



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevos tratamientos contra la hipertensión portal en la cirrosis hepática experimental: 1. Nanopartículas de óxido de cerio y 2. Agonismo parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina

Denise Oró Bozzini

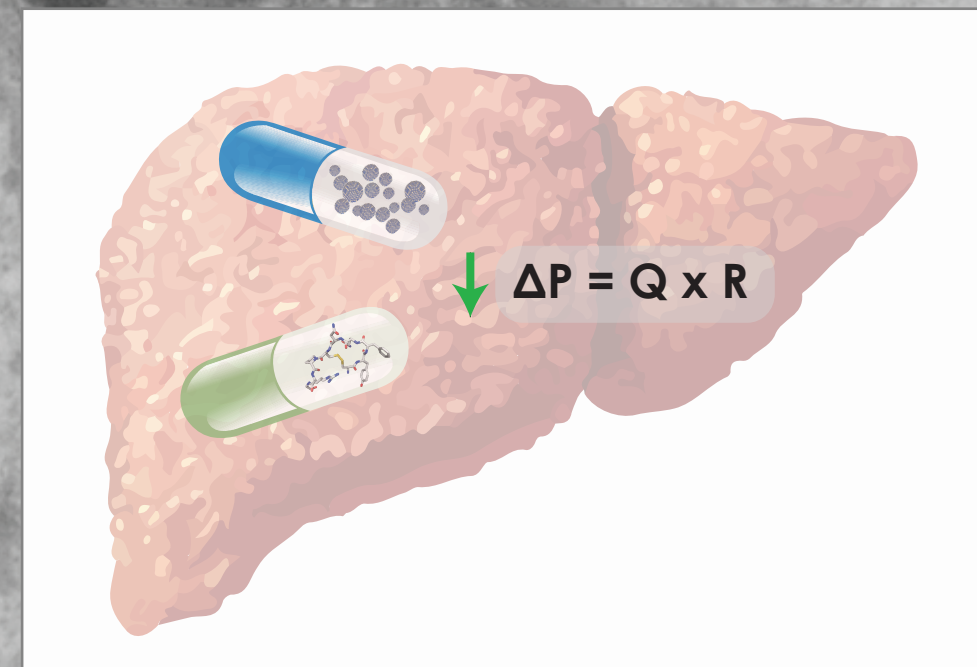
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual 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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.



- Nuevos tratamientos contra la hipertensión portal en la cirrosis hepática experimental:
1. Nanopartículas de óxido de cerio y
 2. Agonismo parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina.





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**NUEVOS TRATAMIENTOS CONTRA LA HIPERTENSIÓN PORTAL EN LA CIRROSIS
HEPÁTICA EXPERIMENTAL: 1. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CERIO Y 2.
AGONISMO PARCIAL DEL RECEPTOR V_{1a} DE LA VASOPRESINA**

Memoria presentada por

DENISE ORÓ BOZZINI

Para optar al título de Doctora Por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Departamento de Ciencias Fisiológicas I

Hospital Clínic - Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Tesis inscrita en el programa de doctorado: Medicina e Investigación Translacional

Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

A mis padres, hermanos y a Darío

ABREVIATURAS

$\cdot\text{CCl}_3$: Radical clorometilo.

ALT: Alanina aminotransferasa.

AST: Aspartato aminotransferasa.

ATF6: Factor-6 activador de la transcripción.

AVP: Vasopresina.

BDL: Ligadura del conducto biliar.

BiP o GPR78 o HSPA5: Proteína de unión a inmunoglobulina.

CAT: Catalasa.

CCl_4 : Tetracloruro de carbono.

CeO_2 : Óxido de cerio.

CeO_2NPs : Nanopartículas de óxido de cerio.

CESH: Células endoteliales sinusoidales hepáticas.

CHE: Células hepáticas estrelladas.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.

DAG: Diacilglicerol.

DMNS: Dimetilnitrosamina.

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica.

EGHNA: Esteatosis hepática no alcohólica.

eNOS: Sintasa endotelial de óxido nítrico.

ET-1: Endotelina 1.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$: Nanopartículas de óxido de hierro.

GFR: Tasa de filtrado glomerular.

GPRCs: Receptores acoplados a proteínas G específicos de tejido.

GPVH: Gradiente de presión venosa hepático.

GPx: Glutación peroxidasa.

GR: Glutación reductasa.

Grx: Glutaredoxinas.

GSH: Glutación.

HNE: 4-hidroxinonemal.

HRS: Síndrome hepatorenal.

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

IFN γ : Interferón gamma.

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible.

IP3: Inositol trifosfato.

IRE1 α : Proteína 1 que requiere inositol.

LPS: Lipopolisacárido.

MDA: Malondialdehido.

MEC: Matriz extracelular.

MRI: Imagen por resonancia magnética.

NK: Natural killer, "asesina natural".

NKT: Natural killer T.

NO: Óxido nítrico.

NPs: Nanopartículas.

PDGF- β : Factor de crecimiento derivado de plaquetas beta.

PERK: Proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico.

Prx: Peroxiredoxina.

RAAS: Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

RBF: Flujo sanguíneo renal.

RE: Retículo endoplasmático.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RVS: Resistencia vascular sistémica.

SNS: Sistema nervioso simpático.

SOD: Superóxido dismutasa.

TAA: Tioacetamida.

TEM: Microscopía electrónica de transferencia.

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta.

TIPS: Derivación portosistémica intrahepática transyugular.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

TP: Terlipresina.

Trx: Tiorredoxina.

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VHB: Virus hepatitis B.

VHC: Virus hepatitis C.

α -SMA: Alfa actina de músculo liso.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. CIRROSIS HEPÁTICA

1.1. Definición y clasificación fisiopatológica	3
1.2. Alteraciones intrahepáticas	6
1.2.1. Fibrosis	6
1.2.2. Inflamación	9
1.2.3. Esteatosis	15
1.2.4. Estrés oxidativo	18
1.2.5. Estrés del retículo endoplasmático	22
1.3. Alteraciones hemodinámicas	23
1.3.1. Hipertensión portal	23
1.3.2. Disfunción en la circulación esplácnica y sistémica	25
1.3.3. Disfunción renal y ascitis	27
1.4. Modelos experimentales de cirrosis	30
1.4.1. Cirrosis inducida con CCl ₄	31
1.5. Terapias	33
1.5.1. Terapias en la fibrosis hepática	33
1.5.2. Terapias en la cirrosis con disfunción renal y circulatoria	35

2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CERIO

2.1. Definición y aplicación biomédica	37
2.2. Síntesis, tamaño y estabilización	39
2.3. Captación celular y localización	39

2.4. Biodistribución	40
3. VASOPRESINA	40
3.1. Estructura de la vasopresina y su receptores	40
3.2. Efectos relevantes de la vasopresina mediados por el receptor V _{1a}	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
OBJETIVOS	51
RESULTADOS	55
Artículo 1: Las nanopartículas de óxido de cerio reducen la esteatosis, la hipertensión portal y muestran propiedades anti-inflamatorias en ratas con fibrosis hepática.	
<i>Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis.</i>	57
Artículo 2: El agonismo parcial del receptor V _{1a} de la vasopresina incrementa la excreción de sodio y reduce la hipertensión portal y la ascitis en ratas cirróticas.	
<i>Vasopressin 1a receptor partial agonism increases sodium excretion and reduces portal hypertension and ascites in cirrhotic rats.</i>	63
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	77
ANEXO	81
BIBLIOGRAFÍA	85
AGRADECIMIENTOS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la enfermedad crónica del hígado.	6
Figura 2. Cambios en la arquitectura hepática asociados a un daño crónico.	7
Figura 3. Microfotografía electrónica de transferencia de una CHE.	8
Figura 4. Fuentes principales de miofibroblastos en la fibrosis hepática.	9
Figura 5. Poblaciones celulares intrahepáticas.	10
Figura 6. Composición celular del hígado sano.	11
Figura 7. Microfotografía electrónica de transferencia de una célula endotelial sinusoidal hepática.	13
Figura 8. Microfotografía electrónica de transferencia de linfocitos en el hígado.	14
Figura 9. Esteatosis hepática no alcohólica: esterosis macrovesicular.	16
Figura 10. Modelo del desarrollo del hígado graso y de esteatohepatitis no alcohólica.	17
Figura 11. Activación de los sensores de la UPR y su efecto en la apoptosis.	23
Figura 12. Representación esquemática de la patogénesis de la formación de edema y ascitis.	27
Figura 13. Anatomía de la nefrona.	28
Figura 14. Patogénesis de las anomalías renales funcionales y de la formación de ascitis en la cirrosis.	29
Figura 15. Estrategias terapéuticas para la fibrosis hepática.	35
Figura 16. Comparación de tamaños en el rango de nanómetros.	37
Figura 17. Simulación atomística de una NP de CeO ₂ y sus planos atómicos.	38
Figura 18. Ciclo redox entre los estados de oxidación Ce ³⁺ y Ce ⁴⁺ .	38
Figura 19. Acoplamiento de la vasopresina y topología del receptor humano V1R.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones antioxidantes y las enzimas que las catalizan.	20
---	----

Introducción

La cirrosis afecta a un gran número de pacientes en el mundo, de hecho constituye una de las enfermedades más prevalente en los países occidentales. Hasta un 40 % de los pacientes con cirrosis son asintomáticos, también llamados cirróticos compensados, y pueden permanecer en este estado durante más de una década, pero el deterioro progresivo es inevitable y pueden desarrollar complicaciones incluyendo ascitis, hemorragia visceral o encefalopatía. De estos pacientes con complicaciones hay un 50% de mortalidad al cabo de 5 años, con aproximadamente un 70% de estas muertes directamente atribuibles a la enfermedad hepática. En nuestro país, las enfermedades crónicas del hígado son responsables de aproximadamente 6000-7000 muertes al año.

La cirrosis puede ser definida como el estadio final de la fibrosis hepática, que consiste en la formación de nódulos y en la alteración de la función hepática. La fibrosis hepática se produce como consecuencia de una cicatrización continua en respuesta a un daño crónico en el hígado. Este daño crónico tiene diversas causas incluyendo enfermedades virales, autoinmunes, colestásicas, metabólicas, así como su inducción por drogas. Las manifestaciones clínicas de la cirrosis pueden variar entre diferentes pacientes, desde ser asintomático hasta perder totalmente la función hígado. La clínica está determinada por la gravedad de la enfermedad hepática y por la extensión de la fibrosis.

En los últimos 20 años ha habido un gran progreso en el conocimiento de los mecanismos moleculares que se dan en la fibrosis hepática y, en particular, en las vías moleculares que conectan la inflamación crónica del hígado con la fibrosis hepática progresiva. Las investigaciones que están en marcha tienen como diana estos mecanismos moleculares, en un esfuerzo para atenuar la respuesta fibrogénica. Estas nuevas estrategias terapéuticas podrían efectivamente ralentizar la progresión de la fibrosis, o incluso llegar a revertirla. Sin embargo, actualmente la mejor terapia para las enfermedades crónicas del hígado continúa siendo la eliminación de la causa primaria de la enfermedad. Por ejemplo, en pacientes con HCV crónica, el método óptimo para revertir la fibrosis es el tratamiento antiviral. A pesar de ello existen casos donde no es posible o no es suficiente con eliminar el agente etiológico. Una posible alternativa sería administrar un compuesto dirigido a cualquier parte de la cascada de activación del proceso fibrogénico, sin embargo, a día de hoy no se ha aprobado ningún medicamento de este tipo.

Es por tanto fundamental identificar nuevas estrategias terapéuticas que permitan detener o revertir la progresión de la enfermedad hepática. Una de las terapias más

prometedoras y que ya ha sido evaluada en pacientes con enfermedad hepática crónica, son los compuestos antioxidantes. El estrés oxidativo se produce por medio de un aumento de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS, RNS) y/o una disminución de los antioxidantes endógenos presentes en el hígado. Las ROS y RNS tienen un rol crucial en la inducción y progresión de la enfermedad hepática, independientemente de su etiología. Están implicadas en la transcripción y activación de numerosas citoquinas y factores de crecimiento que, a su vez, pueden contribuir a la producción de inflamación y de estrés oxidativo. Es por ello que uno de los estudios de la presente tesis consistió en evaluar el potencial terapéutico de un compuesto antioxidante extremadamente novedoso: las nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2). Las nanopartículas de CeO_2 debido a su tamaño, estructura y composición química presentan una gran afinidad por el hígado, y a diferencia de otros compuestos antioxidantes son auto-regenerativas, de manera que permiten evitar una administración continuada.

Por otra parte, las nuevas estrategias no sólo se deben dirigir a prevenir y/o revertir la fibrosis hepática, sino que también es importante atenuar o incluso eliminar los principales trastornos que, en consecuencia a estos cambios estructurales y dinámicos, aparecen en los pacientes con cirrosis hepática avanzada. Dentro de estos trastornos, la hipertensión portal es un síndrome clínico frecuente en los pacientes con cirrosis y se caracteriza por un incremento en la presión venosa portal. Las complicaciones que se desarrollan como consecuencia de este síndrome, como la hemorragia por varices esofágicas, ascitis e insuficiencia renal, constituyen el aspecto clínico dominante y severo de la enfermedad hepática. Por este motivo en pacientes con cirrosis hepática, la hipertensión portal es la principal causa de muerte y de trasplante de hígado. Es por ello que la reducción de la hipertensión portal y de la vasodilatación esplácnica representan las principales dianas terapéuticas para mejorar la prognosis en los pacientes con cirrosis avanzada. Estudios han demostrado que los agonistas del receptor de la vasopresina, gracias a su capacidad de vasoconstricción sistémica y mesentérica, son capaces de reducir la presión portal. A pesar de ello se descartó su uso clínico porque frecuentemente causaban complicaciones cardiovasculares y retención de agua, probablemente debido a su interacción inespecífica con los diferentes receptores de la vasopresina. En este sentido el segundo estudio de la presente tesis analiza el efecto de una nueva generación de agentes farmacológicos capaces de

interactuar selectivamente con el receptor V_{1a} de la vasopresina, en la vasodilatación esplácica y en la hipertensión portal.

