endoteliales.

En los experimentos realizados en macrófagos peritoneales acabados de aislar, hemos mostrado que estas células están sometidas a hipoxia *in vivo*, porque la concentración de oxígeno del líquido ascítico de diferentes pacientes cirróticos es baja, y los macrófagos peritoneales expresan la proteína HIF1 $\alpha$ , los RNA mensajeros de ADM y VEGF. Debido al ínfimo número de células obtenido de los lavados peritoneales de los donantes vivos de hígado, es razonable hipotetizar que, mientras en sujetos sanos la contribución de los macrófagos peritoneales a la producción de sustancias vasoactivas en la zona esplácnica es casi nula, la producción de factores vasodilatadores por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos puede ser relevante en la regulación del tono vascular esplácnico de estos pacientes.

En resumen, los datos del tercer artículo de esta tesis muestran que la hipoxia induce la síntesis de los factores vasodilatadores VEGF y ADM en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos, probablemente a través de un incremento en la transcripción génica mediado por HIF1. Por lo tanto, estos resultados sugieren que una reducción local de la tensión de oxígeno podría potenciar la síntesis de los vasodilatadores derivados de macrófagos, agravando así las alteraciones circulatorias de estos pacientes.



A partir de los resultados de este trabajo de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. Los macrófagos peritoneales de los pacientes cirróticos con ascitis secretan VEGF de manera constitutiva.
2. La incubación con LPS,  $TNF\alpha$  o  $IL1\beta$ , solos o en combinación, potencia la síntesis de proteína y el aumento en la cantidad de mRNA de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis. El incremento en la cantidad de mRNA causado por LPS,  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  tiene lugar a través de un aumento de la transcripción génica e incremento de la vida media del RNA mensajero.
3. Los macrófagos peritoneales de los pacientes cirróticos con ascitis expresan de manera constitutiva los transcritos de las isoformas  $VEGF_{121}$ ,  $VEGF_{165}$  y  $VEGF_{189}$ , y la incubación de estas células con la combinación de LPS,  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  no altera este patrón de expresión.
4. Los pacientes cirróticos con ascitis y PBE tienen una mayor concentración de VEGF en el líquido ascítico que los pacientes cirróticos sin infección. En cambio, no existen diferencias en la concentración plasmática de VEGF entre estos dos tipos de pacientes, ni respecto a individuos sanos.
5. Los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis y PBE producen constitutivamente más VEGF a nivel de mRNA y proteína que los de pacientes cirróticos sin PBE. Sin embargo, ambos tipos de células expresan las isoformas  $VEGF_{121}$ ,  $VEGF_{165}$  y  $VEGF_{189}$ .
6. Los monocitos de individuos sanos y de pacientes cirróticos, con y sin PBE, no sintetizan VEGF. La hipoxia, la incubación con LPS,  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ , o la diferenciación con TPA no modifica este comportamiento.
7. El VEGF sintetizado por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos causa proliferación de HUVEC en cultivo y estimula la síntesis de óxido nítrico en BAEC.
8. Los macrófagos son las únicas células presentes en el líquido ascítico de pacientes cirróticos que expresan VEGF.
9. Los RNA mensajeros de los receptores de VEGF Flt-1 y KDR son expresados en tejido peritoneal de pacientes cirróticos.
10. La hipoxia incrementa la síntesis de VEGF por macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis.

11. Los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis sintetizan constitutivamente ADM. La hipoxia incrementa la síntesis de ADM por estas células.
12. Los monocitos de pacientes cirróticos y de individuos sanos sintetizan ADM. LA hipoxia no altera esta síntesis en ninguno de los dos tipos de células.
13. Los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis no sintetizan ET-1 ni de manera basal ni tras la incubación en hipoxia. En cambio, los monocitos de pacientes cirróticos, pero no los de individuos sanos, sintetizan ET-1 de manera constitutiva y la hipoxia aumenta esta síntesis.
14. La hipoxia aumenta la cantidad de RNA mensajero de VEGF y ADM en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos. Además, no altera el patrón de expresión de las isoformas de VEGF.
15. En condiciones de hipoxia, la subunidad HIF1 $\alpha$  es estabilizada a nivel proteico en macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos.
16. El líquido ascítico de los pacientes cirróticos es un medio pobremente oxigenado.
17. *In vivo*, los macrófagos peritoneales de los pacientes cirróticos expresan la proteína HIF1 $\alpha$  y los mRNA de VEGF y ADM.

De manera global, de los resultados de esta tesis se puede concluir que los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis son capaces de sintetizar sustancias vasoactivas como VEGF y ADM de manera constitutiva, y de aumentar esta síntesis en situaciones patológicas como la peritonitis bacteriana espontánea, en el caso del VEGF, o ante estímulos como la hipoxia moderada, en el caso del VEGF y la ADM, los cuales tienen lugar durante el desarrollo de esta enfermedad. Asimismo, estos datos sugieren que estas células podrían desempeñar a nivel local un papel importante en las complicaciones circulatorias de la zona esplácnica que tienen lugar en la cirrosis hepática.

## Reference List

- Abedi,H. and Zachary,I. (1995). Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc. Res.* 30, 544-556.
- Abedi,H. and Zachary,I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 15442-15451.
- Adamis,A.P., Miller,J.W., Bernal,M.T., D'Amico,D.J., Folkman,J., Yeo,T.K., and Yeo,K.T. (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 118, 445-450.
- Adams,D. and Hamilton,T. (1992). Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In *The Macrophage*, C.Lewis and J.McGee, eds. (New York: Oxford University Press), pp. 75-114.
- Agusti,A.G., Roca,J., Bosch,J., and Rodriguez-Roisin,R. (1990). The lung in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 10, 251-257.
- Aiello,L.P., Pierce,E.A., Foley,E.D., Takagi,H., Chen,H., Riddle,L., Ferrara,N., King,G.L., and Smith,L.E. (1995). Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10457-10461.
- Aiello,L.P. and Wong,J.S. (2000). Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int. Suppl* 77, S113-S119.
- Akagi,Y., Liu,W., Xie,K., Zebrowski,B., Shaheen,R.M., and Ellis,L.M. (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta. *Br. J Cancer* 80, 1506-1511.
- Akiyoshi,F., Sata,M., Suzuki,H., Uchimura,Y., Mitsuyama,K., Matsuo,K., and Tanikawa,K. (1998). Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Dig. Dis. Sci.* 43, 41-45.
- Albillos, A., de la Hera, A, Reyes, E, Montserrat, J, Muñoz, L, Nieto, M, Ruiz-del-Arbol, L, Sanz, E, and Alvarez-de-Mon, M. Aumento de la producción de TNf-alfa (TNF) por los monocitos y homeostasis anormal de células T en sangre periférica en pacientes cirróticos con ascitis: mejoría con norfloxacino. *Gastroenterol Hepatol* 26(Supl 2), 64. 2003a.  
Ref Type: Abstract
- Albillos,A., de la,H.A., Gonzalez,M., Moya,J.L., Calleja,J.L., Monserrat,J., Ruiz-del-Arbol,L., and Alvarez-Mon,M. (2003b). Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 37, 208-217.
- Albillos,A., Rossi,I., Cacho,G., Martinez,M.V., Millan,I., Abreu,L., Barrios,C., and Escartin,P. (1995). Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am. J Physiol* 268, G459-G464.
- Alric,L., Pinelli,E., Carrera,G., Vinel,J.P., Beraud,M., Duffaut,M., Pascal,J.P., and Pipy,B. (1996). Involvement of calcium in macrophage leukotriene release during experimental cirrhosis. *Hepatology* 23, 614-622.
- Altman,C., Grange,J.D., Amiot,X., Pelletier,G., Lacaine,F., Bodin,F., and Etienne,J.P. (1995). Survival after a first episode of spontaneous bacterial peritonitis. Prognosis of potential candidates for orthotopic liver transplantation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 47-50.

- Ando,K. and Fujita,T. (2003). Lessons from the adrenomedullin knockout mouse. *Regul. Pept.* 112, 185-188.
- Ando,K., Ito,Y., Kumada,M., and Fujita,T. (1998). Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* 21, 187-191.
- Ando,K., Omi,N., Shimosawa,T., and Fujita,T. (1997). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) inhibits proliferation of human neuroblastoma TGW cells. *FEBS Lett.* 413, 462-466.
- Anthony,P.P., Ishak,K.G., Nayak,N.C., Poulsen,H.E., Scheuer,P.J., and Sobin,L.H. (1977). The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull. World Health Organ* 55, 521-540.
- Antonetti,D.A., Barber,A.J., Hollinger,L.A., Wolpert,E.B., and Gardner,T.W. (1999). Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J. Biol. Chem.* 274, 23463-23467.
- Armesilla,A.L., Lorenzo,E., Gomez,d.A., Martinez-Martinez,S., Alfranca,A., and Redondo,J.M. (1999). Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol. Cell Biol.* 19, 2032-2043.
- Arroyo,V., Gines,P., Jimenez,W., and Rodes J (1999a). Renal dysfunction in cirrhosis. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, Bircher J, Benhamou J-P, N.McIntyre, Rizzetto M, and Rodes J, eds. (Oxford: Oxford Medical Publications).
- Arroyo,V., Gines,P., Planas,R., and Rodes J (1999b). Pathogenesis, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodes J, eds. (Oxford: Oxford Medical Publications).
- Arroyo,V., Claria,J., Salo,J., and Jimenez,W. (1994). Antidiuretic hormone and the pathogenesis of water retention in cirrhosis with ascites. *Semin. Liver Dis.* 14, 44-58.
- Arroyo,V., Guevara,M., and Gines,P. (2002). Hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathogenesis and treatment. *Gastroenterology* 122, 1658-1676.
- Arroyo,V. and Jimenez,W. (2000). Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 32, 157-170.
- Bachelder,R.E., Crago,A., Chung,J., Wendt,M.A., Shaw,L.M., Robinson,G., and Mercurio,A.M. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 61, 5736-5740.
- Bamba,H., Ota,S., Kato,A., Kawamoto,C., and Fujiwara,K. (2000a). Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 485-491.
- Bamba,H., Ota,S., Kato,A., Kawamoto,C., and Matsuzaki,F. (2000b). Effect of prostaglandin E1 on vascular endothelial growth factor production by human macrophages and colon cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 19, 219-223.
- Barleon,B., Sozzani,S., Zhou,D., Weich,H.A., Mantovani,A., and Marme,D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336-3343.
- Bates,D.O. (1998). The chronic effect of vascular endothelial growth factor on individually perfused frog mesenteric microvessels. *J. Physiol* 513 ( Pt 1), 225-233.
- Bates,D.O. and Curry,F.E. (1996). Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am. J. Physiol* 271, H2520-H2528.

