



# Mecanismes involucrats en la regulació del to vascular hepàtic en la cirrosi: Paper dels antioxidants en la biodisponibilitat de l'òxid nítric

Marta Diví Oriol

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**MECANISMES INVOLUCRATS  
EN LA REGULACIÓ DEL TO  
VASCULAR HEPÀTIC EN LA  
CIRROSI:  
  
PAPER DELS ANTIOXIDANTS  
EN LA BIODISPONIBILITAT DE  
L'ÒXID NÍTRIC**

**Tesi presentada per**

**Marta Diví Oriol**

**Per optar al grau de**

**Doctor per la Universitat de Barcelona**

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

**Tesi realitzada a la Unitat d' Hemodinàmica Hepàtica de l'Institut  
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) – Hospital Clínic  
de Barcelona – Edifici CEK.**

**Barcelona, Setembre 2013**



*A la meva família*  
*(Pares, Avi, Tiet i Juan)*



*"La nostra recompensa es troba en l'esforç i no en el resultat.*

*Un esforç total és una victòria completa".*

*Mahatma Gandhi*





## ÍNDEX

---

Informe dels directors de tesi	p. 3
Agraïments	p. 5
Abreviacions	p.11

### **INTRODUCCIÓ**

1. Bases fisiopatològiques de la hipertensió portal	p.17
1.1 Resistència vascular intrahepàtica	p.18
1.1.1.- Component estructural de la resistència vascular intrahepàtica.	
1.1.2.- Component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica.	
1.1.3.- El flux portal	
1.2. Circulació hiperdinàmica	p.26
2. Estrés oxidatiu	p.27
2.1 Estrés oxidatiu i malalties hepàtiques	p.29
2.2 Antioxidants	p.30
2.2.1 Antioxidants enzimàtics	
2.2.2 Antioxidants no enzimàtics	
2.2.3 Tractament amb antioxidants	

### **JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS**

Justificació i objectius	p.37
--------------------------	------

Estudi 1: Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces intrahepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. p.41

Estudi 2: Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. p.43

# ÍNDIX

---

## **CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS**

Estudi 1 p.47

Estudi 2 p.55

## **RESUM DE RESULTATS**

Estudi 1 p.67

Estudi 2 p.69

**DISCUSSIÓ DELS RESULTATS** p.71

**CONCLUSIONS** p.79

**EPÍLEG** p.83

**REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES** p.87

## **INFORME DELS DIRECTORS DE TESI**

---

Barcelona, 26 de Setembre de 2013

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

### **CERTIFIQUEN:**

Que la tesi doctoral ***MECANISMES INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DEL TO VASCULAR HEPÀTIC EN LA CIRROSI: PAPER DELS ANTIOXIDANTS EN LA BIODISPONIBILITAT DE L'ÒXID NÍTRIC***, presentada per Marta Diví Oriol per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona s'ha realitzat sota la nostra direcció i compleix tots els requisits necessaris per ser defensada davant el Tribunal d'avaluació corresponent.

**Joan Carles García-Pagán**

**Jaume Bosch i Genover**



# AGRAÏMENTS



## AGRAÏMENTS

---

Sincerament és molt difícil descriure en unes poques línies l'agraïment infinit per tots aquells que d'una manera o altre, heu contribuït al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. És complicat nombrar-vos a tots, ja que han passat molts anys i molta gent, per aquest motiu demano disculpes anticipades si algú no s'hi troba reflexat.

Primer de tot et voldria donar les gracies a tu **Jaume** per deixar-me formar part d'aquesta gran família hemodinàmica, per la teva comprensió, interès i ajuda en els moments personals difícils però sobretot, per confiar amb mi des del primer dia i ser el meu director de tesi.

A tu **Joan Carles** per la infinita paciència que has tingut amb mi, per trobar sempre un forat en la teva atapeïda agenda, per la teva comprensió també en els moments personals difícils però sobretot, per demostrar que darrera d'una eminència hi ha una gran persona. Gracies per tot.

A tu **Jordi** per estar sempre disposat a donar-me suport quan l'he necessitat, per acollir-me a casa teva a Boston i ensenyar-me les meravelles de Harvard i per transmetre continuament la teva passió per la ciència; et desitjo el millor tant en l'àmbit professional com en el personal.

A tu **Aina** pel teu ajut durant el temps que no he pogut estar al peu del canó.

A tu **Héctor** per ensenyar-me tot el que sé de les rates, per guiar-me i per ser tant bon company tot i que algun cop ens haguem indignat plegats 😊 però sobretot, per tenir un bon cor. Saps prou bé que sense tu aquesta tesi no hauria tingut fi per això et dono un GRÀCIES ben gran!!!.

A l'**Ester**, la **Montse** i el **Marcos** per ser durant molt de temps: els "Last monkeys". Gràcies a tots tres pel vostre ajut científic, moral i pels bons moments viscuts en farres nocturnes i congressos. A tu **Montse**, et vull donar especialment les gràcies per tot el que has fet per mi quan jo no hi podia ser al 100% i per tenir-me informada en tot moment.

## AGRAÏMENTS

---

A nivell personal, **Ester** i **Montse** m'heu donat el bressol necessari per seguir endavant en aquesta etapa. Podem dir que la tesi, entre moltes altres coses, ha fet néixer una gran amistat que ens ha portat a compartir moments molt importants de les nostres vides, però el millor de tot és que encara en queden molts per viure plegades. Un petonàs tresines.

A tu **Eugenio** per ser tant bon company i millor persona, per les nostres xerrades filosòfiques del tromboxà i el Resveratrol i pel teu suport científic i moral sempre. Et desitjo el millor en aquesta vida!

Als que ens hem trobat pel camí: **Giusi, Lucia, Bàrbara, Vali, Annalisa, Marco, Marc, Javi, Laura, Mercedes** (segur que em deixo algú...) gràcies a TOTS pel vostre ajut científic i pels bons moments generats al laboratori.

A la **nova generació d' hemodinàmics** ànims amb els vostres projectes! Esteu un grup magnífic i segur que tot sortirà bé.

A les **Super Labmas**, les **noies citòmiques** i els **nois de manteniment**, gràcies a tots per la vostra comprensió, per escoltar les meves "cabories" per fer-me més fàcil el dia a dia i motivar-me en els moments baixos. Amb companys així de feina dona molt de gust treballar, sou el millor coaching que es pot tenir!!!.

Gràcies en general a tots **els investigadors de la 2<sup>a</sup> planta del CEK** (els que hi són i els que hi han passat), per interessar-vos per la tesi que està fent la vostra lab manager i ser comprensius en tot moment. No és gens fàcil compaginar feina i tesi però amb gent com vosaltres, sincerament és del tot possible. Ànims a tots amb els vostres projectes. Un visca per la 2<sup>a</sup> planta del CEK!

A tu **Julen** per estar sempre aquí, per ser el químic que em resolia algun dubte amb un producte, per saber el que és escriure una tesi i animar-me a acabar-la perquè tot i la distància hem compartit molts moments i segur que en compartirem molts més.



## AGRAÏMENTS

---

A les colles d'amics de tota la vida: **Eva, Ricardo, Laurita, Nuria, Hector, Patri, Manolo, Rocío, Eval, Vero, Marc, Sonia, Xavi, Victor, Alicia, Grego, Sergio, Desi, Sebi, Seila i Edu** per interessar-vos sempre en com m'anaven els experiments tot i no tenir gaire clar el que feia amb les rates. Gràcies també per animar-me a no deixar-ho a mitges i a finalitzar aquesta etapa.

A la **Magda** pels seus massatges i energia que m'ha donat des del primer dia! Continuarem amb aquesta energia que encara queda molt camí per recórrer.

Al **Juan** per...TOT per aguantar-me en cada moment, aconsellar-me en compaginar tesi i vida, ser comprensiu, saber escoltar i perquè... si no s'estima això no es pot aguantar. Si hem aguantat una tesi...ho aguantem tot! Gracies amor t'estimo molt!

A tu **Ramonet** per estar sempre aquí. Per interessar-te pels meus experiments i facilitar-me sempre l'existència. Per no tenir mai un NO i per ser com ets.

A tu **Papa** que te'n vas anar quan tot just començava aquesta "aventura" i t'he trobat molt a faltar. A la teva manera també m'has ajudat, perquè sé que avui estaries molt orgullós de mi...així que siguis on siguis també et dono les gràcies.

A tu **Mama** t'ho dec tot...recolzament moral, empenta...no sé dir-ho en paraules sincerament però has estat un puntal molt fort perquè avui per fi podem dir que ho hem aconseguit. Com les formigues...però ja ho tenim!

I per tots aquells que no hi són però des d'un lloc o altre m'han donat les forces necessàries per arribar fins aquí. GRACIES!!!!!!.



# **ABREVIACIONES**



## ABREVIACIONS

---

AA	Àcid araquidònic
Ach	Acetilcolina
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de múscul llis
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CAT	Catalasa
CES	Cèl·lules endotelials sinusoïdals
HSC	Cèl·lules hepàtiques estrellades
CO	Monòxid de carboni
COX	Ciclooxigenasa
CuZnSOD	Coure-Zinc-Superòxid dismutase
ADMA	Dimetil arginina asimètrica
ecSOD	Extracel·lular superòxid dismutasa
eNOS	Sintasa de l'òxid nítric endotelial
GMPC	Monofosfat de la guanosina cíclic
GSH	Glutatió
GSH-PX	Glutatió peroxidasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peròxid d'hidrogen
iNOS	Sintasa de l'òxid nítric induïble
MDA	Malòdialdehid
MnSOD	Manganès-superòxid dismutasa
NADPH	Fosfat del dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
nNOS	Sintasa de l'òxid nítric neuronal
NOS	Sintasa de l'òxid nítric
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anió superòxid
OH <sup>-</sup>	Anió hidroxil
NO	Òxid nítric
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>

## ABREVIACIONS

---

PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKG	Proteïna cinasa G
ROS	Especies reactives d'oxigen
SOD	Superòxid dismutasa
STS	Estilbé sintasa
TGF-β	Factor de creixement transformant-β
TXA <sub>2</sub>	Tromboxà A <sub>2</sub>
TXAS	Tromboxà sintasa
XO	Xantina oxidasa

# **INTRODUCCIÓ**





## INTRODUCCIÓ

---

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

### 1. Bases fisiopatològiques de la hipertensió portal

Com en qualsevol sistema hidrodinàmic, la pressió portal ve determinada per la relació entre el flux sanguini portal i la resistència que s'oposa a aquest flux. D'acord amb la Llei d'Ohm, el gradient de pressió entre dos punts en un vas sanguini queda definit com:

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

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

## INTRODUCCIÓ

---

La resistència que s'oposa al flux sanguini s'entén millor quan els factors que influeixen en ella es relacionen mitjançant la llei de Poiseuille:

$$R = 8 n L / r^4$$

On **n** és el coeficient de viscositat de la sang, **r** el radi del vas i **L** la seva longitud. Atès que la longitud dels vasos normalment no es modifica i la viscositat de la sang es manté relativament constant, el factor determinant de la resistència vascular és el radi del vas. D'aquesta manera, una disminució del radi del vas pot provocar un augment important de la resistència vascular i, per tant, un augment del gradient de pressió portal.

Aquests fets han permès arribar a la conclusió que hi ha dos mecanismes bàsics en l'augment de la pressió portal: l'augment del flux sanguini i l'augment de la resistència vascular hepàtica. En la majoria dels casos el desenvolupament i manteniment de la malaltia és degut a una combinació d'ambdós mecanismes, és per això que s'han convertit en components claus d'estudi pel tractament de la hipertensió portal.

### **1.1 Resistència Vascular Intrahepàtica**

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

Inicialment es va considerar que l'elevada resistència vascular intrahepàtica era conseqüència, únicament, de la distorsió de l'arquitectura vascular del fetge cirròtic causada per la malaltia (fibrosi, nòduls de regeneració, trombosi intravascular...) (5, 6).

## INTRODUCCIÓ

---

Però a l'any 1985 Bathal i Grossmann van demostrar que una part d'aquest augment es podia modificar mitjançant fàrmacs (7). Actualment està completament acceptat que una part significativa de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi és modificable farmacològicament i es coneix com a "component dinàmic" el qual pot arribar a representar fins el 40% de la resistència vascular intrahepàtica total. Aquesta troballa s'ha evidenciat amb la utilització d'agents farmacològics que modulen el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica (8, 9). No obstant, recentment s'ha avançat en el coneixement de la fibrogènesi hepàtica, suggerint que el component fix de la resistència vascular intrahepàtica és també potencialment reversible (10-13).

### 1.1.1 Component estructural de la resistència vascular intrahepàtica

El component estructural de la resistència vascular intrahepàtica ve determinat principalment per les modificacions estructurals del parènquima hepàtic a causa de la fibrosi. La fibrosi és el resultat d'un procés de reparació tissular en resposta a un dany hepàtic crònic (14). Un dany agut, està associat a una resposta inflamatòria i una limitada producció de matriu extracel·lular que pot finalitzar amb una regeneració hepàtica de cèl·lules apoptòtiques o necròtiques. En canvi si el dany es perpetua, com és el cas de la cirrosi, la regeneració hepàtica no s'assoleix i els hepatòcits són substituïts progressivament per matriu extracel·lular formada principalment per col·lagen tipus I, III i IV, fibronectina, laminina, àcid hialurònic i proteoglicans (12).

### 1.1.2 Component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica

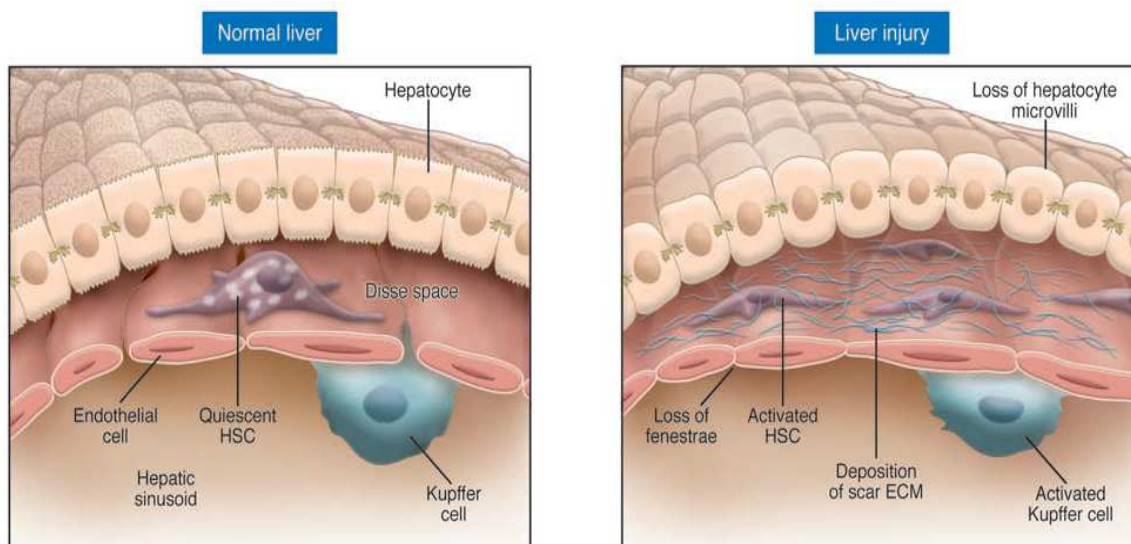
Amb l'objectiu de caracteritzar el component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica, diferents estudis han cercat quins son els elements contràctils intrahepàtics i, si en la cirrosi, existeixen anormalitats en la regulació dels mecanismes de contracció cel·lular.

## INTRODUCCIÓ

Fins l'actualitat s'han descrit diversos tipus de cèl·lules hepàtiques amb capacitat contràctil com els miofibroblasts portals, septals i de les vènules portals (15), però majoritàriament s'ha postulat que les principals cèl·lules involucrades en la regulació del to vascular hepàtic són les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC) (16).

*a) HSC responsables de l'augment de la resistència vascular intrahepàtica*

Les HSC també conegudes com a cèl·lules d'Ito o lipòcits representen aproximadament el 5% del total de les cèl·lules hepàtiques i són el principal magatzem de vitamina A de l'organisme. Es troben situades a l'espai de Disse (espai virtual entre les cèl·lules endotelials i les cèl·lules hepàtiques) i presenten extensions citoplasmàtiques que envolten els sinusoids, característica que permet regular el flux sinusoidal per contracció. En condicions normals les HSC secreten quimiocines inflamatòries, molècules d'adhesió que regulen la formació de la matriu extracel·lular i modulen l'activació leucocitària.



*Figura 1: Desenvolupament de l'activació de les HSC en el sinusoid hepàtic. ECM (matriu extracel·lular). Adaptada de Iredale JP, J Clin Invest. 2007.*

## INTRODUCCIÓ

---

En situacions de dany hepatocel·lular, les HSC adquireixen ràpidament un fenotip "activat" adquirint propietats profibrogèniques, proinflamatòries i proliferatives perpetuant-se en aquest estat i comportant-se com a miofibroblast (Figura 1) (16-18).

*b) Substàncies vasoactives, reguladores de l'increment de la resistència vascular intrahepàtica.*

Un ampli ventall de molècules amb capacitat vasomotora s'ha descrit com a moduladores de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi (19). Aquestes substàncies poden procedir de la circulació sistèmica (com l'angiotensina II o la vasopressina), poden originar-se a l'endoteli i actuar de forma paracrina (com l'òxid nítric (NO), la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) o l'endotelina) o poden tenir un origen neuronal (com la norepinefrina).

Independentment del seu origen, un fet ben conegut i característic de la cirrosi és el marcat desequilibri en la producció i concentració d'aquests mediadors vasoactius. En la circulació hepàtica, durant la cirrosi, es troben elevats nivells de substàncies que actuen com a vasoconstrictors (com l'endotelina o el prostanoïd derivat de la ciclooxigenasa 1 (COX-1): tromboxà A<sub>2</sub>) i reduïdes quantitats de substàncies que actuen com a vasodilatadors (com principalment l'NO) (20-23). A més, s'ha demostrat que els fetges cirròtics presenten una hiperresposta als estímuls vasoconstrictors i una hiporesposta als vasodilatadors (24-29), inclinant encara més la balança a favor de la contracció, actuant sobre elements contràctils, com les HSC del sinusoides hepàtic i, en conseqüència, sobre la resistència vascular intrahepàtica.

## INTRODUCCIÓ

---

### *Tromboxà A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)*

Aquesta molècula que consta de 20 àtoms de carboni és un metabòlit derivat de l'àcid araquidònic (AA) per acció dels enzims ciclooxigenasa (COX) i tromboxà sintasa (TXAS). Té un gran poder com agent vasoconstrictor que promou l'agregació plaquetària, la mitogènesi i està implicat en nombroses patologies cardiovasculars (30, 31). Els primers estudis que van involucrar el TXA<sub>2</sub> en la hipertensió portal varen demostrar, mitjançant diferents models experimentals de cirrosi (llogadura del conducte biliar i inhalació de CCl<sub>4</sub>), que els fetges de rates amb hipertensió portal sintetitzen majors quantitats de TXA<sub>2</sub>, a nivell basal i estimulant la circulació intrahepàtica amb un agonista α-1-adrenèrgic (metoxamina) (26) i a més, que aquest augment en la síntesi de TXA<sub>2</sub> s'acompanya d'un increment significatiu en la pressió portal (26, 32). Estudis posteriors van ampliar aquest coneixement demostrant que la modulació del to vascular hepàtic cirròtic per l'acció de prostanoids vasoconstrictors (principalment TXA<sub>2</sub>) era depenent de la isoforma 1 de la COX (COX-1) i, que les cèl·lules endotelials sinusoïdals (CES) podrien ser les responsables de la seva síntesi (33). Uns anys més tard, el nostre laboratori va demostrar que les CES jugaven un paper clau en la producció de prostanoids, principalment el TXA<sub>2</sub> (22). Més recentment, s'ha demostrat que l'enzim Tromboxà Sintasa (TXAS), responsable de la síntesi del TXA<sub>2</sub>, es troba expressat a l'alça en les CES (34). A més, el bloqueig del receptor comú per TXA<sub>2</sub> i prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) comporta una disminució en la pressió portal disminuint la resistència vascular intrahepàtica (35). Tots aquests fets demostren la importància del TXA<sub>2</sub> com a modulador de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi.