1. CIRROSIS HEPÁTICA

1.1 Definición y clasificación fisiopatológica

La cirrosis es la culminación de un largo proceso donde los lóbulos hepáticos normales son reemplazados por nódulos estructuralmente anormales y separados por un tejido fibroso. Así es como la fibrosis hepática o cicatrización del hígado juega un papel determinante en la evolución a cirrosis en diversas enfermedades hepáticas. Consiste en una excesiva acumulación de tejido fibroso conectivo (componentes de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina) en y alrededor de un tejido inflamado o dañado (Wynn & Ramalingam, 2012). Por otro lado, en el hígado cirrótico se produce una disfunción hepatocelular y se incrementan las resistencias al flujo sanguíneo, lo que resulta en insuficiencia hepática y en hipertensión portal, respectivamente. En la mayoría de los pacientes la progresión a cirrosis ocurre en un intervalo de entre 15-20 años (Bataller & Brenner, 2005). Sólo en Europa se estima que 29 millones de pacientes sufren de enfermedad hepática crónica, y que 170000 mueren cada año por complicaciones de la cirrosis, un número que excede la mortalidad por cáncer de pecho (Bosch et al., 2015). En España la mortalidad asociada a las enfermedades hepáticas (8%) duplica la tasa de mortalidad por cualquier otra causa en los servicios hospitalarios. Las enfermedades hepáticas en nuestro país son la segunda categoría diagnóstica que ha experimentado mayor crecimiento en los últimos cinco años (Calleja y Crespo, 2015).

Los factores etiológicos más relevantes implicados en la cirrosis son los siguientes: (i) infección crónica por virus hepatotropos (virus hepatitis B y C), (ii) exposición crónica a drogas o toxinas; (iii) exposición crónica a condiciones que alteran el metabolismo; (iv) daño autoinmune persistente (Novo et al., 2014). Actualmente, las enfermedades hepáticas con mayor prevalencia en la población occidental son las causadas por infección de virus hepatotropos (virus de la Hepatitis B y C), consumo de alcohol y depósito de grasa a nivel hepatocitario. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen 180 millones de

personas infectadas en todo el mundo por el virus de la hepatitis C (VHC), y que 350.000 muertes producidas al año están relacionadas con esta enfermedad. La prevalencia estimada de la infección en España es del 2,5%, una de las más elevadas entre los países de nuestro entorno. El virus de la hepatitis B (VHB) causa hepatitis B crónica en aproximadamente 400 millones de personas en el mundo. Desde la introducción en la década de 1990 de la vacuna frente al VHB en el calendario de vacunaciones sistemáticas del sistema nacional de salud, la incidencia de VHB ha disminuido notablemente, llegando a una cifra de prevalencia del 0,7% en 2002 (Calleja y Crespo, 2015). La prevalencia de Enfermedad Hepática por Depósito de Grasa en España es del 26% en individuos de edades comprendidas entre 15 y 85 años. En términos poblacionales, supone que aproximadamente 9 millones de pacientes están afectados por la enfermedad. Entre el 30-40% de los pacientes con esteatosis desarrollará esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que evolucionará en el 20% de los casos a fibrosis y cirrosis. La elevada prevalencia de la obesidad y el síndrome metabólico en nuestra sociedad provocará que la esteatosis hepática sea una enfermedad con una elevada frecuencia en el futuro. Por último, la enfermedad hepática inducida por el alcohol representa más de un tercio de las enfermedades hepáticas relevantes, aunque su prevalencia no se conoce con exactitud. En todo el mundo, desde 1990 hasta 2013, la muerte por cirrosis como consecuencia del consumo de alcohol se ha incrementado en un 31,2 % (Calleja y Crespo, 2015).

Durante más de siglo y medio, la descripción del hígado como “cirrótico” fue suficiente para connotar un estado tanto patológico como clínico. Sin embargo, actualmente es esencial comprender todos los estadios posibles en base a la gravedad de la cirrosis para determinar la progresión de la enfermedad hepática, para establecer un pronóstico y para individualizar la terapia (Garcia-Tsao et al., 2010).

- En un contexto anatómico-patológico, se han definido una serie de sistemas de clasificación según el grado de fibrosis en la biopsia hepática. Dentro de los sistemas más utilizados, la escala METAVIR se divide cuatro estadios (F0, ausencia de fibra; F1, fibrosis portal; F2, fibrosis periportal; F3, fibrosis en puente y F4, cirrosis). De forma similar, los sistemas de clasificación Ishak y Scheur definen la fibrosis progresiva de manera semicuantitativa basándose en el patrón y la cantidad relativa de fibra existente en la biopsia hepática (Ishak K et al., 1995; Knodell RG et al., 1981). En este

contexto, el diagnóstico de la cirrosis se establece una vez la fibrosis alcanza el estadio final.

- En un contexto serológico, se han desarrollado y validado diferentes índices que combinan marcadores serológicos indirectos como herramientas no invasivas útiles y de bajo coste para detectar los diferentes grados de fibrosis. Los marcadores serológicos directos son los que reflejan cambios en la composición de la matriz extracelular mientras que los indirectos reflejan alteraciones en la función hepática. Por ejemplo el FibroTest® está basado en la asociación, determinada mediante regresión logística, de 5 parámetros bioquímicos, la edad y el sexo, con la fibrosis; el resultado del test va de 0 a 1, donde 0 corresponde a F0 y 1 a F4 (cirrosis) en la escala METAVIR (Imbert-Bismut et al., 2001). En los últimos años, técnicas de imagen basadas en la medición de la rigidez hepática, como Fibroscan o ARFI, se han convertido en métodos rápidos y reproducibles para evaluar la fibrosis hepática (Fernández-Varo, 2012).
- En un contexto clínico, la cirrosis se clasifica en dos estadios: compensada y descompensada. Dentro de la cirrosis compensada, se han identificado dos subpoblaciones basadas en la ausencia o presencia de varices, dando lugar a diferente prognosis (D'Amico G et al., 2006). Los pacientes con cirrosis pueden permanecer sin complicaciones durante muchos años. La cirrosis descompensada se define como el desarrollo clínicamente evidente de complicaciones de la hipertensión portal (ascitis, varices hemorrágicas, encefalopatía hepática) o insuficiencia hepática (ictericia). A su vez, el estadio descompensado puede ser subclassificado en estadios más severos definidos por el desarrollo de varices hemorrágicas recurrentes, ascitis refractaria, hiponatremia y/o síndrome hepatorenal.
- En un contexto hemodinámico, el gradiente de presión venosa hepático (GPVH) es una medida indirecta de la presión portal (Groszmann et al., 2005). El GPVH normal es 3-5 mmHg, mientras que >10 mmHg es el límite que identifica pacientes con alto riesgo de desarrollar varices, y/o descompensación clínica. A parte de la presión portal, las alteraciones en el sistema hemodinámico juegan un papel importante en el desarrollo de eventos más descompensados como la ascitis refractaria, hiponatremia y el síndrome hepatorenal.

Actualmente, el diagnóstico de la cirrosis en enfermedad avanzada se basa en primer lugar en la evidencia histopatológica de estadio tardío de fibrosis (por ejemplo estadio 4 en sistema METAVIR, o estadio 5 o 6 en el sistema Ishak). Pero dentro de estos sistemas de diagnóstico, el término “cirrosis” refleja el estadio final del proceso de cicatrización, sin tener en cuenta la complejidad de su patogénesis (funcional, hemodinámica, etc.). Ya que estos cambios colectivos son fundamentales en la transición de cirrosis compensada a descompensada, es necesario una clasificación fisiopatológica basada en los datos morfológicos, funcionales y clínicos (Figura 1).

Histología	← F1-F3		F4 (Cirrosis) →	
Clínica	No-cirrosis	Compensada	Compensada	Descompensada
Síntomas	Ninguno	Ninguno (sin varices)	Ninguno (varices presentes)	Ascitis, varices sangrantes, encefalopatía
Sub-estadio	-	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3 y 4
Hemodinámica (GPVH, mmHg)		>6	>10	>12
Biología	Fibrogénesis y Angiogenesis	Cicatriz	Cicatriz gruesa (acelular) y con nódulos	Cicatriz insoluble

Figura 1. Clasificación de la enfermedad crónica del hígado basada en los parámetros histológicos, clínicos, hemodinámicos y biológicos. *Figura adaptada de Garcia-Tsao et al., 2010.*

1.2 Alteraciones intrahepáticas

1.2.1 Fibrosis

La fibrosis hepática es el resultado de una cicatrización como respuesta a un daño crónico. Después de un daño agudo en el hígado las células parenquimales regeneran y reemplazan a las células necróticas o apoptóticas (Figura 2). Este proceso está asociado a una respuesta inflamatoria y a una deposición de matriz extracelular (MEC) limitada. Si este daño hepático persiste, la regeneración hepática falla y los hepatocitos son sustituidos por abundante MEC, incluyendo colágeno fibrilar. Cuando la fibrosis hepática continúa avanzando estas bandas

de colágeno pasan a formar una fibrosis en puente y finalmente un hígado cirrótico (Bataller & Brenner, 2005).

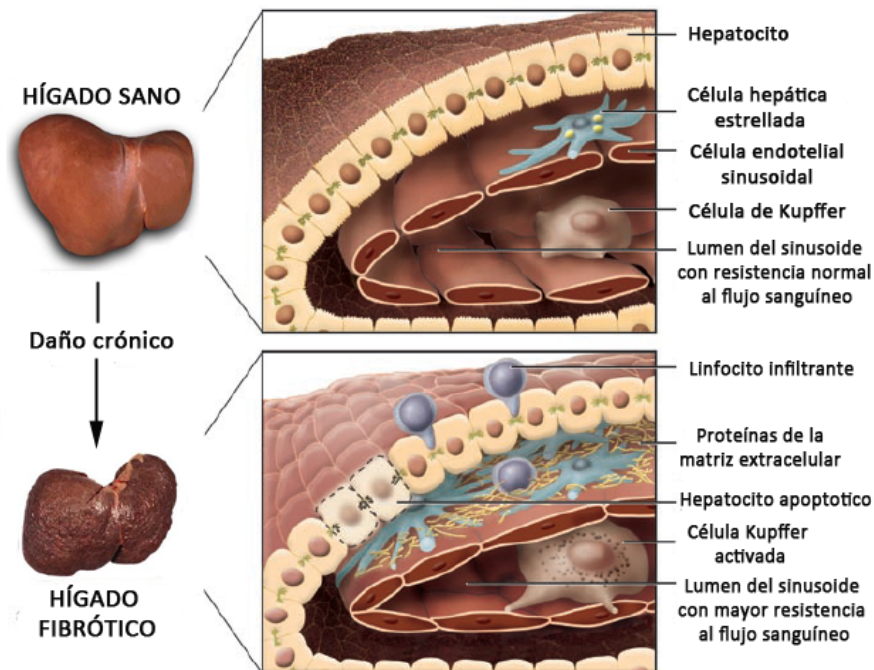


Figura 2. Cambios en la arquitectura hepática asociados a un daño crónico. *Figura adaptada de Bataller & Brenner, 2005.*

En estadios avanzados, el hígado puede llegar a contener aproximadamente 6 veces más de MEC de lo normal. Esta acumulación de MEC es el resultado tanto de un incremento de su síntesis como de una disminución su degradación (Arthur, 2000).

Las **células hepáticas estrelladas** (CHE) son las principales células productoras de MEC en el hígado dañado (Gabele et al, 2003) (Figura 3). En un hígado sano, las CHE residen en el espacio de Disse, constituyen el mayor lugar de almacenaje de vitamina A y expresan marcadores característicos de los adipocitos (PPAR- γ , SREBP-1c y leptina). Después de un daño crónico las CHE se activan y transdiferencian a una célula tipo miofibroblasto, adquiriendo propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas (Marra, 1999). A diferencia de las quiescentes, las CHE activas expresan marcadores miogénicos (α masa, c-myb y MEF-2). Estas células CHE activas migran y se acumulan en los sitios de reparación tisular, secretando grandes cantidades de MEC y regulando su degradación (Bataller & Brenner,

2005). El PDGF, principalmente producido por las células de Kupffer, es el estímulo más potente de proliferación y migración de las CHE (Reichenbach et al, 2012).

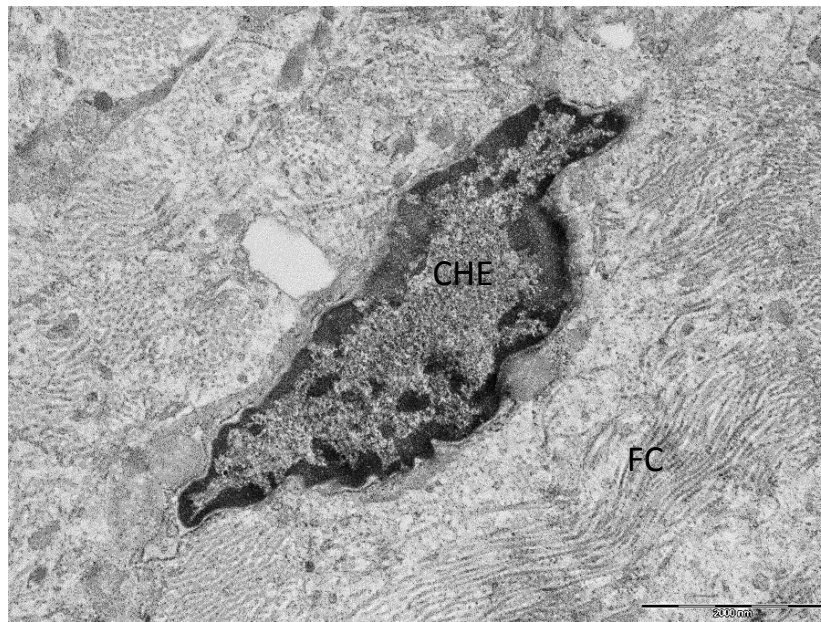


Figura 3. Microfotografía electrónica de transferencia de una célula hepática estrellada activa (CHE) en el hígado de una rata con fibrosis hepática. FC: fibras de colágeno.

En el hígado dañado, existen dos fuentes principales de la cual derivan los miofibroblastos: las CHE y las células portales mesenquimales. Varios estudios también sugieren que tanto hepatocitos como colangiocitos pueden adquirir un fenotipo mesenquimal a través de la transición epitelial-mesenquimal y producir MEC en la fibrosis hepática. Otros estudios también han propuesto que células circulantes provenientes de la médula ósea pueden actuar como células madre, contribuyendo a la población de miofibroblastos (Friedman, 2008; Lemoine et al., 2013) (Figura 4).