- Bates,D.O., Hillman,N.J., Williams,B., Neal,C.R., and Pocock,T.M. (2002). Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J. Anat.* 200, 581-597.
- Baumann,H. and Gauldie,J. (1994). The acute phase response. *Immunol. Today* 15, 74-80.
- Ben Av,P., Crofford,L.J., Wilder,R.L., and Hla,T. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 372, 83-87.
- Bendtsen,F., Schifter,S., and Henriksen,J.H. (1991). Increased circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cirrhosis. *J. Hepatol.* 12, 118-123.
- BenEzra,D., Hemo,I., and Maftzir,G. (1990). In vivo angiogenic activity of interleukins. *Arch. Ophthalmol.* 108, 573-576.
- Benjamin,L.E., Hemo,I., and Keshet,E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125, 1591-1598.
- Bernardi,M., Trevisani,F., Gasbarrini,A., and Gasbarrini,G. (1994). Hepatorenal disorders: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Semin. Liver Dis.* 14, 23-34.
- Berse,B., Brown,L.F., van de,W.L., Dvorak,H.F., and Senger,D.R. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell* 3, 211-220.
- Berthiaume,N., Claing,A., Lipton,H., Cadieux,A., and D'Orleans-Juste,P. (1995). Rat adrenomedullin induces a selective arterial vasodilation via CGRP1 receptors in the double-perfused mesenteric bed of the rat. *Can. J Physiol Pharmacol.* 73, 1080-1083.
- Bhathal,P.S. and Grossman,H.J. (1985). Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J. Hepatol.* 1, 325-337.
- Bichet,D., Szatalowicz,V., Chaimovitz,C., and Schrier,R.W. (1982). Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients. *Ann. Intern. Med.* 96, 413-417.
- Blendis,L. and Wong,F. (2001). The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol. Ther.* 89, 221-231.
- Bobik,R., Hong,Y., Breier,G., Martin,J.F., and Erusalimsky,J.D. (1998). Thrombopoietin stimulates VEGF release from c-Mpl-expressing cell lines and haematopoietic progenitors. *FEBS Lett.* 423, 10-14.
- Bolognesi,M., Merkel,C., Bianco,S., Angeli,P., Sacerdoti,D., Amodio,P., and Gatta,A. (1994). Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 19, 628-634.
- Borgstrom,P., Bourdon,M.A., Hillan,K.J., Sriramarao,P., and Ferrara,N. (1998). Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35, 1-10.
- Bosch,J. and García-Pagán,J. (1999). Pathophysiology of portal hypertension and its complications. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, J.Bircher, J.-P.Benhamou, N.McIntyre, M.Rizzetto, and J.Rodes, eds. (Oxford: Oxford Medical Publications).
- Bottomley,M.J., Webb,N.J., Watson,C.J., Holt,P.J., Freemont,A.J., and Brenchley,P.E. (1999). Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 171-176.

- Bouloumie, A., Schini-Kerth, V.B., and Busse, R. (1999). Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* *41*, 773-780.
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., and Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* *114*, 521-532.
- Brenner, R.M., Nayak, N.R., Slayden, O.D., Critchley, H.O., and Kelly, R.W. (2002). Premenstrual and menstrual changes in the macaque and human endometrium: relevance to endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *955*, 60-74.
- Breslin, J.W., Pappas, P.J., Cerveira, J.J., Hobson, R.W., and Duran, W.N. (2003). VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* *284*, H92-H100.
- Brock, T.A., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1991). Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* *138*, 213-221.
- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A., and Isner, J.M. (1994). Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* *90*, 649-652.
- Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresch, D.A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* *79*, 1157-1164.
- Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1993). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am. J. Pathol.* *143*, 1255-1262.
- Brown, L.F., Detmar, M., Tognazzi, K., Abu-Jawdeh, G., and Iruela-Arispe, M.L. (1997). Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* *76*, 245-255.
- Brown, L.F., Yeo, K.T., Berse, B., Yeo, T.K., Senger, D.R., Dvorak, H.F., and van de, W.L. (1992). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp. Med* *176*, 1375-1379.
- Byl, B., Roucloux, I., Crusiaux, A., Dupont, E., and Deviere, J. (1993). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* *104*, 1492-1497.
- Calvo, A., Abasolo, I., Jimenez, N., Wang, Z., and Montuenga, L. (2002). Adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in the normal prostate and in prostate carcinoma. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 98-104.
- Campbell, D.P., Parker, D.E., and Anagnostopoulos, C.E. (1973). Survival prediction in portacaval shunts: a computerized statistical analysis. *Am. J Surg.* *126*, 748-751.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* *380*, 435-439.
- Caron, K.M. and Smithies, O. (2001). Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 615-619.

- Carrero,P., Okamoto,K., Coumailleau,P., O'Brien,S., Tanaka,H., and Poellinger,L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell Biol.* 20, 402-415.
- Casafont,M.F., las Heras,C.G., Martin,R.L., Lopez Arias,M.J., Ledesma,F., and Pons,R.F. (1996). Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 41, 552-556.
- Castro,A., Jimenez,W., Claria,J., Ros,J., Martinez,J.M., Bosch,M., Arroyo,V., Piulats,J., Rivera,F., and Rodes,J. (1993). Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 18, 367-372.
- Celletti,F.L., Waugh,J.M., Amabile,P.G., Brendolan,A., Hilfiker,P.R., and Dake,M.D. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 7, 425-429.
- Champion,H.C., Akers,D.L., Santiago,J.A., Lambert,D.G., McNamara,D.B., and Kadowitz,P.J. (1997). Analysis of responses to human synthetic adrenomedullin and calcitonin gene-related peptides in the hindlimb vascular bed of the cat. *Mol. Cell Biochem.* 176, 5-11.
- Chang,S.C., Chang,H.I., Chen,F.J., Shiao,G.M., Wang,S.S., and Lee,S.D. (1997). Therapeutic effects of diuretics and paracentesis on lung function in patients with non-alcoholic cirrhosis and tense ascites. *J Hepatol.* 26, 833-838.
- Chao,Y., Wang,S.S., Lee,S.D., Shiao,G.M., Chang,H.I., and Chang,S.C. (1994). Effect of large-volume paracentesis on pulmonary function in patients with cirrhosis and tense ascites. *J Hepatol.* 20, 101-105.
- Charnock-Jones,D.S., Sharkey,A.M., Boocock,C.A., Ahmed,A., Plevin,R., Ferrara,N., and Smith,S.K. (1994). Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol. Reprod.* 51, 524-530.
- Chen,B., Liu,X., Savell,V.H., Dilday,B.R., Johnson,M.W., Jenkins,J.J., and Parham,D.M. (1999a). Increased DNA methyltransferase expression in rhabdomyosarcomas. *Int. J Cancer* 83, 10-14.
- Chen,K.D., Li,Y.S., Kim,M., Li,S., Yuan,S., Chien,S., and Shyy,J.Y. (1999b). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J. Biol. Chem.* 274, 18393-18400.
- Chen,Y.X., Nakashima,Y., Tanaka,K., Shiraiishi,S., Nakagawa,K., and Sueishi,K. (1999c). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 131-139.
- Chen,Z., Fisher,R.J., Riggs,C.W., Rhim,J.S., and Lautenberger,J.A. (1997). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res.* 57, 2013-2019.
- Child,C.G. and Turcotte,J.G. (1964). Surgery and portal hypertension. *Major. Probl. Clin. Surg.* 1, 1-85.
- Chini,E.N., Choi,E., Grande,J.P., Burnett,J.C., and Dousa,T.P. (1995). Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 868-873.
- Chiricolo,M., Lenzi,M., Bianchi,F., Franceschi,C., Bartolini,G., Orlandi,M., Tomasi,V., and Licastro,F. (1989). Immune dysfunction in primary biliary cirrhosis. II. Increased production of prostaglandin E. *Scand. J Immunol.* 30, 363-367.

- Cho, M., Hunt, T.K., and Hussain, M.Z. (2001). Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H2357-H2363.
- Chow, N.H., Hsu, P.I., Lin, X.Z., Yang, H.B., Chan, S.H., Cheng, K.S., Huang, S.M., and Su, I.J. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in normal liver and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* 28, 698-703.
- Chun, Y.S., Choi, E., Kim, T.Y., Kim, M.S., and Park, J.W. (2002). A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene. *Biochem. J.* 362, 71-79.
- Chun, Y.S., Choi, E., Yeo, E.J., Lee, J.H., Kim, M.S., and Park, J.W. (2001). A new HIF-1  $\alpha$  variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J. Cell Sci.* 114, 4051-4061.
- Cirera, I., Bauer, T.M., Navasa, M., Vila, J., Grande, L., Taura, P., Fuster, J., Garcia-Valdecasas, J.C., Lacy, A., Suarez, M.J., Rimola, A., and Rodes, J. (2001). Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 34, 32-37.
- Claffey, K.P., Abrams, K., Shih, S.C., Brown, L.F., Mullen, A., and Keough, M. (2001). Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab Invest* 81, 61-75.
- Claffey, K.P., Wilkison, W.O., and Spiegelman, B.M. (1992). Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J. Biol. Chem.* 267, 16317-16322.
- Claria, J., Jimenez, W., Ros, J., Rigol, M., Angeli, P., Arroyo, V., Rivera, F., and Rodes, J. (1994). Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 20, 1615-1621.
- Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., and Risau, W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271, 17629-17634.
- Cohen, A.W., Carbajal, J.M., and Schaeffer, R.C., Jr. (1999). VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Physiol* 277, H2038-H2049.
- Cohen, T., Gitay-Goren, H., Sharon, R., Shibuya, M., Halaban, R., Levi, B.Z., and Neufeld, G. (1995). VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol. Chem.* 270, 11322-11326.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L.W., Neufeld, G., and Levi, B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 271, 736-741.
- Conn HO and Atterbury CE (1987). Cirrhosis. In *Diseases of the liver*, Schiff L and Schiff ER, eds. (Philadelphia: Lippincott), pp. 725-864.
- Constant, J.S., Feng, J.J., Zabel, D.D., Yuan, H., Suh, D.Y., Scheuenstuhl, H., Hunt, T.K., and Hussain, M.Z. (2000). Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound. Repair Regen.* 8, 353-360.
- Coppock, H.A., Owji, A.A., Austin, C., Upton, P.D., Jackson, M.L., Gardiner, J.V., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Smith, D.M. (1999). Rat-2 fibroblasts express specific adrenomedullin receptors, but not calcitonin-gene-related-peptide receptors, which mediate increased

- intracellular cAMP and inhibit mitogen-activated protein kinase activity. *Biochem. J* 338 ( Pt 1), 15-22.
- Coppock,H.A., Owji,A.A., Bloom,S.R., and Smith,D.M. (1996). A rat skeletal muscle cell line (L6) expresses specific adrenomedullin binding sites but activates adenylate cyclase via calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem. J.* 318 ( Pt 1), 241-245.
- Cormier-Regard,S., Nguyen,S.V., and Claycomb,W.C. (1998). Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 17787-17792.
- Corne,J., Chupp,G., Lee,C.G., Homer,R.J., Zhu,Z., Chen,Q., Ma,B., Du,Y., Roux,F., McArdle,J., Waxman,A.B., and Elias,J.A. (2000). IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J. Clin. Invest* 106, 783-791.
- Corpechot,C., Barbu,V., Wendum,D., Kinnman,N., Rey,C., Poupon,R., Housset,C., and Rosmorduc,O. (2002). Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 35, 1010-1021.
- Couffinhal,T., Kearney,M., Witzendichler,B., Chen,D., Murohara,T., Losordo,D.W., Symes,J., and Isner,J.M. (1997a). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am. J Pathol.* 150, 1673-1685.
- Couffinhal,T., Kearney,M., Witzendichler,B., Chen,D., Murohara,T., Losordo,D.W., Symes,J., and Isner,J.M. (1997b). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am. J. Pathol.* 150, 1673-1685.
- Creamer,D., Allen,M., Jaggar,R., Stevens,R., Bicknell,R., and Barker,J. (2002). Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Arch. Dermatol.* 138, 791-796.
- Crowther,M., Brown,N.J., Bishop,E.T., and Lewis,C.E. (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J. Leukoc. Biol.* 70, 478-490.
- Cucina,A., Borrelli,V., Randone,B., Coluccia,P., Sapienza,P., and Cavallaro,A. (2003). Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *J. Surg. Res.* 109, 16-23.
- D'Angelo,G., Struman,I., Martial,J., and Weiner,R.I. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6374-6378.
- Damert,A., Ikeda,E., and Risau,W. (1997). Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem. J.* 327 ( Pt 2), 419-423.
- de Vries,C., Escobedo,J.A., Ueno,H., Houck,K., Ferrara,N., and Williams,L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.
- Detmar,M. (2000). The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 24 Suppl 1, S78-S84.
- Devriere,J., Content,J., Denys,C., Vandenbussche,P., Schandene,L., Wybran,J., and Dupont,E. (1990). Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 11, 628-634.
- Di Iorio,R., Marinoni,E., Letizia,C., Alo,P., Villaccio,B., and Cosmi,E.V. (1998). Adrenomedullin, a new vasoactive peptide, is increased in preeclampsia. *Hypertension* 32, 758-763.