## INTRODUCCIÓ

---

### *Òxid Nítric (NO)*

L'òxid nítric és una molècula gasosa fonamental en diversos processos biològics que ha estat definit com el vasodilatador més important d'origen endotelial. Dins del camp de la hipertensió portal s'han publicat nombrosos estudis avaluant el seu paper en la regulació i modulació del to vascular hepàtic. L'òxid nítric és sintetitzat com a subproducte de la formació de L-citrul·lina per part de tres isoformes de l'enzim sintasa d'NO (NOS), la forma neuronal (nNOS), la forma induïble (iNOS) i l'endotelial (eNOS) (36). La producció hepàtica fisiològica d'NO per part de les CES és derivada de l'eNOS en resposta a estímuls com l'estrès de fregament (shear stress) i la presència de vasoconstrictors (37, 38). El seu mecanisme d'acció és paracrí, promovent l'activació de la guanilat ciclasa soluble que estimula la formació de monofosfat cíclic de guanosina (cGMP) (39). La diana més important del cGMP és una proteïna cinasa cGMP-dependent (PKG) que fosforila nombroses proteïnes involucrades en la regulació de la homeòstasi del calci ( $Ca^{2+}$ ), entre les quals trobem el receptor inositol 1,4,5-trifosfat. Aquesta fosforilació comporta una disminució de la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular que produirà la relaxació de les HSC i la vasodilatació (40).

El paper de l'NO en un fetge sa és de compensació enfront estímuls vasoconstrictors i, per tant, la seva biodisponibilitat és suficient i efectiva (41). Pel contrari, en un fetge cirròtic on hi ha un augment del to vascular, s'observa una marcada disfunció endotelial caracteritzada per la incapacitat de l'endoteli per a respondre a estímuls vasodilatadors i per una resposta augmentada a estímuls vasoconstrictors. Aquest fenomen ha estat atribuït, entre d'altres factors, a una disminució en la biodisponibilitat d'NO tant en l'endoteli com en el teixit total (42-44), la qual cosa es considera un factor

## INTRODUCCIÓ

---

fonamental que promou l'augment de la resistència vascular intrahepàtica.

Aquesta menor biodisponibilitat d'NO en els fetges cirròtics es produeix, malgrat que l'eNOS, com a enzim principal encarregat de la síntesi d'NO, es troba en quantitats equivalents a la dels fetges sans (45). Fins l'actualitat, moltes han estat les hipòtesis que expliquen aquest fet. En primer lloc, cal destacar l'existència de diferents desregulacions posttraduccionals de l'enzim eNOS entre les quals trobem: un augment de la seva interacció amb proteïnes inhibidores, com la caveolina (46, 47), la NOSIP (48) o la NOSTRIN (49, 50), la disminució de la seva fosforilació dependent d'Akt (45) i el desacoblament de l'enzim a causa de la deficiència d'alguns dels seus cofactors, com la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (51, 52). Més endavant, es va demostrar que la interacció d'un inhibidor de la senyalització dels receptors acoblats a proteïna G (GRK-2) amb la proteïna Akt provoca una reducció en l'activació de l'enzim eNOS (53). A més, s'ha descrit la presència d'un inhibidor endogen de l'eNOS, la dimetil arginina asimètrica (ADMA), implicat en la disminució de la seva activitat enzimàtica en fetges cirròtics (54).

El dèficit d'NO ha proporcionat la base racional pel tractament de la hipertensió portal amb donants d'NO, en un inici no selectius (55, 56) i més recentment fetge selectius (57-59), per tal d'evitar la hipotensió arterial causada pels primers. Fins a dia d'avui s'han dut a terme molts estudis, els quals han aconseguit incrementar la producció hepàtica d'NO reduint així la resistència vascular intrahepàtica i la pressió portal de rates cirròtiques sense modificar la pressió arterial. Entre els diferents estudis podem trobar estratègies com la transferència gènica al fetge amb adenovirus codificant per la nNOS (60) o per l'eNOS (61, 62) o l'Akt constitutivament activa (45). Tot i el seu èxit aquests estudis no s'han aplicat clínicament però han demostrat que aquesta estratègia és adient per augmentar els nivells



## INTRODUCCIÓ

---

d'NO hepàtics. Més recentment s'han fet diferents tractaments amb estaines (63, 64) o amb el cofactor de l'eNOS: la BH<sub>4</sub> (51, 52).

### 1.1.3 El flux portal

El segon factor que contribueix a agreujar la síndrome de la hipertensió portal és l'augment del flux venós portal. Aquest augment és el resultat d'una marcada vasodilatació arteriolar esplàncnica, la qual produeix un increment en el volum sanguini que arriba al fetge mitjançant la vena porta. Aquesta situació és causada per un alliberament exagerat de vasodilatadors endògens i circulants i per una hiporesposta als agents vasoconstrictors (65).

S'han descrit diverses substàncies vasodilatadores com el glucagó (66, 67), la PGI<sub>2</sub> (68, 69) o el monòxid de carboni (CO) (70, 71) com a causes de la vasodilatació esplàncnica de la cirrosi, però el mediador més important sembla ser l'NO.

S'ha investigat el possible paper de l'NO com a regulador del to vascular esplànncic i els seus mecanismes d'acció. Pacients amb cirrosi i models experimentals d'animals amb hipertensió portal mostren nivells plasmàtics d'NO elevats, principalment en la zona portal, suggerint una producció d'NO esplàncnica. A més, s'ha vist que la producció d'NO esplàncnica en rates cirròtiques és superior a la de les controls, i la inhibició de la seva síntesi redueix el flux de l'arteria mesentèrica superior, el grau de col·lateralització i prevé parcialment el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica típica de la hipertensió portal (72-76).

S'han descrit diversos mecanismes que explicarien l'excessiva producció d'NO en el territori esplànncic. En fases inicials de la malaltia l'augment de producció d'NO és causat per un augment de fosforilació de l'eNOS per part de l'enzim Akt (77). Posteriorment, es produeix un increment d'expressió i activitat de l'enzim

## INTRODUCCIÓ

---

eNOS (78, 79), i en fases més avançades s'han descrit diversos factors que la poden activar entre ells, l'estrès per fregament (shear stress), la translocació bacteriana i els nivells elevats de citosines pro inflammatòries com TNF- $\alpha$  (75, 80, 81).

L'NO té un paper antagònic en la cirrosi. En la circulació intrahepàtica existeix un dèficit en la seva producció el qual provoca una alteració del to vascular hepàtic. En canvi, en la circulació esplàncnica i sistèmica, la producció d'NO es troba augmentada, la qual cosa condueix a una forta vasodilatació arterial i a una hiporesposta a vasoconstrictors. Aquest fenomen es coneix com la "paradoxa de la hipertensió portal" (40). Aquestes dues situacions contribueixen a mantenir i empitjorar la síndrome de la hipertensió portal, la qual impedeix el tractament amb donants d'NO no-selectius de fetge ja que redueixen la resistència vascular intrahepàtica i la pressió portal, però alhora augmenten la vasodilatació perifèrica que s'acompanya d'una disminució de la pressió arterial sistèmica (82).

### **1.2 Circulació hiperdinàmica**

Els pacients en fases avançades de cirrosi presenten la síndrome anomenada circulació hiperdinàmica de la hipertensió portal. Aquesta es caracteritza per una vasodilatació generalitzada acompanyada d'un descens en la pressió arterial i en la resistència vascular perifèrica juntament amb un augment en la despesa cardíaca i volum plasmàtic (83).

Aquests canvis hemodinàmics a nivell sistèmic són derivats de l'exagerada vasodilatació esplàncnica típica de la cirrosi. Es creu que part dels vasodilatadors esplàncnics passarien a la circulació general (ja sigui per no haver estat degradats hepàticament o per haver evitat el fetge al circular per venes porto col·laterals) conduint a una vasodilatació arterial generalitzada, seguida d'una hipovolèmia

## INTRODUCCIÓ

---

relativa de la circulació arterial. En aquest punt l'organisme activa una sèrie de sistemes reguladors, com el sistema renina-angiotensina, el sistema nerviós o la secreció de vasopressina els quals activen la retenció d'aigua i sodi per part del ronyó, augmentant així el volum plasmàtic per intentar mantenir la pressió arterial perifèrica (83-86).

Com a conseqüència d'aquesta adaptació, l'alteració de la funció renal més precoç i comú dels pacients amb hipertensió portal és l'elevada retenció de sodi. A més, diverses complicacions en altres òrgans s'han relacionat amb la síndrome de la circulació hiperdinàmica, com la síndrome hepatopulmonar, la progressió d'encefalopatia hepàtica, la síndrome d'isquèmia i formació d'estrès oxidatiu en diferents teixits, etc... (87, 88). Diversos autors han relacionat la severitat de la circulació hiperdinàmica amb la prognosi i supervivència dels pacients amb hipertensió portal (89).

## 2. Estrés oxidatiu

Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) són ions o petites molècules orgàniques i inorgàniques que presenten alta reactivitat i es generen com un subproducte del metabolisme normal de l'oxigen. Les ROS inclouen radicals lliures (espècies amb un o més electrons desaparellats) com l'anió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) o l'anió hidroxil ( $OH^{\cdot-}$ ), i espècies no radicals com el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), entre d'altres. Un excés de producció de ROS pot derivar de múltiples tipus cel·lulars com les cèl·lules endotelials, les cèl·lules musculars llises, les cèl·lules inflamatòries i els macròfags. Nombrosos sistemes enzimàtics d'aquestes cèl·lules tenen el potencial per generar ROS. Entre els més destacats trobem la xantina oxidasa (XO) (90), la nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) oxidasa (91), la COX (92) i el citocrom P450 (93). Les ROS modulen processos de creixement, proliferació i mort cel·lular (94-96).

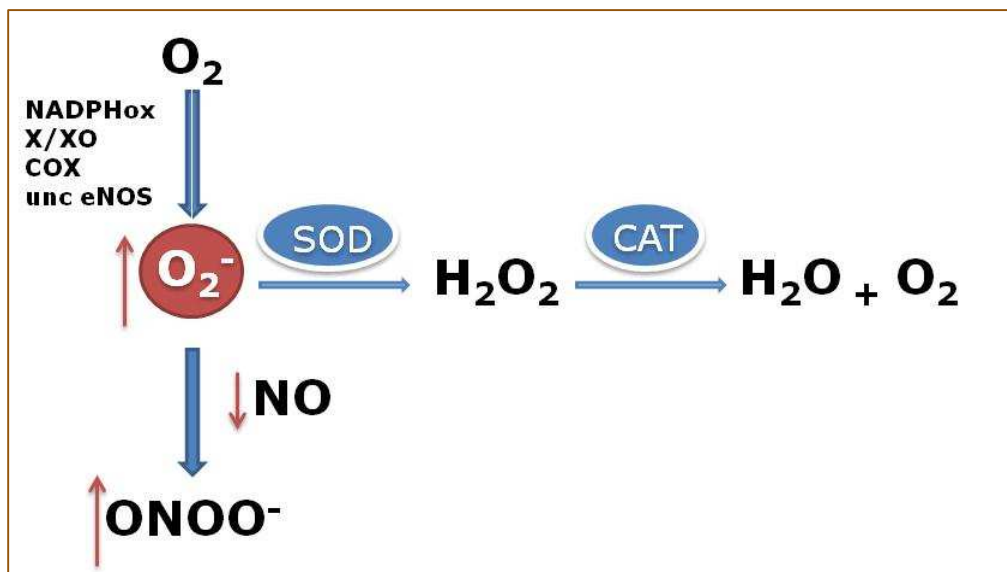
## INTRODUCCIÓ

---

Les ROS també poden afectar a la biodisponibilitat d'NO per la seva capacitat d'oxidar i, per tant, d'inactivar el cofactor de l'eNOS: la BH<sub>4</sub> (97). Aquest cofactor és de gran importància en la transferència d'electrons del grup prostètic hemo de la NOS a L-Arginina. En absència de BH<sub>4</sub> activa, la NOS és incapaç de transferir electrons i utilitza oxigen com a substrat donant lloc a la formació de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> enlloc d'NO, situació que s'ha anomenat: "desacoblament de l'eNOS" (98-100). Aquest fenomen ha estat descrit en diferents patologies entre les quals s'inclouen la diabetis (101), la hipercolesterolèmia (102) i la hipertensió (97).

L'elevada exposició a radicals lliures de diverses fonts ha conduït als organismes a desenvolupar diferents mecanismes de defensa com són els sistemes antioxidants, que en situacions normals es troben en equilibri amb la generació de ROS, mantenint així un balanç en l'estat redox cel·lular (103).

Per altra banda, en situacions patològiques existeix una pertorbació d'aquest equilibri a causa d'un augment en la producció de ROS i/o una disminució dels sistemes antioxidants. Aquesta situació es coneix com: "estrés oxidatiu", el qual ha estat implicat en l'augment del to vascular observat en la hipertensió (104, 105), l'arteriosclerosi (106) i la diabetis (101), entre d'altres. En aquests trastorns, el factor principal que promou l'augment de to vascular és una disminució en la biodisponibilitat d'NO endotelial (107), la qual pot venir tant per una disminució en l'activitat de l'eNOS com per la capacitat del mateix NO a reaccionar amb l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> donant lloc a la formació de peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) (108) (Figura 2). El radical ONOO<sup>-</sup> té gran capacitat per unir-se als residus de tirosina de les proteïnes en un procés que rep el nom de nitrotirosinació proteica el qual ha esdevingut un important marcador de la reacció entre l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i l'NO (109, 110).



*Figura 2: Principals fonts de ROS, enzims antioxidants i mecanisme de reducció de la biodisponibilitat d'NO per excés d'anió  $O_2^-$ .*

*SOD, superòxid dismutasa; CAT, catalasa; NADPHox, nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidasa; COX, ciclooxigenasa; unc eNOS, descacoblament de l'eNOS.*

### 2.1 Estrés oxidatiu i malalties hepàtiques.

L'estrés oxidatiu s'ha suggerit com un factor important en la progressió fisiopatològica de diverses malalties hepàtiques com l'hepatitis C crònica (111), l'esteatohepatitis no alcohòlica (112), la malaltia alcohòlica hepàtica (113, 114), la isquèmia/reperfusió (115, 116) i la fibrosi hepàtica (93, 117). En totes aquestes malalties s'observen dos fenòmens: per una banda hi ha un clar augment plasmàtic i tissular de diferents marcadors d'estrés oxidatiu com és el cas del malondialdehid (MDA) i del  $ONOO^-$ , entre d'altres i, per una altra banda es detecten baixos nivells hepàtics i plasmàtics de diversos antioxidants com la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i les vitamines A, E i C.

El complex enzimàtic NADPH oxidasa és una font important d'estrés oxidatiu en diferents patologies cardiovasculars (91, 118, 119). El nostre grup va demostrar que aquest complex era un factor clau en el desenvolupament de l'angiogènesi esplàncnica (120) no obstant, en contra del que es pensava, a nivell intrahepàtic el complex NADPH

## INTRODUCCIÓ

---

oxidasa no és responsable de l'increment d'estrès oxidatiu, de la disfunció endotelial ni de l'augment de la resistència vascular intrahepàtica (121).

En canvi, l'activitat disminuïda de l'enzim SOD, així com l'augment en l'activitat dels sistemes COX i XO serien els responsables de l'elevada producció de ROS pel fetge cirròtic, el qual segresta una significativa part de l'NO disponible (44).

### 2.2 Antioxidants

Els agents antioxidants són un conjunt de compostos químics o biològics que inhibeixen de forma directa o indirecta els efectes nocius de les ROS. L'organisme posseeix una varietat d'agents antioxidants que poden contrarestar l'estrès oxidatiu en cas de malaltia. Segons el seu mecanisme d'acció aquests agents es poden classificar en dos grups.

#### 2.2.1 Antioxidants enzimàtics.

En aquest grup principalment s'hi troben la CAT, la glutatió peroxidasa (GSH-PX), la tioredoxina peroxidasa i la SOD (122).

La SOD és el principal enzim que metabolitza l' $O_2^{\bullet-}$  per formar  $H_2O_2$ . Existeixen tres isoformes de la SOD: la coure-zinc-SOD (CuZnSOD), l'extracel·lular SOD (ecSOD) i la manganès-SOD (MnSOD), aquesta última es troba localitzada en el mitocondri i és l'isoenzim clau en la detoxificació de l'anió  $O_2^{\bullet-}$ .

#### 2.2.2. Antioxidants no enzimàtics

En aquest grup s'inclouen aquells agents antioxidants exògens que per teràpia o bé per ingesta amb la dieta, milloren l'estrès oxidatiu en la malaltia. Alguns d'ells són: l'àcid ascòrbic (vitamina C), l'àcid lipoic,

## INTRODUCCIÓ

---

l'α-tocoferol (vitamina E), el glutatió (GSH), els carotenoids i els flavonoids (122).

### 2.2.3 Tractament amb antioxidants

En la hipertensió portal els primers en atorgar un paper dels antioxidants a la malaltia van ser Moore i els seus col·laboradors, els quals van administrar l'antioxidant N-acetilcisteïna a rates amb lligadura parcial de la vena porta. Les rates tractades amb l'agent antioxidant no van desenvolupar circulació hiperdinàmica, contràriament al que va passar a les rates tractades amb vehicle. Aquest fet es va associar amb una reducció de marcadors d'estrès oxidatiu i de la pressió portal, atribuïda a una disminució del flux portal (123). El mateix grup va estudiar els efectes amb l'àcid lipoic i els resultats obtinguts foren similars (124). Recolzant aquests fets, un estudi amb pacients cirròtics dut a terme a la nostra unitat, va demostrar que l'administració aguda d'altres dosis de vitamina C, com agent antioxidant, comporta una reducció en els nivells plasmàtics de MDA i millora la disfunció endotelial intrahepàtica (125).

Més recentment, un treball realitzat al nostre grup va demostrar, per primer cop, que l'activitat de l'enzim SOD es troba significativament disminuïda en els fetges cirròtics respecte els fetges control, probablement per una disminució en l'expressió proteica de les isoformes citoplasmàtica i mitocondrial (44). Aquest estudi va donar peu a un segon treball, el qual va demostrar que l'administració d'adenovirus ecSOD a rates cirròtiques produïa una disminució significativa dels nivells de  $O_2^{\bullet-}$  intrahepàtics. Aquestes rates, a més, varen presentar una disminució de la pressió portal sense modificació de la pressió arterial (126).

En els darrers anys l'estudi dels polifenols presents a la dieta ha generat un gran interès per les seves propietats antioxidants,

## INTRODUCCIÓ

antimutagèniques, anticarcinogèniques i antiinflamatòries (127). Un dels més estudiats és la isoforma trans del Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbè) donat que és el polifenol més àmpliament distribuït a la natura. De la mateixa manera, l'interès per l'ús d'antioxidants catalítics exògens ha permès enfocar l'ús de mimètics de l'enzim SOD, com és el Tempol com agent quimiopreventiu pel tractament de varies malalties associades als efectes nocius dels antioxidants (128-132).

### a) Tempol

El tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) es classifica dins el grup dels nitròxids, coneguts també com a aminoxils o nitroxils. La família dels nitròxids són radicals lliures que comparteixen un grup nitròxid reduït ( $\cdot\text{N-O}$ ) com a part d'un anell de cinc o sis àtoms de carboni. Els grups metil ( $-\text{CH}_3$ ) presents a l'estructura impedeixen la seva reacció amb altres radicals de manera que els hi confereixen una gran estabilitat. La diferència entre tots ells ve determinada segons la naturalesa del grup que ocupi la posició "R". En el cas del tempol el grup R correspon a un grup hidroxil OH) (Figura 3).