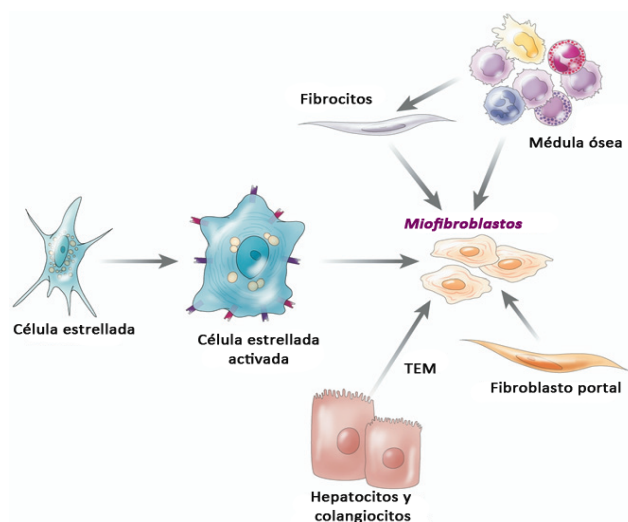


Figura 4. Fuentes principales de miofibroblastos en la fibrosis hepática. TEM: transición epitelio-mesénquima.

Figura adaptada de Friedman, 2008.

1.2.2. Inflamación

El hígado tiene una ubicación anatómica única que le permite recibir continuamente sangre, tanto del sistema arterial (arterias hepáticas) como del tracto gastrointestinal vía la vena porta. Esta propiedad hace que el hígado tenga una función central en la homeostasis y en la respuesta inflamatoria. Las células sanguíneas circulantes, por ejemplo del sistema inmune innato o adaptativo, pasan a través de una red de sinusoides y contactan con las células intrahepáticas (hepatocitos, células endoteliales, macrófagos-residentes (células Kupffer), linfocitos y CHE entre otras) (Figura 5). La comunicación entre estos tipos celulares y la regulación de las funciones hepáticas se efectúa principalmente mediante citoquinas (Tacke, Luedde & Trautwein, 2009).

Normalmente la fibrosis hepática es precedida por una inflamación crónica. En esta progresión de la inflamación crónica existe una activación del sistema inmune innato y adaptativo, con infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), sobreexpresión de iNOS, y reclutamiento de linfocitos a través de la vena porta, vena hepática y sinusoides (Queiroz de Andrade et al., 2015). El infiltrado inflamatorio puede incluir linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, histiocitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células NK y mastocitos. La inflamación del hígado se asocia a la necrosis y apoptosis de los hepatocitos.

Los cuerpos apoptóticos derivados de este daño pueden activar CHE quiescentes y células de Kupffer, y estas a su vez pueden promover la respuesta inflamatoria y fibrogénica.

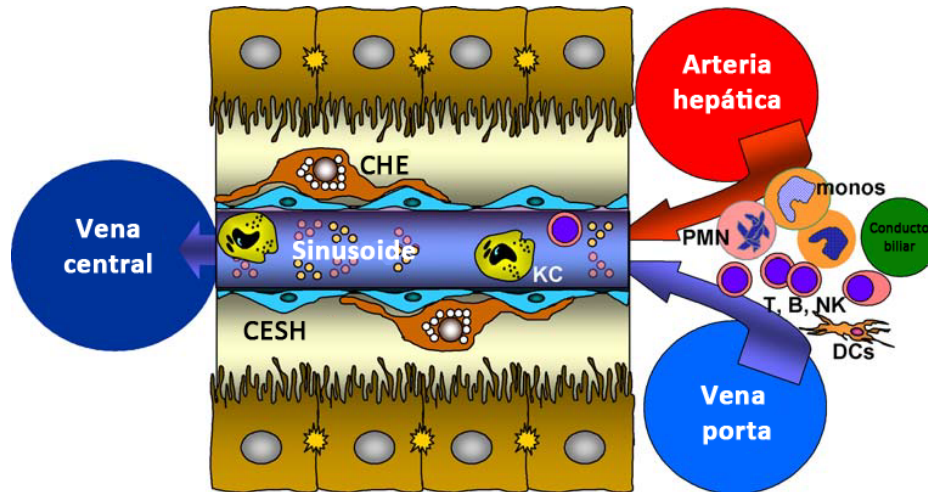


Figura 5. Poblaciones celulares intrahepáticas. CHE: célula hepática estrellada, CESH: célula endotelial sinusoidal hepática, KC: célula de Kupffer, PMN: neutrófilos, monos: monocitos, DCs: células dendríticas y linfocitos (células T, B, NK y NKT). *Figura adaptada de Tacke, Luedde & Trautwein, 2009.*

Las **células de Kupffer** (macrófagos residentes o derivadas de monocitos) representan un 20 % de las células no parenquimales del hígado (Mackay, 2002) (Figura 6). Residen en el espacio vascular sinusoidal, sobretudo en el área periportal, de manera que están idóneamente situadas para eliminar endotoxinas de la sangre circulante y fagocitar debris y microorganismos (Racanelli & Rehmann, 2006). Estos macrófagos residentes del hígado constituyen el 80-90 % de los macrófagos tisulares presentes en el cuerpo (Ishibashi et al., 2009). Dependiendo del ambiente inmunológico en el que se encuentran, los macrófagos pueden polarizarse a un fenotipo clásico (M1) o a un fenotipo alternativo (M2). Los macrófagos-M1 “activos” son importantes en las enfermedades inflamatorias crónicas, como la arteriosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, o en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. La inflamación producida por los macrófagos-M1 es contrarrestada por la polarización a macrófagos-M2 que promueven la resolución de la inflamación y el reparación tisular (Wan et al., 2014).

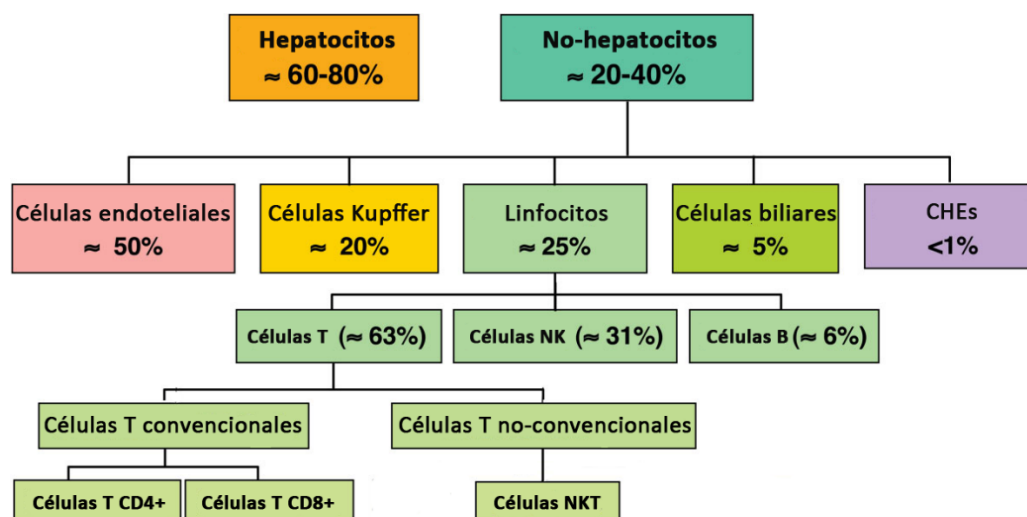


Figura 6. Composición celular del hígado sano. *Figura adaptada de Racanelli & Behermann 2006.*

Las células de Kupffer se activan por estímulos como el LPS o superantígenos bacterianos. Al activarse secretan un amplio panel de citoquinas como TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-1 β promoviendo la infiltración y actividad antimicrobiana de neutrófilos (Luedde et al., 2002). También producen quimionas (MCP-1, IL-8), leucotrienos, óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno (ROS) que contribuyen al daño hepático. En las enfermedades agudas o crónicas del hígado las células de Kupffer y los macrófagos derivados de monocitos infiltrantes pueden promover la cascada inflamatoria al secretar estos mediadores inflamatorios, los cuales atraen a las células T e inducen la apoptosis de los hepatocitos (Schumann et al., 2000). Las células de Kupffer también pueden estimular la síntesis de MEC, la proliferación celular y la secreción de retinoides en las CHE a través de la acción de citoquinas (TGF- β , PDFG- β), ROS y peróxidos lipídicos.

En respuesta a diversos estímulos como LPS, IL-1 y TNF- α entre otros, también se produce un aumento de expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la producción de prostaglandinas y tromboxano (Feng et al., 1995). En las células de Kupffer, por ejemplo, la activación del NF- κ B por endotoxina o por radicales libres induce la expresión de la COX-2 (Nanji 2002). En modelos de enfermedad alcohólica en ratas se ha demostrado que el aumento de expresión de la COX-2 está asociado a la intensidad de la inflamación, al aumento de la endotoxina, del TNF- α y de la peroxidación lipídica (Nanji et al., 1997).

Las **CHE activadas** a su vez pueden incrementar la producción de citoquinas inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión y la presentación de antígenos a linfocitos T y células NK, amplificando la infiltración de células inflamatorias. Esta respuesta inflamatoria incrementada y mediada por la respuesta inmune puede promover la necrosis y apoptosis de los hepatocitos, por lo tanto, perpetuando el estímulo de la fibrogenesis en un ciclo de realimentación positiva (Czaja, 2014).

Las **células NK** representan una población de linfocitos con una potente actividad citolítica contra células infectadas por virus y contra células tumorales. Las células NK se regulan mediante citoquinas derivadas de células de Kupffer (por ejemplo IL-12 e IL-18) y por IL-4 secretada por células NKT. Las células NK al activarse producen grandes cantidades de IFN- γ (antiviral), modulando la respuesta de las células T en el hígado y promoviendo cambios intracelulares en células endoteliales y hepatocitos, llegando incluso a promover la muerte de hepatocitos.

Las **células NKT** son subpoblaciones inusuales de células T que expresan marcadores de superficie de células T y de NK. Promueven el daño hepático agudo al secretar IL-4, IFN- γ y mediando la apoptosis de hepatocitos.

Las **células dendríticas** están localizadas alrededor de las venas centrales y los tractos portales. En el hígado sano, las células dendríticas se encuentran en un estado inmaduro a la espera de capturar y procesar antígenos. Las células dendríticas inmaduras pueden inhibir la proliferación y la producción de citoquinas de linfocitos T infiltrantes. Una vez activadas, pierden esa capacidad y migran vía espacio de Disse a los tractos linfáticos y portales, para llegar finalmente a los nódulos linfáticos extrahepáticos.

Las **células endoteliales sinusoidales hepáticas** (CESH) pueden endocitar y/o fagocitar antígenos a través de receptores de manera similar a las células dendríticas (Figura 7).

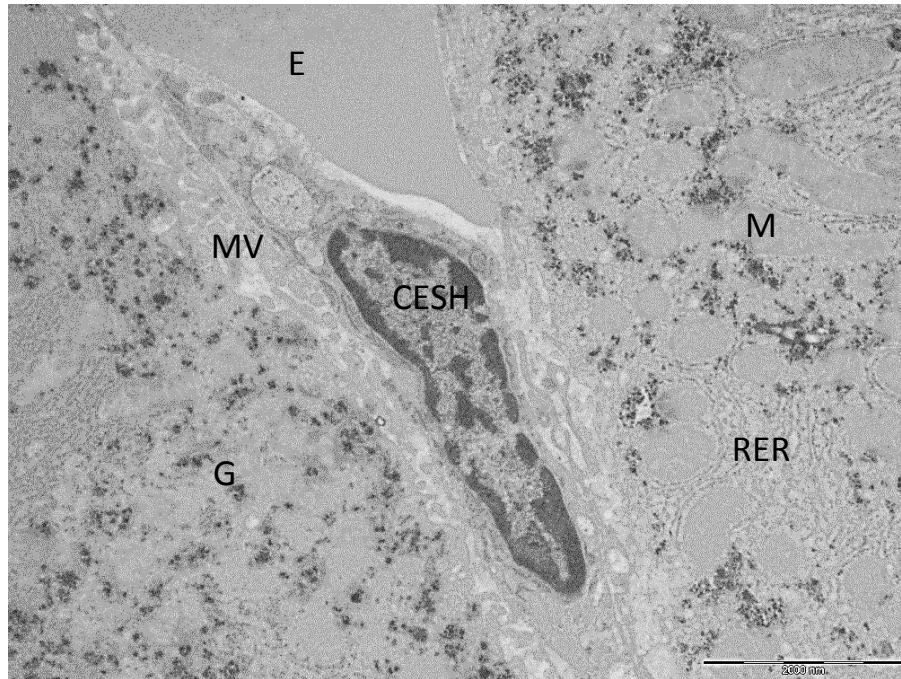


Figura 7. Microfotografía electrónica de transferencia de una célula endotelial sinusoidal hepática (CESH) en el hígado de una rata con fibrosis hepática. E: eritrocito, MV: microvilli, M: mitocondrias, RER: retículo endoplasmático rugoso, G: glucógeno

Finalmente, en el daño hepático agudo existe una amplificación mediada por citoquinas del infiltrado intrahepático. Un paso crítico en esta amplificación inespecífica es el reclutamiento de leucocitos (Figura 8). Los **neutrófilos** son reclutados por moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas, muchas de ellas producidas por células Kupffer. Los neutrófilos por si mismos secretan factores solubles que contribuyen al reclutamiento adicional de células mononucleares no específicas de antígeno. Los neutrófilos son una fuente importante de ROS, las cuales pueden estimular directamente la síntesis de colágeno en las CHE.