- Dias, S., Boyd, R., and Balkwill, F. (1998). IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *Int. J. Cancer* 78, 361-365.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Doanes, A.M., Hegland, D.D., Sethi, R., Kovacs, I., Bruder, J.T., and Finkel, T. (1999). VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 545-548.
- Dor, Y., Porat, R., and Keshet, E. (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J Physiol Cell Physiol* 280, C1367-C1374.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650-1659.
- Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368-4380.
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J Pathol.* 146, 1029-1039.
- Ebert, B.L. and Bunn, H.F. (1998). Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol. Cell Biol.* 18, 4089-4096.
- Eguchi, S., Hirata, Y., Kano, H., Sato, K., Watanabe, Y., Watanabe, T.X., Nakajima, K., Sakakibara, S., and Marumo, F. (1994). Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 340, 226-230.
- Eilers, A., Seegert, D., Schindler, C., Baccarini, M., and Decker, T. (1993). The response of gamma interferon activation factor is under developmental control in cells of the macrophage lineage. *Mol. Cell Biol.* 13, 3245-3254.
- El Awad, B., Kreft, B., Wolber, E.M., Hellwig-Burgel, T., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (2000). Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int.* 58, 43-50.
- Elhawary, A.M., Poon, J., and Pang, C.C. (1995). Effects of calcitonin gene-related peptide receptor antagonists on renal actions of adrenomedullin. *Br. J Pharmacol.* 115, 1133-1140.
- Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., and Cheresh, D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* 4, 915-924.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18, 1905-1914.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4273-4278.

Eppler,S.M., Combs,D.L., Henry,T.D., Lopez,J.J., Ellis,S.G., Yi,J.H., Annex,B.H., McCluskey,E.R., and Zioncheck,T.F. (2002). A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 20-32.

Eriksson,A., Cao,R., Roy,J., Tritsarlis,K., Wahlestedt,C., Dissing,S., Thyberg,J., and Cao,Y. (2003). Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation* 107, 1532-1538.

Erlinger,S. and Benhamou,J.-P. (1999). Cirrhosis: clinical aspects. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, M.Rizzetto, and Rodes J, eds. (Oxford: Oxford Medical Publications).

Esser,S., Wolburg,K., Wolburg,H., Breier,G., Kurzchalia,T., and Risau,W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* 140, 947-959.

Fabrega,E., Casafont,F., Crespo,J., de la,P.J., San Miguel,G., de las,H.G., Garcia-Unzueta,M.T., Amado,J.A., and Pons-Romero,F. (1997). Plasma adrenomedullin levels in patients with hepatic cirrhosis. *Am. J Gastroenterol.* 92, 1901-1904.

Faller,D.V. (1999). Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 26, 74-84.

Fallon,M.B. and Abrams,G.A. (2000). Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 32, 859-865.

Fallon,M.B., Abrams,G.A., Luo,B., Hou,Z., Dai,J., and Ku,D.D. (1997). The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 113, 606-614.

Fava,R.A., Olsen,N.J., Spencer-Green,G., Yeo,K.T., Yeo,T.K., Berse,B., Jackman,R.W., Senger,D.R., Dvorak,H.F., and Brown,L.F. (1994). Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J. Exp. Med.* 180, 341-346.

Feng,C.J., Kang,B., Kaye,A.D., Kadowitz,P.J., and Nossaman,B.D. (1994). L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci.* 55, L433-L438.

Feng,D., Nagy,J.A., Hipp,J., Dvorak,H.F., and Dvorak,A.M. (1996). Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J. Exp. Med.* 183, 1981-1986.

Feng,D., Nagy,J.A., Hipp,J., Pyne,K., Dvorak,H.F., and Dvorak,A.M. (1997). Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores. *J. Physiol* 504 ( Pt 3), 747-761.

Fernandez,J., Bauer,T., Navasa,M., and Rodes,J. (2000). Diagnosis, treatment and prevention of spontaneous bacterial peritonitis. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 14, 975-990.

Fernandez,M., Lambrecht,R.W., and Bonkovsky,H.L. (2001). Increased heme oxygenase activity in splanchnic organs from portal hypertensive rats: role in modulating mesenteric vascular reactivity. *J. Hepatol.* 34, 812-817.

Fernandez-Rodriguez,C.M., Prada,I.R., Prieto,J., Montuenga,L.M., Elssasser,T., Quiroga,J., Moreiras,M., Andrade,A., and Cuttitta,F. (1998). Circulating adrenomedullin in cirrhosis: relationship to hyperdynamic circulation. *J Hepatol.* 29, 250-256.

Ferrara,N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 77, 527-543.

- Ferrara,N., Carver-Moore,K., Chen,H., Dowd,M., Lu,L., O'Shea,K.S., Powell-Braxton,L., Hillan,K.J., and Moore,M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrara,N., Chen,H., Davis-Smyth,T., Gerber,H.P., Nguyen,T.N., Peers,D., Chisholm,V., Hillan,K.J., and Schwall,R.H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4, 336-340.
- Ferrara,N. and Davis-Smyth,T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25.
- Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med* 9, 669-676.
- Ferrara,N. and Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.
- Firth,J.D., Ebert,B.L., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6496-6500.
- Flamme,I., Frohlich,T., von Reutern,M., Kappel,A., Damert,A., and Risau,W. (1997). HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech. Dev.* 63, 51-60.
- Fluckiger,M. (1884). Vorkommen von trommelschagel formigen fingerendphalangen ohne chronische veränderungen an der lungen oder am herzen. *Wien Med Wochenschr* 34, 1457.
- Folkman,J. and Klagsbrun,M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- Follo,A., Llovet,J.M., Navasa,M., Planas,R., Forns,X., Francitorra,A., Rimola,A., Gassull,M.A., Arroyo,V., and Rodes,J. (1994). Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 20, 1495-1501.
- Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., and Breitman,M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Forsythe,J.A., Jiang,B.H., Iyer,N.V., Agani,F., Leung,S.W., Koos,R.D., and Semenza,G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 16, 4604-4613.
- Fowler,D.E., Yang,S., Zhou,M., Chaudry,I.H., Simms,H.H., and Wang,P. (2003). Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response. *J. Surg. Res.* 109, 175-181.
- Frank,S., Hubner,G., Breier,G., Longaker,M.T., Greenhalgh,D.G., and Werner,S. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 270, 12607-12613.
- Freeman,M.R., Schneck,F.X., Gagnon,M.L., Corless,C., Soker,S., Niknejad,K., Peoples,G.E., and Klagsbrun,M. (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4140-4145.
- Fuh,G., Li,B., Crowley,C., Cunningham,B., and Wells,J.A. (1998). Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 11197-11204.

Fujioka,S., Ono,Y., Kangawa,K., and Okada,K. (1999). Plasma concentration of adrenomedullin is increased in hemorrhagic shock in dogs. *Anesth. Analg.* *88*, 326-328.

Fukumura,D., Xu,L., Chen,Y., Gohongi,T., Seed,B., and Jain,R.K. (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.* *61*, 6020-6024.

Fulton,D., Gratton,J.P., McCabe,T.J., Fontana,J., Fujio,Y., Walsh,K., Franke,T.F., Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* *399*, 597-601.

Galson,D.L., Tsuchiya,T., Tendler,D.S., Huang,L.E., Ren,Y., Ogura,T., and Bunn,H.F. (1995). The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2135-2144.

Garayoa,M., Martinez,A., Lee,S., Pio,R., An,W.G., Neckers,L., Trepel,J., Montuenga,L.M., Ryan,H., Johnson,R., Gassmann,M., and Cuttitta,F. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol. Endocrinol.* *14*, 848-862.

Garcia-Cardena,G., Fan,R., Shah,V., Sorrentino,R., Cirino,G., Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* *392*, 821-824.

Garcia-Gonzalez,M., Boixeda,D., Herrero,D., and Burgaleta,C. (1993). Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* *105*, 527-531.

García-Pagán,J. and Bosch,J. (1999). The splanchnic circulation in cirrhosis. In *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment.*, V.Arroyo, P.Gines, Rodes J, and R.W.Schrier, eds. Blackwell science Inc).

Garcia-Tsao,G. (2001). Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* *120*, 726-748.

Garcia-Tsao,G., Lee,F.Y., Barden,G.E., Cartun,R., and West,A.B. (1995). Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* *108*, 1835-1841.

Gardiner,S.M., Kemp,P.A., March,J.E., and Bennett,T. (1995). Regional haemodynamic effects of human and rat adrenomedullin in conscious rats. *Br. J Pharmacol.* *114*, 584-591.

Gaudry,M., Bregerie,O., Andrieu,V., El Benna,J., Pocardalo,M.A., and Hakim,J. (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* *90*, 4153-4161.

Gerber,H.P., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998a). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 13313-13316.

Gerber,H.P., Hillan,K.J., Ryan,A.M., Kowalski,J., Keller,G.A., Rangell,L., Wright,B.D., Radtke,F., Aguet,M., and Ferrara,N. (1999a). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* *126*, 1149-1159.

Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* *273*, 30336-30343.

Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., and Ferrara,N. (1999b). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5, 623-628.

Gether,U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90-113.

Geva,E. and Jaffe,R.B. (2000). Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil. Steril.* 74, 429-438.

Ghosh,A.K., Hirasawa,N., and Ohuchi,K. (2001). Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1419-1428.

Gille,H., Kowalski,J., Yu,L., Chen,H., Pisabarro,M.T., Davis-Smyth,T., and Ferrara,N. (2000). A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J.* 19, 4064-4073.

Giménez, A. Estudio secuencial de la cirrosis hepática experimental: efecto del zinc sobre la fibrogénesis y la colagenólisis. 1992. Universitat de Barcelona-Departament de Medicina. Ref Type: Thesis/Dissertation

Gines,P., Quintero,E., Arroyo,V., Teres,J., Bruguera,M., Rimola,A., Caballeria,J., Rodes,J., and Rozman,C. (1987). Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 7, 122-128.

Gliki,G., Abu-Ghazaleh,R., Jezequel,S., Wheeler-Jones,C., and Zachary,I. (2001). Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. J.* 353, 503-512.

Gluzman-Poltorak,Z., Cohen,T., Herzog,Y., and Neufeld,G. (2000). Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J. Biol. Chem.* 275, 18040-18045.

Gnarra,J.R., Zhou,S., Merrill,M.J., Wagner,J.R., Krumm,A., Papavassiliou,E., Oldfield,E.H., Klausner,R.D., and Linehan,W.M. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 10589-10594.

Goede,V., Brogelli,L., Ziche,M., and Augustin,H.G. (1999). Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer* 82, 765-770.

Goldman,C.K., Kim,J., Wong,W.L., King,V., Brock,T., and Gillespie,G.Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell* 4, 121-133.