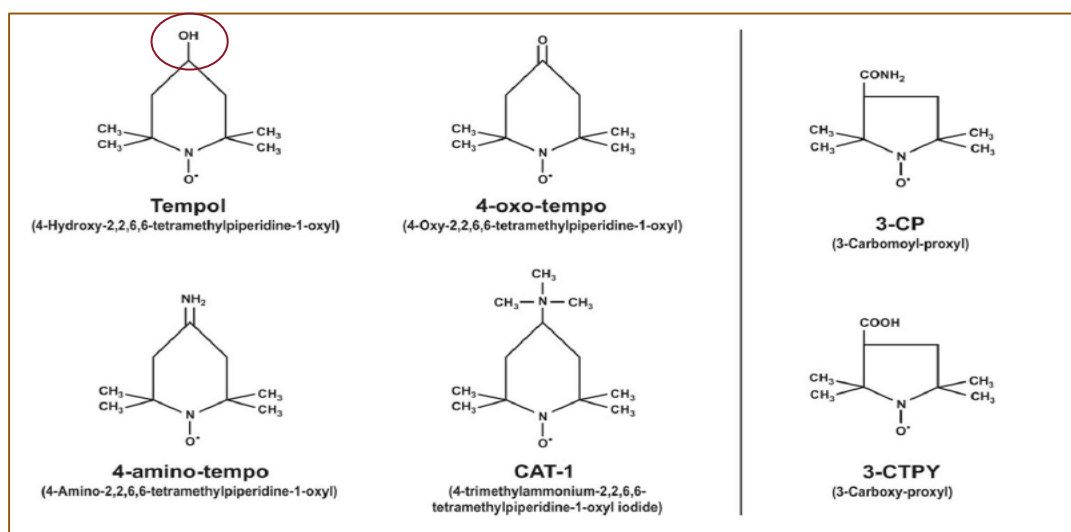
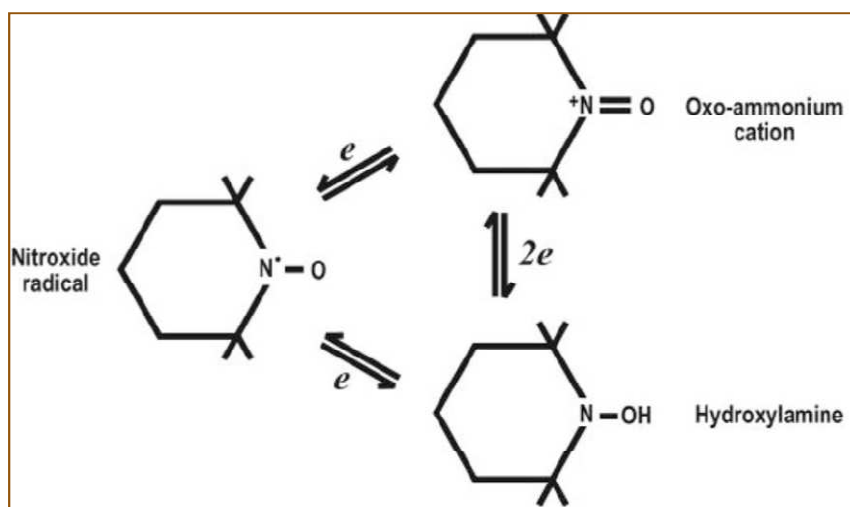


Figura 3: Diferents exemples de la família dels nitròxids. Adaptat de Wilcox et al. 2008.



## INTRODUCCIÓ

El tempol és un potent agent antioxidant de baix pes molecular permeable a les membranes biològiques, mimetitzant l'activitat de l'enzim SOD i elimina el  $O_2^{\bullet-}$  tant *in vitro* com *in vivo* (133). Està descrit com el nitròxid més potent en protegir cèl·lules i teixits de les ROS (134, 135). L'acció dels nitròxids per metabolitzar les ROS té lloc mitjançant un intercanvi cíclic d'electrons entre tres estats d'oxidació diferents: catió oxo-amoni, radical nitròxid i hidroxilamina (Figura 4).



*Figura 4:* Equilibri redox entre les formes oxidades i reduïdes dels nitròxids. Adaptat de Wilcox et al 2005.

Els nitròxids, *in vivo*, es troben en equilibri entre la forma de radical nitròxid i la forma d' hidroxilamina. Aquest equilibri depèn de l'estat REDOX cel·lular i, per tant és un equilibri reversible (136). En condicions patològiques l'intercanvi d'electrons té lloc molt ràpidament i s'ha demostrat que la forma hidroxilamina és qui posseeix l'activitat antioxidant (133, 134, 137). La reacció contrària pot tenir lloc també amb la presència d' $H_2O_2$  o altres agents oxidants com els metalls de transició (138) (Figura 4). Els nitròxids poden unir-se covalentment a proteïnes i altres agents com la hemoglobina i la CAT. D'aquesta manera, poden donar lloc al corresponent catió oxoamoni (137) i a partir d'aleshores es poden sotmetre a reaccions ràpides d'un electró per tornar a la forma de radical nitròxid o bé interaccionar amb la NADPH oxidasa i 2 electrons per donar la forma hidroxilamina (Figura 4).

## INTRODUCCIÓ

Fins l'actualitat, el tempol s'ha utilitzat com l'alternativa més senzilla a la transfecció de l'enzim SOD per prevenir el dany cel·lular causat per les ROS en diferents situacions patològiques com: la inflamació (139), la radiació (140), la hipòxia (141, 142) i la isquèmia/reperfusió cardíaca i hepàtica (143, 144). A nivell tissular, el tempol ha adquirit un paper important per la seva capacitat a reduir els nivells de ROS (133), millorar la disfunció pancreàtica en la insulino resistència (145), i protegir el fetge del dany hepàtic (146).

### b) Resveratrol

El Resveratrol (3, 5,4'-trihydroxystilbè) és un polifenol natural present en més de 70 espècies de plantes. També es pot trobar en diferents tipus de fruites, fruits secs, nous i sobretot en el raïm i els seus derivats (147).

La seva síntesi té lloc a partir de la l' aminoàcid: phenylalanina (Phe) i l'enzim catalitzador estilbè sintasa (STS). A més, està condicionada per factors d'estrès, ja siguin climàtics, per elevades concentracions d'ozó, radiació ultraviolada o infecció per fongs (148). La seva estructura presenta dos anells benzènics units per un pont etilè i tres grups hidroxil. A la natura, el podem trobar en dos isòmers: la isoforma "*cis*-" i la isoforma "*trans*-" no obstant aquesta darrera és la que presenta més estabilitat (149) (Figura 5).

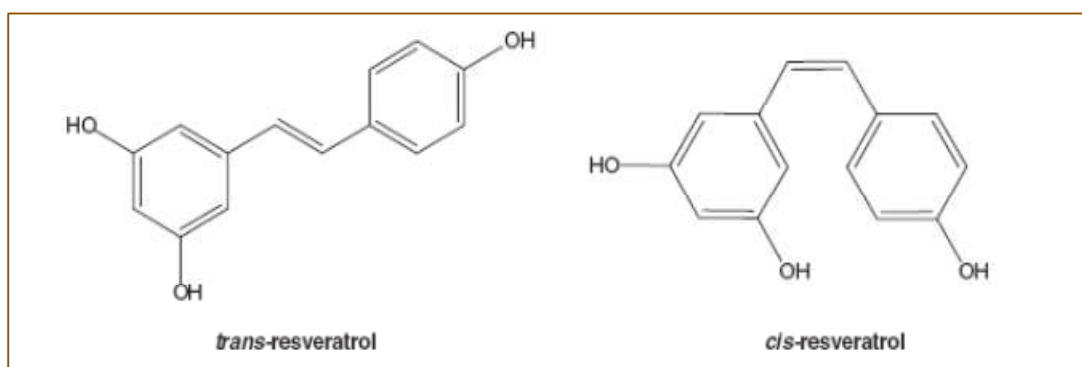


Figura 5: Estructura química de les isoformes del Resveratrol. Adaptada de Gambini J, et al. Rev Esp Geriatr Gerontol. 2013.

## INTRODUCCIÓ

---

Les cultures orientals han estat pioneres en l'ús de plantes que contenen Resveratrol per la seva medicina tradicional. Però no va ser fins al 1989, on va esdevenir de gran importància com a possible agent terapèutic. Aquest mateix any, es va publicar un estudi on s'observava que l'índex de mortalitat per malalties cardiovasculars era inferior a França que a altres països industrialitzats, com ara els Estats Units o el Regne Unit. En canvi, el consum de grasses saturades, les concentracions de colesterol al sèrum i altres factors de risc com la pressió arterial, l'índex de massa corporal i el consum de tabac no eren inferiors als dels altres països. Els investigadors varen associar la reducció de mortalitat amb el major consum de vi a la població francesa (150). Aquests resultats foren coneguts com la "paradoxa francesa" i es va concloure que hi havia una relació inversa entre el consum moderat de vi negre i la incidència de malalties cardiovasculars. Aquell mateix any es van detectar quantitats de Resveratrol al vi negre, confirmant així el possible efecte cardioprotector del vi, el qual podria ser el responsable de la menor mortalitat. A partir d'aquest moment, es van incrementar els estudis destinats a esbrinar les possibles propietats beneficioses del raïm i el vi negre així com les del Resveratrol (151-153).

Fins l'actualitat, diferents estudis han demostrat la importància del Resveratrol per les seves propietats antioxidants, antineoplàsiques, antiinflamatòries i antiplaquetaries (153-156). En diferents models experimentals s'ha demostrat que el Resveratrol millora la disfunció endotelial. Aquest efecte se li ha atribuït a la seva capacitat per reduir l'estrès oxidatiu mitjançant l'augment d'expressió i activitat de l'eNOS i la inhibició de l'activitat de la COX-1 (157-160). Les seves propietats com agent antioxidant en lesions hepàtiques s'han evidenciat amb casos experimentals d'isquèmia/reperfusió o amb l'administració d'etanol on s'ha demostrat un augment en l'activitat dels enzims SOD

## **INTRODUCCIÓ**

---

i CAT (161, 162). Per altra banda, lesions hepàtiques induïdes amb  $\text{CCl}_4$  han demostrat la seva acció antifibrogenica (163).

# **JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS**



## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---

La cirrosi hepàtica segons la seva etiologia és una malaltia freqüent a nivell mundial. L'alcoholisme, el fetge gras i l'hepatitis crònica vírica representen gairebé el 90% dels casos de cirrosi en els països occidentals. La cirrosi hepàtica és més freqüent en homes d'entre 40-50 anys no obstant, també hi ha casos juvenils i fins i tot infantils (164, 165).

La hipertensió portal i les seves complicacions (trencament de varius esofàgiques, ascites, síndrome hepatorenal, encefalopatia hepàtica...) són la principal causa de mort i transplantament en malalts cirròtics (1). És per això que s'han destinat nombrosos esforços en investigació clínica i bàsica per determinar els mecanismes implicats en el desenvolupament d'aquesta síndrome.

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

Actualment la principal teràpia utilitzada en pacients cirròtics és l'ús d'agents  $\beta$ -bloquejants, els quals redueixen la pressió portal disminuint el flux venós portal, que comporta un descens en la despesa cardíaca i una vasoconstricció esplàncnica (166-168). En els darrers anys s'ha demostrat que és possible manipular farmacològicament la resistència vascular intrahepàtica sense necessitat de modificar el flux portal (125, 169). A data d'avui no es coneixen encara tots els mediadors vasoactius implicats a l'increment de la resistència vascular intrahepàtica ni els mecanismes que regulen la seva acció.

## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---

Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'estrès oxidatiu juga un paper important en la progressió de les malalties hepàtiques (170, 171). La seva presència implica un augment de les ROS que, al reaccionar amb l'NO dona lloc a la producció de ONOO<sup>-</sup> contribuint així a una baixa biodisponibilitat d'NO. El coneixement d'aquests mecanismes ha permès dirigir la recerca actual cap a noves teràpies dirigides a augmentar la seva biodisponibilitat en el teixit hepàtic, modulant el cofactor de l'eNOS: tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)(51), administrant adenovirus ecSOD (Ad ecSOD) com agent antioxidant (126) i augmentant l'activitat de l'eNOS amb simvastatina (63, 169). Aquesta recerca també s'ha dut a terme en malalts cirròtics (125, 172, 173).

Els treballs de recerca de la present tesi doctoral estan globalment orientats a ampliar el coneixement dels mecanismes moleculars responsables de l'augment del component dinàmic de la resistència vascular intrahepàtica en la cirrosi, concretament el paper de l'estrès oxidatiu i el seu possible tractament amb l'ús d'agents antioxidants.



### **2.1 Estudi 1: Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats**

En els fetges cirròtics, com en altres malalties vasculars, s'ha demostrat que l'estrès oxidatiu contribueix a la baixa biodisponibilitat d'NO a causa de l'elevada producció d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> per part de diversos sistemes enzimàtics com la COX i la XO (90, 92) i, per una reducció de l'activitat enzimàtica i els nivells proteics d'un dels principals sistemes enzimàtics encarregats de metabolitzar-lo: l'enzim SOD (44, 174).

L'augment de la biodisponibilitat intrahepàtica d'NO, la disminució de producció d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i la disminució de la pressió portal són objectius d'estudi pel tractament de la hipertensió portal en la cirrosi.

Al nostre laboratori es va dur a terme un estudi dirigit a disminuir la producció d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en els fetges de rates cirròtiques mitjançant l'administració d'adenovirus codificant per ecSOD. Aquest estudi, efectivament va disminuir els nivells d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intrahepàtics, va augmentar la biodisponibilitat d'NO, va millorar la disfunció endotelial i, el més important va disminuir la pressió portal (126). Aquests resultats recolzen la idea que les teràpies antioxidants podrien ser una bona alternativa pel tractament de la hipertensió portal en la cirrosi. Malauradament, les teràpies virals presenten controvèrsies en els éssers humans i els seus efectes s'extingeixen al cap de poques setmanes de la seva administració.

Amb aquests fets, la **hipòtesi** del present estudi fou trobar una altra estratègia que permetés reduir els nivells d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intrahepàtics, augmentant així la biodisponibilitat d'NO però que es pogués aplicar a l'àmbit clínic.

## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---

Per tant, els **objectius** del present estudi van ser avaluar si l'administració sistèmica de Tempol, com a mimètic de l'enzim SOD, comporta una reducció dels nivells d' $O_2^{\bullet-}$  intrahepàtics, augmenta la biodisponibilitat d'NO i, com a conseqüència millora el to vascular hepàtic i redueix la pressió portal en rates cirròtiques amb hipertensió portal.

### **2.2 Estudi 2: Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats.**

L'augment de la resistència vascular intrahepàtica és el factor inicial que determina l'aparició de la hipertensió portal. Aquest augment no és només per canvis morfològics com a resultat de la inflamació hepàtica i la fibrosi, sinó també per alteracions funcionals que regulen el to vascular hepàtic com l'exagerada resposta a agents vasoconstrictors i la deficient resposta a agents vasodilatadors (175). La baixa biodisponibilitat d'NO i l'augment dels prostanoids derivats del metabolisme de COX-1 juguen un gran paper en l'alteració del to vascular hepàtic i el desenvolupament de la hipertensió portal.

El Resveratrol és una fitotoalexina present al raïm i als seus derivats com el vi i el most, però també en els cacauets i les nous, al qual se li ha atribuït un paper important com a protector cardiovascular (147). En canvi, en diferents models experimentals el Resveratrol ha millorat la disfunció endotelial, ha reduït l'estrès oxidatiu, ha augmentat l'activitat enzimàtica i l'expressió de l'eNOS i ha inhibit l'activitat enzimàtica de COX-1 (157-160). Addicionalment, se li han atribuït propietats antioxidants en models experimentals de dany hepàtic per isquèmia/reperfusió o ingesta d'etanol el qual ha conduït a un augment de l'activitat dels enzims SOD i CAT (161, 162). Concretament, en la cirrosi hepàtica el Resveratrol ha atenuat el desenvolupament del procés fibrotic (163).

Així doncs, tenint en compte els efectes directes com agent antioxidant, la seva capacitat per modular vies de senyalització involucrades en regulació de la biodisponibilitat d'NO i de la fibrosi, la **hipòtesi** del següent estudi fou que el Resveratrol podia exercir efectes beneficiosos en els mecanismes implicats en el desenvolupament de la hipertensió portal en la cirrosi.

## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

---

**L'objectiu** del present estudi fou investigar els efectes de l'administració crònica de Resveratrol en la disfunció endotelial, en la biodisponibilitat d'NO i en el procés fibrotic de rates cirròtiques amb hipertensió portal.

**CÒPIES DELS  
ARTICLES  
ORIGINALS**



**Estudi 1:**

**Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces intrahepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

Garcia-Calderó H\*, Rodríguez-Vilarrupla A\*, Gracia-Sancho J\*, **Diví M**, Lavina B, Bosch J, García-Pagán JC.

*Journal of Hepatology 2011 vol 54: 660-665*

\*Membres que comparteixen la primera autoria





## Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats

Héctor García-Calderó<sup>†</sup>, Aina Rodríguez-Vilarrupla<sup>†</sup>, Jorge Gracia-Sancho<sup>†</sup>, Marta Diví, Bàrbara Laviña, Jaume Bosch, Joan-Carles García-Pagán\*

Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), University of Barcelona, Spain

**Background & Aims:** Increased superoxide in cirrhotic livers, by reducing nitric oxide bioavailability, contributes to increase intrahepatic vascular resistance to portal blood flow and as a consequence portal pressure. We aimed to evaluate whether a strategy directed to reduce superoxide using tempol, a small membrane permeable SOD-mimetic, is able to modulate intrahepatic nitric oxide content and reduce portal pressure in cirrhotic rats.

**Methods:** Superoxide and nitric oxide were evaluated in control sinusoidal endothelial cells (SEC) pre-treated with the pro-oxidant diethyldithiocarbamate (DDC) and in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat livers treated with tempol or vehicle. Mean arterial pressure, portal pressure, and portal blood flow were measured in control and cirrhotic rats treated with tempol (180 μmol/kg/h; via ileocholec vein) or vehicle. In a subset of animals, hemodynamic measurements were performed after NO-inhibition with L-NAME.

**Results:** Tempol reduced superoxide content and increased NO both in SEC and cirrhotic livers. In cirrhotic rats, but not in controls, tempol significantly reduced portal pressure, and increased portal blood flow, which most likely reflects a reduction in intrahepatic vascular resistance. Tempol significantly reduced mean arterial pressure. L-NAME prevented all these effects.

**Conclusions:** Tempol reduces superoxide, increases nitric oxide, and reduces portal pressure in sinusoidal endothelial cells and in cirrhotic livers. These results confirm that oxidative stress has a role in the pathogenesis of portal hypertension and supports the use of antioxidants in its treatment. However, when

considering the use of antioxidants as additional therapy to treat portal hypertension, the potential to produce deleterious effects on systemic hemodynamics needs to be carefully evaluated.

© 2010 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Increased hepatic vascular resistance to portal blood flow is the main cause of portal hypertension in cirrhosis and is the result of the structural changes inherent to cirrhosis and an increased hepatic vascular tone [1]. Insufficient nitric oxide (NO) availability in the liver circulation is considered as a major pathogenic factor increasing hepatic vascular tone in cirrhosis [2–4], which has been attributed to a decreased endothelial NO synthase (eNOS) activity due to alterations in its posttranslational regulation [5,6]. In addition, scavenging of NO by increased levels of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) is another factor that has been shown to reduce NO bioavailability [7,8].

In cirrhotic livers there is an increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production due to both an increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> release by enzymatic systems, such as cyclooxygenase (COX) and/or xanthine oxidase (XO), and a reduced expression and activity of superoxide dismutase (SOD), a critical enzyme that metabolises O<sub>2</sub><sup>-</sup> [9,10]. We have recently demonstrated that the increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels found in cirrhotic livers, further contribute to reduce NO bioavailability within the liver by scavenging NO, in a reaction in which O<sub>2</sub><sup>-</sup> reacts with NO to form peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) [9,11]. Supporting such a role for oxidative stress in reducing hepatic NO availability in patients with cirrhosis, the acute administration of high doses of the antioxidant vitamin C reduces MDA levels, a plasma marker of oxidative stress, and improves intrahepatic endothelial dysfunction [12]. Importantly, a recent study from our laboratory further reinforces the role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> modulating NO bioavailability by demonstrating that increasing SOD activity by transfecting adenovirus encoding extracellular SOD gene, reduces O<sub>2</sub><sup>-</sup> content, increases hepatic NO bioavailability, improves intrahepatic endothelial function, and reduces portal pressure in cirrhotic rats with portal hypertension [11].

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) is a potent antioxidant of low molecular weight that permeates

Keywords: Nitric oxide; Superoxide; Sinusoidal endothelial cells; Portal hypertension.

Received 11 March 2010; received in revised form 22 July 2010; accepted 22 July 2010; available online 25 September 2010

\*Corresponding author. Address: Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 5400x2824; fax: +34 93 2279856.

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

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work and share first authorship. Abbreviations: SOD, superoxide dismutase; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; NO, nitric oxide; L-NAME, L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide; COX, cyclooxygenase; XO, xanthine oxidase; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite; MDA, malondialdehyde; DDC, diethyldithiocarbamate; SEC, sinusoidal endothelial cells; DAF-FM-DA, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DHE, dihydroethidium; MAP, mean arterial pressure; PP, portal pressure; PBF, portal blood flow.





biological membranes, mimics SOD activity, and scavenges  $O_2^-$  anions *in vitro* and *in vivo* [13]. Tempol has been used to prevent  $O_2^-$ -induced damage in different conditions, such as inflammation [14], radiation [15], and cardiac ischemia/reperfusion injury [16] with the advantage of an easier applicability compared to SOD-transfection.