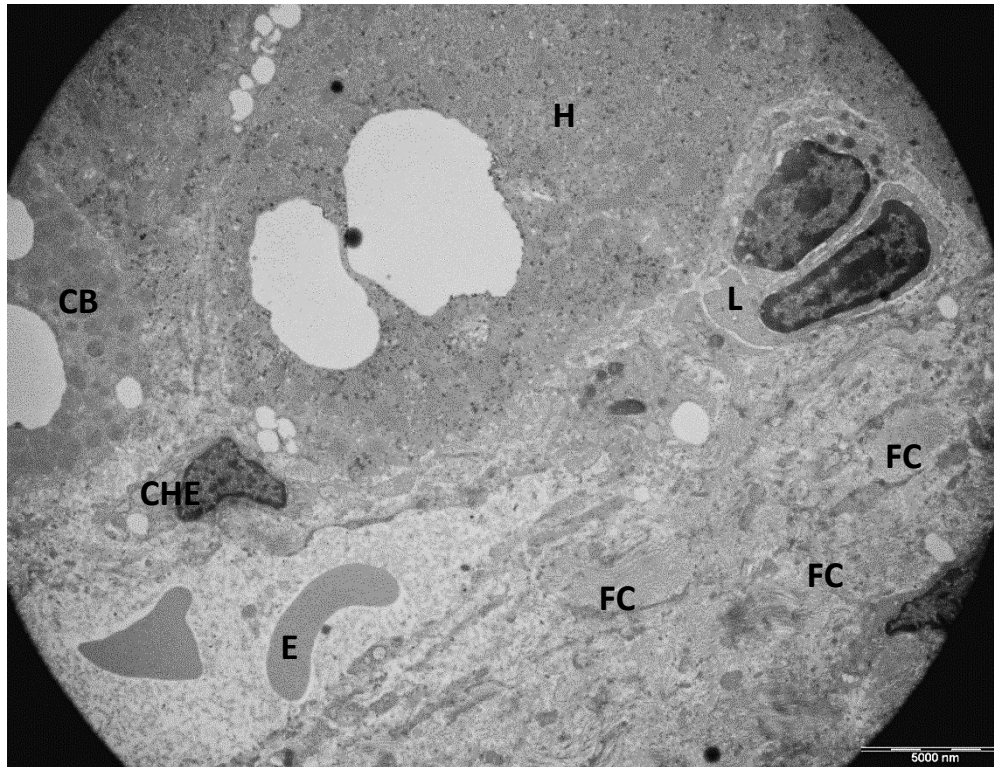


Figura 8. Microfotografía electrónica de transferencia de linfocitos en el hígado de una rata con fibrosis hepática. H: hepatocito, L: linfocitos, E: eritrocito, CB: canalículo biliar, CHE: célula hepática estrellada, FC: fibras de colágeno.

A parte de los efectos directos de las células inmunes en los hepatocitos, en el hígado las vías inflamatorias están reguladas por citoquinas. Entre las múltiples citoquinas relevantes en el daño hepático y su homeostasis, las vías del TNF- α e IL-6 son las más estudiadas debido a su importancia en el hígado. En pacientes con fallo hepático, los niveles séricos de TNF- α se encuentran incrementados. De la misma manera, los niveles séricos e intrahepáticos de IL-6 aumentan en pacientes con enfermedades agudas y crónicas del hígado (Tacke, Luedde & Trautwein, 2009).

El **TNF- α** puede activar en los hepatocitos tanto vías proapoptóticas (caspasas) como antiapoptóticas (NF-kappaB). La unión del TNF- α a su receptor de membrana, TNF-R1, hace que el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) se una y este a su vez recluta el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). FADD recluta a la caspasa 8 al complejo del TNF-R1, donde se activa e inicia la cascada de proteasas que conduce a la activación de las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6, 7) y por tanto, a la apoptosis. La unión del TNF α a su receptor también conduce a la activación de la vía del NF-kappaB a través de la fosforilación de dos

serinas en el dominio N-terminal de las proteínas inhibidoras IκBs. Después de la fosforilación, las IκBs se poliubiquitinizan por una cascada de reacciones enzimáticas, seguidas de la degradación de IκBs por el proteasoma, liberando al NF-kappaB de sus inhibidores. NF-kappaB se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes dianas dependientes de NF-kappaB (por ejemplo supresores de la apoptosis) (Chen & Goeddel, 2002).

La **IL-6** se une a su receptor gp80/IL-6 en los hepatocitos, que a su vez recluta a gp130. La unión de gp130 conduce a la dimerización de los dominios intracelulares de dos moléculas gp130, lo que promueve la asociación con quinasas Janus asociadas a receptor (JAKs: JAK1, JAK2 y TYK). Las JAKs se activan y fosforilan residuos tirosina en gp130. Dependiendo de la localización de las tirosinas fosforiladas se activan vías de señalización asociadas a proteínas de señal transductora y activadora de transcripción (STAT), principalmente STAT-3, o vías de señalización asociadas a RAS/MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) mediando numerosos efectos posteriores (Streetz et al., 2000). Una función importante de la señalización dependiente de IL-6 en el hígado es la inducción de la respuesta de fase aguda.

1.2.3. Esteatosis

La esteatosis es la acumulación anormal de grasa en el tejido hepático (Figura 9). Es la característica patológica distintiva en las biopsias hepáticas de pacientes con esteatosis hepática no alcohólica (EGHNA), pero también es habitual en otras enfermedades crónicas del hígado (Li et al., 2011).

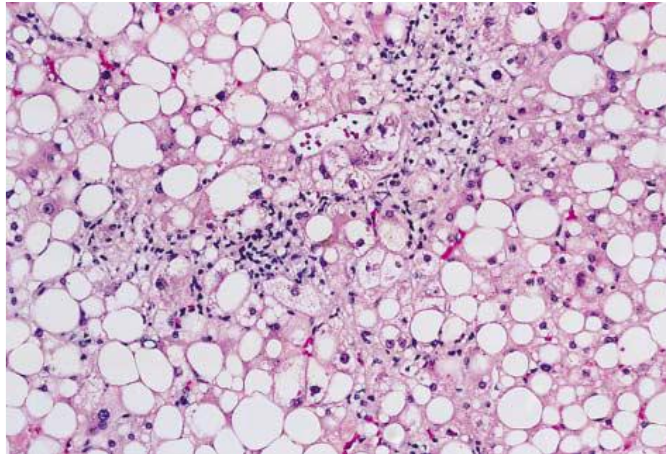


Figura 9. Esteatosis hepática no alcohólica: estosis macrovesicular (hematoxilina y eosina, 200x).

Figura de Angulo, 2002.

Si la EGHNA no es tratada puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y finalmente a cirrosis (Angulo, 2002). Originalmente, se describió la progresión de EGHNA desde una simple esteatosis a EHNA como un modelo de “dos eventos” (Day & James, 1998). El primer evento sería el que llevaría al desarrollo de esteatosis y en él, la resistencia a la insulina tendría un papel primordial. Este primer evento sensibilizaría el hígado al segundo evento, que llevaría a la lesión hepatocitaria, la inflamación y, finalmente, a la fibrosis. Los principales candidatos para el segundo evento son el estrés oxidativo y una producción anómala de citoquinas. Desde entonces, expertos en el campo han considerado que este modelo de dos eventos es una simplificación excesiva de la patogénesis de la EHNA y creen que probablemente múltiples factores paralelos son responsables de progresión de la enfermedad (Tilg & Moschen, 2014) (Figura 10).

La retención de lípidos dentro de los hepatocitos, principalmente en forma de triglicéridos, es un pre-requisito para el desarrollo de EGHNA. Aún no se conoce bien cuáles son las alteraciones metabólicas que conducen a esta acumulación de lípidos, pero pueden consistir en alteraciones en las vías de captación, síntesis, degradación o secreción de lípidos hepáticos (Angulo, 2002).

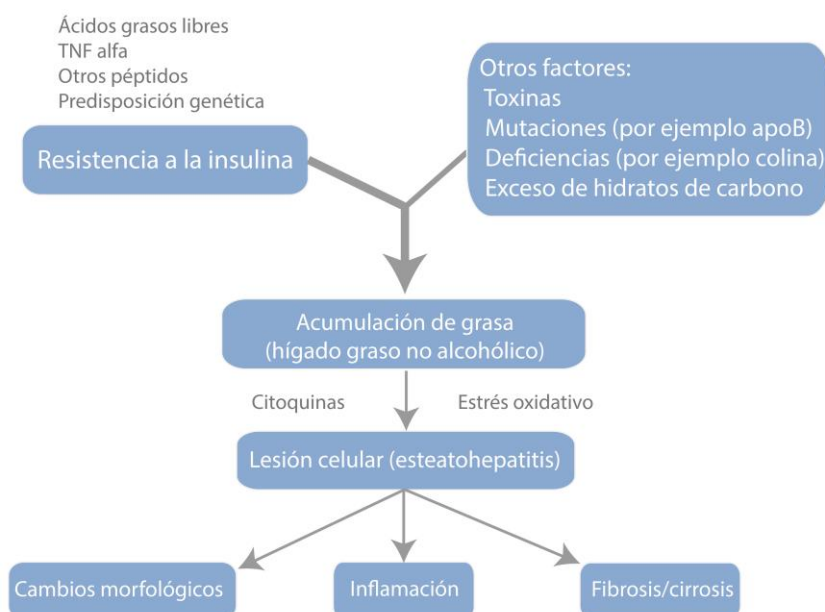


Figura 10: Modelo del desarrollo del hígado graso y de esteatohepatitis no alcohólica. *Figura adaptada de Vargas 2004.*

La resistencia a la insulina es el factor que más se reproduce en el desarrollo de EGHNA (Marchesini et al., 1999). De la misma manera, los pacientes cirróticos tienen un metabolismo de la glucosa alterado. Se calcula que el 60-80% es intolerante a la glucosa y que el 10-15% desarrolla una diabetes mellitus. El desarrollo de la diabetes después del diagnóstico de cirrosis hepática es relativamente rápido; durante un período de 5 años, un 15-20% de pacientes cirróticos desarrollan una hiperglucemia evidente (Vargas, 2004). La patogénesis molecular de la resistencia a la insulina también parece ser multifactorial, y se han identificado varias dianas moleculares relacionadas con la inhibición de la acción de la insulina (Angulo, 2002). Una de las que parece tener mayor importancia es la *downregulation* del IRS-1 (sustrato 1 del receptor de insulina) por un exceso de ácidos grasos libres. El TNF- α derivado de la inflamación también induce resistencia a la insulina y parece ser que es a través de la *downregulation* de la señal de IRS-1 causada por la fosforilación de la serina de IRS-1 (Vargas, 2004). La resistencia a la insulina conduce a la acumulación de grasa en los hepatocitos mediante dos mecanismos principales: lipólisis en adipocitos que incrementa los ácidos grasos circulantes, e hiperinsulinemia. El incremento de captación de ácidos grasos en los hepatocitos produce una sobrecarga de la β -oxidación mitocondrial, con la consecuente acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos. Estos ácidos grasos son los sustratos e inductores del citocromo P450 2E1 y 4A. Estos citocromos, que están elevados en la

esteatohepatitis, favorecen la producción de radicales libres de oxígeno capaces de inducir la peroxidación lipídica de las membranas de los hepatocitos (Weltman et al., 1998). Por otro lado, el aumento de los niveles de ácidos grasos intrahepáticos proporciona una fuente para el estrés oxidativo, el cual es, en parte, responsable de la progresión de esteatosis a esteatohepatitis y finalmente cirrosis. La mitocondria es la fuente celular principal de ROS, y puede desencadenar esteatohepatitis y fibrosis por tres mecanismos principales: peroxidación lipídica, inducción de citoquinas e inducción del ligando Fas. Las ROS producen peroxidación lipídica, la cual causa muerte celular y la secreción de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-nonenal (HNE) (Esterbauer et al., 1991). Estas moléculas a su vez también inducen muerte celular y activan a las CHE, promoviendo la síntesis de colágeno. El HNE promueve la inflamación tisular ya que posee actividad quimiotáctica para los neutrófilos (Curzio et al., 1985). Los productos de la peroxidación lipídica también alteran el ADN mitocondrial y reaccionan con proteínas mitocondriales, con lo que se inhibe el transporte de electrones en la cadena respiratoria; esto incrementa todavía más la producción de ROS y crea un círculo vicioso de estrés oxidativo y peroxidación lipídica.

1.2.4. Estrés oxidativo

La evidencia de estrés oxidativo se ha detectado en casi todas las enfermedades crónicas del hígado clínicas e experimentales independientemente de su etiología y grado de fibrosis. Las moléculas relacionadas con el estrés oxidativo pueden actuar como mediadores capaces de modular el daño celular responsable de la progresión de la fibrosis (Parola & Robino, 2001).

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos o moleculares. Las **especies reactivas del oxígeno** (ROS) son los radicales derivados del oxígeno y representan la fuente más importante de radicales libres. Es un término colectivo que engloba tanto radicales del oxígeno, por ejemplo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}); como derivados del oxígeno que no contienen electrones desapareados, por ejemplo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Las ROS pueden ser generadas de forma endógena por la cadena respiratoria mitocondrial, la citocromo P450 y la auto-oxidación de sustratos endógenos, como proteínas del grupo hemo, catecolaminas y

quinonas. Además, hay enzimas que producen ROS, como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Otra fuente de ROS en el sistema intracelular son los peroxisomas (Valko et al., 2004). Los peroxisomas representan el lugar con mayor consumo de oxígeno dentro de la célula y participan en varias funciones metabólicas con consumo de oxígeno. Este consumo de oxígeno hace que se produzca H_2O_2 y que se oxide posteriormente a otras moléculas. Las ROS se producen como intermediarios del metabolismo y pueden tener efectos beneficiosos como por ejemplo la citotoxicidad frente a bacterias. Sin embargo, también pueden afectar a las células del organismo al oxidar macro-moléculas como los lípidos, proteínas o incluso el DNA, inhibiendo sus funciones. Por tanto, las ROS pueden afectar a las vías de señalización modulando la expresión génica, el metabolismo, el ciclo celular y la muerte celular (Sid et al. 2013).

De la misma manera, las **especies reactivas de nitrógeno (RNS)** son otra fuente de radicales. Por ejemplo el radical óxido nítrico ($NO\cdot$) se genera en tejidos biológicos por sintasas de óxido nítrico específicas (NOSs), que metabolizan la arginina a citrulina con la formación de $NO\cdot$ (Ghafourifar & Cadenas, 2005). El $NO\cdot$ actúa como una molécula de señalización en diversos procesos fisiológicos, incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmunológica. La sobreproducción de RNS conduce a un estrés nitrosativo y esto ocurre cuando la generación de RNS excede al sistema ocupado de neutralizarlas y eliminarlas. Las células del sistema inmune producen el anión superóxido y NO durante la explosión oxidativa que se da en el proceso inflamatorio (Sánchez-Valle et al., 2012).