Goligorsky,M.S., Abedi,H., Noiri,E., Takhtajan,A., Lense,S., Romanov,V., and Zachary,I. (1999). Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am. J. Physiol* 276, C1271-C1281.

Gorbig,M.N., Gines,P., Bataller,R., Nicolas,J.M., Garcia-Ramallo,E., Cejudo,P., Sancho-Bru,P., Jimenez,W., Arroyo,V., and Rodes,J. (2001). Human hepatic stellate cells secrete adrenomedullin: potential autocrine factor in the regulation of cell contractility. *J Hepatol.* 34, 222-229.

Griga,T., Werner,S., Koller,M., Tromm,A., and May,B. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1196-1201.

- Grossniklaus, H.E., Ling, J.X., Wallace, T.M., Dithmar, S., Lawson, D.H., Cohen, C., Elnér, V.M., Elnér, S.G., and Sternberg, P., Jr. (2002). Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 8, 119-126.
- Gruden, G., Thomas, S., Burt, D., Lane, S., Chusney, G., Sacks, S., and Viberti, G. (1997). Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells: mechanisms of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12112-12116.
- Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B., and Marme, D. (1995). Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 25915-25919.
- Gu, J.W., Brady, A.L., Anand, V., Moore, M.C., Kelly, W.C., and Adair, T.H. (1999). Adenosine upregulates VEGF expression in cultured myocardial vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol* 277, H595-H602.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., and Bradfield, C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 7, 205-213.
- Guarner, C. and Runyon, B.A. (1995). Macrophage function in cirrhosis and the risk of bacterial infection. *Hepatology* 22, 367-369.
- Guarner, C. and Soriano, G. (1997). Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin. Liver Dis.* 17, 203-217.
- Guerrin, M., Moukadiri, H., Chollet, P., Moro, F., Dutt, K., Malecaze, F., and Plouet, J. (1995). Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J. Cell Physiol* 164, 385-394.
- Guevara, M., Gines, P., Jimenez, W., Sort, P., Fernandez-Esparrach, G., Escorsell, A., Bataller, R., Bosch, J., Arroyo, V., Rivera, F., and Rodes, J. (1998). Increased adrenomedullin levels in cirrhosis: relationship with hemodynamic abnormalities and vasoconstrictor systems. *Gastroenterology* 114, 336-343.
- Gupta, S., Morgan, T.R., and Gordan, G.S. (1992). Calcitonin gene-related peptide in hepatorenal syndrome. A possible mediator of peripheral vasodilation? *J. Clin. Gastroenterol.* 14, 122-126.
- Hamilton, G., Phing, R.C., Hutton, R.A., Dandona, P., and Hobbs, K.E. (1982). The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. *Hepatology* 2, 236-242.
- Hanck, C., Glatzel, M., Singer, M.V., and Rossol, S. (2000). Gene expression of TNF-receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol.* 32, 51-57.
- Hariawala, M.D., Horowitz, J.R., Esakof, D., Sheriff, D.D., Walter, D.H., Keyt, B., Isner, J.M., and Symes, J.F. (1996). VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J. Surg. Res.* 63, 77-82.
- Harmey, J.H., Dimitriadis, E., Kay, E., Redmond, H.P., and Bouchier-Hayes, D. (1998). Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann. Surg. Oncol.* 5, 271-278.
- Haroon, Z.A., Raleigh, J.A., Greenberg, C.S., and Dewhirst, M.W. (2000). Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann. Surg.* 231, 137-147.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G., Moore, M.A., and Rafii, S. (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 193, 1005-1014.

Hattori,Y., Murakami,Y., Atsuta,H., Minamino,N., Kangawa,K., and Kasai,K. (1998). Glucocorticoid regulation of adrenomedullin in a rat model of endotoxic shock. *Life Sci.* 62, L181-L189.

He,H., Bessho,H., Fujisawa,Y., Horiuchi,K., Tomohiro,A., Kita,T., Aki,Y., Kimura,S., Tamaki,T., and Abe,Y. (1995). Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol.* 273, 209-214.

He,H., Venema,V.J., Gu,X., Venema,R.C., Marrero,M.B., and Caldwell,R.B. (1999). Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* 274, 25130-25135.

Henriksen,J.H. and Ring-Larsen,H. (1994). Hepatorenal disorders: role of the sympathetic nervous system. *Semin. Liver Dis.* 14, 35-43.

Hilairt,S., Belanger,C., Bertrand,J., Laperriere,A., Foord,S.M., and Bouvier,M. (2001a). Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J. Biol. Chem.* 276, 42182-42190.

Hilairt,S., Foord,S.M., Marshall,F.H., and Bouvier,M. (2001b). Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 29575-29581.

Hinson,J.P., Kapas,S., and Smith,D.M. (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr. Rev.* 21, 138-167.

Hippenstiel,S., Krull,M., Ikemann,A., Risau,W., Clauss,M., and Suttorp,N. (1998). VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am. J. Physiol* 274, L678-L684.

Hiratsuka,S., Nakamura,K., Iwai,S., Murakami,M., Itoh,T., Kijima,H., Shipley,J.M., Senior,R.M., and Shibuya,M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2, 289-300.

Hoffman,E.C., Reyes,H., Chu,F.F., Sander,F., Conley,L.H., Brooks,B.A., and Hankinson,O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954-958.

Hogenesch,J.B., Chan,W.K., Jackiw,V.H., Brown,R.C., Gu,Y.Z., Pray-Grant,M., Perdew,G.H., and Bradfield,C.A. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 8581-8593.

Hojo,Y., Ikeda,U., Maeda,Y., Takahashi,M., Takizawa,T., Okada,M., Funayama,H., and Shimada,K. (2000). Interaction between human monocytes and vascular smooth muscle cells induces vascular endothelial growth factor expression. *Atherosclerosis* 150, 63-70.

Hood,J.D., Meininger,C.J., Ziche,M., and Granger,H.J. (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am. J. Physiol* 274, H1054-H1058.

Horiuchi,T. and Weller,P.F. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 70-77.

Horowitz,J.R., Rivard,A., van der,Z.R., Hariawala,M., Sheriff,D.D., Esakof,D.D., Chaudhry,G.M., Symes,J.F., and Isner,J.M. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2793-2800.

Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol* 5, 1806-1814.

Hu, J., Discher, D.J., Bishopric, N.H., and Webster, K.A. (1998). Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 894-899.

Hu, Y.L., Tee, M.K., Goetzl, E.J., Auersperg, N., Mills, G.B., Ferrara, N., and Jaffe, R.B. (2001). Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 762-768.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7987-7992.

Hyder, S.M., Stancel, G.M., Chiappetta, C., Murthy, L., Boettger-Tong, H.L., and Makela, S. (1996). Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res.* 56, 3954-3960.

Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., Jr., and Goldberg, M.A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 10595-10599.

Imai, T., Hirata, Y., Iwashina, M., and Marumo, F. (1995). Hormonal regulation of rat adrenomedullin gene in vasculature. *Endocrinology* 136, 1544-1548.

Inoue, H., Takamori, M., Nagata, N., Nishikawa, T., Oda, H., Yamamoto, S., and Koshihara, Y. (2001a). An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1 $\beta$  in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.* 50, 65-72.

Inoue, M., Itoh, H., Tanaka, T., Chun, T.H., Doi, K., Fukunaga, Y., Sawada, N., Yamashita, J., Masatsugu, K., Saito, T., Sakaguchi, S., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T., and Nakao, K. (2001b). Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 560-566.

Ishimitsu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Hino, J., Matsuoka, H., Kitamura, K., Eto, T., and Matsuo, H. (1994). Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 631-639.

Ishimitsu, T., Miyata, A., Matsuoka, H., and Kangawa, K. (1998). Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 463-470.

Ishimitsu, T., Nishikimi, T., Matsuoka, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Minami, J., Matsuo, H., and Eto, T. (1996). Behaviour of adrenomedullin during acute and chronic salt loading in normotensive and hypertensive subjects. *Clin. Sci. (Lond)* 91, 293-298.

Ishizaka, Y., Ishizaka, Y., Tanaka, M., Kitamura, K., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., and Eto, T. (1994). Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 642-646.

Issbrucker, K., Marti, H.H., Hippenstiel, S., Springmann, G., Voswinckel, R., Gaumann, A., Breier, G., Drexler, H.C., Suttrop, N., and Clauss, M. (2003). p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J.* 17, 262-264.

- Isumi, Y., Shoji, H., Sugo, S., Tochimoto, T., Yoshioka, M., Kangawa, K., Matsuo, H., and Minamino, N. (1998). Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 139, 838-846.
- Itaya, H., Imaizumi, T., Yoshida, H., Koyama, M., Suzuki, S., and Satoh, K. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb. Haemost.* 85, 171-176.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF-1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292, 464-468.
- Iwasaki, H., Eguchi, S., Shichiri, M., Marumo, F., and Hirata, Y. (1998). Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 139, 3432-3441.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jackson, J.R., Minton, J.A., Ho, M.L., Wei, N., and Winkler, J.D. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 $\beta$ . *J. Rheumatol.* 24, 1253-1259.
- Jensen, B.L., Gambaryan, S., Schmaus, E., and Kurtz, A. (1998). Effects of dietary salt on adrenomedullin and its receptor mRNAs in rat kidney. *Am. J Physiol* 275, F55-F61.
- Jensen, B.L., Kramer, B.K., and Kurtz, A. (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29, 1148-1155.
- Jerat, S. and Kaufman, S. (1998). Effect of pregnancy and steroid hormones on plasma adrenomedullin levels in the rat. *Can. J Physiol Pharmacol.* 76, 463-466.
- Jiménez, W., Poo, J., and Leivas, A. (1999). Endothelin and systemic, renal and hepatic hemodynamic disturbances in cirrhosis. In *Ascites and renal dysfunction in liver disease*, V.Arroyo, P.Ginès, J.Rodés, and R.Schrier, eds. (Malden: Blackwell Science Inc), pp. 291-303.
- Jimenez, W., Martinez-Pardo, A., Arroyo, V., Bruix, J., Rimola, A., Gaya, J., Rivera, F., and Rodes, J. (1985). Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 5, 245-250.
- Jimenez, W., Ros, J., Morales-Ruiz, M., Navasa, M., Sole, M., Colmenero, J., Sort, P., Rivera, F., Arroyo, V., and Rodes, J. (1999). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 30, 670-676.
- Jozkowicz, A., Dulak, J., Piatkowska, E., Placha, W., and Dembinska-Kiec, A. (2000). Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  increase the generation of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells and in macrophages. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1147-1157.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J.* 17, 6573-6586.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6519-6525.