The aims of the present study were to evaluate the efficacy, increasing NO bioavailability, and reducing portal pressure, and safety, modifying systemic hemodynamics, of intravenous administration of tempol, a cell-membrane permeable SOD mimetic, in an animal model of cirrhosis and portal hypertension.

## Material and methods

### *In vitro* experiments

Evaluation of NO bioavailability and  $O_2^-$  in sinusoidal endothelial cells (SEC) from control rats treated with the SOD inhibitor diethyldithiocarbamate (DDC).

In order to generate increased  $O_2^-$  levels, SEC isolated from control rat livers were incubated for 6 h with the specific SOD inhibitor, diethyldithiocarbamate (DDC, 25  $\mu$ M). Then, *in situ*  $O_2^-$  content and NO bioavailability were evaluated in SEC-DDC treated alone or in association with tempol (DDC+Tempol, 50  $\mu$ M), as described below.

### Isolation and culture of liver SEC

SEC were isolated from control rat livers, as described previously [17,18]. Cells were cultured for 12 h (37 °C, 5%  $CO_2$ ) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media. Almost 93% of these cells were SEC, as assessed by specific immunocytochemical marking using rat endothelial cell antigen 1 [9,19], and they had a viability above 95% (assessed by trypan blue exclusion). All studies were performed on cells at the first passage, 12 h after SEC isolation, to preserve their typical phenotype.

### Measurement of NO bioavailability

*In situ* NO levels in SEC were assessed with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA; Invitrogen, Eugene, OR, USA) as previously described [9]. Freshly isolated SEC were washed in RPMI 1640 media without phenol red and loaded with DAF-FM-DA (final concentration 10  $\mu$ M, 20 min, 37 °C). Then, SEC were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), kept in the dark, and maintained at 37 °C with a warm stage on a laser scanning confocal microscope (model TCS-SL DMIRE2, Leica, Wetzlar, Germany) and images were obtained with a 488-nm (excitation) and 505- to 530-nm (emission) filter set for DAF-FM-DA, with a 40 $\times$  1.3 oil objective. Quantitative analysis was obtained by averaging the peak relative fluorescent intensity (optical density arbitrary units) of each image (Image J 1.33u software, National Institutes of Health) and normalizing the fluorescent result to the total number of cultured cells counted from each corresponding digitalized phase contrast microscope image [9].

### Measurement of $O_2^-$ generation in SEC

The generation of *in situ*  $O_2^-$  levels was evaluated in freshly isolated SEC with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE), as previously described [9]. Fluorescence images were obtained with a laser scanning confocal microscope (TCS-SL DMIRE2, Leica) using 488 nm as the excitation wavelength and the emission spectrum of 610 nm. Quantitative analysis was performed with Image J 1.33u software (National Institutes of Health), as described above.

### *In vivo* experiments

#### Induction of cirrhosis by carbon tetrachloride ( $CCl_4$ )

Male Wistar rats weighing 50–75 g underwent repeated inhalation exposure to  $CCl_4$ . Phenobarbital (0.3 g/L) was added to the drinking water as previously described [20,21]. A high yield of micronodular cirrhosis was obtained after approximately 11–14 weeks of  $CCl_4$  inhalation. When the cirrhotic rats developed

ascites, administration of phenobarbital was stopped, and the subsequent experiments were performed 1 week later. Control animals received only phenobarbital. The animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, NIH Publication 86-23, revised 1985).

### *In vivo* hemodynamic study

Rats were anesthetized with Ketamine (100 mg/kg body weight, Imalgene 1000; Merial, Lyon, France) plus Midazolam (5 mg/kg body weight, Laboratoro Reig Jofré, S.A., Barcelona, Spain) and maintained at a constant temperature of  $37 \pm 0.5$  °C (continuously monitored during the entire experiment). A tracheotomy and cannulation with a PE-240 catheter (Portex, Kent, UK) was performed in order to maintain adequate respiration during the anesthesia, and fastened to a surgical board. Indwelling catheters made of polyethylene tubing (PE-50; Portex, Kent, UK) were placed into the femoral artery and the ileocolic vein to continuously monitor mean arterial pressure (MAP; mmHg) and portal pressure (PP; mmHg) [22], by using two independent pressure transducers. Portal blood flow (PBF, ml/min<sup>-1</sup>) was measured with a non-constrictive peri-vascular ultrasonic transit-time flow probe (2PR, 2-mm diameter, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) placed around the portal vein just before its entrance in the liver avoiding the measurement of most portal-collateral blood flow. The flow probe and the pressure transducers were connected to a Powerlab (4SP) linked to a computer using the Chart v5.0.1 for Windows software (ADInstruments, Mountain View, LA). Intrahepatic vascular resistance (IVR) was calculated as: PP/PBF.

After 10 min of stabilization, tempol (180  $\mu$ mol/kg/h) [23] ( $n = 8$  control rats and  $n = 13$  cirrhotic rats) or saline ( $n = 7$ , control rats and  $n = 10$ , cirrhotic rats) was administered for 30 min through the ileocolic catheter. Intravenous infusion of 1% albumin dissolved in 0.154 mol/L NaCl solution was infused at 2 ml/h into the femoral vein to maintain euolemic state [23].

Hemodynamic measurements were done before tempol (pre-treatment data) and 10 min after the 30 min tempol infusion (post-treatment data).

In addition, in order to assess whether the effects of tempol were mediated by NO, the same designed experiment was conducted in an independent group of rats ( $n = 5$ ) after pre-treatment with the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (15 mg/kg, i.v.) [24].

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

*In situ*  $O_2^-$  levels were evaluated in fresh liver cryosections (10  $\mu$ m) obtained from cirrhotic rats treated with tempol (180  $\mu$ mol/kg/h;  $n = 3$ ) or vehicle (saline;  $n = 2$ ) [23] using the oxidative fluorescent dye DHE, as described above.

### Nitric oxide bioavailability

Measurements of cGMP, a marker of NO bioavailability, were performed in rat liver homogenates from cirrhotic rats treated with tempol ( $n = 8$ ) or vehicle ( $n = 8$ ) by enzyme immunoassay, as previously described [9,11,24].

### Drugs and chemicals

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine 1-oxyl), L-NAME, DDC, DHE, and other chemical reagents were purchased from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain). Mouse anti-rat endothelial cell antigen 1 monoclonal antibody was obtained from Serotec (Oxford, United Kingdom). Collagenase 1 was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Percoll was from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Reagents for cell culture were provided by Biological Industries, Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel). cGMP enzyme immunoassay was supplied by Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA).

### Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS 14.0 for Windows statistical package. All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test or the non-parametric test for related (Wilcoxon) and unpaired data (Mann-Whitney) when adequate. Significance was established at the 0.05 level.

Research Article

Results

Effect of tempol on  $O_2^-$  levels and NO bioavailability in SEC from control rat livers treated with the SOD inhibitor DDC

Control SEC treated with the SOD inhibitor DDC displayed a marked and significant increase in  $O_2^-$ , as shown by DHE staining, in comparison with vehicle-treated SEC (Fig. 1). This increase in  $O_2^-$  was associated with a significant reduction in NO bioavailability, as evidenced by DAF-FM-DA staining (Fig. 1). Tempol co-administration produced a marked and significant attenuation of the increase in  $O_2^-$  levels, which was associated with a partial but significant increase in NO bioavailability, revealing that tempol is able to scavenge  $O_2^-$  and therefore, modulate NO bioavailability in SEC (Fig. 1).

Effect of tempol on  $O_2^-$  levels and NO bioavailability in cirrhotic rat livers

We assessed whether tempol is able to modulate NO bioavailability by decreasing the elevated  $O_2^-$  content of cirrhotic rat livers. Tempol treatment produced a marked and significant reduction in  $O_2^-$  levels in cirrhotic rat livers (Fig. 2) that was associated with a significant increase in hepatic cGMP levels (a surrogate marker of NO bioavailability) ( $12.4 \pm 0.2$  vs.  $19.7 \pm 1.1$  pmol/ml;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

Effects of tempol on systemic and hepatic hemodynamics in control and  $CCl_4$  cirrhotic rats

Cirrhotic rats showed arterial hypotension and portal hypertension in comparison with control rats (Table 1). Tempol had no

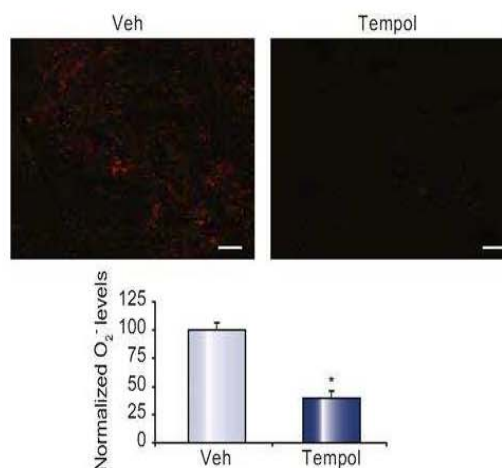


Fig. 2. Representative confocal microscopy images of *in situ* detection of  $O_2^-$  with the oxidative dye dihydroethidium (DHE) in fresh liver sections from cirrhotic rats treated with vehicle (Veh) or with tempol (bar, 10  $\mu$ m). Bottom panel: DHE fluorescence intensity analysis showed that tempol significantly reduced intrahepatic  $O_2^-$  content in cirrhotic rats treated with tempol ( $n = 3$ ) vs. those treated with vehicle ( $n = 2$ ) (Values represent normalized arbitrary units). \* $p < 0.01$ .

significant effects on hepatic and systemic hemodynamics in control rats (Table 1). By contrast, in cirrhotic rats, tempol produced a significant reduction in PP (from 15.8 mmHg to 14.6 mmHg;  $p < 0.05$ ; mean decrease 7.5%). This reduction was associated with a significant increase in PBF, which suggests a reduction in intrahepatic vascular resistance. In addition, tempol significantly reduced MAP (Fig. 4, Table 1).

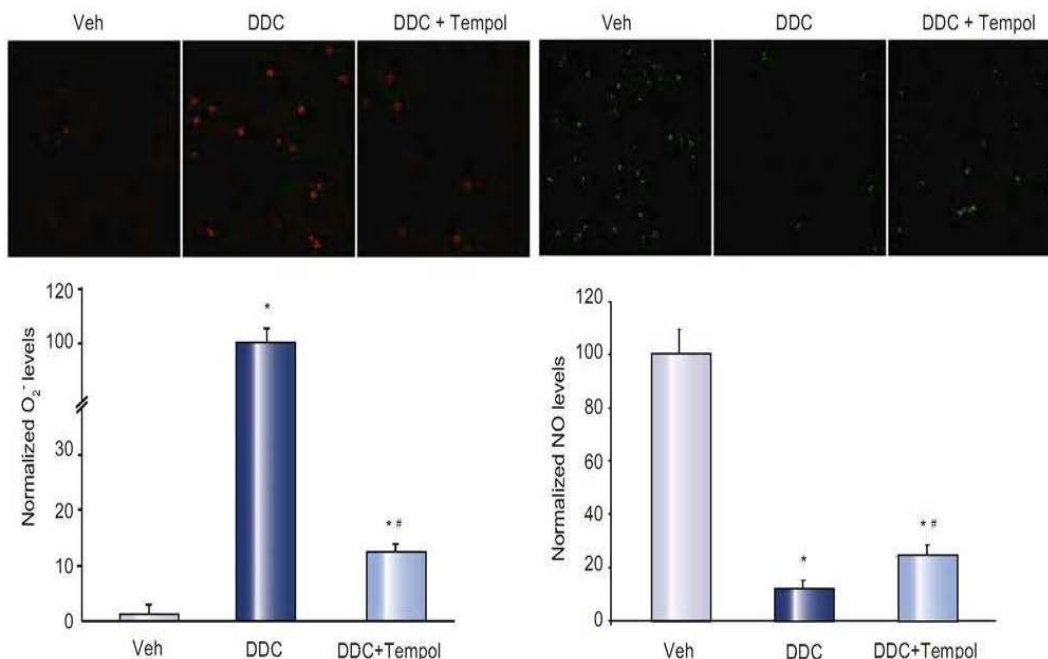
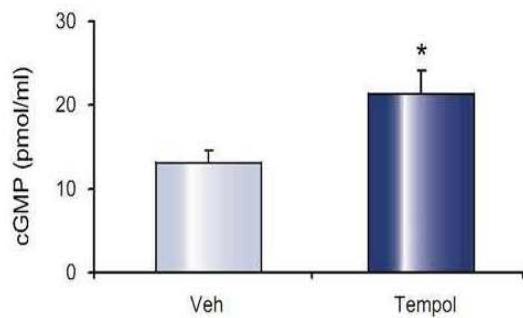


Fig. 1. *In situ* superoxide ( $O_2^-$ ) detection by dihydroethidium (DHE) staining and nitric oxide (NO) quantification by DAF staining in sinusoidal endothelial cells freshly isolated from control rat livers treated with the specific superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate (DDC) alone or in association with tempol (DDC + Tempol). Top panels, representative images of DHE and DAF staining of SEC treated as described above. Bottom panels, fluorescence intensity of DHE and DAF in arbitrary units normalized to the total number of cells from ten different replicates (DHE: 1424 individual SEC-Veh, 1287 DDC-SEC, and 1193 DDC + Tempol-SEC; DAF: 1652 individual SEC-Veh, 1046 DDC-SEC, and 1558 DDC + Tempol-SEC). \* $p < 0.01$  vs. veh, \*\* $p < 0.05$  vs. DDC.





**Fig. 3. Intrahepatic cGMP levels in cirrhotic rats treated with vehicle (Veh) or with tempol.** cGMP levels were significantly increased in tempol rat livers (n = 8 per group). \*p < 0.05.

To explore whether the hemodynamic effects of tempol in cirrhotic rats were mainly mediated by NO, experiments were done after NO synthase inhibition by L-NAME administration. L-NAME completely prevented the effects of tempol on hepatic and systemic hemodynamics suggesting that these effects were NO dependent (Table 2).

**Discussion**

Increased hepatic vascular resistance in cirrhosis has been related to reduced NO bioavailability within the cirrhotic liver. To date, attempts to correct intrahepatic NO deficiency in experimental cirrhosis have been based on interventions aimed to increase NO, among other strategies, by over-expressing NO synthases [25–27] or enhancing its activity [24,28,29].

Recently, we have demonstrated that in cirrhotic livers, as it occurs in other vascular disorders, the increased  $O_2^-$  reacts with NO and contributes to further decrease of NO bioavailability [9].  $O_2^-$  content in cirrhotic rat livers is increased because of an enhanced generation by COX and XO and to a reduced metabolism by SOD [9,10]. In that regard, transfection, of cirrhotic rats with portal hypertension, with an adenovirus coding for extracellular SOD, resulted in a marked reduction in  $O_2^-$ , enhancing NO

**Table 1. Effects of tempol on systemic and hepatic hemodynamics in control and cirrhotic rats.**

Characteristic	CT preT	CT postT	CH preT	CH postT
MAP (mmHg)	124.9 ± 16.4	115.7 ± 16.0	94.1 ± 17.5*	84.5 ± 20.4*
PP (mmHg)	7.9 ± 1.4	7.7 ± 1.2	15.8 ± 2.9*	14.6 ± 3.9*
PBF (ml/min)	11.1 ± 2.8	11.7 ± 2.4	15.2 ± 5.0*	18.8 ± 5.5*
IVR (mmHg/ml·min <sup>-1</sup> )	10.8 ± 2.5	10.3 ± 3.1	12.4 ± 1.3*	9.5 ± 4.6*

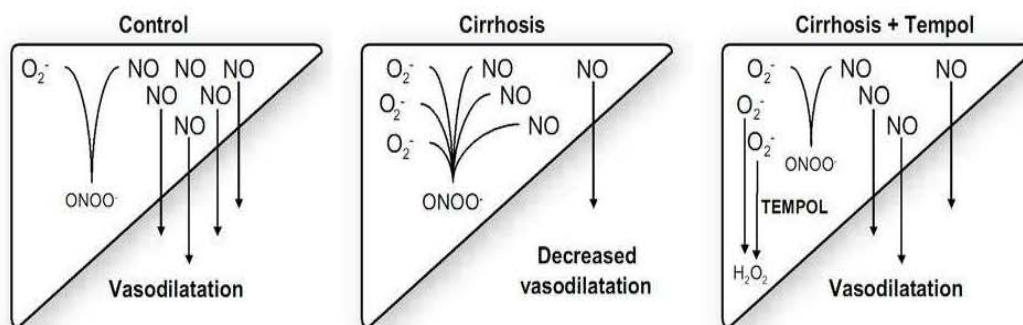
Effects of tempol (180 μmol/kg/h) on mean arterial pressure (MAP), portal pressure (PP), portal blood flow (PBF), and intrahepatic vascular resistance (IVR) in control (CT) and cirrhotic (CH) rats. Measurements were obtained at baseline (preT) and 10 min after tempol infusion through the ileocolic vein (postT). Data are presented as mean ± SD (CT, n = 10; CH, n = 13). \*p < 0.05 vs. CT preT and #p < 0.05 vs CH preT.

**Table 2. Effects of L-NAME on hepatic and systemic hemodynamic responses to tempol.**

Characteristic	preLN	postLN	postLN-postT
MAP (mmHg)	89.1 ± 18	120.2 ± 11.6*	129.9 ± 15.4**
PP (mmHg)	15.7 ± 1.9	13.4 ± 1.0	16.0 ± 4.1
PBF (ml/min)	11.1 ± 4.2	8.8 ± 2.2	9.1 ± 3.1
IVR (mmHg/ml·min <sup>-1</sup> )	14.0 ± 1.9	14.8 ± 6.2	17.8 ± 9.9

Effects of L-NAME (15 mg/kg) administration prior to tempol (180 μmol/kg/h) on mean arterial pressure (MAP), portal pressure (PP), portal blood flow (PBF), and intrahepatic vascular resistance (IVR) in cirrhotic (CH) rats. Measurements were obtained at baseline (preLN), after L-NAME administration (postLN), and after tempol infusion (postLN-postT). Data are presented as mean ± SD (n = 5 per group). \*p < 0.05 vs. preLN, \*\*p < 0.05 vs. postLN.

bioavailability (as estimated by the hepatic levels of cGMP), thus reducing portal pressure and improving endothelium-dependent hepatic vasodilatation. This study provided evidence *in vivo* that decreasing  $O_2^-$  levels by increasing SOD activity may represent an effective strategy for improving NO bioavailability within the liver [11]. After adenoviral transfection, approximately 90% of the adenoviral vector is localized in the liver, therefore, this may explain its beneficial effect on the hepatic circulation without affecting arterial pressure and would be a theoretical advan-



**Fig. 4. Tempol vasodilatory effects in the cirrhotic liver.** Left panel, control livers exhibit low levels of superoxide radical ( $O_2^-$ ) and normal nitric oxide (NO) bioavailability, inducing proper vasodilatation. Middle panel, in the cirrhotic liver, increased levels of  $O_2^-$  react with NO to form peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), further reducing the already diminished hepatic NO bioavailability. Right panel, tempol administration to cirrhotic livers, by metabolizing  $O_2^-$  to form  $H_2O_2$ , reduces hepatic  $O_2^-$  content, thus increases NO bioavailability and improves hepatic vasodilatation.



Research Article

tage over other strategies aimed at increasing NO availability by administering non-selective NO-donors that carry the risk of worsening the hyperdynamic syndrome of cirrhosis. Although it is a valuable research tool, the use of adenovirus-based gene therapies is highly controversial in humans [30]. In addition, the effect vanishes after weeks. To further explore the approach of increasing NO bioavailability by means of reducing  $O_2^-$  levels by restoring SOD activity, we used the systemic administration of tempol. Tempol is a stable low molecular weight cell permeable antioxidant, mimicking SOD, very effective scavenging intra and extracellular  $O_2^-$  that has been shown to effectively improve pathological conditions associated with marked oxidative stress [11,14–16].