Cuando hay una sobreproducción de ROS y RNS, se altera la función mitocondrial, se modula la expresión de citoquinas, se alteran las respuestas inmunes y se activan cascadas de señalización resultando en un daño hepatocelular, apoptosis y daño celular en la fibrosis hepática. En muchas enfermedades del hígado se encuentran niveles elevados de ROS Y RNS, con una evidencia sustancial de que la magnitud de proteínas y lípidos modificados por la oxidación correlaciona con la severidad de la enfermedad (Muriel, 2009).

Los productos finales de la **peroxidación lipídica**, por ejemplo el 4-hidroxi-2,3-nonemal (HNE) o el malondialdehído (MDA) también pueden actuar como mediadores potenciales del estrés oxidativo, afectando a vías de señalización y a la proliferación de las células. Estos

productos pueden ser secretados tanto por células inflamatorias como por hepatocitos dañados.

Para regular la formación de radicales libres, las células han desarrollado mecanismos antioxidantes, incluyendo moléculas y enzimas derivadas de la alimentación y sintetizadas de manera endógena. Estos mecanismos son capaces de contrarrestar los efectos deletéreos de los radicales libres y mantener la homeostasis celular (Parola & Robino, 2001).

Las **defensas antioxidantes enzimáticas** incluyen (Tabla 1):

- Superóxido dismutasa (SOD): tiene tres isoformas con diferentes localizaciones intracelulares. Las que contienen cobre y zinc están en el citoplasma y en el espacio intermembrana mitocondrial (Cu/Zn-SOD: SOD1). Las que contienen manganeso están en la mitocondria (Mn-SOD: SOD2). Estas enzimas catalizan la dismutación del ion peróxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno.
- Catalasa (CAT): es una enzima que contiene hierro y se encuentra principalmente en los peroxisomas y detoxifica el H_2O_2 .
- Sistema glutatión (GSH) reductasa (GR) y GSH peroxidasa (GPx): utilizan como cofactores el GSH y NADPH y eliminan H_2O_2 .
- Otra familia de enzimas antioxidantes son las peroxiredoxinas (Prx), que pueden desintoxicar H_2O_2 con el uso de electrones provenientes de la tiorredoxina (Trx).
- Por último, las glutaredoxinas (Grx) son oxidoreductasas dependientes de GSH-tiol-disulfuro que catalizan la reducción dependiente de GSH de disulfuros y disulfuros-GSH.

Tabla 1

Reacciones antioxidantes y las enzimas que las catalizan
Superoxido dismutasa (SOD) $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalasa (CAT) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutatión Peroxidasa (GPx) $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSH + 2H_2O$
Glutatión Reductasa (GRed) $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP$

Las **defensas antioxidantes no enzimáticas** incluyen el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), GSH, carotenoides (precursores de la vitamina A), flavonoides, bilirrubina y el ácido úrico. Otras moléculas con capacidad antioxidante son las proteínas que se unen a metales. Estas proteínas hacen que los metales (hierro y cobre) se mantengan en un estado no reactivo. La transferrina y la lactoferrina se unen al hierro, mientras que la albúmina se une al cobre (Valko, 2007). En condiciones normales, estas moléculas presentan una actividad y concentración intracelular óptima para mantener el balance redox en las células.

Los neutrófilos, macrófagos y células de Kupffer constituyen la fuente mayoritaria de ROS durante la inflamación hepática, mientras que alteraciones individuales en los hepatocitos (por ejemplo en la inducción de isoformas de la citocromo P450, polimorfismos genéticos, estado antioxidante, etc.) pueden también desempeñar un papel en el estrés oxidativo. Si el estrés oxidativo es severo, todas las estructuras celulares (en particular la mitocondria y proteínas del citoesqueleto), macromoléculas (DNA, lípidos, enzimas) y las vías metabólicas se pueden oxidar, dañar y finalmente bloquear, conduciendo a la muerte celular por necrosis. Por otro lado, si el estrés oxidativo no es tan severo y no es suficiente para dañar de forma irreversible las funciones mitocondriales o para inactivar las caspasas, se ha sugerido que puede causar apoptosis celular (Parola & Robino, 2001).

El estrés oxidativo, a través de la generación de ROS, juega un papel importante en la producción del daño hepático e iniciando la fibrogénesis hepática. La disrupción oxidativa de los lípidos, proteínas y DNA induce necrosis y apoptosis de los hepatocitos, lo cual amplifica la respuesta inflamatoria, resultando en la iniciación de la fibrosis. Las ROS también estimulan la producción de mediadores profibrogénicos en las células de Kupffer y en las células inflamatorias circulantes. Estas ROS también son en sí mismas fibrogénicas y estimulan la proliferación de las CHE (Guimaraes ELM, et al. 2006).

1.2.5. Estrés en el retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo importante cuyas funciones incluyen: plegamiento y transporte de proteínas, homeostasis del calcio, síntesis de lípidos y participación en funciones celulares. El estrés del RE es una característica relevante en la patogénesis de enfermedades asociadas a la fibrosis. A pesar de que el estrés del RE constituye una función protectora frente a un estímulo nocivo, el estrés persistente del RE conduce a la apoptosis celular (Li et al., 2015).

La desregulación de la síntesis y procesamiento de proteínas en el RE causa la acumulación de proteínas mal plegadas, provocando el estrés del RE y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Hollien, 2013). La UPR típica consiste en tres vías, que están mediadas por tres transductores transmembrana del RE: proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico (PERK), proteína-1 α que requiere inositol (IRE1 α) y el factor-6 activador de la transcripción (ATF6). La UPR se activa mediante la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) también llamada GPR78/HSPA5. La acumulación de proteínas no plegadas secuestran BiPs, de manera que las BiPs se disocian de los tres transductores transmembrana del RE conduciendo a su activación. CHOP se expresa poco en condiciones fisiológicas, pero su expresión aumenta en presencia de estrés del RE persistente. La activación de CHOP, un mediador central del estrés del RE, induce la apoptosis y se regula por las tres vías de la UPR (Woelhbie & Hetz, 2011).

El RE es un orgánulo importante en el almacenamiento de Ca²⁺, por tanto tiene un papel importante en vías de señalización que utilizan el Ca²⁺ como segundo mensajero. Cuando una célula sufre un estrés del RE prolongado, las vías de señalización de muerte celular como la calpaína, caspasa-12, CHOP y JNK se activan. La liberación de Ca²⁺ del RE activa la calpaína que a su vez activa proteolíticamente a la caspasa-12 mediando la apoptosis (Figura 11).

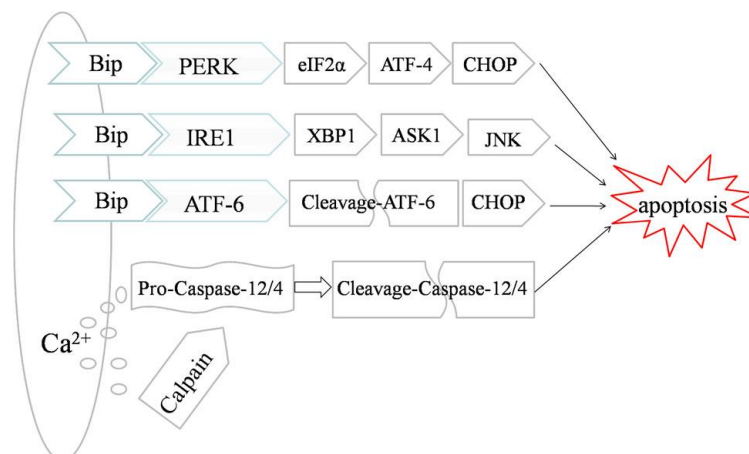


Figura 11. Activación de los sensores de la UPR y su efecto en la apoptosis. *Figura de Li et al., 2006.*

Cuando las CHE se activan generan MEC, este incremento en la síntesis de proteínas hace que haya un aumento en la capacidad plegadora de proteínas en el RE que puede alterar la homeostasis de RE. Se ha demostrado que bloqueando el estrés de RE mediante la vía IRE1 en las CHE se reduce el potencial fibrogénico de estas células. Por otro lado, la inducción de RE en las CHE aumenta la expresión de genes profibrogénicos como el Col1 α , el receptor del PDGF- β y el α -sma (Hernández-Gea et al., 2013). Además, el estrés del RE y la UPR están ligados a vías de señalización de inflamación y estrés como IRE1 y NF-KB-IKK. El estrés del RE puede incrementar la respuesta inflamatoria al activar el NF-Kb, JNK, ROS, TNF α y TGF β (Brenner et al., 2013). Por tanto, la apoptosis asociada al RE está involucrada tanto en la progresión y como en la regresión de la fibrosis hepática. En la progresión de la fibrosis, el estrés del RE induce la apoptosis de los hepatocitos. Mientras que la apoptosis de las CHE activadas inducida por el estrés del RE ha sido propuesta como un mecanismo para atenuar o revertir la fibrosis hepática.

1.3 Alteraciones hemodinámicas

1.3.1 Hipertensión portal

La hipertensión portal es un síndrome clínico frecuente en los pacientes con cirrosis y se caracteriza por un incremento en la presión venosa portal. Como consecuencia hay un incremento en el gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava inferior por encima

de los valores normales (1-5mmHg). En pacientes con cirrosis hepática, la hipertensión portal es la principal causa de muerte y de trasplante de hígado (Bosch et al., 2015).

De acuerdo con la aplicación hemodinámica de la Ley de Ohm, el gradiente de presión portal (ΔP) es directamente proporcional al flujo sanguíneo circulante a través del sistema venoso portal (Q) y a la resistencia opuesta a este flujo (R) ($\Delta P = Q \times R$). Por tanto, desde un punto de vista teórico, el incremento en la presión portal puede ser considerado como una consecuencia del incremento de la resistencia, del incremento del flujo sanguíneo, o de una combinación de los dos factores.

El incremento de la resistencia intrahepática en el hígado cirrótico no es sólo una consecuencia mecánica de la disrupción en la arquitectura de la anatomía vascular hepática causada por la fibrosis y la formación de nódulos (componente estructural), sino que también interviene un componente hemodinámico debido a un incremento en el tono vascular hepático. Este último puede ser causado por una deficiencia de sustancias vasodilatadoras y/o por un exceso de producción de vasoconstrictores, por una disfunción de las células hepáticas sinusoidales, y por la contracción de las CHE activadas.

Cuando hay daño hepático por ejemplo en el desarrollo de la cirrosis, incluso la membrana plasmática de los hepatocitos adyacentes al sinusoides sufre cambios como por ejemplo la pérdida de microvellosidades. Sin embargo, los cambios más relevantes ocurren en las células sinusoidales: CESH y CHE. Las CESH normalmente tienen fenestraciones que facilitan el transporte de macromoléculas del lumen sinusoidal a los hepatocitos. En respuesta al daño estas fenestraciones se pierden y las CESH sufren una reprogramación de su fenotipo funcional y de las vías de señalización angiogénicas. Por otro lado, las CHE sufren una serie de cambios que pueden ser resumidos como un incremento en su contractibilidad, capacidad migratoria, deposición de matriz y cambios en la secreción de factores paracrinos. Estos cambios también conducen al incremento de las proteínas de matriz en los sinusoides hepáticos y al incremento de la contractibilidad de las células perisinusoidales (Iwakiri et al., 2014).

Disfunción de las células endoteliales sinusoidales

Las CESH son la primera defensa frente al daño hepático y ejercen diversos efectos en la función hepática como el tono vascular, inmunidad, crecimiento de hepatocitos y remodelado

de la angiogénesis. El concepto de la disfunción endotelial se caracteriza por una disminución de la secreción de moléculas vasodiladoras por parte de las CESH. Un buen ejemplo es la disminución de la producción del óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador, que ocurre por al menos por dos mecanismos: 1) inhibición de la sintasa endotelial de NO (eNOS) por reguladores negativos como la caveolina-1 (sobre-expresada en cirrosis) (Morales-Ruiz et al., 2003), 2) el aumento de estrés oxidativo en la cirrosis hace que los radicales superóxido reaccionen con el NO y se forme peróxido de nitrito (ONOO-) reduciendo la biodisponibilidad de NO. Estos cambios están acompañados por un incremento de la secreción de moléculas vasoconstrictoras como el tromboxano A2 producido por la COX-1 o como la endotelina-1 (ET-1) que se une a los receptores de las CHE (Iwakiri, 2014).

Células hepáticas estrelladas activas

El reclutamiento de las CHE activas a los vasos sinusoidales incrementa la resistencia vascular en la cirrosis. Además, las CHE activas reducen su respuesta en presencia de vasodilatadores como el NO. Por otro lado, la ET-1 (incrementada en la cirrosis) aumenta la contracción de las CHE. El incremento de la producción de ET-1 y la disminución de NO en los hígados cirróticos, aumentan las resistencias intrahepáticas al flujo portal a través de las CHE activas (Pinzani et al., 1996; Perri et., 2006).

Angiogénesis

La angiogénesis juega un papel crucial en la circulación intrahepática presente en la hipertensión portal. Las CHE activas junto con otros miofibroblastos pueden promover la angiogénesis al secretar factores angiogénicos, como la angiopoyetina o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que activan a las CESH. Con la formación de nuevos vasos hay una alteración irregular del flujo sanguíneo que puede contribuir al incremento de las resistencias vasculares (Melgar-Lesmes et al., 2009; Iwakiri, 2014).

1.3.2 Disfunción en la circulación esplácnica y sistémica

La disfunción de la circulación arterial sistémica se caracteriza por una reducción en la resistencia vascular sistémica debido en primer lugar a una vasodilatación arterial de la circulación esplácnica causada por la hipertensión portal. Aunque muchos vasodilatadores

han sido propuestos para explicar los cambios en la circulación esplácnica, el óxido nítrico parece ser el de mayor importancia (Arroyo & Jiménez, 2000).