- Kamoi,H., Kanazawa,H., Hirata,K., Kurihara,N., Yano,Y., and Otani,S. (1995). Adrenomedullin inhibits the secretion of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, from rat alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 1031-1035.
- Kano,H., Kohno,M., Yasunari,K., Yokokawa,K., Horio,T., Ikeda,M., Minami,M., Hanehira,T., Takeda,T., and Yoshikawa,J. (1996). Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* **14**, 209-213.
- Kapas,S., Brown,D.W., Farthing,P.M., and Hagi-Pavli,E. (1997). Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP. *FEBS Lett.* **418**, 287-290.
- Kapas,S., Martinez,A., Cuttitta,F., and Hinson,J.P. (1998). Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. *J Endocrinol* **156**, 477-484.
- Kaufman,S., Andrew,P., Sultanian,R., and Deng,Y. (2001). Adrenomedullin increases fluid extravasation from the splenic circulation of the rat. *J Physiol* **534**, 527-533.
- Keck,P.J., Hauser,S.D., Krivi,G., Sanzo,K., Warren,T., Feder,J., and Connolly,D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.
- Kendall,R.L. and Thomas,K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10705-10709.
- Kendall,R.L., Wang,G., and Thomas,K.A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 324-328.
- Keyt,B.A., Nguyen,H.V., Berleau,L.T., Duarte,C.M., Park,J., Chen,H., and Ferrara,N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 5638-5646.
- Kim,K.J., Li,B., Winer,J., Armanini,M., Gillett,N., Phillips,H.S., and Ferrara,N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844.
- Kiriakidis,S., Andreakos,E., Monaco,C., Foxwell,B., Feldmann,M., and Paleolog,E. (2003). VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J Cell Sci.* **116**, 665-674.
- Kita,T., Kitamura,K., Kuwasako,K., Kawamoto,M., and Eto,T. (1998). Short-term modulation of the renin-angiotensin system does not alter plasma adrenomedullin concentration in humans. *J Hypertens.* **16**, 2057-2062.
- Kitamura,K., Ichiki,Y., Tanaka,M., Kawamoto,M., Emura,J., Sakakibara,S., Kangawa,K., Matsuo,H., and Eto,T. (1994). Immunoreactive adrenomedullin in human plasma. *FEBS Lett.* **341**, 288-290.
- Kitamura,K., Kangawa,K., Kawamoto,M., Ichiki,Y., Nakamura,S., Matsuo,H., and Eto,T. (1993a). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 553-560.
- Kitamura,K., Sakata,J., Kangawa,K., Kojima,M., Matsuo,H., and Eto,T. (1993b). Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 720-725.

Kitamuro, T., Takahashi, K., Nakayama, M., Murakami, O., Hida, W., Shirato, K., and Shibahara, S. (2000). Induction of adrenomedullin during hypoxia in cultured human glioblastoma cells. *J Neurochem.* 75, 1826-1833.

Kitamuro, T., Takahashi, K., Totsune, K., Nakayama, M., Murakami, O., Hida, W., Shirato, K., and Shibahara, S. (2001). Differential expression of adrenomedullin and its receptor component, receptor activity modifying protein (RAMP) 2 during hypoxia in cultured human neuroblastoma cells. *Peptides* 22, 1795-1801.

Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005.

Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K., Amento, E.P., Unemori, E.N., Wong, W.L., Pope, R.M., and Ferrara, N. (1994). Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 152, 4149-4156.

Kojima, H., Tsujimoto, T., Uemura, M., Takaya, A., Okamoto, S., Ueda, S., Nishio, K., Miyamoto, S., Kubo, A., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., and Fukui, H. (1998). Significance of increased plasma adrenomedullin concentration in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 28, 840-846.

Konig, J.E., Tolnay, E., Wiethage, T., and Muller, K.M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor in diffuse malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch.* 435, 8-12.

Korpelainen, E.I., Karkkainen, M., Gunji, Y., Vikkula, M., and Alitalo, K. (1999). Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 18, 1-8.

Koyama, S., Sato, E., Tsukadaira, A., Haniuda, M., Numanami, H., Kurai, M., Nagai, S., and Izumi, T. (2002). Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. *Eur Respir. J* 20, 1449-1456.

Kraft, A., Weindel, K., Ochs, A., Marth, C., Zmija, J., Schumacher, P., Unger, C., Marme, D., and Gastl, G. (1999). Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 85, 178-187.

Krist, L.F., Eestermans, I.L., Steenbergen, J.J., Hoefsmit, E.C., Cuesta, M.A., Meyer, S., and Beelen, R.H. (1995). Cellular composition of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical and ultrastructural study. *Anat. Rec.* 241, 163-174.

Kronemann, N., Bouloumi, A., Bassus, S., Kirchmaier, C.M., Busse, R., and Schini-Kerth, V.B. (1999). Aggregating human platelets stimulate expression of vascular endothelial growth factor in cultured vascular smooth muscle cells through a synergistic effect of transforming growth factor-beta(1) and platelet-derived growth factor(AB). *Circulation* 100, 855-860.

Krowka, M.J. and Cortese, D.A. (1990). Hepatopulmonary syndrome: an evolving perspective in the era of liver transplantation. *Hepatology* 11, 138-142.

Ku, D.D., Zaleski, J.K., Liu, S., and Brock, T.A. (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol* 265, H586-H592.

Kubo, A., Minamino, N., Isumi, Y., Kangawa, K., Dohi, K., and Matsuo, H. (1998a). Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett.* 426, 233-237.

Kubo, A., Minamino, N., Isumi, Y., Katafuchi, T., Kangawa, K., Dohi, K., and Matsuo, H. (1998b). Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J. Biol. Chem.* 273, 16730-16738.

- Kuchinke,W., Hart,R.P., and Jonakait,G.M. (1995). Identification of mRNAs regulated by interferon-gamma in cultured rat astrocytes by PCR differential display. *Neuroimmunomodulation*. 2, 347-355.
- Kureishi,Y., Kobayashi,S., Nishimura,J., Nakano,T., and Kanaide,H. (1995). Adrenomedullin decreases both cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and Ca(2+)-sensitivity in pig coronary arterial smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 572-579.
- Kvanta,A., Sarman,S., Fagerholm,P., Seregard,S., and Steen,B. (2000). Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 70, 419-428.
- Laffi,G., Foschi,M., Masini,E., Simoni,A., Mugnai,L., La Villa,G., Barletta,G., Mannaioni,P.F., and Gentilini,P. (1995). Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* 22, 1666-1673.
- Lakshminarayanan,S., Antonetti,D.A., Gardner,T.W., and Tarbell,J.M. (2000). Effect of VEGF on retinal microvascular endothelial hydraulic conductivity: the role of NO. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 4256-4261.
- Lamoreaux,W.J., Fitzgerald,M.E., Reiner,A., Hasty,K.A., and Charles,S.T. (1998). Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc. Res.* 55, 29-42.
- Landgren,E., Schiller,P., Cao,Y., and Claesson-Welsh,L. (1998). Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 16, 359-367.
- Lang,M.G., Paterno,R., Faraci,F.M., and Heistad,D.D. (1997). Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke* 28, 181-185.
- Lebrun,L., Pelletier,G., Briantais,M.J., Galanaud,P., and Etienne,J.P. (1992). Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J. Hepatol.* 16, 98-101.
- LeCouter,J., Moritz,D.R., Li,B., Phillips,G.L., Liang,X.H., Gerber,H.P., Hillan,K.J., and Ferrara,N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.
- Lee,F.Y., Lu,R.H., Tsai,Y.T., Lin,H.C., Hou,M.C., Li,C.P., Liao,T.M., Lin,L.F., Wang,S.S., and Lee,S.D. (1996). Plasma interleukin-6 levels in patients with cirrhosis. Relationship to endotoxemia, tumor necrosis factor-alpha, and hyperdynamic circulation. *Scand. J Gastroenterol* 31, 500-505.
- Lee,S.H., Wolf,P.L., Escudero,R., Deutsch,R., Jamieson,S.W., and Thistlethwaite,P.A. (2000). Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J Med* 342, 626-633.
- Leek,R.D., Hunt,N.C., Landers,R.J., Lewis,C.E., Royds,J.A., and Harris,A.L. (2000). Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* 190, 430-436.
- Leibovich,S.J., Chen,J.F., Pinhal-Enfield,G., Belem,P.C., Elson,G., Rosania,A., Ramanathan,M., Montesinos,C., Jacobson,M., Schwarzschild,M.A., Fink,J.S., and Cronstein,B. (2002). Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *Am. J. Pathol.* 160, 2231-2244.

Leibovich,S.J., Polverini,P.J., Shepard,H.M., Wiseman,D.M., Shively,V., and Nuseir,N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630-632.

Leivas,A., Jimenez,W., Lamas,S., Bosch-Marce,M., Oriola,J., Claria,J., Arroyo,V., Rivera,F., and Rodes,J. (1995). Endothelin 1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 108, 1842-1848.

Letizia,C., Cerci,S., Centanni,M., De Toma,G., Subioli,S., Scuro,L., and Scavo,D. (1998). Circulating levels of adrenomedullin in patients with Addison's disease before and after corticosteroid treatment. *Clin. Endocrinol (Oxf)* 48, 145-148.

Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., and Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Levy,N.S., Chung,S., Furneaux,H., and Levy,A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol. Chem.* 273, 6417-6423.

Li,B., Ogasawara,A.K., Yang,R., Wei,W., He,G.W., Zioncheck,T.F., Bunting,S., de Vos,A.M., and Jin,H. (2002). KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 39, 1095-1100.

Li,J., Hampton,T., Morgan,J.P., and Simons,M. (1997). Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J. Clin. Invest* 100, 18-24.

Li,J., Perrella,M.A., Tsai,J.C., Yet,S.F., Hsieh,C.M., Yoshizumi,M., Patterson,C., Endege,W.O., Zhou,F., and Lee,M.E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270, 308-312.

Liu,Y., Cox,S.R., Morita,T., and Kourembanas,S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638-643.

Llach,J., Gines,P., Arroyo,V., Rimola,A., Tito,L., Badalamenti,S., Jimenez,W., Gaya,J., Rivera,F., and Rodes,J. (1988). Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites. *Gastroenterology* 94, 482-487.

Llovet,J.M., Bartoli,R., Planas,R., Cabre,E., Jimenez,M., Urban,A., Ojanguren,I., Arnal,J., and Gassull,M.A. (1994). Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 35, 1648-1652.

Lopez-Novoa,J.M., Rengel,M.A., and Hernando,L. (1980). Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am. J Physiol* 238, F353-F357.

Luna-Casado,L., Diez-Ruiz,A., Gutierrez-Gea,F., Santos-Perez,J.L., Rico-Irles,J., Wachter,H., and Fuchs,D. (1997). Increased peripheral mononuclear cells expression of adhesion molecules in alcoholic cirrhosis: its relation to immune activation. *J Hepatol* 27, 477-483.

Luo,Y., Raible,D., and Raper,J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.

Mack,C.A., Patel,S.R., Schwarz,E.A., Zanzonico,P., Hahn,R.T., Ilercil,A., Devereux,R.B., Goldsmith,S.J., Christian,T.F., Sanborn,T.A., Kovetski,I., Hackett,N., Isom,O.W., Crystal,R.G., and Rosengart,T.K. (1998). Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 115, 168-176.

Makino, I., Shibata, K., Makino, Y., Kangawa, K., and Kawarabayashi, T. (1999a). Adrenomedullin attenuates the hypertension in hypertensive pregnant rats induced by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol.* *371*, 159-167.

Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* *414*, 550-554.

Makino, Y., Shibata, K., Makino, I., Ono, Y., Kangawa, K., and Kawarabayashi, T. (1999b). Expression of adrenomedullin in feto-placental circulation of human normotensive pregnant women and pregnancy-induced hypertensive women. *Endocrinology* *140*, 5439-5442.

Malavaud, B., Tack, I., Jonca, F., Pradde, F., Moro, F., Ader, J.L., and Plouet, J. (1997). Activation of Flk-1/KDR mediates angiogenesis but not hypotension. *Cardiovasc. Res.* *36*, 276-281.

Malecaze, F., Clamens, S., Simorre-Pinatel, V., Mathis, A., Chollet, P., Favard, C., Bayard, F., and Plouet, J. (1994). Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* *112*, 1476-1482.

Mallamaci, F., Zoccali, C., Parlongo, S., Cutrupi, S., Tripepi, G., and Postorino, M. (1998). Plasma adrenomedullin during acute changes in intravascular volume in hemodialysis patients. *Kidney Int.* *54*, 1697-1703.