Our study clearly demonstrates that tempol is able to effectively decrease  $O_2^-$  content in cirrhotic rat livers, an effect associated with a significant improvement in NO bioavailability. These results confirm the concept that it is possible to increase hepatic NO bioavailability by reducing intrahepatic  $O_2^-$  levels. The extent of the reduction of  $O_2^-$  and of the increase in NO bioavailability (assessed by changes in cGMP) caused by tempol administration was similar to that observed in our previous study using EcSOD transfection [11], demonstrating that tempol efficiently reached cirrhotic rat livers. The high antioxidant capacity of tempol was also demonstrated by the observation that tempol attenuated the increase in  $O_2^-$  levels and partially restored the insufficient NO bioavailability induced by the SOD inhibitor, DDC, in sinusoidal endothelial cells.

The molecular effects of systemic tempol on the cirrhotic liver nitric oxide bioavailability promoted a significant reduction in PP. This was associated with a significant increase in PBF, suggesting that the mechanism for such reduction was a decrease in the IVR caused by tempol. Our finding showing that pre-treatment with L-NAME completely prevented the effects of tempol, indicating that these effects are NO mediated.

In the design of our *in vivo* measurements of PBF we were very cautious to place the flow probe as close as possible to the liver, therefore avoiding most portal-collateral circulation, and excluding possible interference from portal blood flowing through shunts. Thus, measured PBF is what goes through the liver and makes our estimation of IVR convincingly accurate. Although *in situ* liver perfusion experiments are also a good choice for evaluating IVR, in the present study we chose *in vivo* estimation due to the extremely short half life of tempol and as a consequence the uncertainty of achieving steady and reliable tempol concentrations in the perfusion buffer.

The observed increase in PBF, and more importantly, the reduction in arterial pressure, suggest that the effects of tempol were not only limited to hepatic circulation but also extended to the systemic circulation. We cannot rule out, together with increased systemic NO availability, that systemic  $H_2O_2$  accumulation could be implicated in the decreased arterial pressure observed in tempol-treated cirrhotic animals. In fact, it is well known that  $H_2O_2$  may produce vasodilation or vasoconstriction depending on the vascular bed and experimental conditions [31,32]. Different studies have postulated that tempol can transiently increase vascular  $H_2O_2$  leading to vasodilation [32,33]. Hence, tempol may exacerbate the hypotension associated with the hyperdynamic syndrome of cirrhosis and portal hypertension, reinforcing the idea that therapies aimed at increasing liver NO availability should be liver-selective [2,24,34,35].

In conclusion, the current study demonstrates that administration of tempol to cirrhotic rats reduces hepatic oxidative stress and increases NO availability, which is associated with a reduction in PP secondary to an improvement in the intrahepatic circulation, confirming that oxidative stress is one of the multifactorial causes worsening portal hypertension in cirrhosis. However, tempol, as a non liver-selective agent, has the potential of producing deleterious effects on systemic hemodynamics. This needs to be carefully evaluated when considering the use of antioxidants as additional therapy to treat portal hypertension in cirrhosis.

Conflict of interest

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

Acknowledgments

Authors acknowledge Montse Monclús for outstanding technical support. This study was supported by grants from the ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07/61298) and Instituto de Salud Carlos III (PI 09/01261). Ciberehd is funded by Instituto de Salud Carlos III.

References

- [1] Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141–156.
- [2] Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478–491.
- [3] Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926–931.
- [4] Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344–351.
- [5] Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222–1228.
- [6] Liu SL, Premont RT, Kontos CD, Zhu SK, Rockey DC. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med* 2005;11:952–958.
- [7] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840–844.
- [8] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29–38.
- [9] Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248–1256.
- [10] Van de Castelele M, Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003;2:2.
- [11] Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009;58:118–125.
- [12] Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Turnes J, Bellot P, Deulofeu R, Abalde JG, et al. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 2006;43:485–491.
- [13] Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* 2008;60:418–469.



- [14] Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Samuni A, Rachmilewitz D. A stable nitroxide radical effectively decreases mucosal damage in experimental colitis. *Gut* 1995;37:386-393.
- [15] Mitchell JB, Degraff W, Kaufman D, Krishna MC, Samuni A, Finkelstein E, et al. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide-dismutase mimic. *Tempol Arch Biochem Biophys* 1991;289:62-70.
- [16] Gelvan D, Saltman P, Powell SR. Cardiac reperfusion damage prevented by a nitroxide free-radical. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:4680-4684.
- [17] Braet F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrod B, et al. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab Invest* 1994;70:944-952.
- [18] Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Caldero H, Bosch J, García-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220-227.
- [19] Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, García-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G763-G770.
- [20] Graupera M, García-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al. 5-Lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;122:387-393.
- [21] Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, Brandes RP, Fernandez M, Bosch J, et al. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:959-966.
- [22] Castaneda B, Bernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Perez-del-Pulgar S, Moutinho E, et al. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2000;31:581-586.
- [23] Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998;32:59-64.
- [24] Abraldes JC, Rodríguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, García-Caldero H, García-Pagan JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;46:1040-1046.
- [25] Van de CM, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, et al. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;51:440-445.
- [26] Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, et al. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1023-G1030.
- [27] Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-748.
- [28] Matei V, Rodríguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl<sub>4</sub> cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:44-52.
- [29] Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, García-Pagán JC, et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004;126:749-755.
- [30] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003;4:346-358.
- [31] Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003;92:e31-e40.
- [32] Chen Y, Pearlman A, Luo Z, Wilcox CS. Hydrogen peroxide mediates a transient vasorelaxation with tempol during oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2085-H2092.
- [33] Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, et al. Role of Cu, Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H441-H448.
- [34] Bosch J. Decreasing hepatic vascular tone by liver-specific NO donors: wishful thinking or a promising reality? *J Hepatol* 2003;39:1072-1075.
- [35] Berzigotti A, Bellot P, De GA, García-Pagan JC, Gagnon C, Spenard J, et al. NCX-1000, a Nitric oxide-releasing derivative of UDCA. Does not decrease portal pressure in patients with cirrhosis: results of a randomized, double-blind, dose-escalating study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1094-1101.

**Estudi 2:**

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

Di Pascoli M\*, **Diví M\***, Rodríguez-Vilarrupla A, Rosado E, Gracia-Sancho J, Vilaseca M, Bosch J, García-Pagán JC.

*Journal of Hepatology 2013 vol 58: 904-910*

\*Membres que comparteixen la primera autoria





## Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats

Marco Di Pascoli<sup>†</sup>, Marta Diví<sup>†</sup>, Aina Rodríguez-Vilarrupla, Eugenio Rosado, Jorge Gracia-Sancho, Marina Vilaseca, Jaume Bosch, Joan Carles García-Pagán\*

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

**Background & Aims:** Resveratrol, a polyphenol found in a variety of fruits, exerts a wide range of beneficial effects on the endothelium, regulates multiple vasoactive substances and decreases oxidative stress, factors involved in the pathophysiology of portal hypertension. Our study aimed at evaluating the effects of resveratrol on hepatic and systemic hemodynamics, hepatic endothelial dysfunction, and hepatic fibrosis in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats.

**Methods:** Resveratrol (10 and 20 mg/kg/day) or its vehicle was administered to cirrhotic rats for two weeks and hepatic and systemic hemodynamics were measured. Moreover, we evaluated endothelial function by dose-relaxation curves to acetylcholine, hepatic NO bioavailability and TXA<sub>2</sub> production. We also evaluated liver fibrosis by Sirius Red staining of liver sections, collagen-1, NFκB, TGFβ mRNA expression, and desmin and α-smooth muscle actin (α-SMA) protein expression, as a surrogate of hepatic stellate cell activation.

**Results:** Resveratrol administration significantly decreased portal pressure compared to vehicle (12.1 ± 0.9 vs. 14.3 ± 2.2 mmHg; *p* < 0.05) without significant changes in systemic hemodynamics. Reduction in portal pressure was associated with an improved vasodilatory response to acetylcholine, with decreased TXA<sub>2</sub> production, increased endothelial NO, and with a significant reduction in liver fibrosis. The decrease in hepatic fibrosis was associated with a reduced collagen-1, TGFβ, NFκB mRNA expression and desmin and α-SMA protein expression.

**Conclusions:** Resveratrol administration reduces portal pressure, hepatic stellate cell activation and liver fibrosis, and improves hepatic endothelial dysfunction in cirrhotic rats, suggesting it may be a useful dietary supplement in the treatment of portal hypertension in patients with cirrhosis.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

In cirrhosis, the initial factor determining the onset of portal hypertension is the increase in intrahepatic vascular resistance. This is not only due to morphological changes resulting from chronic liver inflammation and fibrosis, but also to reversible functional alterations, including an exaggerated response of the porto-hepatic vascular bed to vasoconstrictors and a deficient response to vasodilators [1]. A decreased nitric oxide (NO) availability and an increase in cyclo-oxygenase-1 (COX-1)-derived prostanoids within the liver play a major role in the pathogenesis of these dynamic alterations [2-5].

Reduced NO availability has been shown to be in part due to an increase scavenging by superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and different strategies aimed at reducing O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels [6,7], such as superoxide dismutase (SOD) gene transfer, are able to reduce portal pressure in experimental models of cirrhosis in the rat.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a natural polyphenolic flavonoid found in a large amount of plant species, including grapes and their derivatives, berries and nuts. It has been suggested to have important health benefits attributed to its demonstrated anti-oxidant, anti-neoplastic, anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activities [8-11]. Specifically, in different experimental models, resveratrol improves vascular dysfunction, an effect that is attributed to its ability to reduce oxidative stress, to upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and activity, and to inhibit COX-1 activity [12-15].

Resveratrol has been shown to exert anti-oxidant effects in experimental models of liver injury induced by ischemia/reperfusion and ethanol by inducing the enzymatic activity of SOD and catalase [16,17], and to attenuate fibrosis development when co-administered with CCl<sub>4</sub> to rats [18]. Additionally, resveratrol

Keywords: Oxidative stress; Endothelial dysfunction; Nitric oxide; Thromboxane. Received 28 June 2012; received in revised form 29 November 2012; accepted 4 December 2012; available online 20 December 2012

\* Corresponding author. Address: Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2275400x2824; fax: +34 93 2279856.

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

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work and share first authorship. Abbreviations: NO, nitric oxide; COX-1, cyclooxygenase-1; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; MAP, mmHg, mean arterial pressure; PP, mmHg, portal pressure; PBF, ml min<sup>-1</sup>, portal blood flow; SMABF, ml min<sup>-1</sup>, superior mesenteric artery blood flow; Mtx, methoxamine; Ach, acetylcholine; TXB<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub>; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide; DHE, dihydroethidium; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; P-eNOS, phosphorylated eNOS; α-SMA, α smooth muscle actin.





reduces the hepatotoxicity induced by acetaminophen, ethanol and carbone tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), and prevents liver damage due to ischemia-reperfusion, irradiation, and high-fat diet [19]. Overall, we hypothesized that resveratrol may exert beneficial effects in the pathophysiological mechanisms involved in the development of portal hypertension in cirrhosis.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of chronic administration of resveratrol in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats with portal hypertension.

## Materials and methods

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

In male Wistar rats (50–75 g), cirrhosis was induced by inhalation of CCl<sub>4</sub> three times a week, and phenobarbital (0.3 g/L) was added to the drinking water as previously described [6]. When cirrhotic rats had developed ascites, after approximately 12–15 weeks of CCl<sub>4</sub> inhalation, administration of CCl<sub>4</sub> and phenobarbital was discontinued. One week later, the animals were randomized to receive resveratrol (10 mg/kg body weight (bw); Sigma, Tres Cantos, Madrid, Spain) or its vehicle (carboxymethylcellulose 0.7%) daily by gavage for two weeks. Resveratrol or its vehicle was prepared and administered by a third person and, therefore, the investigators performing the experiments were not aware of the treatment received by the rats. Experiments were initiated 1 h after the administration of the last dose of resveratrol or vehicle. The dose of 10 mg/kg bw/day of resveratrol has been shown to reduce liver oxidative damage after bile duct ligation [20] and to decrease acute liver damage induced by acute CCl<sub>4</sub> intoxication [21]. To evaluate a possible dose-dependent effect of resveratrol, an additional group of rats were treated with resveratrol at 20 mg/kg bw/day (n = 10) or its corresponding vehicle (n = 8). The animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi y Sunyer (IDIBAPS). All procedures were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with European Community guidelines for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EEC Directive 86/609).

### In vivo hemodynamic studies

Rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg; Merial Laboratories, Barcelona, Spain) plus midazolam (5 mg/kg; Laboratorios Reig Jofré, Barcelona, Spain) intraperitoneally. A tracheostomy was performed and a polyethylene tube PE-240 was inserted into the trachea to ensure a patent airway. PE-50 catheters were introduced into the femoral artery to measure mean arterial pressure (MAP; mmHg) and into the ileocolic vein to measure portal pressure (PP, mmHg). Perivascular ultrasonic flow probes connected to a flow meter (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) were placed around the portal vein, as close as possible to the liver to avoid portal-collateral blood flow, in order to measure portal blood flow (PBF; ml min<sup>-1</sup>) going through the liver, and at the superior mesenteric artery to measure superior mesenteric artery blood flow (SMABF; ml min<sup>-1</sup>). Blood pressures and flows were registered on a multichannel computer-based recorder (PowerLab; AD Instruments, Colorado Springs, CO). The temperature of the animals was maintained at 37 ± 0.5 °C and hemodynamic data were collected after a 20 min stabilization period.

### Evaluation of endothelial function

After *in vivo* hemodynamic measurements, livers were quickly isolated and perfused by a flow-controlled perfusion system as previously described [22]. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilize for 20 min before vasoactive substances were added. The intrahepatic microcirculation was precontracted by adding the  $\alpha_1$ -adrenergic agonist methoxamine (Mtx; 10<sup>-8</sup> mol/L; Sigma) to the reservoir. After 5 min, concentration-response curves to cumulative doses of acetylcholine (ACh; 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, and 10<sup>-5</sup> mol/L; Sigma) were evaluated. The concentration of ACh was increased by 1 log unit every 1.5 min interval. Responses to ACh were calculated as the percentage change in portal perfusion pressure [5]. The gross appearance of the liver, stable perfusion pressure, bile production over 0.4  $\mu$ l/min/g of liver and a stable buffer pH (7.4 ± 0.3) were monitored during this period. If any viability or stability criteria were not satisfied, the experiment was discarded.

### Effects of resveratrol on oxidative stress and hepatic SOD activity

#### Measurement of O<sub>2</sub> content.

To evaluate if resveratrol is able to reduce intrahepatic O<sub>2</sub> levels, livers from cirrhotic rats treated with resveratrol (n = 2) or vehicle (n = 2) were promptly removed after the hemodynamic measurements and *in situ* O<sub>2</sub> content was evaluated in fresh liver cryosections (10  $\mu$ m) stained with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA), as previously described [23,24].

#### SOD activity.

Total SOD activity was measured in liver homogenates obtained from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle (n = 9 per group), using a commercially available immunoassay (Sigma). The assay is based on the competition reaction between the sample-containing SOD and the highly water-soluble tetrazolium salt (WST) that produces a water-soluble formazan dye upon reaction with O<sub>2</sub>. Briefly, livers were homogenized in buffer containing 20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 210 mM mannitol and 70 mM sucrose. After centrifugation at 1500g for 5 min at 4 °C, the supernatant was collected and protein concentration was quantified. SOD activity assay was performed according to manufacturer's instructions.

### Evaluation of NO pathway

#### Nitric oxide bioavailability.

Measurements of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a marker of NO bioavailability, were performed in liver homogenates from cirrhotic rats treated with resveratrol (n = 8) or vehicle (n = 8) using an enzyme immunoassay (Cayman Chemical Company, Tallin, Estonia), as previously described [7,25].

#### eNOS and P-eNOS protein expression.

Total eNOS and P-eNOS protein expression was determined by Western blot in liver homogenates from cirrhotic rats treated with resveratrol (n = 4) or vehicle (n = 4) as previously described [7]. Antibodies against phosphorylated eNOS (Ser1176; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and total eNOS (BD Biosciences, San Jose, CA) were incubated for 16 h at 4 °C, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Stressgen, Victoria, BC, Canada) for 1 h at room temperature. Blots were revealed by chemiluminescence. Protein expression was determined by densitometric analysis using Science Lab 2001, Image Gauge (Fuji Photo Film Gmbh, Düsseldorf, Germany). Quantitative densitometry values of eNOS and P-eNOS were normalized to GAPDH.

### Measurement of thromboxane A<sub>2</sub>

In liver-perfusion experiments, samples of the perfusate were obtained before Mtx administration and after the dose-response to ACh. The samples were stored at -80 °C, and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), the end metabolite of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), was quantified in duplicate using a commercially available enzyme immunoassay (Cayman) [26,27]. TXB<sub>2</sub> production was expressed as absolute increment after dose-response curve to ACh over baseline before Mtx administration [28].

### Effects of resveratrol on sinusoidal endothelial cells

#### Isolation of sinusoidal endothelial cells.

Sinusoidal endothelial cells were isolated from control and cirrhotic rats as previously described [24]. Briefly, after collagenase perfusion of the livers and isopycnic sedimentation of the resulting dispersed cells through a two-step density gradient of Percoll, pure monolayer cultures of SEC were established by selective attachment on a substrate of rat tail collagen type I. Afterwards, cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 and studies were performed on cells from the first passage, 12 h after their isolation, to preserve their typical phenotype.

#### Measurements of NO levels and TXA<sub>2</sub> production in SEC.

To determine whether resveratrol administration could increase NO bioavailability in SEC isolated from five cirrhotic rat livers (CH-SEC), CH-SEC were incubated for 24 h at 37 °C with resveratrol (50  $\mu$ M) or with vehicle (ethanol). Then, nitric oxide levels were assessed with DAF-FM-DA as previously described [29]. In addition, nitrites/nitrates (NOx) production was assessed in aliquots of SEC supernatants using specific microelectrodes (Lazar Laboratories, Los Angeles, CA) according to manufacturer's instructions.



## Research Article

SEC isolated from cirrhotic rats were treated with resveratrol or vehicle for 24 h, and afterwards arachidonic acid (40  $\mu$ M) was added for 20 min in order to stimulate prostanoid production. Then, the supernatant was collected and TXA<sub>2</sub> determined as described above.

### Evaluation of hepatic fibrosis

#### Sirius Red staining

Livers from cirrhotic rats treated with resveratrol (n = 8) or vehicle (n = 9) were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned and stained with 0.1% Sirius Red, photographed, and analyzed using a microscope equipped with a digital camera [29,30]. Eight fields from each slide were randomly selected, and the red-stained area per total area was measured using AxioVision software.

#### Immunohistochemistry of $\alpha$ -SMA and desmin

Immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with mouse anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) antibody (1:1000; Sigma) and mouse anti-desmin antibody (1:50; DAKO, Denmark) or, as a negative control, with phosphate-buffered saline. Bound antibodies were visualized using with Dako Real Envision Detection System Peroxidase/DAB+, and slides were then counterstained with hematoxylin.

$\alpha$ -SMA and desmin relative volume was determined by point-counting morphometry on immunoperoxidase-stained sections, using a point grid to obtain the number of intercepts over  $\alpha$ -SMA and desmin positive cells over the tissue. Fourteen fields were counted in each liver (n = 6 per group). All measurements were performed by two blinded observers. The relative volume was calculated by dividing the number of points over that particular cell type by the total number of points over liver tissue. Results are normalized to vehicle.

#### Fibrosis markers expression

Hepatic protein expression of  $\alpha$ -SMA was determined by Western blot in hepatic samples using a mouse antibody against  $\alpha$ -SMA (Sigma).

#### Collagen 1, $\alpha$ -SMA, TGF $\beta$ , NF $\kappa$ B, MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 gene expression

Hepatic gene expression of all genes was assessed by real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction using predesigned gene expression assays obtained from Applied Biosystems (AB, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocol and reported relative to endogenous control GAPDH. All PCR reactions were performed in duplicate and using nuclease-free water as no template control.

#### Effects of resveratrol on $\alpha$ -SMA and procollagen I gene expression, and Bad protein expression in hepatic stellate cells

To study the effect of resveratrol treatment on HSC, we used the immortalized humane stellate cell line LX2 (kindly provided by Dr. Bataller), which has been previously well characterised [31]. LX2 were seeded onto p35 plates at density of 150,000 per plate in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin, and 1% streptomycin and cultured overnight. Resveratrol was added at concentration of 10 or 50  $\mu$ M to subconfluent cultures of LX2 for 24 h.

$\alpha$ -SMA and procollagen I gene expression was determined by real-time PCR using predesigned gene expression assays obtained from Applied Biosystems according to the manufacturer's protocol and reported relative to endogenous control 18S as indicated above.