Un pequeño incremento en la presión portal es detectado en primer lugar por la microcirculación intestinal, la cual incrementa la producción de VEGF con el subsecuente incremento de los niveles de eNOS y de NO en la microcirculación intestinal. Cuando la presión portal sigue incrementando, se desarrolla una vasodilatación en la circulación esplácnica arterial (por ejemplo en las arterias mesentéricas). También se produce una hipocontractibilidad por la presencia de una excesiva cantidad de moléculas vasodilatadoras (NO, endocannabinoides) (Ros et al., 1995; Reichenbach, Ros & Jiménez, 2010) y una disminución de vasoconstrictores (neuropéptido Y, urotensina II, angiotensina y bradiquinina) (Iwakiri, 2014).

En los estadios tempranos de la cirrosis, cuando los pacientes no presentan síntomas y se encuentran en un estado físico sano, el incremento en las resistencias vasculares hepáticas, principalmente debido a la fibrosis, es moderado y por tanto, el incremento en la presión portal también es moderado. En este contexto, hay una leve reducción en la resistencia vascular sistémica debido a una vasodilatación arterial esplácnica moderada, la cual es compensada por un incremento en el gasto cardiaco, permitiendo que la presión y el volumen sanguíneo arterial se mantengan dentro de unos límites normales. En los estados avanzados de la cirrosis, cuando los pacientes presentan síntomas, la reducción en la resistencia vascular sistémica es mayor y no puede ser compensada por el incremento del gasto cardiaco. En este contexto de insuficiencia en la circulación arterial, la presión arterial se debe mantener por medio de la activación del sistema vasoconstrictor, incluyendo el sistema renina-angiotensina, el sistema nervioso simpático y, en estadios más avanzados, la hipersecreción no osmótica de la vasopresina (hormona antidiurética) (Figura 12). Estos sistemas ayudan a mantener un volumen de sangre arterial y una presión arterial efectiva pero también tienen efectos notorios en la función renal, particularmente en la retención de sodio y agua con la consecuente acumulación de ascitis y edema. Si la activación de estos sistemas se mantiene, el aumento en la vasoconstricción renal puede causar una reducción del filtrado glomerular, una condición conocida como síndrome hepatorenal (HRS) (Solà & Ginès, 2010).

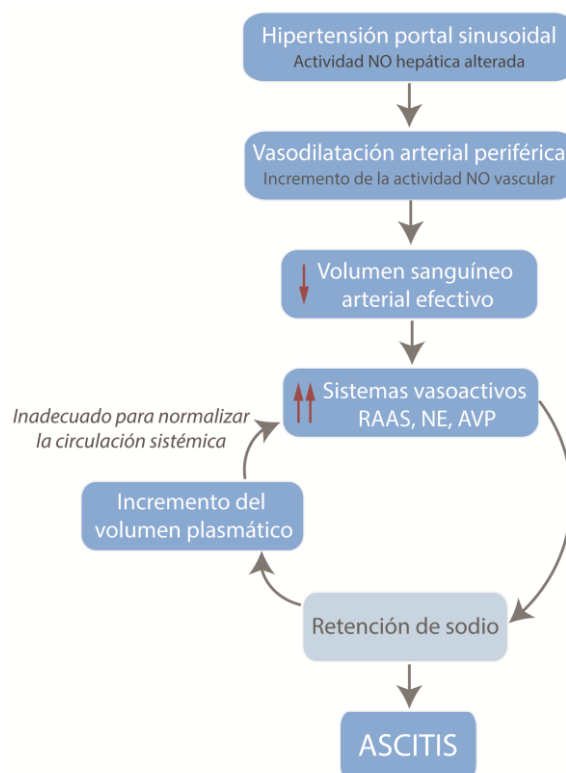


Figura 12. Representación esquemática de la patogénesis de la formación de ascitis. *Figura adaptada de Fernández-Varo et al., 2010.*

1.3.3 Disfunción renal y ascitis

El sodio es el catión más prevalente osmóticamente en el fluido extracelular. El contenido total de sodio en el cuerpo determina la cantidad de fluido extracelular, con lo cual cualquier incremento en la concentración de sodio es asociado con un incremento en el fluido extracelular. Para mantener el volumen de fluido extracelular constante, el organismo ha desarrollado mecanismos precisos para adaptar la excreción de sodio al consumo de sodio (Fernández-Llama, Ginès & Schrier, 2005).

Aunque no hay estudios que demuestren la relación cronológica entre la retención de sodio y la formación de ascitis en pacientes con cirrosis, investigaciones experimentales en animales han proporcionado suficientes evidencias que indican que la retención de sodio precede a la formación de ascitis, enfatizando la importancia de la disfunción renal en la patogénesis de la cirrosis (López-Novoa et al., 1980; Jiménez et al., 1985). Por otro lado, es importante destacar que el incremento de la retención de sodio en la cirrosis no es un evento fijo e irreversible, sino que estos cambios varían durante el desarrollo de la enfermedad.

Las leves alteraciones en el manejo de sodio renal presente en los pacientes cirróticos pre-ascíticos, responsables del incremento del volumen sanguíneo, son probablemente un mecanismo homeostático para compensar el incremento en la capacitancia vascular del sistema vascular esplácnico debido a la vasodilatación arterial.

Los sistemas neurohumorales principales que participan en la regulación de la excreción de sodio son el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el sistema nervioso simpático (SNS), ambos antinatriuréticos. La aldosterona incrementa la reabsorción de sodio en la nefrona distal. El SNS estimula la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, en la asa de Henle y en los túbulos distales y colectores. Los péptidos natriuréticos son una familia de sustancias que incluyen el péptido natriurético atrial, el péptido natriurético cerebral, el péptido natriurético tipo C y la urodilatina, con propiedades natriuréticas y/o vasoactivas. Estas sustancias inhiben la reabsorción de sodio en el túbulo colector distal (Arroyo & Jiménez, 2000) (Figura 13).

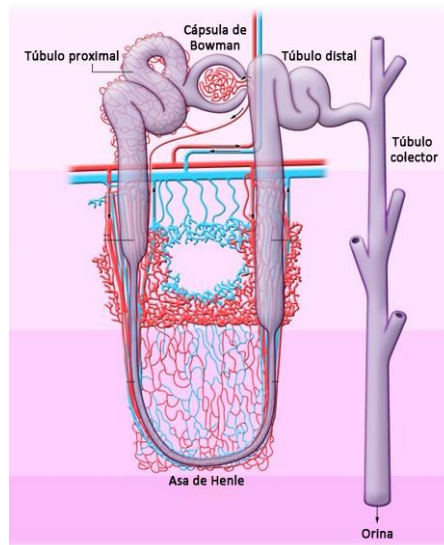


Figura 13. Anatomía de la nefrona. *Figura adaptada de Bonventre & Yang 2011.*

En la fase pre-ascítica de la cirrosis el metabolismo renal de sodio está alterado pero sin embargo los pacientes presentan un flujo sanguíneo renal (RBF), una tasa de filtrado glomerular (GFR) y un aclaramiento de agua libre normal. En esta fase la vasodilatación arterial esplácnica es moderada y el sistema linfático es capaz de retornar el incremento en la producción de linfa a la circulación sistémica. El líquido que retienen los riñones incrementa el volumen plasmático y suprime las señales estimuladoras de los sistemas antinatriuréticos.

Por tanto, no se forma ascitis ni edema. Cuando la enfermedad del hígado progresa, la vasodilatación esplácnica aumenta, resultando en un llenado insuficiente de la circulación arterial más intenso y una marcada retención de sodio y agua. En este momento, el volumen de sangre arterial efectivo es imposible de mantener por el incremento de volumen plasmático, probablemente porque el líquido retenido pasa de la circulación esplácnica a la cavidad peritoneal como ascitis y/o de la circulación sistémica al sistema tisular intersticial como edema. Ocurre una persistente estimulación de los sistemas vasoconstrictores para intentar mantener el volumen de sangre arterial efectivo. La activación de estos sistemas perpetúa la retención de sodio y agua, acumulándose en forma de ascitis (Fernández-Llama, Ginès & Schrier, 2005) (Figura 14).

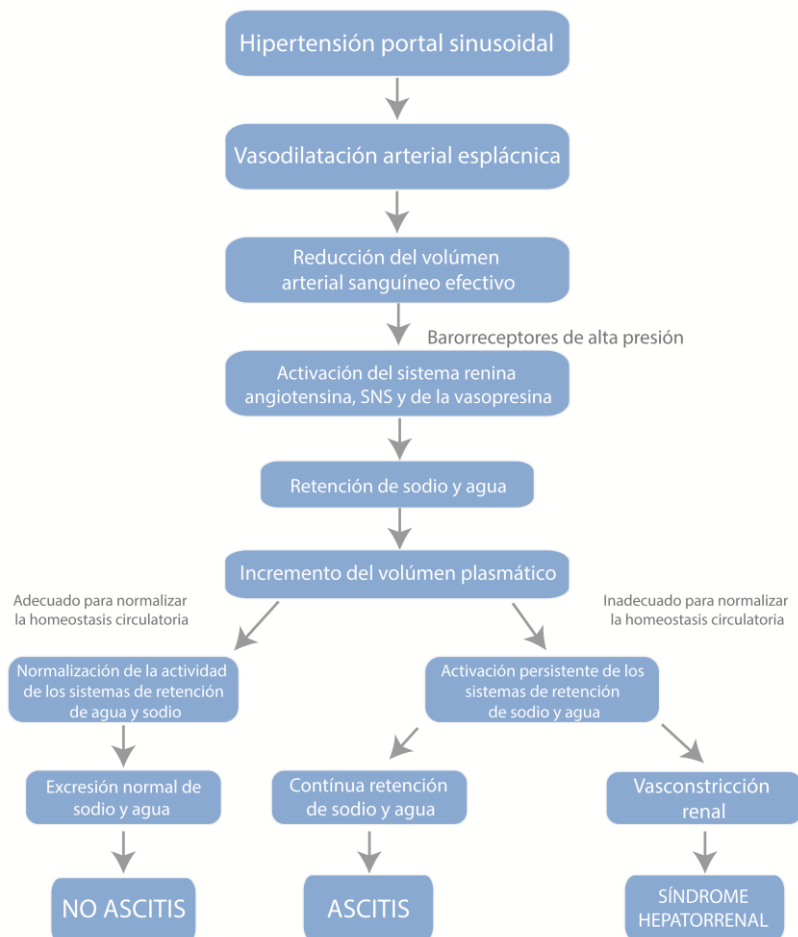


Figura 14. Patogénesis de las anomalías renales funcionales y de la formación de ascitis en la cirrosis. *Figura adaptada de Fernández-Llama, Ginès & Schrier, 2005.*

1.4 Modelos experimentales de cirrosis

La disponibilidad de modelos experimentales es crucial tanto para el estudio como el desarrollo de tratamientos de enfermedades humanas. Es por ello que el conocimiento de la cirrosis hepática y la fisiopatología asociada a sus complicaciones se basan, en gran parte, en los modelos experimentales de daño hepático (Clària & Jiménez, 2005).

De acuerdo a su etiología, los modelos experimentales de enfermedad hepática se pueden clasificar como: colestásico, nutricional, alcohólico, inmunológico y tóxico.

En cuanto al modelo **colestásico** de cirrosis, la ligadura del conducto biliar (BDL) consiste en la doble ligadura del conducto biliar extrapancreático cerca del hilio hepático con hilo de seda y la escisión del conducto biliar entre los dos nudos. Después del procedimiento quirúrgico la cirrosis biliar se desarrolla en aproximadamente 4 semanas. Histológicamente se observa un infiltrado de tejido conectivo en la zona portal y un aumento en la proliferación de células epiteliales del conducto biliar y de hepatocitos (Zimmermann et al., 1994). A nivel hemodinámico hay un aumento de la presión portal y del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias vasculares sistémicas y esplácnicas. Las mayores desventajas de este modelo son la elevada mortalidad y las diferentes respuestas a la obstrucción biliar dependiendo de la especie (Clària & Jiménez, 2005).

Un ejemplo de **cirrosis hepática inducida nutricionalmente** es la dieta deficiente en metionina/colina, la cual desarrolla fibrosis centrolobular y cirrosis en ratas y ratones después de 12-24 semanas de tratamiento (Ghoshal et al., 1983). La respuesta variable entre animales y la identificación de estadios histológicos son las principales desventajas de este modelo.

Existen varios modelos de **cirrosis inducida por hepatotoxinas**:

- La cirrosis inducida por dimetilnitrosamina (DMNS) consiste en la administración de este agente carcinogénico que causa carcinoma hepatocelular al formar uniones covalentes y metilación del DNA y proteínas. El DMNS se ha utilizado en ratas y perros, al cabo de 3-4 semanas de administración desarrolla cirrosis con hipertensión portal, retención de sodio y ascitis (Jenkins et al., 1985). Su principal desventaja es que el DMNS es altamente tóxico y un potente carcinogénico.

- La tioacetamida (TAA) también produce cirrosis macronodular en ratas al cabo de 2-3 meses con hipertensión portal y ascitis secundaria a la inducción de estrés oxidativo en el hígado (Li et al., 2002). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las características hemodinámicas y renales de este modelo.
- La D-galactosamina es otra hepatotoxina que produce daño hepático al reducir la uridina trifosfato y otros nucleótidos de uridina, por tanto disminuyendo la síntesis de RNA y proteínas. La D-galactosamina en ratas induce disfunción hepática progresiva acompañada de hipertensión portal, circulación hiperdinámica y ascitis (Javle et al., 1998). A pesar de ello, se considera que este modelo reproduce el daño hepático agudo observado en la hepatitis humana.
- La cirrosis inducida con tetracloruro de carbono (CCl₄) es, con diferencia, el modelo más utilizado principalmente por su disponibilidad, versatilidad y reproducibilidad.

1.4.1 Cirrosis inducida con CCl₄

El daño hepático inducido con CCl₄ se produce por el radical clorometilo ($\cdot\text{CCl}_3$), un metabolito reactivo que se origina durante el metabolismo oxidativo del CCl₄ por los miembros de la familia de la citocromo P450. Las especies reactivas $\cdot\text{CCl}_3$ inducen la producción de ROS y causan degradación peroxidativa de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular. Muchos compuestos, incluyendo el fenobarbital, acetona y etanol, que inducen la actividad de la citocromo P450, son capaces de potenciar la hepatotoxicidad de los metabolitos del CCl₄ y aceleran la formación de cirrosis.