Mandl-Weber, S., Cohen, C.D., Haslinger, B., Kretzler, M., and Sitter, T. (2002). Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* *61*, 570-578.

Marti, H.H. and Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 15809-15814.

Martin, P.Y., Xu, D.L., Niederberger, M., Weigert, A., Tsai, P., St John, J., Gines, P., and Schrier, R.W. (1996). Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am. J Physiol* *270*, F494-F499.

Martinez, A., Elsasser, T.H., Muro-Cacho, C., Moody, T.W., Miller, M.J., Macri, C.J., and Cuttitta, F. (1997). Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology* *138*, 5597-5604.

Maruyama, K., Mori, Y., Murasawa, S., Masaki, H., Takahashi, N., Tsutusmi, Y., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Shibuya, M., Inada, M., Matsubara, H., and Iwasaka, T. (1999). Interleukin-1 beta upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR/flk-1 via activation of protein tyrosine kinases. *J Mol. Cell Cardiol.* *31*, 607-617.

Marx, P.T., Mulder, A.B., Van Den Bergh, F.A., Overbeeke, R., Haanen, C., and Vermes, I. (1999). Apoptosis inducers endotoxin and Fas-ligation enhance the expression of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Endothelium* *6*, 335-340.

Matsumoto, A., Ogura, K., Hirata, Y., Kakoki, M., Watanabe, F., Takenaka, K., Shiratori, Y., Momomura, S., and Omata, M. (1995). Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann. Intern. Med* *123*, 110-113.

Matsushita, K., Motani, R., Sakuta, T., Nagaoka, S., Matsuyama, T., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H., and Torii, M. (1999). Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infect. Immun.* *67*, 1633-1639.

Matsuyama,W., Hashiguchi,T., Matsumuro,K., Iwami,F., Hirotsu,Y., Kawabata,M., Arimura,K., and Osame,M. (2000). Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162, 1120-1122.

McLaren,J., Prentice,A., Charnock-Jones,D.S., Millican,S.A., Muller,K.H., Sharkey,A.M., and Smith,S.K. (1996). Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J. Clin. Invest* 98, 482-489.

McLatchie,L.M., Fraser,N.J., Main,M.J., Wise,A., Brown,J., Thompson,N., Solari,R., Lee,M.G., and Foord,S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333-339.

McNicol,P.L., Liu,G., Shulkes,A., Hardy,K.J., and Jones,R.M. (1993). Vasoactive intestinal peptide and calcitonin gene-related peptide levels and hemodynamics during human liver transplantation. *Transplant. Proc.* 25, 1830-1831.

Mechtcheriakova,D., Wlachos,A., Holzmuller,H., Binder,B.R., and Hofer,E. (1999). Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* 93, 3811-3823.

Melder,R.J., Koenig,G.C., Witwer,B.P., Safabakhsh,N., Munn,L.L., and Jain,R.K. (1996). During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat. Med.* 2, 992-997.

Melnyk,O., Shuman,M.A., and Kim,K.J. (1996). Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res.* 56, 921-924.

Michel,C.C., Mason,J.C., Curry,F.E., Tooke,J.E., and Hunter,P.J. (1974). A development of the Landis technique for measuring the filtration coefficient of individual capillaries in the frog mesentery. *Q. J. Exp. Physiol Cogn Med. Sci.* 59, 283-309.

Millauer,B., Wizigmann-Voos,S., Schnurch,H., Martinez,R., Moller,N.P., Risau,W., and Ullrich,A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-846.

Miller,J.W., Adamis,A.P., Shima,D.T., D'Amore,P.A., Moulton,R.S., O'Reilly,M.S., Folkman,J., Dvorak,H.F., Brown,L.F., Berse,B., and . (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.* 145, 574-584.

Minamino,N., Shoji,H., Sugo,S., Kangawa,K., and Matsuo,H. (1995). Adrenocortical steroids, thyroid hormones and retinoic acid augment the production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 686-693.

Minchenko,A. and Caro,J. (2000). Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol. Cell Biochem.* 208, 53-62.

Miura,H., Miyazaki,T., Kuroda,M., Oka,T., Machinami,R., Kodama,T., Shibuya,M., Makuuchi,M., Yazaki,Y., and Ohnishi,S. (1997). Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 27, 854-861.

Mohle,R., Green,D., Moore,M.A., Nachman,R.L., and Rafii,S. (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 663-668.

Moller,S., Becker,U., Schifter,S., Abrahamsen,J., and Henriksen,J.H. (1996a). Effect of oxygen inhalation on systemic, central, and splanchnic haemodynamics in cirrhosis. *J Hepatol.* 25, 316-328.

- Moller,S., Bendtsen,F., Schifter,S., and Henriksen,J.H. (1996b). Relation of calcitonin gene-related peptide to systemic vasodilatation and central hypovolaemia in cirrhosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 928-933.
- Moller,S. and Henriksen,J.H. (1999). The systemic circulation in cirrhosis. In *Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment.*, V.Arroyo, P.Gines, Rodes J, and R.W.Schrier, eds. Blackwell science Inc).
- Moller,S., Hillingso,J., Christensen,E., and Henriksen,J.H. (1998). Arterial hypoxaemia in cirrhosis: fact or fiction? *Gut* 42, 868-874.
- Moody,T.W., Miller,M.J., Martinez,A., Unsworth,E., and Cuttitta,F. (1997). Adrenomedullin binds with high affinity, elevates cyclic AMP, and stimulates c-fos mRNA in C6 glioma cells. *Peptides* 18, 1111-1115.
- Morales-Ruiz,M., Fulton,D., Sowa,G., Languino,L.R., Fujio,Y., Walsh,K., and Sessa,W.C. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ. Res.* 86, 892-896.
- Morales-Ruiz,M., Jimenez,W., Perez-Sala,D., Ros,J., Leivas,A., Lamas,S., Rivera,F., and Arroyo,V. (1996). Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 24, 1481-1486.
- Moreau,R., Lee,S.S., Soupison,T., Roche-Sicot,J., and Sicot,C. (1988). Abnormal tissue oxygenation in patients with cirrhosis and liver failure. *J Hepatol.* 7, 98-105.
- Morris,S.M., Jr. and Billiar,T.R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J Physiol* 266, E829-E839.
- Mukhopadhyay,D., Tsiokas,L., and Sukhatme,V.P. (1995). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.* 55, 6161-6165.
- Mukutmoni,M., Hubbard,N.E., and Erickson,K.L. (2001). Prostaglandin E(2) modulation of vascular endothelial growth factor production in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 123-131.
- Muller,Y.A., Christinger,H.W., Keyt,B.A., and de Vos,A.M. (1997). The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure.* 5, 1325-1338.
- Murakami,Y., Hattori,Y., Taniyama,M., Kitamura,K., and Kasai,K. (1998). Adrenomedullin regulation by thyroid hormone in the rat. *Life Sci.* 63, L337-L342.
- Murohara,T., Horowitz,J.R., Silver,M., Tsurumi,Y., Chen,D., Sullivan,A., and Isner,J.M. (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.
- Nagata N, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Tanaka N, Eto T, and Takasaki M (1998). Dissociation of adrenomedullin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in pregnant and non-pregnant women. *Eur J Endocrinol* 611-614.
- Nagy,J.A., Mase,E.M., Herzberg,K.T., Meyers,M.S., Yeo,K.T., Yeo,T.K., Sioussat,T.M., and Dvorak,H.F. (1995). Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res.* 55, 360-368.
- Nagy,J.A., Vasile,E., Feng,D., Sundberg,C., Brown,L.F., Detmar,M.J., Lawitts,J.A., Benjamin,L., Tan,X., Manseau,E.J., Dvorak,A.M., and Dvorak,H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.* 196, 1497-1506.

- Nakamura, M., Yoshida, H., Makita, S., Arakawa, N., Niinuma, H., and Hiramori, K. (1997). Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 95, 1214-1221.
- Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Murakami, H., Sasano, H., Shirato, K., and Shibahara, S. (1999a). Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin. Sci. (Lond)* 97, 247-251.
- Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Shirato, K., and Shibahara, S. (1998). Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 514-517.
- Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Shirato, K., and Shibahara, S. (1999b). Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured human coronary artery endothelial cells. *Peptides* 20, 769-772.
- Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Yanai, M., Sasaki, H., Shirato, K., and Shibahara, S. (1999c). Production and secretion of adrenomedullin in cultured human alveolar macrophages. *Peptides* 20, 1123-1125.
- Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E.A., Wu, T., Couffinhal, T., Varticovski, L., and Isner, J.M. (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol. Chem.* 270, 31189-31195.
- Nauck, M., Karakiulakis, G., Perruchoud, A.P., Papakonstantinou, E., and Roth, M. (1998). Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 341, 309-315.
- Naug, H.L., Browning, J., Gole, G.A., and Gobe, G. (2000). Vitreal macrophages express vascular endothelial growth factor in oxygen-induced retinopathy. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 28, 48-52.
- Navasa, M., Follo, A., Filella, X., Jimenez, W., Francitorra, A., Planas, R., Rimola, A., Arroyo, V., and Rodes, J. (1998). Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 27, 1227-1232.
- Neal CR and Michel, C. C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) increases permeability by inducing openings through endothelial cells. *Int.J.Microcirculation* 17, 198. 1997.  
Ref Type: Generic
- Neal CR and Michel, C.C. (1998a). Differing effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on the ultrastructure of mesenteric microvessels of frog and rat. *J. Physiol* 506, 24.
- Neal CR and Michel, C.C. (1998b). Ultrastructural changes in microvascular endothelium associated with increased permeability. *J. Vasc. Res.* 35, 388.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovich, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.
- Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 13-19.
- Nguyen, S.V. and Claycomb, W.C. (1999). Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 382-386.

- Niederberger, M., Martin, P.Y., Gines, P., Morris, K., Tsai, P., Xu, D.L., McMurtry, I., and Schrier, R.W. (1995). Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 109, 1624-1630.
- Nishimatsu, H., Suzuki, E., Nagata, D., Moriyama, N., Satonaka, H., Walsh, K., Sata, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Goto, A., Kitamura, T., and Hirata, Y. (2001). Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ. Res.* 89, 63-70.
- Nishimori, T., Tsujino, M., Sato, K., Imai, T., Marumo, F., and Hirata, Y. (1997). Dexamethasone-induced up-regulation of adrenomedullin and atrial natriuretic peptide genes in cultured rat ventricular myocytes. *J Mol. Cell Cardiol.* 29, 2125-2130.
- Noiri, E., Hu, Y., Bahou, W.F., Keese, C.R., Giaever, I., and Goligorsky, M.S. (1997). Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1747-1752.
- Oberg-Welsh, C., Sandler, S., Andersson, A., and Welsh, M. (1997). Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 126, 125-132.
- Oehler, M.K., Hague, S., Rees, M.C., and Bicknell, R. (2002). Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene* 21, 2815-2821.
- Ogita, T., Hashimoto, E., Yamasaki, M., Nakaoka, T., Matsuoka, R., Kira, Y., and Fujita, T. (2001). Hypoxic induction of adrenomedullin in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Hypertens.* 19, 603-608.
- Okada, F., Rak, J.W., Croix, B.S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R.S. (1998). Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3609-3614.
- Owji, A.A., Smith, D.M., Coppock, H.A., Morgan, D.G., Bhogal, R., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (1995). An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 136, 2127-2134.
- Ozawa, K., Kondo, T., Hori, O., Kitao, Y., Stern, D.M., Eisenmenger, W., Ogawa, S., and Ohshima, T. (2001). Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin. Invest* 108, 41-50.
- Pal, S., Datta, K., and Mukhopadhyay, D. (2001). Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res.* 61, 6952-6957.
- Paleolog, E. (1997). Target effector role of vascular endothelium in the inflammatory response: insights from the clinical trial of anti-TNF alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Mol. Pathol.* 50, 225-233.
- Parkes, D.G. and May, C.N. (1995). ACTH-suppressive and vasodilator actions of adrenomedullin in conscious sheep. *J Neuroendocrinol.* 7, 923-929.
- Parkes, D.G. and May, C.N. (1997). Direct cardiac and vascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Br. J Pharmacol.* 120, 1179-1185.
- Pedram, A., Razandi, M., and Levin, E.R. (1998). Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 273, 26722-26728.

- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *181*, 902-906.
- Perez, d.P., Pizcueta, P., Engel, P., and Bosch, J. (2000). Enhanced monocyte activation and hepatotoxicity in response to endotoxin in portal hypertension. *J Hepatol.* *32*, 25-31.
- Perez-Paramo MP, Muñoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, and Ortiz-Berrocal J (2000). Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* *31*, 43-48.
- Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpana, A., Ferrara, N., Saksela, O., and Alitalo, K. (1994). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 6271-6274.
- Peterson, T.C. and Isbrucker, R.A. (1992). Fibroproliferation in liver disease: role of monocyte factors. *Hepatology* *15*, 191-197.
- Pinzani, M., Milani, S., De Franco, R., Grappone, C., Caligiuri, A., Gentilini, A., Tosti-Guerra, C., Maggi, M., Failli, P., Ruocco, C., and Gentilini, P. (1996). Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* *110*, 534-548.
- Pizcueta, P., Pique, J.M., Fernandez, M., Bosch, J., Rodes, J., Whittle, B.J., and Moncada, S. (1992). Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* *103*, 1909-1915.
- Plouet, J. and Moukadiri, H. (1990). Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *265*, 22071-22074.
- Plouet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* *8*, 3801-3806.
- Pocock, T.M. and Bates, D.O. (2001). In vivo mechanisms of vascular endothelial growth factor-mediated increased hydraulic conductivity of *Rana* capillaries. *J. Physiol* *534*, 479-488.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E., and Neufeld, G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol. Chem.* *272*, 7151-7158.
- Polverini, P. (1997). Role of macrophage in angiogenesis-dependent diseases. In *Regulation of angiogenesis*, I. Goldberg and E. Rosen, eds. (Basilea: Birkhausen Verlag), pp. 11-28.
- Poyner, D.R., Sexton, P.M., Marshall, I., Smith, D.M., Quirion, R., Born, W., Muff, R., Fischer, J.A., and Foord, S.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* *54*, 233-246.
- Prytz, H. and Bjorneboe, M. (1973). Hyperglobulinaemia in liver disease. *Lancet* *2*, 150-151.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., and Ratcliffe, P.J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J. Biol. Chem.* *272*, 11205-11214.
- Pugh, R.N., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., and Williams, R. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br. J Surg.* *60*, 646-649.
- Rabbany, S.Y., Heissig, B., Hattori, K., and Rafii, S. (2003). Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol. Med.* *9*, 109-117.

- Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R.S. (1995). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4575-4580.
- Ramos, M.A., Kuzuya, M., Esaki, T., Miura, S., Satake, S., Asai, T., Kanda, S., Hayashi, T., and Iguchi, A. (1998). Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1188-1196.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-32637.
- Rimola, A. and Navasa, M. (1999). Infections in liver disease. In *Oxford textbook of clinical hepatology*, Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzetto M, and J.Rodes, eds. (Oxford: Oxford Medical Publications), pp. 1861-1874.
- Rimola, A., Soto, R., Bory, F., Arroyo, V., Piera, C., and Rodes, J. (1984). Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 4, 53-58.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 6), 2369-2379.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E. (1997). Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57, 765-772.
- Rockey, D.C. (2003). Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 37, 4-12.
- Rockey, D.C. and Weisiger, R.A. (1996). Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 24, 233-240.
- Rodes, J., Bosch, J., and Arroyo, V. (1975). Clinical types and drug therapy of renal impairment in cirrhosis. *Postgrad. Med. J.* 51, 492-497.
- Rodriguez-Roisin, R., Agusti, A.G., and Roca, J. (1992). The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax* 47, 897-902.
- Rodriguez-Roisin, R. and Roca, J. (1997). Hepatopulmonary syndrome: the paradigm of liver-induced hypoxaemia. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 11, 387-406.
- Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H., Waltenberger, J., Yayon, A., and Weich, H.A. (1998). Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp. Cell Res.* 241, 161-170.
- Rolla, G., Brussino, L., Colagrande, P., Dutto, L., Polizzi, S., Scappaticci, E., Bergerone, S., Morello, M., Marzano, A., Martinasso, G., Salizzoni, M., and Bucca, C. (1997). Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology* 26, 842-847.
- Romppanen, H., Marttila, M., Magga, J., Vuolteenaho, O., Kinnunen, P., Szokodi, I., and Ruskoaho, H. (1997). Adrenomedullin gene expression in the rat heart is stimulated by acute pressure overload: blunted effect in experimental hypertension. *Endocrinology* 138, 2636-2639.
- Rong, P.B., Kalsi, J., and Hodgson, H.J. (1984). Hyperglobulinaemia in chronic liver disease: relationships between in vitro immunoglobulin synthesis, short lived suppressor cell activity and serum immunoglobulin levels. *Clin. Exp. Immunol.* 55, 546-552.
- Ros, J., Claria, J., To-Figueras, J., Planaguma, A., Cejudo-Martin, P., Fernandez-Varo, G., Martin-Ruiz, R., Arroyo, V., Rivera, F., Rodes, J., and Jimenez, W. (2002). Endogenous cannabinoids: a

new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 122, 85-93.

Rosmorduc, O, Wendum, D, Galy, B, Huez, I, Prat, H, de Saint Maur, PP, and Poupon, R. Expression of angiogenic factors bFGF and VEGF in human cirrhosis and hepatocarcinoma. *Hepatology* 24. 1996.  
Ref Type: Abstract

Rosmorduc, O., Wendum, D., Corpechot, C., Galy, B., Sebbagh, N., Raleigh, J., Housset, C., and Poupon, R. (1999). Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am. J Pathol.* 155, 1065-1073.

Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 10661-10672.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169-2177.

Runyon, B.A. (1988). Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 8, 632-635.

Runyon, B.A., Squier, S., and Borzio, M. (1994). Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 21, 792-796.

Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H.A., Kohno, K., and Kuwano, M. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol. Chem.* 271, 28220-28228.

Sakaguchi, I., Ikeda, N., Nakayama, M., Kato, Y., Yano, I., and Kaneda, K. (2000). Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages. *Infect. Immun.* 68, 2043-2052.

Sakai, K., Saito, K., and Ishizuka, N. (1998). Adrenomedullin synergistically interacts with endogenous vasodilators in rats: a possible role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol.* 359, 151-159.

Sakata, J., Asada, Y., Shimokubo, T., Kitani, M., Inatsu, H., Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Sumiyoshi, A., and Eto, T. (1998). Adrenomedullin in the gastrointestinal tract. Distribution and gene expression in rat and augmented gastric adrenomedullin after fasting. *J Gastroenterol.* 33, 828-834.

Sakuta, T., Matsushita, K., Yamaguchi, N., Oyama, T., Motani, R., Koga, T., Nagaoka, S., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H., and Torii, M. (2001). Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. *J Med Microbiol.* 50, 233-237.

Salceda, S. and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647.

Salven, P., Anttonen, K., Repo, H., Joensuu, H., and Orpana, A. (2001). Endotoxins induce and interferon alpha suppresses vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human peripheral blood mononuclear cells. *FASEB J.* 15, 1318-1320.

- Salvesen, H.B. and Akslen, L.A. (1999). Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer* 84, 538-543.
- Samson, W.K. (1999). Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu. Rev. Physiol* 61, 363-389.
- Samson, W.K., Murphy, T., and Schell, D.A. (1995). A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* 136, 2349-2352.
- Sata, M., Kakoki, M., Nagata, D., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Aoyagi, T., Sugiura, S., Kojima, H., Nagano, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omata, M., Nagai, R., and Hirata, Y. (2000). Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 36, 83-88.
- Sato, K., Yamazaki, K., Shizume, K., Kanaji, Y., Obara, T., Ohsumi, K., Demura, H., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. (1995). Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and *flt* mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J. Clin. Invest* 96, 1295-1302.
- Sato, T., Asanuma, Y., Masaki, Y., Sato, Y., Hatakeyama, Y., Kusano, T., and Koyama, K. (1996). Changes in tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 beta production following liver surgery on cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 43, 1148-1153.
- Schafer, C., Schips, I., Landig, J., Bode, J.C., and Bode, C. (1995). Tumor-necrosis-factor and interleukin-6 response of peripheral blood monocytes to low concentrations of lipopolysaccharide in patients with alcoholic liver disease. *Z. Gastroenterol.* 33, 503-508.
- Schrier, R.W., Arroyo, V., Bernardi, M., Epstein, M., Henriksen, J.H., and Rodes, J. (1988). Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8, 1151-1157.
- Segawa, K., Minami, K., Sata, T., Kuroiwa, A., and Shigematsu, A. (1996). Inhibitory effect of adrenomedullin on rat mesangial cell mitogenesis. *Nephron* 74, 577-579.
- Semenza, G.L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl. Physiol* 88, 1474-1480.
- Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12, 5447-5454.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *Flk-1*-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shen, B.Q., Lee, D.Y., and Zioncheck, T.F. (1999). Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/*Flk-1* receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 33057-33063.
- Sherer, D.M., Eliakim, R., and Abulafia, O. (2000). The role of angiogenesis in the accumulation of peritoneal fluid in benign conditions and the development of malignant ascites in the female. *Gynecol. Obstet. Invest* 50, 217-224.

- Shichiri, M., Kato, H., Doi, M., Marumo, F., and Hirata, Y. (1999). Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis. *Mol. Endocrinol* 13, 1353-1363.
- Shifren, J.L., Mesiano, S., Taylor, R.N., Ferrara, N., and Jaffe, R.B. (1998). Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 1342-1347.
- Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1995). Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol. Chem.* 270, 4412-4417.
- Shimokubo, T., Sakata, J., Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., and Eto, T. (1996). Adrenomedullin: changes in circulating and cardiac tissue concentration in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet. *Clin. Exp. Hypertens.* 18, 949-961.
- Shimosawa, T., Ito, Y., Ando, K., Kitamura, K., Kangawa, K., and Fujita, T. (1995). Proadrenomedullin NH(2)-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits norepinephrine overflow from nerve endings. *J. Clin. Invest* 96, 1672-1676.
- Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R., and Ware, J.A. (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C $\delta$  activity. *Circ. Res.* 85, 247-256.
- Sieber, C.C., Lopez-Talavera, J.C., and Groszmann, R.J. (1993). Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 104, 1750-1754.
- Siemeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G., and Marme, D. (1996). Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 56, 2299-2301.
- Six, I., Kureishi, Y., Luo, Z., and Walsh, K. (2002). Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS Lett.* 532, 67-69.
- Smyth, A.P., Rook, S.L., Detmar, M., and Robinson, G.S. (1997). Antisense oligonucleotides inhibit vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 108, 523-526.
- Soh, E.Y., Sobhi, S.A., Wong, M.G., Meng, Y.G., Siperstein, A.E., Clark, O.H., and Duh, Q.Y. (1996). Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 120, 944-947.
- Soker, S., Kaefer, M., Johnson, M., Klagsbrun, M., Atala, A., and Freeman, M.R. (2001). Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. *Am. J. Pathol.* 159, 651-659.
- Sondell, M., Lundborg, G., and Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 19, 5731-5740.
- Spyridopoulos, I., Luedemann, C., Chen, D., Kearney, M., Chen, D., Murohara, T., Principe, N., Isner, J.M., and Losordo, D.W. (2002). Divergence of angiogenic and vascular permeability signaling by VEGF: inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, NO-dependent vascular permeability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 901-906.
- Stavri, G.T., Zachary, I.C., Baskerville, P.A., Martin, J.F., and Erusalimsky, J.D. (1995). Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92, 11-14.