Protein expression of Bad, a proapoptotic member of the Bcl-2 gene family, which is involved in initiating apoptosis, was determined by Western blot using a rabbit antibody against Bad (Cell Signaling Technology).

#### Effects of resveratrol on CD68 expression in cirrhotic rat livers

Livers were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin-eosin (H&E). For CD68, that is typically expressed by infiltrating inflammatory cells [32], immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with a mouse anti-CD68 antibody diluted (1:100; Serotec, Kidlington, UK), as described above. The number of CD68-positive cells was quantified using AxioVision software.

#### Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS 19.0 (IBM) for Windows statistical package. All results are expressed as mean  $\pm$  SD unless otherwise specified in figure legends. Comparisons between two groups were performed with the Student t-

test for unpaired data, or Mann-Whitney test when assumptions of normality could not be verified. The ANOVA test for repeated measurements was used if appropriate. Significance was set at the 0.05 level.

## Results

### Effect of resveratrol on hepatic and systemic hemodynamics in cirrhotic rats

Cirrhotic rats receiving long-term treatment with resveratrol (10 mg/kg bw/day) had a significantly lower PP than cirrhotic rats treated with vehicle (12.1  $\pm$  0.9 vs. 14.3  $\pm$  2.2 mmHg; p = 0.02), corresponding to a PP reduction of 15%. No significant changes in PBF, SMABF, MAP or HR were observed (Table 1). Intrahepatic vascular resistance was lower in resveratrol-treated rats, although the difference did not reach statistical significance.

### Effect of resveratrol on endothelial function in cirrhotic rat livers

To further characterize the effects of resveratrol on liver vasculature, livers from cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle were isolated and perfused. As expected, livers from cirrhotic rats treated with vehicle exhibited endothelial dysfunction, as shown by the reduced vasorelaxation in response to 10<sup>-7</sup> M Ach and by a paradoxical vasoconstriction at the 10<sup>-6</sup> M, and 10<sup>-5</sup> M dose. Resveratrol administration improved hepatic vasorelaxation, indicating an amelioration of endothelial dysfunction (Fig. 1A).

### Effect of resveratrol on O<sub>2</sub> levels in cirrhotic rat livers

Resveratrol administration produced a significant decrease in O<sub>2</sub> levels, as shown by DHE fluorescence, demonstrating its antioxidant effect. To evaluate whether part of this effect was due to an upregulation of the reduced SOD activity of cirrhotic rat livers, SOD activity in vehicle and resveratrol-treated cirrhotic rats was measured. No differences in SOD activity were observed between both groups (Fig. 1B).

### Effect of resveratrol on TXB<sub>2</sub> production

Resveratrol resulted in a significant decrease in hepatic TXB<sub>2</sub> production compared to vehicle (0.15  $\pm$  0.05 vs. 1  $\pm$  0.6 normalized arbitrary units; 85% reduction; p < 0.01) (Fig. 1C).

### Effect of resveratrol on NO pathway

No significant differences in eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser 1176 were observed among livers from cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle. Moreover, no significant differences in cGMP content (a marker of NO bioavailability) were observed (Fig. 1D).

### Effects of resveratrol in sinusoidal endothelial cells

Resveratrol administration promoted a significant increase in NO in CH-SEC (Fig. 2A). On the other hand, resveratrol significantly attenuated the increase in TXA<sub>2</sub> levels induced by AA administration in CH-SEC (Fig. 2B).



**Table 1. Effects of resveratrol (10 mg/kg bw/day) administration on hepatic and systemic hemodynamics in cirrhotic rats.**

Parameter	Vehicle n = 8	Resveratrol n = 8	p value
PP (mmHg)	14.3 ± 2.2	12.1 ± 0.9*	0.02
MAP (mmHg)	94 ± 18	94 ± 16	0.98
PBF (ml/min)	12.9 ± 4.2	12.9 ± 3.1	0.99
SMABF (ml/min)	11.9 ± 1.9	11.3 ± 2.1	0.57
HR (beats/min)	313 ± 56	326 ± 40	0.59

Results are expressed as mean ± SD.

\*p = 0.02.

PP, portal pressure; MAP, mean arterial pressure; PBF, portal blood flow; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; HR, heart rate.

*Effect of resveratrol on hepatic fibrosis and hepatic stellate cells*

As expected, cirrhotic rats had a marked architectural distortion with abundant fibrosis. Rats receiving resveratrol exhibited a significant reduction in hepatic fibrosis, as proved by a decreased fibrosis area on Sirius Red stained liver sections (Fig. 3A). This was associated with a significant reduction in collagen I and the profibrogenic factors *NFκB* and *TGFβ* mRNA expression (Fig. 3B top panel). Moreover, a marked decrease in α-SMA, a surrogate marker of hepatic stellate cell activation, gene (Fig. 3B) and protein (Fig. 3A and C) expression was observed together with a profound decline in desmin expression (Fig. 3A), thus suggesting that the decrease in HSC activation may be mostly due to the consequence of apoptosis of activated HSC. On the other

hand, no differences in MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 were observed among both groups (Fig. 3B, bottom panel).

To further explore the role of resveratrol on hepatic stellate cells, we performed *in vitro* experiments with LX2. As shown in Fig. 4, resveratrol produced a significant reduction in procollagen I and α-SMA gene expression in LX2 (Fig. 4A) and an increase in Bad expression (Fig. 4B).

All together, these results support that resveratrol markedly reduces hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis.

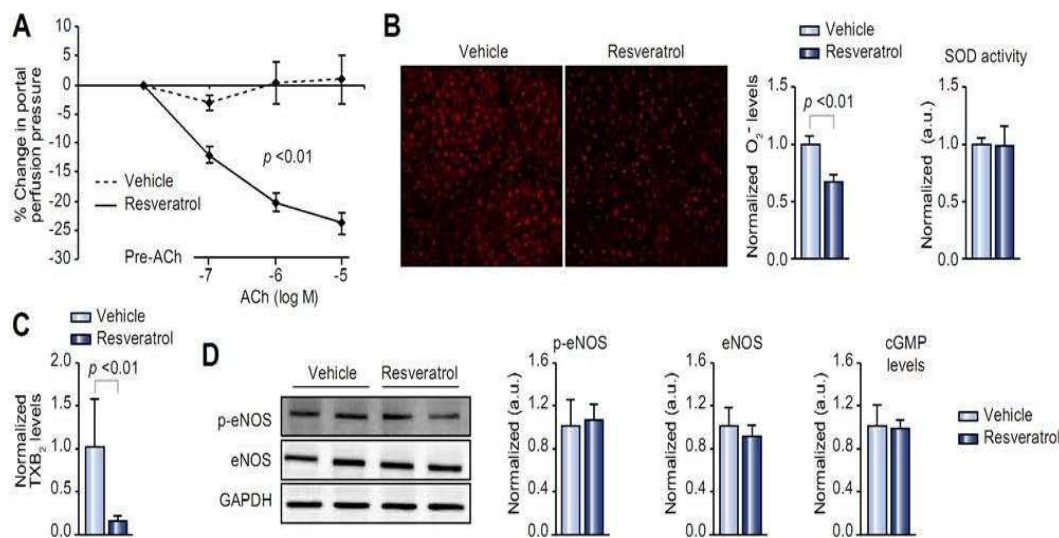
*Effects of resveratrol on CD68 expression in cirrhotic rats*

Using histological analyses as well as immunohistochemistry for CD68, we found that resveratrol attenuated the inflammatory infiltration (34% decrease) in cirrhotic rat livers (Supplementary Fig. 1).

*Effects of 20 mg/kg bw/day of resveratrol*

Cirrhotic rats treated with a double dose of resveratrol also showed a significantly lower PP than cirrhotic rats treated with vehicle (11.6 ± 2.2 vs. 14.7 ± 1.8 mmHg; p < 0.05), similar to what observed in rats treated with the 10 mg/kg bw/day dose. Treatment with 20 mg/kg bw/day of resveratrol also did not reduce MAP (90 ± 15 mmHg vs. 91 ± 20 mmHg in rats treated with vehicle) (Table 2).

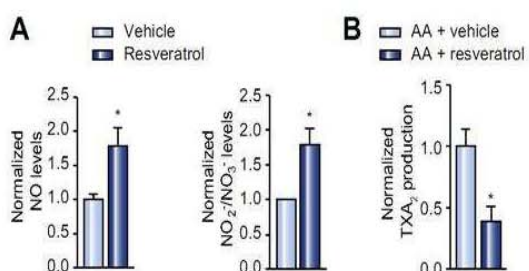
Rats receiving 20 mg/kg bw/day of resveratrol exhibited a marked and similar reduction in collagen deposition, collagen I mRNA expression and α-SMA protein expression to those receiving the 10 mg/kg bw/day dose (Supplementary Fig. 2).



**Fig. 1. Effect of resveratrol on endothelial dysfunction.** (A) Endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine (ACh) in isolated and perfused livers from CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. Animals were treated with 10 mg/kg bw/day of resveratrol (n = 6) or vehicle (n = 7). Results are expressed as the percentage change of PP in response to ACh and presented as mean ± SEM. Resveratrol administration significantly improved the impaired vasodilatory response to ACh in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat livers. (B) Effect of resveratrol on superoxide levels in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. (Left panel) Representative confocal microscopy images of *in situ* intrahepatic detection of O<sub>2</sub><sup>-</sup> with dihydroethidium, in fresh liver sections from cirrhotic rats treated with resveratrol (10 mg/kg bw/day; n = 2) or vehicle (n = 2). (Right panel, left) DHE fluorescence intensity analysis showed a marked and significant reduction in intrahepatic O<sub>2</sub><sup>-</sup> in cirrhotic rats treated with resveratrol. Values are represented as arbitrary units (AU) normalized to vehicle livers ± SEM. (Right) Total SOD activity determined in liver homogenates from cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle. (C) TXB<sub>2</sub> production in resveratrol (n = 6) or vehicle-treated (n = 7) CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat livers. Values represent mean ± SEM. (D) Effect of resveratrol on NO pathway. (Right panel) Representative Western blot image of p-eNOS and total eNOS in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rat livers treated with vehicle or resveratrol. (Left panel) Densitometry analysis of eNOS and p-eNOS (n = 4 per group). Values represent arbitrary units normalized to GAPDH/vehicle livers. Intrahepatic cGMP levels in cirrhotic rats chronically treated with resveratrol or vehicle. Values represent arbitrary units normalized to vehicle livers. No significant differences in cGMP levels were observed (n = 8 per group). (This figure appears in color on the web.)



Research Article



**Fig. 2. Effects of resveratrol in sinusoidal endothelial cells.** (A) (Left panel) Fluorescent detection of intracellular nitric oxide (NO) in sinusoidal endothelial cells (SEC) isolated from cirrhotic rat livers (CH-SEC). Fluorescence intensity of DAF-FM-DA in arbitrary units was normalized to the total number of cells. The data shown are from 4888 individual resveratrol- and 4081 vehicle-treated CH-SEC obtained from three different experiments. (Right panel) NOx production in SEC supernatants (n = 12 per group). Resveratrol promoted a significant increase in NO bioavailability. \*p < 0.01 vs. vehicle-treated CH-SEC. (B) Thromboxane (TXA<sub>2</sub>) production by SEC from cirrhotic rats stimulated with AA in the presence or absence of resveratrol (n = 12 per group). In SEC-CH, resveratrol treatment produced a significant decrease in TXA<sub>2</sub> (~80%). \*p < 0.05.

Discussion

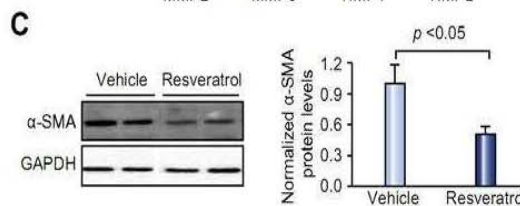
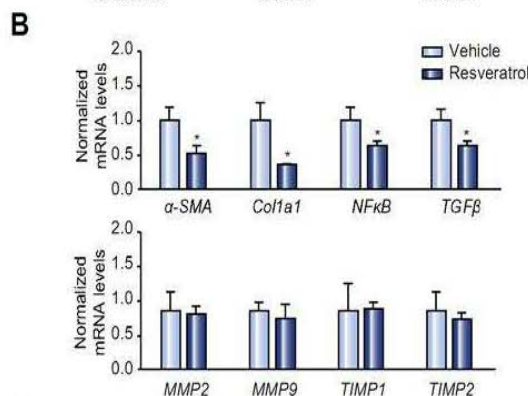
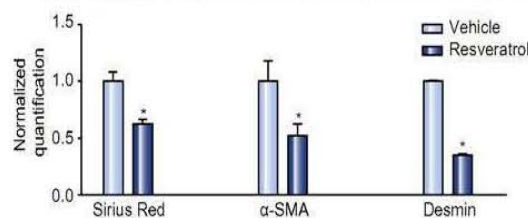
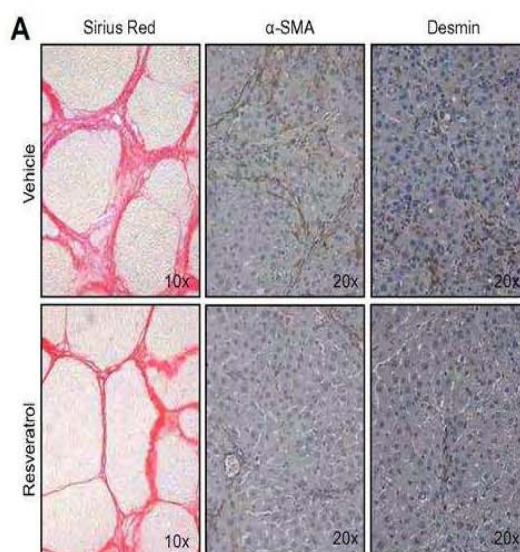
In cirrhosis, an increase in hepatic vascular resistance to portal blood flow is the primary factor in the development of portal hypertension [3]. Therefore, it is of great interest to develop therapeutic strategies aimed at decreasing portal pressure by reducing hepatic vascular resistance.

Resveratrol is a natural substance with many biological functions; among others, it induces antioxidant enzymes, increases NO bioavailability and inhibits the production of inflammatory factors [33].

The main finding of the present study is that in established cirrhotic rats with severe portal hypertension, the oral administration of resveratrol for two weeks reduces portal pressure, without affecting portal blood flow, indicating an effective reduction in hepatic vascular resistance. This beneficial effect on portal pressure was confirmed when a double dose of resveratrol was used. Remarkably, the beneficial effect of resveratrol on portal pressure occurred in the absence of deleterious effects on systemic hemodynamics, as shown by the absence of significant changes in mean arterial pressure, heart rate and superior mesenteric artery blood flow.

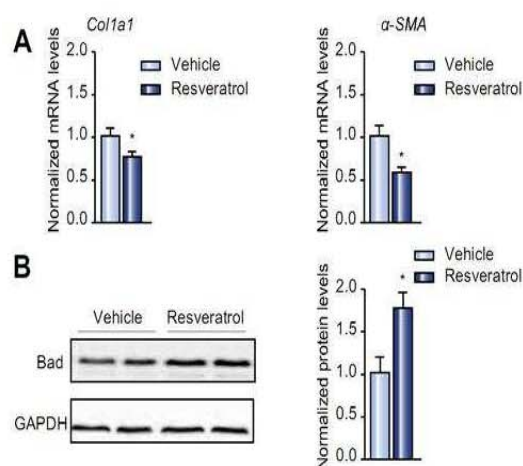
Our results further suggest that the reduction in hepatic resistance induced by resveratrol was the result of both amelioration of the liver architectural abnormalities and an improvement in endothelial dysfunction. Indeed, resveratrol significantly reduced liver fibrosis, as shown by the reduction in fibrosis area on Sirius Red stained liver sections and the decrease in collagen I mRNA expression, an effect that was not observed in cirrhotic rats treated with vehicle, demonstrating that this was due to an enhancement by resveratrol of the regression of fibrosis that occurs after ceasing CCl<sub>4</sub> administration. Our results showing a decline in both desmin and α-SMA expression in liver tissue suggests that a decrease in HSC activation may be mostly due to the consequence of apoptosis of activated HSC. This suggestion is further supported by our findings in LX2 cells showing that resveratrol significantly decreases collagen I and α-SMA gene expression in association with an increase in Bad protein expression, a marker of apoptosis induction.

It has been well documented that a reduction of oxidative stress can deactivate mechanisms leading to liver fibrosis [34].



**Fig. 3. Effect of resveratrol (10 mg/kg bw/day) on hepatic fibrosis in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats.** (A) (Top panel) Representative histological images (staining with Sirius Red) and immunohistochemistry (α-SMA and desmin staining) of liver: from resveratrol- or vehicle-treated CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats. (Bottom panel) Quantification of liver fibrosis (Sirius Red staining area per total area, and α-SMA and desmin relative volume) in cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle. Values represent arbitrary units normalized to vehicle livers. (B) α-SMA, Col1a1, NFκB, TGFβ, MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 mRNA expression levels in livers from cirrhotic rats treated with resveratrol or vehicle. Values are normalized to the expression of vehicle-treated livers. (C) (Left panel) Representative Western blot analysis for α-SMA in livers from vehicle (n = 7) or resveratrol-treated (n = 7) CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats. (Right panel) Densitometry quantification of α-SMA in cirrhotic livers treated with resveratrol and vehicle. Values represent arbitrary unit normalized to vehicle livers. \*p < 0.05. (This figure appears in color on the web.)





**Fig. 4.** Effects of resveratrol on hepatic stellate cells *in vitro*. (A) Relative  $\alpha$ -SMA and *Col1a1* mRNA levels in LX2 treated with resveratrol ( $n = 12$ ) or vehicle ( $n = 12$ ) normalized to an endogenous reference gene (*18S*). Values (mean  $\pm$  SEM) are normalized to vehicle-treated LX2 cells. (B) (Left panel) Representative Western blot analysis for Bad in LX2 treated with resveratrol ( $n = 7$ ) or vehicle ( $n = 7$ ). (Right panel) Densitometry quantification of Bad in cirrhotic livers treated with resveratrol and vehicle. Values represent arbitrary units normalized to vehicle livers. \* $p < 0.05$ .

**Table 2.** Effects of resveratrol (20 mg/kg bw/day) administration on hepatic and systemic hemodynamics in cirrhotic rats.

Parameter	Vehicle $n = 8$	Resveratrol $n = 9$	$p$ value
PP (mmHg)	14.7 $\pm$ 1.7	11.6 $\pm$ 2.1*	0.01
MAP (mmHg)	91 $\pm$ 21	89 $\pm$ 15	0.86
HR (beats/min)	316 $\pm$ 17	347 $\pm$ 40	0.06

Results are expressed as mean  $\pm$  SD.

\* $p = 0.01$ .

PP, portal pressure; MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

Therefore, we could speculate that, in our setting, the antifibrotic effect of resveratrol may be due, at least partly, to its anti-oxidant activity [35]. Indeed, it has been shown that resveratrol inhibits the activation of NF-kappaB, which promotes the transcription of several cytokines, including the pro-fibrogenic TGF $\beta$  [18,36,37]. In that regard, we have also demonstrated that resveratrol treatment produces a significant reduction in NF $\kappa$ B and TGF $\beta$  gene expression, suggesting that resveratrol is able to reduce fibrosis by reducing profibrogenic stimuli in cirrhotic rat livers. Whatever the mechanism, these effects on liver fibrosis were not boosted by higher doses of resveratrol, since similar reductions in fibrosis were observed with 10 and 20 mg/kg bw/day.

Cirrhotic livers of rats treated with resveratrol had a reduction in O $_2^-$  levels. Resveratrol itself, as a polyphenolic compound, has been shown to scavenge hydroxyl, O $_2^-$  and other radicals [38,39]. Moreover, resveratrol has also indirect antioxidant effects by upregulating different endogenous cellular antioxidant systems, such as SOD, catalase, and glutathione peroxidase, and by inhibition of enzymatic systems involved in ROS formation, like NAPDH oxidase [40,41]. Although decreased scavenging of O $_2^-$  by diminished SOD activity has been reported as one of the causes of the increased oxidative stress in cirrhotic livers [24], we did not find any effect of resveratrol treatment on SOD activity. Therefore, we think that what observed is a direct antioxidant

effect of resveratrol although we cannot exclude that other mechanisms, different from SOD activity increase, could be implicated.