El CCl₄ se ha utilizado para inducir cirrosis en rata, ratón, cerdo, cobaya, hámster, babuino y perro. Al absorberse a través de los pulmones y del tracto gastrointestinal, el CCl₄ se puede administrar por diferentes rutas: subcutáneo, inyección intramuscular o intraperitoneal, sonda gástrica e inhalación en cámara cerrada. A la práctica, la mayoría de estudios se realizan en ratas y ratones a los cuales se administra el CCl₄ por inhalación o inyección.

En nuestro laboratorio, la cirrosis se induce en ratas macho mediante inhalación de CCl₄ en una cámara cerrada utilizando el método de McLean & McLean (McLean et al., 1969) modificado por López-Novoa (López-Novoa et al., 1976). Se añade fenobarbital (0.3 g/L) al agua de bebida para reducir el tiempo requerido para inducir cirrosis. Las medidas de la caja

son: 70x25x30 cm y se introducen en ella 4-6 ratas en cada sesión de inhalación. El aire comprimido pasa a la cámara de gas a través de un medidor de flujo burbujeante (1l/min) conectado a un frasco que contiene CCl₄. Los animales se exponen a la atmósfera de gas dos veces por semana (lunes y viernes) empezando con 0.5 minutos de aire burbujeante y 0.5 minutos en la atmósfera de gas. En las semanas siguientes la dosis será incrementada de 1 minuto en 1 minuto hasta llegar a 5 minutos de aire burbujeante y 5 minutos en atmósfera de gas. La inhalación de CCl₄ es un método seguro, altamente reproducible y relativamente predecible para inducir cirrosis en rata.

En el modelo de cirrosis inducida por CCl₄ se observa histológicamente daño hepatocelular con necrosis centrolobular, esteatosis e inflamación en los estadios tempranos de intoxicación. Durante la administración crónica, de 6 a 9 semanas de intoxicación con CCl₄, se observan hepatocitos necróticos, infiltrado inflamatorio, regeneración de hepatocitos, y deposición perivenular y periportal de tejido conectivo. La regeneración continuada de hepatocitos y la fibrogénesis activa combinado con capilarización conduce a una distorsión arquitectural, que finalmente acaba en una cirrosis micronodular (Jiménez et al., 1992).

Las ratas con cirrosis inducida por CCl₄ presentan anomalías circulatorias intrahepáticas y extrahepáticas similares a las observadas en cirrosis humana. El cambio más relevante es el incremento de la resistencia vascular hepática que conduce a una hipertensión portal. El incremento crónico de la presión portal promueve la formación de vasos colaterales porto-sistémicos, una de las mayores consecuencias de la hipertensión portal. Las ratas con cirrosis inducida por CCl₄ también exhiben un deterioro de la hemodinámica sistémica caracterizado por una hipotensión arterial, baja resistencia periférica, alto gasto cardíaco e incremento del volumen sanguíneo (Vorobioff et al., 1984). Estos cambios hemodinámicos activan los sistemas endógenos vasoactivos (RAAS, SNS y la vasopresina). Estos sistemas vasoconstrictores inducen la retención renal de agua y sodio que constituye un paso crítico para la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal (formación de ascitis). Es por ello que este modelo representa una herramienta muy útil para investigar la fisiopatología de trastornos hemodinámicos, la disfunción renal y la formación de ascitis observados en la cirrosis humana (Clària & Jiménez, 2005).

1.5 Terapias

1.5.1 Terapias en la fibrosis hepática

La evidencia de que la fibrosis es un proceso dinámico y reversible junto con la identificación de los mediadores de la fibrosis y los avances en su diagnóstico no invasivo han propulsado el desarrollo de fármacos antifibróticos, aunque actualmente ninguno de ellos ha sido aprobado (Lee et al. 2015). A día de hoy, con el éxito de los fármacos antivirales para el VHB y el VHC, el esfuerzo a la hora de diseñar fármacos antifibróticos se está enfocando sobretodo en la fibrosis relacionada con EHNA.

Actualmente existen diferentes estrategias terapéuticas en el tratamiento la fibrosis hepática (Figura 15):

- 1) Control o cura de la enfermedad primaria o reducción del daño tisular:** la eliminación o control de la etiología sigue siendo el tratamiento más efectivo. Por otro lado, se han desarrollado una clase de compuestos conocidos como hepatoprotectores que minimizan las señales de daño que provocan la inflamación y la fibrosis. Ejemplo de estas moléculas son los inhibidores de la apoptosis (como el emricasan) o inhibición de la catepsina-B, una proteasa lisosomal (Pockros et al., 2007; Baskin-Bey et al., 2005). Otra estrategia son los fármacos dirigidos a atenuar la lipotoxicidad como la acetil CoA-carboxilasa. En cuanto a la inflamación, se han desarrollado antagonistas de los receptores de las citoquinas, como el de la IL-1. Los antioxidantes ejercen un efecto preventivo en el daño de los hepatocitos pero también pueden ser directamente antifibróticos, por ejemplo la vitamina E es efectiva en pacientes con EHNA (Sanyal et al., 2010). También se han desarrollado antagonistas de la NOX con el fin de reducir el estrés oxidativo generado por la NADPH (Paik et al., 2011). También se ha demostrado el efecto beneficioso en la hipertensión portal que pueden tener los antioxidantes como la Vitamina C o la SOD en pacientes cirróticos y en fibrosis experimental, respectivamente (Hernández et al., 2006; Laviña et al., 2009).
- 2) Interacciones receptor-ligando y señalización intracelular como objetivos:** La identificación de los receptores de membrana que se expresan en las CHE ha

generado nuevas dianas terapéuticas. Ejemplos a destacar de estas dianas son los receptores neuroquímicos (antagonismo del CB1, CB2 o del recetor del 5HT-2B) (Mallat et al, 2013; Reichenbach et al., 2012; Ebrahimkhani et al., 2011); el sistema renina-angiotensina (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ACE); antagonismo de la ET-1 y del NO; inhibidores de receptores tirosina quinasa incluyendo el PDGF, FGF y el TGF α ; y receptores nucleares como el agonismo del PPAR γ .

- 3) Inhibición de la fibrogenesis:** El TGF β es el estímulo más potente de la síntesis de colágeno I y otros componentes de la matriz, es por ello que inhibir su acción es el foco de muchas estrategias antifibróticas. Sin embargo, el reto es conseguir una inhibición localizada en el área fibrótica, ya que la inhibición sistémica del TGF β puede inducir inflamación, crecimiento epitelial y neoplasia. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) también es una potente señal fibrogénica y actualmente se están probando como tratamiento un anticuerpo anti-CTGF (FG-3019) en pacientes con fibrosis hepática (Wang et al., 2011).

- 4) Promover la resolución de la fibrosis:** Incrementando la degradación de la matriz por ejemplo utilizando antagonistas de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), aunque de momento sólo se han probado en modelos animales. Otra estrategia es estimular la eliminación de las CHE activas, por ejemplo inhibiendo vías señales pro-apoptóticas como Bcl-2 o NF-Kb (Chakraborty & Mann, 2010), aumentando la apoptosis de los miofibroblastos con antagonismo del CB1 (rimonabant) o del 5HT, o induciendo su muerte al amplificar la respuesta de células NK (por ejemplo con IFN γ) (Bansal et al., 2011).

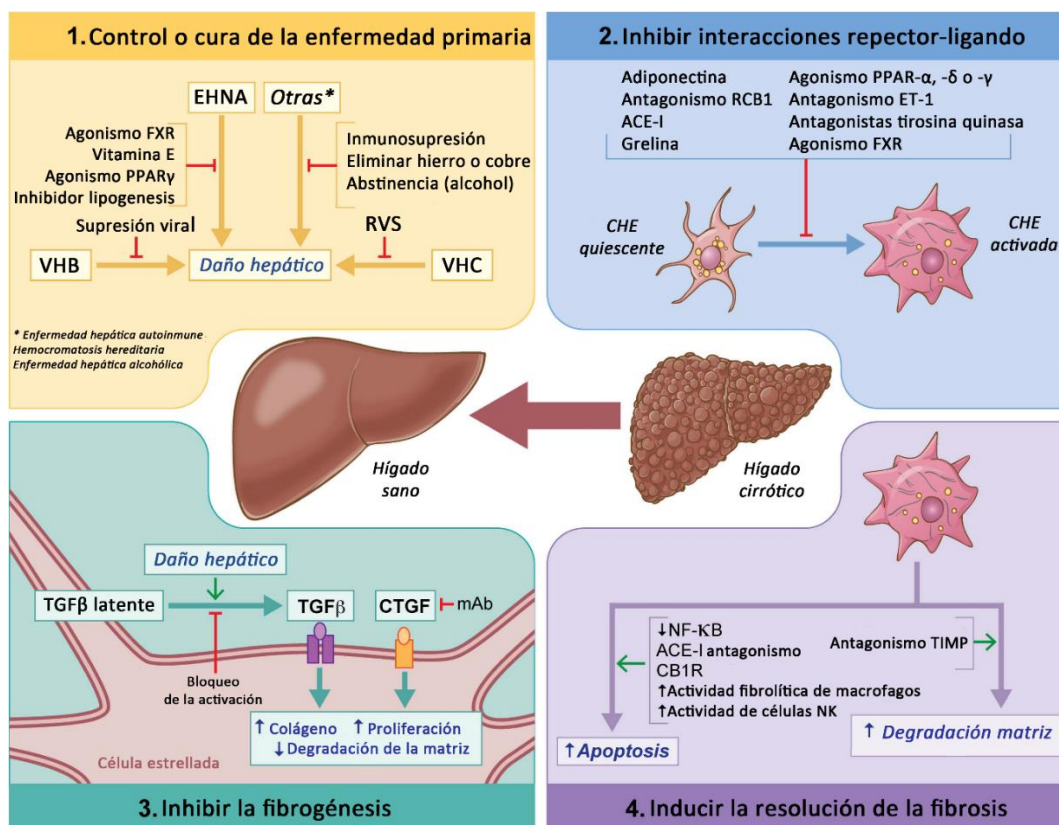


Figura 15. Estrategias terapéuticas para la fibrosis hepática. RVS: respuesta viral sostenida. Figura adaptada de Lee et al., 2015.

1.5.1 Terapias en la cirrosis con disfunción renal y circulatoria

El tratamiento actual para la ascitis y el edema se basa en una dieta con restricción de sal junto con diuréticos para incrementar la excreción renal de sodio (Solà & Ginès, 2010). Los **diuréticos** que se utilizan son los antagonistas de la aldosterona, ya que la secreción de aldosterona está incrementada en la cirrosis. Sin embargo, los diuréticos no son efectivos en aproximadamente el 10-20% de los pacientes y pueden desarrollar complicaciones hasta en el 40 % de los pacientes (Runyon, 2009; Moore & Aithal, 2006). Otro tratamiento para la ascitis es la **paracentesis** de grandes volúmenes, la cual es efectiva en pacientes con ascitis refractaria por la falta de respuesta a los diuréticos (Ginès et al., 1987). La paracentesis se asocia a la administración de albúmina para prevenir la disfunción circulatoria como consecuencia de la eliminación de un gran volumen de líquido ascítico. Las principales desventajas de la paracentesis es el tiempo que requiere, la necesidad de administrar albúmina (no fácilmente disponible) y sobre todo, que no previene la recurrencia de la ascitis

al no interferir con los mecanismos que producen la ascitis. Una alternativa a la paracentesis es el uso de la **derivación portosistémica intrahepática transyugular (TIPS)**. La TIPS consiste en insertar una endoprótesis vascular o stent a través de la yugular causando una reducción de la presión portal y de la retención renal de sodio. El uso de TIPS tiene una aplicabilidad limitada (no se puede utilizar en pacientes con fallo hepático severo), tiene un coste alto, requiere experiencia para su inserción e incrementa el riesgo de encefalopatía hepática. Los **β -bloqueantes** también pueden tener efectos beneficiosos en la prevención de las complicaciones de la cirrosis al reducir la presión portal. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos fármacos pueden tener efectos deletéreos en pacientes con cirrosis avanzada (Sersté et al, 2010).

En cuanto la hiponatremia hipervolémica, en los últimos años se han desarrollado una nueva generación de fármacos, conocidos como **vaptanos** que antagonizan selectivamente los receptores V2 de la vasopresina en los túbulos renales (Decaux et al., 2008). Ejemplos de estos fármacos son el conivaptan (antagonista dual V1/V2) (Fernández-Varo et al., 2003) ya aprobado en EEUU, tolvaptan (antagonista oral selectivo V2) también aprobado por la FDA. A pesar de ello, aún se necesita más información para el uso de los vaptanos en la cirrosis, particularmente en su seguridad a largo plazo.

Finalmente, en el tratamiento del síndrome hepatorenal el método actual más efectivo es la administración de fármacos **vasoconstrictores**. El vasoconstrictor de elección es la terlipresina (análogo de la vasopresina), mejora la función circulatoria al causar vasoconstricción en la red vascular esplácnica dilatada incrementando la presión arterial y suprimiendo la actividad de vasoconstrictores endógenos en los riñones. La terlipresina es efectiva en un 40-50 % de pacientes con HRS tipo 1 (Gluud et al., 2010). Otros vasoconstrictores que se han utilizado como tratamiento de la HRS incluyen la noradrenalina y mododrina, ambos en combinación con albúmina. La **terapia renal sustitutiva** también se ha utilizado en pacientes con HRS tipo 1, sobre todo en aquellos candidatos para un trasplante de hígado. Esta terapia es una opción temporal en pacientes que no responden a vasoconstrictores o en aquellos que desarrollan una sobrecarga de volumen severa, acidosis metabólica y/o hiperpotasemia refractaria (Meltzer & Brentjens, 2010).

2. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CERIO

2.1. Definición y aplicación biomédica

Las nanopartículas pueden ser definidas como partículas con un tamaño en el rango de 1 a 100 nm (Figura 16).