- Sugishita, Y., Shimizu, T., Yao, A., Kinugawa, K., Nojiri, T., Harada, K., Matsui, H., Nagai, R., and Takahashi, T. (2000). Lipopolysaccharide augments expression and secretion of vascular endothelial growth factor in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 657-662.
- Sugo, S., Minamino, N., Kangawa, K., Miyamoto, K., Kitamura, K., Sakata, J., Eto, T., and Matsuo, H. (1994a). Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 1160-1166.
- Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T., and Matsuo, H. (1994b). Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *203*, 719-726.
- Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T., and Matsuo, H. (1995). Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *207*, 25-32.
- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., and Sorg, C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc. Biol.* *55*, 410-422.
- Sutter, C.H., Laughner, E., and Semenza, G.L. (2000). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 4748-4753.
- Swift, M.E., Kleinman, H.K., and DiPietro, L.A. (1999). Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* *79*, 1479-1487.
- Taichman, N.S., Young, S., Cruchley, A.T., Taylor, P., and Paleolog, E. (1997). Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc. Biol.* *62*, 397-400.
- Takahashi K, Satoh F, Sone M, Totsune K, Arihara Z, Noshiro T, Mouri T, and Murakami O (1998). Expression of adrenomedullin mRNA in adrenocortical tumors and secretion of adrenomedullin by cultured adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 1719-1724.
- Takahashi, K., Satoh, F., Hara, E., Sone, M., Murakami, O., Kayama, T., Yoshimoto, T., and Shibahara, S. (1997). Production and secretion of adrenomedullin from glial cell tumors and its effects on cAMP production. *Peptides* *18*, 1117-1124.
- Takahashi, T., Shirasawa, T., Miyake, K., Yahagi, Y., Maruyama, N., Kasahara, N., Kawamura, T., Matsumura, O., Mitarai, T., and Sakai, O. (1995). Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *209*, 218-226.
- Takahashi, T., Ueno, H., and Shibuya, M. (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* *18*, 2221-2230.
- Takano, K., Yamashita, N., and Fujita, T. (1996). Proadrenomedullin NH<sub>2</sub>-terminal 20 peptide inhibits the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel current through a pertussis toxin-sensitive G protein in rat pheochromocytoma-derived PC 12 cells. *J. Clin. Invest* *98*, 14-17.
- Tanaka, M., Kitamura, K., Ishizaka, Y., Ishiyama, Y., Kato, J., Kangawa, K., and Eto, T. (1995). Plasma adrenomedullin in various diseases and exercise-induced change in adrenomedullin in healthy subjects. *Intern. Med.* *34*, 728-733.
- Tanaka, T., Kanai, H., Sekiguchi, K., Aihara, Y., Yokoyama, T., Arai, M., Kanda, T., Nagai, R., and Kurabayashi, M. (2000). Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol. Cell Cardiol.* *32*, 1955-1967.

- Taylor, M.M. and Samson, W.K. (2002). Adrenomedullin and the integrative physiology of fluid and electrolyte balance. *Microsc. Res. Tech.* 57, 105-109.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579-1586.
- Thakker, G.D., Hajjar, D.P., Muller, W.A., and Rosengart, T.K. (1999). The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 10002-10007.
- Thrash-Bingham, C.A. and Tartof, K.D. (1999). aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 143-151.
- Tian, H., McKnight, S.L., and Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11, 72-82.
- Tietge, U.J., Bahr, M.J., Manns, M.P., and Boker, K.H. (2001). Decreased splanchnic oxygen uptake and increased systemic oxygen uptake in cirrhosis are normalized after liver transplantation. *Liver Transpl.* 7, 1015-1022.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol. Chem.* 266, 11947-11954.
- Tito, L., Rimola, A., Gines, P., Llach, J., Arroyo, V., and Rodes, J. (1988). Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 8, 27-31.
- Toepfer, M., Hartmann, G., Schlosshauer, M., Hautmann, H., Tschop, M., Fischer, R., and Huber, R.M. (1998). Adrenomedullin: a player at high altitude? *Chest* 113, 1428.
- Toledo, C., Salmeron, J.M., Rimola, A., Navasa, M., Arroyo, V., Llach, J., Gines, A., Gines, P., and Rodes, J. (1993). Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 17, 251-257.
- Tonnesen, M., Feng, X., and Clark, R. (2000). Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5, 40-46.
- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S.D., LaCasse, E., Korneluk, R.G., and Kerbel, R.S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 781-788.
- Triger, D.R. and Wright, R. (1973). Hyperglobulinaemia in liver disease. *Lancet* 1, 1494-1496.
- Tsopanoglou, N.E. and Maragoudakis, M.E. (1999). On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 23969-23976.
- Udono, T., Takahashi, K., Nakayama, M., Yoshinoya, A., Totsune, K., Murakami, O., Durlu, Y.K., Tamai, M., and Shibahara, S. (2001). Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1080-1086.
- Unaue, E. (1993). Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In *Fundamental Immunology*, W.Paul, ed. (New York: Raven), pp. 111-144.

Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A., and Amento, E.P. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell Physiol* **153**, 557-562.

Unemori, E.N., Lewis, M., Constant, J., Arnold, G., Grove, B.H., Normand, J., Deshpande, U., Salles, A., Pickford, L.B., Erikson, M.E., Hunt, T.K., and Huang, X. (2000). Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. *Wound. Repair Regen.* **8**, 361-370.

Vachieri, F., Moreau, R., Hadengue, A., Gadano, A., Soupison, T., Valla, D., and Lebrec, D. (1997). Hypoxemia in patients with cirrhosis: relationship with liver failure and hemodynamic alterations. *J Hepatol.* **27**, 492-495.

Vaisman, N., Gospodarowicz, D., and Neufeld, G. (1990). Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 19461-19466.

van Bruggen, N., Thibodeaux, H., Palmer, J.T., Lee, W.P., Fu, L., Cairns, B., Tumas, D., Gerlai, R., Williams, S.P., van Lookeren, C.M., and Ferrara, N. (1999). VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest* **104**, 1613-1620.

van der Zee R., Murohara, T., Luo, Z., Zollmann, F., Passeri, J., Lekutat, C., and Isner, J.M. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* **95**, 1030-1037.

Vesely, D.L., Blankenship, M., Douglass, M.A., McCormick, M.T., Rodriguez-Paz, G., and Schocken, D.D. (1996). Atrial natriuretic peptide increases adrenomedullin in the circulation of healthy humans. *Life Sci.* **59**, 243-254.

Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **93**, 1493-1495.

Volpes, R., van den Oord, J.J., and Desmet, V.J. (1992). Can hepatocytes serve as 'activated' immunomodulating cells in the immune response? *J Hepatol.* **16**, 228-240.

Vorobioff, J., Bredfeldt, J.E., and Groszmann, R.J. (1984). Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* **87**, 1120-1126.

Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Ferrara, N., and Donner, D.B. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J. Biol. Chem.* **271**, 29483-29488.

Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A., and Ferrara, N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J. Clin. Invest* **95**, 1789-1797.

Wellner, M., Maasch, C., Kupprion, C., Lindschau, C., Luft, F.C., and Haller, H. (1999). The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 178-185.

Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* **16**, 1151-1162.

Wheeler-Jones, C., Abu-Ghazaleh, R., Cospedal, R., Houlston, R.A., Martin, J., and Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* **420**, 28-32.

- Wiesmann,C., Fuh,G., Christinger,H.W., Eigenbrot,C., Wells,J.A., and de Vos,A.M. (1997). Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91, 695-704.
- Wijffels,J.F., Hendrickx,R.J., Steenbergen,J.J., Eestermans,I.L., and Beelen,R.H. (1992). Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. *Res. Immunol.* 143, 401-409.
- Williams,B., Baker,A.Q., Gallacher,B., and Lodwick,D. (1995). Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25, 913-917.
- Withers,D.J., Coppock,H.A., Seufferlein,T., Smith,D.M., Bloom,S.R., and Rozengurt,E. (1996). Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 378, 83-87.
- Wojta,J., Kaun,C., Breuss,J.M., Koshelnick,Y., Beckmann,R., Hattey,E., Mildner,M., Weninger,W., Nakamura,T., Tschachler,E., and Binder,B.R. (1999). Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. *Lab Invest* 79, 427-438.
- Wu,H.M., Huang,Q., Yuan,Y., and Granger,H.J. (1996). VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am. J. Physiol* 271, H2735-H2739.
- Wu,L.W., Mayo,L.D., Dunbar,J.D., Kessler,K.M., Baerwald,M.R., Jaffe,E.A., Wang,D., Warren,R.S., and Donner,D.B. (2000). Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5096-5103.
- Wu,R., Zhou,M., and Wang,P. (2003). Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 downregulate TNF- $\alpha$  in macrophage cell line and rat Kupffer cells. *Regul. Pept.* 112, 19-26.
- Xia,P., Aiello,L.P., Ishii,H., Jiang,Z.Y., Park,D.J., Robinson,G.S., Takagi,H., Newsome,W.P., Jirousek,M.R., and King,G.L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J. Clin. Invest* 98, 2018-2026.
- Xiong,M., Elson,G., Legarda,D., and Leibovich,S.J. (1998). Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am. J. Pathol.* 153, 587-598.
- Yamaguchi,T., Baba,K., Doi,Y., and Yano,K. (1995). Effect of adrenomedullin on aldosterone secretion by dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells. *Life Sci.* 56, 379-387.
- Yang,R., Thomas,G.R., Bunting,S., Ko,A., Ferrara,N., Keyt,B., Ross,J., and Jin,H. (1996). Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27, 838-844.
- Yang,S., Zhou,M., Chaudry,I.H., and Wang,P. (2001). The role of lipopolysaccharide in stimulating adrenomedullin production during polymicrobial sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* 1537, 167-174.
- Yeung,V.T., Ho,S.K., Nicholls,M.G., and Cockram,C.S. (1996). Adrenomedullin, a novel vasoactive hormone, binds to mouse astrocytes and stimulates cyclic AMP production. *J. Neurosci. Res.* 46, 330-335.
- Zachary,I. and Gliki,G. (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res.* 49, 568-581.

Zaks-Zilberman,M., Salkowski,C.A., Elsasser,T., Cuttitta,F., and Vogel,S.N. (1998). Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine macrophages. *Infect. Immun.* *66*, 4669-4675.

Zhang,L., Yu,D., Hu,M., Xiong,S., Lang,A., Ellis,L.M., and Pollock,R.E. (2000). Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* *60*, 3655-3661.

Zhang,M., Luo,B., Chen,S.J., Abrams,G.A., and Fallon,M.B. (1999). Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am. J Physiol* *277*, G944-G952.

Zhao,Y., Hague,S., Manek,S., Zhang,L., Bicknell,R., and Rees,M.C. (1998). PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium. *Oncogene* *16*, 409-415.

Zudaire,E., Cuttitta,F., and Martinez,A. (2003). Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul. Pept.* *112*, 121-130.