Resveratrol administration also improved endothelial dysfunction. We have previously demonstrated that reduced NO bioavailability and a COX-1-dependent increase in TXA $_2$  are the main factors mediating the endothelial dysfunction of cirrhotic rat livers [5,42,43]. Resveratrol has been shown to act as a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 [15] and, in agreement with that, we found that resveratrol markedly inhibited TXA $_2$  production in whole tissue. We also observed that resveratrol could attenuate the increase in TXA $_2$  levels induced by AA administration in SEC-CH, confirming the role of COX-1-derived prostanoids in the improvement of endothelial dysfunction by resveratrol. In addition, resveratrol treatment promoted a significant increase in NO bioavailability in endothelial cells isolated from cirrhotic livers. Taken together, these results suggest that resveratrol may improve endothelial dysfunction by increasing endothelial NO and reducing endothelial TXA $_2$ . Besides, it is highly likely that the improvement in liver fibrosis produced by resveratrol itself may play a major role in the recovery of endothelial function.

Furthermore, we herein show that resveratrol reduces the number of CD68-positive cells (34% decrease) in cirrhotic livers. This finding is in agreement with a published study showing that resveratrol may attenuate inflammatory infiltration [37], an effect that may represent an additional benefit of resveratrol treatment.

In conclusion, our data show that chronic resveratrol administration to cirrhotic rats reduces portal pressure both by causing a regression of liver fibrosis and by correcting hepatic endothelial dysfunction, without affecting systemic hemodynamics. Due to these properties and its low toxicity, resveratrol, which is widely available, may be a useful supplement in the treatment of patients with cirrhosis and portal hypertension.

#### Financial support

This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2010/17043) and from the Instituto de Salud Carlos III (ACI 2009-0938 and FIS PS09/01261), Spain. Jorge Gracia-Sancho has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad. Ciberehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

#### Conflict of interest

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

#### Acknowledgements

Part of this work was carried out at the Esther Koplowitz Centre, Barcelona.

The authors thank Héctor García and Montse Monclús for experienced technical assistance.

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.012>.



Research Article

References

- [1] Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-567.
- [2] Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-351.
- [3] Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2007;46:193-197.
- [4] Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G763-G770.
- [5] Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, Abraldes JG, Rosello J, Bosch J, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;39:515-521.
- [6] Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4-cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009;58:118-125.
- [7] Garcia-Caldero H, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Divi M, Lavina B, Bosch J, et al. Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2010;54:660-665.
- [8] Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000;66:663-673.
- [9] Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res* 2003;523-524:145-150.
- [10] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004;24:2783-2840.
- [11] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995;235:207-219.
- [12] Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;106:1652-1658.
- [13] Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc* 2008;67:42-47.
- [14] Xu Q, Hao X, Yang Q, Si L. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:389-394.
- [15] Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem* 2004;279:22727-22737.
- [16] Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:7101-7106.
- [17] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El MM, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007;80:1033-1039.
- [18] Chavez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, et al. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J Appl Toxicol* 2008;28:35-43.
- [19] Bishayee A, Darvesh AS, Politis T, McGory R. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver Int* 2010;30:1103-1114.
- [20] Ara C, Kirimlioglu H, Karabulut AB, Coban S, Ay S, Harputluoglu M, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. *J Surg Res* 2005;127:112-117.
- [21] Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V, Perez-Alvarez V, Muriel P. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl4 in the rat. *J Appl Toxicol* 2008;28:147-155.
- [22] Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al. 5-Lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;122:387-393.
- [23] Guillaume M, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Rosado E, Mancini A, Bosch J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4-cirrhotic rats. *J Hepatol* 2013;58:240-246.
- [24] Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248-1256.
- [25] Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;46:1040-1046.
- [26] Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;37:172-181.
- [27] Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220-227.
- [28] Rosado E, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Monclus M, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Interaction between NO and COX pathways modulating hepatic endothelial cells from control and cirrhotic rats. *J Cell Mol Med* 2012;16:2461-2470.
- [29] Rodriguez-Vilarrupla A, Lavina B, Garcia-Caldero H, Russo L, Rosado E, Roglans N, et al. PPARalpha activation improves endothelial dysfunction and reduces fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2012;56:1033-1039.
- [30] Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:475-483.
- [31] Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-151.
- [32] McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* 2000;46:260-269.
- [33] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506.
- [34] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
- [35] Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehrlirli AO, Demiralp E, Sener C, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep* 2012;39:4589-4596.
- [36] Lee ES, Shin MO, Yoon S, Moon JO. Resveratrol inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Arch Pharm Res* 2010;33:925-932.
- [37] Chan CC, Cheng LY, Lin CL, Huang YH, Lin HC, Lee FY. The protective role of natural phytoalexin resveratrol on inflammation, fibrosis and regeneration in cholestatic liver injury. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1841-1849.
- [38] Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:1017-1026.
- [39] Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 1997;61:2103-2110.
- [40] Li H, Xia N, Forstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide* 2012;26:102-110.
- [41] Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:406-412.
- [42] Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Mateu V, Bataller R, Abraldes JG, Bosch J, et al. Large-conductance calcium-activated potassium channels modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2008;28:566-573.
- [43] Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-931.





# **RESUM DE RESULTATS**



### **4.1 Estudi 1: Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces intrahepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats.**

- Les CES (cèl·lules endotelials sinusoïdals) de rates control tractades amb un inhibidor específic de l'enzim SOD, presenten elevats nivells d'estrès oxidatiu que provoquen una disminució en la biodisponibilitat d'NO endotelial. Aquest fet és parcialment restaurat tractant-les amb Tempol.
- Les rates cirròtiques tractades amb Tempol presenten una disminució de l'estrès oxidatiu i un augment en la biodisponibilitat d'NO.
  - L'administració *in vivo* de Tempol a rates cirròtiques disminueix la pressió portal. Aquesta disminució s'associa a un augment del flux venós portal, que suggereix una disminució de la resistència vascular intrahepàtica. Malauradament la PAM (pressió arterial mitja) es troba significativament disminuïda.
  - L'administració prèvia de L-NAME, inhibidor específic de NOS, elimina completament els efectes del Tempol, suggerint que el seu mecanisme d'acció depèn de la via de l'NO.



### **4.2 Estudi 2: Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats.**

- L'administració de Resveratrol durant 15 dies amb una dosi de 10mg/kg/dia a rates cirròtiques amb hipertensió portal produeix un descens significatiu del 15% en la pressió portal sense cap modificació en el flux portal, suggerint una disminució de la resistència vascular intrahepàtica.
  - El tractament no produeix canvis significatius a nivell sistèmic. Aquests efectes es confirmen per un grup addicional de rates que va ser tractat durant 15 dies amb doble dosi de Resveratrol de 20mg/kg/dia.
  - Es produeix una millora significativa de la disfunció endotelial, avaluada per dosis creixents del vasodilatador depenent d'endoteli: Ach (acetilcolina) i disminueix marcadament la producció hepàtica de TXA<sub>2</sub> (tromboxà).
- L'administració de Resveratrol comporta una disminució significativa de l'estrès oxidatiu hepàtic, tot i que no es veu acompanyat d'un augment en la biodisponibilitat d'NO ni es produeixen canvis significatius en la seva via de síntesi. Per altra banda, l'activitat de l'enzim SOD tampoc es veu modificada.
- El tractament amb Resveratrol disminueix la fibrosi hepàtica i l'activació de les HSC (cèl·lules hepàtiques estrellades).
  - Aquests efectes s'han confirmat en una línia cel·lular de cèl·lules estrellades humanes activades (LX2) i amb un grup addicional de rates que va ser tractat durant 15 dies amb doble dosi de Resveratrol de 20mg/kg/dia.

## RESUM DE RESULTATS

---

- L'administració de Resveratrol provoca un descens del 34% del infiltrat inflamatori produït durant el procés fibrotic.
- En CES (cèl·lules endotelials sinusoïdals) de rates cirròtiques l'administració de Resveratrol produeix un augment significatiu en la biodisponibilitat d'NO i atenua la producció de TXA<sub>2</sub>.

# **DISCUSSIÓ DELS RESULTATS**





## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

L'augment de la resistència vascular intrahepàtica es considera el principal factor que contribueix al desenvolupament de la hipertensió portal en la cirrosi hepàtica. Durant molt de temps, aquest augment ha estat considerat com la única conseqüència en la distorsió de l'arquitectura vascular hepàtica causada per la malaltia, però fa uns anys es va demostrar que una part d'aquest augment era manipulable mitjançant fàrmacs (7). La disfunció endotelial és un dels mecanismes implicats en aquest augment i la baixa producció d'NO per les CES (cèl·lules endotelials sinusoïdals) sembla ésser el principal factor involucrat (43). Per tant, estratègies dirigides a augmentar la producció d'NO s'han demostrat que milloren la disfunció endotelial en animals (51, 52, 60-64) i en pacients cirròtics (125, 169, 176). Malauradament, els elevats nivells de ROS (espècies reactives d'oxigen) que acompanyen a la malaltia contribueixen a mantenir l'escassa producció d'NO (44, 177). El nostre laboratori va realitzar un estudi on per primer cop, es va demostrar que l'administració d'adenovirus ecSOD a rates cirròtiques amb hipertensió portal produïa un augment en l'activitat de l'enzim SOD, el que conduïa a una disminució dels nivells d' $O_2^{\bullet-}$  intrahepàtics i un augment en la biodisponibilitat d'NO, així com una disminució en la pressió portal (126). Tot i això, les teràpies virals presenten controvèrsies en els éssers humans i els seus efectes s'extingeixen al cap de poques setmanes de l'administració. No obstant, aquest estudi va suggerir que una teràpia antioxidant podria ser utilitzada com alternativa interessant per a tractar la hipertensió portal en la cirrosi.

Conseqüentment, els objectius dels treballs d'investigació presentats en la present tesi doctoral es varen enfocar en cercar estratègies antioxidants alternatives amb aplicació clínica i avaluar el seu paper en altres mecanismes fisiopatològics implicats en el desenvolupament de la hipertensió portal com és el procés fibrotic.

## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

Els resultats del **primer estudi** demostren que l'administració aguda del mimètic de l'enzim SOD: Tempol és capaç de disminuir els nivells d' $O_2^-$  en els fetges cirròtics i, aquesta disminució va acompanyada d'un augment en la biodisponibilitat d'NO. Aquests resultats són similars als obtinguts en l'estudi previ on es va administrar l'adenovirus codificant per la isoforma ecSOD a rates cirròtiques amb hipertensió portal (126), demostrant així l'eficàcia del tempol en els fetges cirròtics. De la mateixa manera, resultats similars s'han descrit en la diabetes mellitus (145), en la insulino-resistència (129), en patologies cardiovasculars (131, 178) i en casos d'isquèmia-reperfusió cerebral (130, 132, 179, 180).

El gran poder antioxidant del Tempol es va demostrar amb la inhibició específica de l'enzim SOD en CES ja que va ser capaç de disminuir els nivells d' $O_2^-$  i, restaurar parcialment, la biodisponibilitat d'NO.

En aquest estudi es demostra que en rates sanes el Tempol no provoca canvis sistèmics ni hemodinàmics. Pel contrari, en rates cirròtiques amb hipertensió portal l'administració aguda de Tempol condueix a una disminució significativa de la pressió portal associada amb un augment significatiu del flux portal suggerint així, la disminució en la resistència vascular intrahepàtica. De la mateixa manera, s'observa una disminució significativa de la pressió arterial sistèmica que, juntament amb l'augment del flux portal suggereix que el Tempol no només juga un paper important a nivell intrahepàtic, sinó que també ho fa a nivell sistèmic. Els efectes del Tempol queden totalment anul·lats quan s'inhibeix NOS amb l'inhibidor específic: L-NAME demostrant així, que els efectes observats depenen de la via de l'NO.

És conegut que l' $H_2O_2$  pot actuar com agent vasodilatador o vasoconstrictor segons el territori vascular i les condicions experimentals (181, 182) i que l'administració de Tempol pot

## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

augmentar transitòriament els nivells vasculars d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que afavoreixen la vasodilatació (182, 183). Per tant, no es pot obviar que l'augment en la biodisponibilitat d'NO i l'acumulació d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puguin estar implicats en la disminució de la pressió arterial sistèmica que s'observa en les rates cirròtiques tractades amb Tempol. Tenint en compte això, el Tempol podria estar afavorint la hipotensió arterial que, juntament amb la circulació hiperdinàmica associada a la cirrosi i la hipertensió portal reforça la idea que les teràpies adients per augmentar la biodisponibilitat d'NO han d'anar dirigides exclusivament al teixit hepàtic (40, 63, 184, 185).

El **segon estudi** s'ha dut a terme amb un compost d'origen natural amb un elevat potencial antioxidant anomenat Resveratrol. Es pot administrar fàcilment per via oral i actua sobre diferents mecanismes fisiopatològics involucrats en el desenvolupament de la hipertensió portal (148).

L'administració de Resveratrol en rates cirròtiques amb hipertensió portal durant dues setmanes ha produït una disminució en la pressió portal sense cap modificació en el flux portal, suggerint així una disminució en la resistència vascular intrahepàtica. Cal destacar, que aquests efectes beneficiosos s'han produït en absència de canvis significatius a nivell sistèmic (pressió arterial, ritme cardíac i flux esplàncnic).

El tractament ha reduït significativament la fibrosi hepàtica, ja que els fetges d'aquelles rates que han rebut Resveratrol presenten menys quantitat de fibra respecte els fetges de les rates tractades amb vehicle. A més, aquest fet s'associa amb la reducció de l'expressió gènica de col·lagen I i els factors pro-fibrogenics NFκB i TGF-β. Per altra banda, la disminució en l'expressió gènica i proteica del principal marcador d'activació de les HSC (cèl·lules hepàtiques estrellades): α-SMA i, al mateix temps, la disminució del marcador endògen

## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

d'HSC: desmina, suggereix que la reducció de fibra i components de fibrogènesi pot ser conseqüència de l'apoptosi de les HSC que estan activades. Aquest resultat es confirma *in vitro* amb LX2, una línia cel·lular immortal creada a partir de HSC humanes que presenten un fenotip similar a les HSC activades *in vivo* (186). En aquestes cèl·lules s'observa que aquelles tractades amb Resveratrol presenten una disminució significativa de l'expressió gènica de col·lagen I i  $\alpha$ -SMA respecte les tractades amb vehicle que s'associa amb un augment del marcador d'apoptosi cel·lular: Bad. Per altra banda, el tractament amb Resveratrol també millora la inflamació hepàtica causada pel desenvolupament de la malaltia, tal com demostra la disminució del marcador d'inflamació CD68 (187). Per tant, es pot hipotetitzar que la regressió en la fibrosi hepàtica i la millora de la disfunció endotelial podrien explicar la disminució de la resistència vascular intrahepàtica provocada pel tractament. En tot cas, l'efecte observat no es potencia amb el doble de dosi.

El Resveratrol, com a polifenol, elimina l'anió  $O_2^{\bullet-}$  i altres radicals (188, 189) però a més, indirectament produeix un augment en l'activitat dels principals sistemes antioxidants: SOD, CAT, glutatió peroxidasa (GSH) i la inhibició de sistemes enzimàtics implicats en la generació de ROS com és la NADPH oxidasa (190, 191). En aquest estudi, el Resveratrol ha confirmat el seu poder antioxidant disminuint els nivells intrahepàtics d' $O_2^{\bullet-}$ , no obstant aquest resultat no s'acompanya d'un augment en l'activitat enzimàtica de l'enzim SOD tal com fins ara, s'havia demostrat al nostre laboratori (44). Això fa pensar que, donat el seu ampli espectre d'acció, altres mecanismes diferents que contribueixen a l'augment de l'activitat enzimàtica de la SOD, hi puguin estar implicats.

Estudis pioners del nostre laboratori han demostrat que la reduïda biodisponibilitat d'NO i l'augment en els nivells de tromboxà ( $TXA_2$ ), produïts per la via de COX-1, són els principals factors que modulen

## DISCUSSIÓ DE RESULTATS

---

la disfunció endotelial en els fetges de rates cirròtiques amb hipertensió portal (43, 192, 193). Per altra banda, el Resveratrol s'ha demostrat que inhibeix l'activitat peroxidasa de COX-1 (158). El tractament crònic amb Resveratrol ha produït una disminució intrahepàtica i cel·lular dels nivells de TXA<sub>2</sub>, confirmant el paper de COX-1 en la producció de prostanoids i en la millora de la disfunció endotelial. A més, cal remarcar que el Resveratrol ha produït un augment cel·lular en la biodisponibilitat d'NO endotelial. Per tant, aquests resultats suggereixen que el Resveratrol millora la disfunció endotelial augmentant la biodisponibilitat d'NO i disminuint la síntesi de tromboxà.

El tractament crònic ha demostrat una millora generalitzada en la hipertensió portal i al mateix temps ha confirmat la relació entre els sistemes COX i NO (34). Però el fet més destacat és la notable millora de l'endoteli vascular reduint el procés fibrotic i provocant un augment en la biodisponibilitat de l'NO endotelial. Es pot especular que la inhibició del procés fibrotic estigui mediat, en part, per l'activitat antioxidant del Resveratrol (194). No obstant, recolzant aquests resultats, un estudi posterior dut a terme al nostre laboratori, ha demostrat que la millora de l'endoteli també comporta una millora en les cèl·lules hepàtiques estrellades de forma paracrina, provocant una millora en la fibrosi hepàtica (195).

Els resultats d'aquest estudi demostren per primer cop, que l'administració crònica de Resveratrol a rates cirròtiques amb hipertensió portal aconsegueix disminuir la pressió portal mitjançant la regressió del procés fibrotic i millora la disfunció endotelial augmentant la biodisponibilitat d'NO sense produir canvis a nivell sistèmic.



# CONCLUSIONS





## CONCLUSIONS

---

- L'administració de Tempol a rates cirròtiques amb hipertensió portal disminueix l'estrès oxidatiu i augmenta la biodisponibilitat intrahepàtica d'NO.
- El tractament amb Tempol produeix un descens significatiu en la pressió portal com a conseqüència d'una millora en la circulació intrahepàtica.
- El tractament amb Tempol ha produït efectes sistèmics demostrant que no actua exclusivament a nivell intrahepàtic.
- El tractament crònic amb Resveratrol a rates cirròtiques amb hipertensió portal disminueix la pressió portal provocant la regressió en el procés fibrotic i inflamatori.
- L'administració del Resveratrol produeix una millora en el to vascular hepàtic sense canvis a nivell sistèmic.



**EPÍLEG**



Ens els darrers anys s'han dut a terme un gran nombre d'estudis que han permès identificar diferents mecanismes implicats en el desenvolupament de la hipertensió portal. Malauradament, a data d'avui la única cura definitiva segueix essent el transplantament hepàtic en casos d'extrema gravetat i, l'administració d'agents  $\beta$ -bloquejants per prevenir complicacions de la malaltia com el sagnat per varius esofàgiques. En la darrera dècada s'ha postulat l'administració d'estatines per la millora de l'endoteli vascular hepàtic mitjançant el factor de transcripció: KLF2, el qual es troba àmpliament expressat en el fetge cirròtic i regula un gran nombre de mecanismes (196, 197). La simvastatina en concret ha demostrat aquest fet, (63, 198) mitjançant la millora del fenotip endotelial i la desactivació de les cèl·lules hepàtiques estrellades (195).

Per altra banda, l'interès en els flavonoids i les seves propietats antioxidants ha anat agafant força en el camp de la hipertensió portal. En la present tesi doctoral s'ha estudiat el Resveratrol, un polifenol natural que s'obté principalment per la ingesta de fruita, raïm i els seus derivats i, fruits secs. Altres flavonoids com els del cacau, presents a la xocolata negra, també han demostrat una millora en els malalts cirròtics (199).

Tot i que encara no es pot parlar d'un únic fàrmac per curar la malaltia, els treballs englobats en la present tesi doctoral i, els que han estat publicats paral·lelament suggereixen que el tractament adient pels malalts cirròtics podria ser aquell en que es combinés agents  $\beta$ -bloquejants amb estatines i, com a complement, una dieta sana i equilibrada rica en agents antioxidants.



# **REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES**





## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (1) Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):141-156.
- (2) Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992 Mar;21(1):1-14.
- (3) Groszmann RJ, Atterbury CE. The pathophysiology of portal hypertension: a basis for classification. *Semin Liver Dis* 1982 Aug;2(3):177-186.
- (4) Navasa M, Pares A, Bruguera M, Caballeria J, Bosch J, Rodes J. Portal hypertension in primary biliary cirrhosis. Relationship with histological features. *J Hepatol* 1987 Dec;5(3):292-298.
- (5) Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* 1985 Jul;5(4):643-648.
- (6) Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995 May;21(5):1238-1247.
- (7) Bathal PS, Grossmann HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;1:325-329.
- (8) Marteau P, Ballet F, Chretien Y, Rey C, Jaillon P, Poupon R. Effect of vasodilators on hepatic microcirculation: a study of the inhibition of norepinephrine-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1988 Mar;8(2):228-231.
- (9) Marteau P, Ballet F, Chazouilleres O, Chretien Y, Rey C, Petit D, et al. Effect of vasodilators on hepatic microcirculation in cirrhosis: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989 Jun;9(6):820-823.
- (10) Iredale J. Recent developments in targeting liver fibrosis. *Clin Med* 2008 Feb;8(1):29-31.
- (11) Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006 Sep;45(3):429-438.
- (12) Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000 Apr;46(4):443-446.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (13) Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012 Jun 6;5 Suppl 1:S26.:S26.
- (14) Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-53.:S38-S53.
- (15) Kaneda K, Ekataksin W, Sogawa M, Matsumura A, Cho A, Kawada N. Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction. *Hepatology* 1998 Mar;27(3):735-747.
- (16) Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19(4):397-410.
- (17) Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005 Feb;115(2):209-218.
- (18) Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Aug;279(2):G245-G249.
- (19) Garcia-Pagan JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol* 2012 Aug;57(2):458-461.
- (20) Grossman HJ, Grossman VL, Bhathal PS. Enhanced vasoconstrictor response of the isolated perfused cirrhotic rat liver to humoral vasoconstrictor substances found in portal venous blood. *J Gastroenterol Hepatol* 1992 May;7(3):283-287.
- (21) Elliot AJ, Vo LT, Grossman VL, Bhathal PS, Grossman HJ. Endothelin-induced vasoconstriction in isolated perfused liver preparations from normal and cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 Apr;12(4):314-318.
- (22) Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007 Aug;47(2):220-227.
- (23) Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, et al. Carbon-Monoxide - An Endogenous Modulator of Sinusoidal Tone in the Perfused-Rat-Liver. *Journal of Clinical Investigation* 1995 Nov;96(5):2431-2437.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (24) Moller S, Gulberg V, Henriksen JH, Gerbes AL. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J Hepatol* 1995 Aug;23(2):135-144.
- (25) Ballet F, Chretien Y, Rey C, Poupon R. Differential response of normal and cirrhotic liver to vasoactive agents. A study in the isolated perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Jan;244(1):283-289.
- (26) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abrales JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003 Jan;37(1):172-181.
- (27) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al. 5-Lipoxygenase Inhibition Reduces Intrahepatic Vascular Resistance of Cirrhotic Rat Livers: A Possible Role of Cysteinyl-Leukotrienes. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):387-393.
- (28) Birney Y, Redmond EM, Sitzmann JV, Cahill PA. Eicosanoids in cirrhosis and portal hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003 Oct;72(1-2):3-18.
- (29) Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002 Aug 23;1(1):1.
- (30) Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* 2005 May;69(3):107-127.
- (31) Sellers MM, Stallone JN. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 May;294(5):H1978-H1986.
- (32) Yokoyama Y, Xu H, Kresge N, Keller S, Sarmadi AH, Baveja R, et al. Role of Thromboxane A2 in Early BDL-induced Portal Hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Nov 13;.
- (33) Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 Apr;288(4):G763-G770.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (34) Rosado E, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Monclus M, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Interaction between NO and COX pathways modulating hepatic endothelial cells from control and cirrhotic rats. *J Cell Mol Med* 2012 Oct;16(10):2461-2470.
- (35) Rosado E, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Tripathi D, Garcia-Caldero H, Bosch J, et al. Terutroban, A TP-receptor antagonist, reduces portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2013 May 23;10.
- (36) Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994 May;31(3):131-143.
- (37) Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997 Dec 1;100(11):2923-2930.
- (38) Pastor CM, Hadengue A. Shear stress modulates the vascular tone in perfused livers isolated from normal rats. *Hepatology* 2000 Oct;32(4 Pt 1):786-791.
- (39) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):109-142.
- (40) Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002 Feb;35(2):478-491.
- (41) Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994 Sep;267(3 Pt 1):G416-G422.
- (42) Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998 Feb;114(2):344-351.
- (43) Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998 Oct;28(4):926-931.
- (44) Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008 Apr;47(4):1248-1256.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (45) Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):522-531.
- (46) Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999 Nov;117(5):1222-1228.
- (47) Hendrickson H, Chatterjee S, Cao S, Ruiz MM, Sessa WC, Shah V. Influence of caveolin on constitutively activated recombinant eNOS: insights into eNOS dysfunction in BDL rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Sep;285(3):G652-G660.
- (48) Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001 Dec;299(3):818-824.
- (49) Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S. NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Dec 24;99(26):17167-17172.
- (50) Mookerjee RP, Wiesenthal A, Icking A, Hodges SJ, Davies NA, Schilling K, et al. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2007 Jun;132(7):2533-2541.
- (51) Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernandez M, Bosch J, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis. *Hepatology* 2006 Jul;44(1):44-52.
- (52) Matei V, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Three-day tetrahydrobiopterin therapy increases in vivo hepatic NOS activity and reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol* 2008 Aug;49(2):192-197.
- (53) Liu SL, Premont RT, Kontos CD, Zhu SK, Rockey DC. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nature Medicine* 2005 Sep;11(9):952-958.
- (54) Yang YY, Lee TY, Huang YT, Chan CC, Yeh YC, Lee FY, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) determines the improvement of hepatic endothelial dysfunction by vitamin E in cirrhotic rats. *Liver Int* 2012 Jan;32(1):48-57.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (55) Van de CM, Hosli M, Sagesser H, Reichen J. Intraportal administration of glyceryl trinitrate or nitroprusside exerts more systemic than intrahepatic effects in anaesthetised cirrhotic rats. *J Hepatol* 1999 Aug;31(2):300-305.
- (56) Navasa M, Chesta J, Bosch J, Rodes J. Reduction of portal pressure by isosorbide-5-mononitrate in patients with cirrhosis. Effects on splanchnic and systemic hemodynamics and liver function. *Gastroenterology* 1989 Apr;96(4):1110-1118.
- (57) Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, et al. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17;98(15):8897-8902.
- (58) Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003 Dec;39(6):940-946.
- (59) Moal F, Veal N, Vuillemin E, Barriere E, Wang J, Fizanne L, et al. Hemodynamic and antifibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 2006 Nov 7;12(41):6639-6645.
- (60) Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000 Mar;105(6):741-748.
- (61) Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, et al. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Nov;279(5):G1023-G1030.
- (62) Van de CM, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, et al. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002 Sep;51(3):440-445.
- (63) Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007 Feb 15;46:1040-1046.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (64) Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007 Jul;46(1):242-253.
- (65) Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 2008 Sep;57(9):1300-1314.
- (66) Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kvietys PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984 Nov;247(5 Pt 1):G486-G493.
- (67) Kravetz D, Bosch J, Arderiu MT, Pizcueta MP, Casamitjana R, Rivera F, et al. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1988 Mar;254(3 Pt 1):G322-G328.
- (68) Bruix J, Bosch J, Kravetz D, Mastai R, Rodes J. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1985 Feb;88(2):430-435.
- (69) Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Mourelle MI, Pique JM, Bosch J, et al. Acute and chronic cyclooxygenase blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996 May;110(5):1529-1535.
- (70) Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *Hepatology* 1999 Jun;29(6):1672-1679.
- (71) Fernandez M, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase activity in splanchnic organs from portal hypertensive rats: role in modulating mesenteric vascular reactivity. *Journal of Hepatology* 2001 Jun;34(6):812-817.
- (72) Battista S, Bar F, Mengozzi G, Zanon E, Grosso M, Molino G. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J Hepatol* 1997 Jan;26(1):75-80.
- (73) Pizcueta MP, Pique JM, Bosch J, Whittle BJ, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992 Jan;105(1):184-190.



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (74) Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993 Nov;18(5):1139-1143.
- (75) Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998 Dec;28(6):1467-1473.
- (76) Garcia-Pagan JC, Fernandez M, Bernadich C, Pizcueta P, Pique JM, Bosch J, et al. Effects of continued NO inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. *Am J Physiol* 1994 Dec;267(6 Pt 1):G984-G990.
- (77) Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, et al. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Jun;282(6):H2084-H2090.
- (78) Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993;104:1750-1754.
- (79) Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, St John J, et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996 Mar;270(3 Pt 2):F494-F499.
- (80) Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 1991 Feb;17(2):187-193.
- (81) Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999 Nov;104(9):1223-1233.
- (82) Salmeron JM, Ruiz dA, Gines A, Garcia-Pagan JC, Gines P, Feu F, et al. Renal effects of acute isosorbide-5-mononitrate administration in cirrhosis. *Hepatology* 1993 May;17(5):800-806.
- (83) Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988 Sep;8(5):1151-1157.



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (84) Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994 Nov;20(5):1359-1363.
- (85) Gines P, Martin PY, Niederberger M. Prognostic significance of renal dysfunction in cirrhosis. *Kidney Int Suppl* 1997 Oct;61:S77-82.:S77-S82.
- (86) Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. The role of central blood volume in the development of sodium retention in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1996 Jan;110(1):193-198.
- (87) Fallon MB, Abrams GA. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 2000 Oct;32(4 Pt 1):859-865.
- (88) Lockwood AH, Yap EW, Rhoades HM, Wong WH. Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991 Mar;11(2):331-336.
- (89) Fernandez-Esparrach G, Sanchez-Fueyo A, Gines P, Uriz J, Quinto L, Ventura PJ, et al. A prognostic model for predicting survival in cirrhosis with ascites. *J Hepatol* 2001 Jan;34(1):46-52.
- (90) Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004 Mar 16;555(Pt 3):589-606.
- (91) Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006 May;8(5-6):691-728.
- (92) Siedlik PH, Marnett LJ. Oxidizing radical generation by prostaglandin H synthase. *Methods Enzymol* 1984;105:412-416.
- (93) Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001 Aug;35(2):297-306.
- (94) Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003 Dec;42(6):1075-1081.
- (95) Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 1997 Mar 10;404(2-3):249-252.
- (96) Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002 Jan;82(1):47-95.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (97) Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003 Apr;111(8):1201-1209.
- (98) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Aug 4;95(16):9220-9225.
- (99) Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003 Jun;278(25):22546-22554.
- (100) Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1998 Nov 6;438(3):161-164.
- (101) Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, et al. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens* 2005 Jun;18(6):839-843.
- (102) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993 Jun;91(6):2546-2551.
- (103) Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61:1-31.:1-31.
- (104) Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004 Sep;44(3):248-252.
- (105) Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006 Jul 15;71(2):247-258.
- (106) Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2005 May;7(3):242-248.
- (107) Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006 Apr 4;113(13):1708-1714.
- (108) Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18(4):195-199.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (109) Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Mar 23;101(12):4003-4008.
- (110) Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans* 2006 Nov;34(Pt 5):965-970.
- (111) Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G847-G851.
- (112) Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005 Nov;22 Suppl 2:71-73.
- (113) Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S63-S74.
- (114) Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005 Nov;29(11 Suppl):110S-115S.
- (115) Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985 Dec;40(6):584-590.
- (116) Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988 Apr;81(4):1240-1246.
- (117) Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003 Nov;112(9):1383-1394.
- (118) Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 2011 Sep;106(5):735-747.
- (119) Paletta-Silva R, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 2013 Feb 7;14(2):3683-3704.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (120) Angermayr B, Fernandez M, Mejias M, Gracia-Sancho J, Garcia-Pagan JC, Bosch J. NAD(P)H oxidase modulates angiogenesis and the development of portosystemic collaterals and splanchnic hyperaemia in portal hypertensive rats. *Gut* 2007 Apr;56(4):560-564.
- (121) Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, Brandes RP, Fernandez M, Bosch J, et al. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007 Jan 9;133(3):959-966.
- (122) Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* 1999;31(4):261-272.
- (123) Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 1998 Sep;28(3):689-694.
- (124) Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, et al. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999 May;29(5):1358-1363.
- (125) Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Turnes J, Bellot P, Deulofeu R, Abraldes JG, et al. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 2006 Mar;43(3):485-491.
- (126) Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009 Jan;58(1):118-125.
- (127) Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45(4):287-306.
- (128) Banday AA, Marwaha A, Tallam LS, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes* 2005 Jul;54(7):2219-2226.
- (129) Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Francis J. Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Obesity (Silver Spring)* 2009 Nov;17(11):1994-2002.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (130) Kato N, Yanaka K, Hyodo K, Homma K, Nagase S, Nose T. Stable nitroxide Tempol ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2003 Jul 25;979(1-2):188-193.
- (131) Laskowski A, Woodman OL, Cao AH, Drummond GR, Marshall T, Kaye DM, et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2006 Oct 1;72(1):112-123.
- (132) Mehta SH, Webb RC, Ergul A, Tawfik A, Dorrance AM. Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Feb;286(2):R283-R288.
- (133) Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* 2008 Dec;60(4):418-469.
- (134) Krishna MC, Degraff W, Hankovszky OH, Sar CP, Kalai T, Jeko J, et al. Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. *J Med Chem* 1998 Aug 27;41(18):3477-3492.
- (135) Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Gao MT, Zheng RL. The relationship between structure and antioxidative activity of piperidine nitroxides. *J Pharm Pharmacol* 2006 Jul;58(7):941-949.
- (136) Onishi H, Morales MF. States of myosin subfragment-1 studied by catalyzed ascorbate reduction of bound spin label. *Arch Biochem Biophys* 1976 Jan;172(1):12-19.
- (137) Krishna MC, Grahame DA, Samuni A, Mitchell JB, Russo A. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Jun 15;89(12):5537-5541.
- (138) Dikalov S, Grigor'ev IA, Voinov M, Bassenge E. Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jul;248(2):211-215.
- (139) Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Samuni A, Rachmilewitz D. A Stable Nitroxide Radical Effectively Decreases Mucosal Damage in Experimental Colitis. *Gut* 1995 Sep;37(3):386-393.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (140) Mitchell JB, Degraff W, Kaufman D, Krishna MC, Samuni A, Finkelstein E, et al. Inhibition of Oxygen-Dependent Radiation-Induced Damage by the Nitroxide Superoxide-Dismutase Mimic, Tempol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991 Aug 15;289(1):62-70.
- (141) Yamada J, Yoshimura S, Yamakawa H, Sawada M, Nakagawa M, Hara S, et al. Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res* 2003 Jan;45(1):1-8.
- (142) Lang-Rollin IC, Rideout HJ, Noticewala M, Stefanis L. Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J Neurosci* 2003 Dec 3;23(35):11015-11025.
- (143) Gelvan D, Saltman P, Powell SR. Cardiac Reperfusion Damage Prevented by A Nitroxide Free-Radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991 Jun;88(11):4680-4684.
- (144) Tabakman R, Lazarovici P, Kohen R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *J Neurosci Res* 2002 May 15;68(4):463-469.
- (145) Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, et al. Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes* 2007 Dec;56(12):2927-2937.
- (146) Wei Y, Clark SE, Thyfault JP, Uptergrove GM, Li W, Whaley-Connell AT, et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats. *Am J Pathol* 2009 Apr;174(4):1329-1337.
- (147) Pirola L, Frojdo S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 2008 May;60(5):323-332.
- (148) Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 2008 Apr 15;7(8):1020-1035.
- (149) Brent C.Trela and Andrew L.Waterhouse. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *Journal of agricultural Foode Chemistry* 1996 Apr;44:1253-1257.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (150) Renaud S, de LM. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992 Jun;339(8808):1523-1526.
- (151) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006 Nov 16;444(7117):337-342.
- (152) Delmas D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 2005 May;49(5):377-395.
- (153) Fremont L. Biological effects of Resveratrol. *Life Sci* 2000 Jan 14;66(8):663-673.
- (154) Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of Resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004 Sep;24(5A):2783-2840.
- (155) Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-Resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995 Mar 31;235(2):207-219.
- (156) Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of Resveratrol. *Mutat Res* 2003 Feb;523-524:145-50.:145-150.
- (157) Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002 Sep 24;106(13):1652-1658.
- (158) Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem* 2004 May 21;279(21):22727-22737.
- (159) Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc* 2008 Feb;67(1):42-47.
- (160) Xu Q, Hao X, Yang Q, Si L. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Oct 16;388(2):389-394.



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (161) Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008 Dec 14;14(46):7101-7106.
- (162) Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El MM, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007 Feb;80(11):1033-1039.
- (163) Chavez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, et al. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J Appl Toxicol* 2008 Jan;28(1):35-43.
- (164) Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am* 2009 Jul;93(4):787-99, vii.
- (165) Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, et al. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference\*. *J Viral Hepat* 2011 Sep;18 Suppl 1:1-16. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01499.x.:1-16.
- (166) D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Semin Liver Dis* 1999;19(4):475-505.
- (167) Bosch J, Abraldes JG, Groszmann RJ. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003;38(suppl 1):S54-S68.
- (168) Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol* 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S131-S137.
- (169) Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004 Mar;126(3):749-755.
- (170) Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Ther* 2001 Mar;89(3):295-308.
- (171) Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 2004 Jul;3(3):86-92.



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (172) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001 Mar 27;103(12):1618-1623.
- (173) Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, et al. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia - Endothelial assessment of risk from lipids in youth (EARLY) trial. *Circulation* 2003 Sep 2;108(9):1059-1063.
- (174) Van de Castele M., Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003 Jan 10;2(1):2.
- (175) Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010 Sep;53(3):558-567.
- (176) Bellis L, Berzigotti A, Abraldes JG, Moitinho E, Garcia-Pagan JC, Bosch J, et al. Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003 Feb;37(2):378-384.
- (177) Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2007 Feb;46(2):193-197.
- (178) Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Nov;293(5):H2726-H2737.
- (179) Rak R, Chao DL, Pluta RM, Mitchell JB, Oldfield EH, Watson JC. Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia. *J Neurosurg* 2000 Apr;92(4):646-651.
- (180) Leker RR, Teichner A, Lavie G, Shohami E, Lamensdorf I, Ovadia H. The nitroxide antioxidant tempol is cerebroprotective against focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol* 2002 Aug;176(2):355-363.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (181) Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 2003 Feb 7;92(2):e31-e40.
- (182) Chen Y, Pearlman A, Luo Z, Wilcox CS. Hydrogen peroxide mediates a transient vasorelaxation with tempol during oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Oct;293(4):H2085-H2092.
- (183) Yada T, Shimokawa H, Morikawa K, Takaki A, Shinozaki Y, Mori H, et al. Role of Cu,Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric microcirculation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 Jan;294(1):H441-H448.
- (184) Bosch J. Decreasing hepatic vascular tone by liver-specific NO donors: wishful thinking or a promising reality? *J Hepatol* 2003 Dec;39(6):1072-1075.
- (185) Berzigotti A, Bellot P, De GA, Garcia-Pagan JC, Gagnon C, Spenard J, et al. NCX-1000, a Nitric Oxide-Releasing Derivative of UDCA, Does Not Decrease Portal Pressure in Patients With Cirrhosis: Results of a Randomized, Double-Blind, Dose-Escalating Study. *Am J Gastroenterol* 2009 Nov 17.
- (186) Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005 Jan;54(1):142-151.
- (187) McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* 2000 Feb;46(2):260-269.
- (188) Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Oct 3;309(4):1017-1026.
- (189) Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 1997;61(21):2103-2110.
- (190) Li H, Xia N, Forstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of Resveratrol. *Nitric Oxide* 2012 Feb 15;26(2):102-110.

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

---

- (191) Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by Resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Mar 7;367(2):406-412.
- (192) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, Abrales JG, Rosello J, Bosch J, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;39(4):515-521.
- (193) Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Matei V, Bataller R, Abrales JG, Bosch J, et al. Large-conductance calcium-activated potassium channels modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2008 Apr;28(4):566-573.
- (194) Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep* 2012 Apr;39(4):4589-4596.
- (195) Marrone G, Russo L, Rosado E, Hide D, Garcia-Cardena G, Garcia-Pagan JC, et al. The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J Hepatol* 2013 Jan 1;58(1):98-103.
- (196) Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, Garcia-Cardena G, Bosch J. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* 2011 Apr;60(4):517-524.
- (197) Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem* 2005 Jul 22;280(29):26714-26719.
- (198) Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Hide D, Marrone G, Guixemuntet S, Peralta C, et al. Simvastatin Maintains Function and Viability of Steatotic Rat Livers Procured for Transplantation. *J Hepatol* 2013 Feb 18;58(6):1140-1146.
- (199) De Gottardi A, Berzigotti A, Seijo S, D'Amico M, Thormann W, Abrales JG, et al. Postprandial effects of dark chocolate on portal hypertension in patients with cirrhosis: results of a phase 2, double-blind, randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2012 Sep;96(3):584-590.