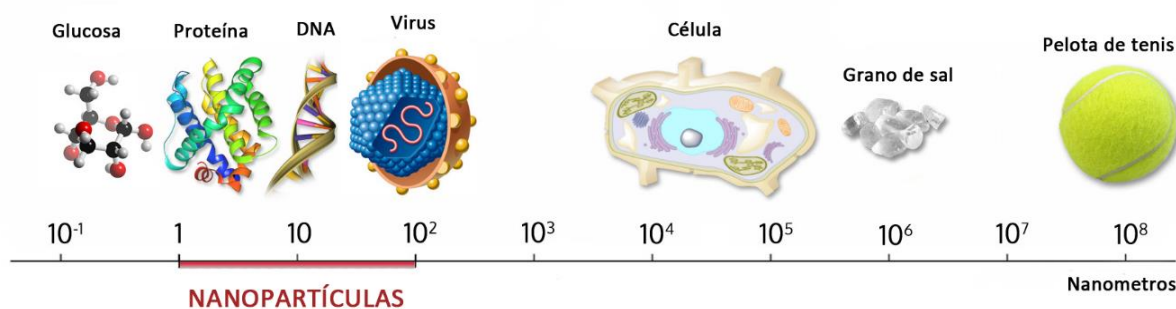


Figura 16. Comparación de tamaños en el rango de nanómetros.

A lo largo de las últimas décadas, se han desarrollado diferentes tipos de nanopartículas a partir de varios componentes, incluyendo carbono, óxidos de sílice, óxidos de metal, nanocrisales, lípidos, polímeros, dendrímeros y puntos cuánticos entre otros (Sandhir et al., 2015).

En particular, las nanopartículas metálicas constituyen una serie de compuestos óxidos formados a partir de nanopartículas de óxido de metal. La síntesis de este tipo de nanopartículas se hace principalmente a través de dos vías dependiendo de la naturaleza del sistema de transformación utilizado, vía líquido-sólido o gas-sólido. Las nanopartículas de óxido de metal tienen una estructura distintiva con propiedades interesantes como el potencial redox, efecto catalítico, estabilidad mecánica, biocompatibilidad y gran área superficial. Por estas razones, las nanopartículas de óxido de metal han ganado un considerable interés en el campo de la imagen biomédica, detección y biología terapéutica (Tuli et al., 2015).

El cerio (Ce) es un metal de la serie de los lantánidos y es el elemento más abundante de las tierras raras. Fue descubierto en 1803 y tomó su nombre de Ceres, el planeta enano/asteroide que se había encontrado dos años antes. Cuando se combina con oxígeno puede adoptar una estructura cristalina de fluorita con un área superficial altamente reactiva

a la hora de neutralizar radicales (Estevez & Erlichman, 2014) (Figura 17). El óxido de cerio (CeO_2) se ha utilizado durante décadas para pulir vidrios y como convertidor catalítico entre otras aplicaciones.

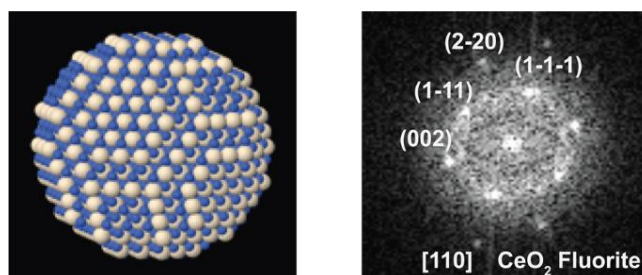


Figura 17. Simulación atómica de una NP de óxido de cerio y sus planos atómicos. *Figura adaptada de Oró et al., 2016.*

Las nanopartículas (NPs) de óxido de cerio (CeO_2 NPs) tienen dos estados de oxidación Ce^{3+} y Ce^{4+} que pueden dar lugar a un ciclo redox autoregenerativo acompañado de la liberación de oxígeno en su superficie. La falta de oxígeno crea sitios reactivos en su superficie. Estos sitios reactivos tienen la capacidad de captar radicales libres (Niu et al., 2011) (Figura 18).

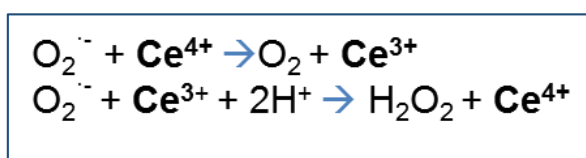


Figura 18. Ciclo redox entre los estados de oxidación Ce^{3+} y Ce^{4+}

Esta habilidad de las CeO_2 NPs de captar radicales libres ha impulsado su uso como antioxidante, incluyendo estudios donde demuestran su actividad mimética a la SOD y a la CAT y su capacidad de eliminar radicales libres (Wason & Zhao, 2013). Es por ello que las CeO_2 NPs se han estudiado en sistemas biológicos y han mostrado tener efectos antioxidantes en varios modelos experimentales patológicos incluyendo disfunción cardíaca (Niu et al., 2007), isquemia cerebral (Estevez et al., 2011), hipoxia e hipertensión pulmonar (Arya et al., 2013; Kolli et al., 2014), cáncer de ovario (Giri et al., 2013), obesidad (Rocca et al., 2015), sepsis (Selvaraj et al., 2015) y daño agudo renal (Manne et al., 2015).

2.2. Síntesis, tamaño y estabilización

Las propiedades redox de las CeO₂NPs están ligadas a su estructura cristalina que, a su vez, depende del proceso de síntesis. Los métodos para sintetizar CeO₂NPs son muy variados y como consecuencia se pueden crear CeO₂NPs de diferente tamaño y superficie. Los métodos de síntesis incluyen hidrólisis, precipitación, deposición termal, síntesis por combustión, sólido-hielo, método hidrotermal o solvotermal, microemulsión, condensación de gas, síntesis sonoquímica, y síntesis electroquímica entre otras (Dowding et al., 2013). Además, las CeO₂NPs se pueden sintetizar con un revestimiento o estabilizador con el objetivo de producir nanopartículas dispersas que son menos propensas a la agregación. El ácido cítrico es el estabilizador más utilizado ya que es biocompatible. Sin embargo, es importante destacar que el estabilizador también puede cambiar al introducirlo en una solución fisiológica (Estevez & Erlichman, 2014).

Por otro lado, las nanopartículas pueden interactuar con biomoléculas solubles al entrar en un ambiente biológico. Cuando una nanopartícula entra en un biofluido, las proteínas comienzan a migrar hacia su superficie. Las proteínas más abundantes llegan primero y se asocian débilmente a la superficie, se separan rápidamente y vuelven a la solución. Las proteínas de menos abundancia pero con mayor afinidad reemplazan a las proteínas de mayor abundancia y menor afinidad. Aunque no se sabe exactamente cuánto tiempo requiere este proceso de intercambio, la “corona de proteínas” en muchas formulaciones de nanopartículas alcanza un estado de equilibrio en cuestión de minutos. A pesar de su importancia, aún no existen estudios proteómicos que caractericen la corona de proteínas plasmáticas presentes en las nanopartículas (Walkey et al., 2015).

2.3. Captación celular y localización

Se ha demostrado que las CeO₂NPs pueden entrar en las células de mamíferos tanto en estados normales como patológicos, con una adsorción importante que ocurre a las 3 horas de exposición en cultivo (Singh et al., 2010). Se ha observado que las CeO₂NPs pueden entrar en las células por varias vías, incluyendo endocitosis mediada por receptor y endocitosis mediada por clatrina y caveolas (Wason & Zhao, 2013). El tamaño de las partículas y su carga superficial son determinantes para la adsorción celular y su localización intracelular. Por tanto,

existe un debate sobre la localización intracelular de las CeO₂NPs, hay estudios que demuestran que se acumulan en el citoplasma sin trascolarse al núcleo (Alili et al., 2011), otros señalan que pueden acumularse en el espacio perinuclear (Horie et al., 2011), mientras otros detectan CeO₂NPs co-localizadas con la mitocondria, ER, lisosomas, difusas en el citoplasma y en el núcleo (Singh et al., 2010). Por otro lado, el pH de los diferentes compartimentos subcelulares ha demostrado ser determinante en la actividad anti- o pro-oxidante de las CeO₂NPs (Asati et al., 2010).

2.4. Biodistribución

Numerosos estudios han demostrado que las CeO₂NPs (<10 nm) son toleradas por los animales sin inducir toxicidad o respuesta inmune (Wason & Zhao, 2013). Sin embargo, hay algunos estudios que demuestran que estas nanopartículas pueden inducir alteraciones hepáticas patológicas, si bien es cierto que en estos estudios la dosis de CeO₂NPs administrada es mucho más alta (entre 10 a 1000 veces mayor) (Nalabotu et al., 2011; Tseng et al., 2012). Cuando se administran vía intravenosa o intraperitoneal, las CeO₂NPs se acumulan principalmente en el bazo y en el hígado, y en menor medida en los pulmones y riñones, no se observan en corazón ni en el cerebro. La acumulación tisular es mayor cuando se administra de manera intravenosa. Por otro lado, las CeO₂NPs no se eliminan rápidamente sino que persisten en los animales durante al menos 30 días sin encontrar concentraciones apreciables de CeO₂NPs en la orina o heces (Hirst et al., 2013; Yokel et al., 2013).

3. VASOPRESINA

3.1. Estructura de la vasopresina y su receptores

La **vasopresina** es una hormona peptídica con un puente disulfuro entre dos cisteínas y se sintetiza en las neuronas magnocelulares del hipotálamo. Aunque la oxitocina difiere de la vasopresina en sólo un aminoácido (80 % homología), tienen claramente una actividad fisiológica divergente. La vasopresina está implicada en la homeostasis osmótica y cardiovascular, mientras que la oxitocina es importante en el parto, lactancia y comportamiento sexual. Ambas están codificadas por diferentes genes pero estos genes se encuentran en el mismo cromosoma (Holmes et al., 2003).

Secreción de la vasopresina

Después de su síntesis en el hipotálamo, la vasopresina es transportada a la pituitaria posterior, donde es almacenada hasta que se estimula su secreción. Las estimulaciones osmóticas y no-osmóticas son las dos vías mayoritarias que controlan la secreción de vasopresina (Petersen, 2006).

Después de una estimulación hiperosmótica de los osmoreceptores centrales las células neurosecretoras magnocelulares se activan para secretar vasopresina al corriente sanguíneo. Los osmoreceptores periféricos que controlan la secreción de la vasopresina están localizados en la región que contiene la vasculatura menérgica y portal. Estos lugares son estratégicos para la detección temprana de incrementos en las osmolaridad después de la ingesta de alimentos y líquido.

Por otro lado, la reducción del volumen sanguíneo es detectada por los baroreceptores arteriales y atriales y se estimula la secreción de vasopresina.

La regulación osmótica de la secreción de vasopresina es sensible a pequeños incrementos en la osmolaridad plasmática (un aumento del 2 % produce una antidiuresis máxima), mientras que se requiere entre un 15-20 % de disminución de la presión sanguínea para inducir una antidiuresis máxima.

Receptores de la vasopresina

Las acciones de la vasopresina están mediadas por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G específicos de tejido (GPCRs), los cuales se clasifican en los siguientes subtipos:

- V₁R o V_{1a}: receptor V₁ vascular
- V₂R: receptor V₂ renal
- V₃R o V_{1b}: receptor V₃ pituitaria
- OTR: subtipos de la oxitocina
- P₂R: receptores P₂ purinérgicos

Los GPCRs están compuestos por 7 dominios transmembrana (hélices α hidrofóbicas) unidos por bucles extracelulares e intracelulares alternados, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal citoplasmático (Figura 19)

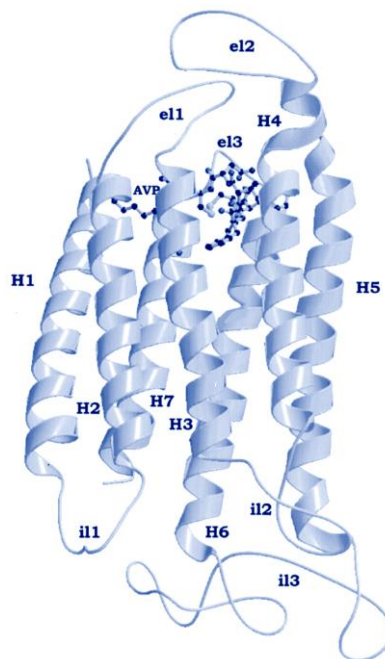


Figura 19. Acoplamiento de la vasopresina y topología del receptor humano V₁R. AVP: vasopresina; i1, i2 e i3: bucles intracelulares; e1, e2 y e3: bucles extracelulares; H1-H7: segmentos transmembrana. *Figura adaptada de Holmes et al., 2003.*

La señal de la vasopresina se transmite por los subtipos de proteína G_s y G_{q/11}. La vía de señalización G_s se caracteriza por la inhibición de la adenil ciclasa, lo que produce el incremento de los niveles de AMPc que a su vez activa múltiples maquinarias celulares, incluyendo canales de ion, factores de transcripción y enzimas metabólicas. La vía de señalización G_{q/11} es la vía clásica activada por hormonas movilizadoras de calcio y estimula a la fosfolipasa β para producir los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ produce la secreción de calcio desde compartimentos intracelulares y el DAG recluta la PKC a la membrana y la activa. La subunidad α de la proteína G_q también activa el factor de transcripción kappaB.

El efecto antidiurético de la vasopresina ocurre vía activación del V₂R. La vasopresina regula la excreción de agua en el riñón al incrementar la permeabilidad osmótica de agua en el túbulo colector, un efecto que se produce por la activación de AMPc a través de la proteína G_s del V₂R. El incremento intracelular de AMPc en el riñón hace que se fusionen las vesículas de acuaporinas 2 a la membrana plasmática apical de las células del túbulo colector, incrementando la reabsorción de agua.

Receptor V_{1a} (V_{1R})

Funcionalmente el receptor V_{1a} activa proteínas de la familia G_{q/11}. Las vías de señalización asociadas al receptor V_{1a} incluyen la activación de la captación de calcio, la fosfolipasa A₂, fosfolipasa C y la fosfolipasa D.

Los receptores V_{1a} se encuentran en gran parte en el músculo liso vascular y producen vasoconstricción al incrementar el calcio intracelular vía la cascada fosfatidil-inositol-bifosfato. Los receptores V_{1a} adicionalmente se localizan en cerebro, testículos, ganglio superior cervical, hígado, vasos sanguíneos, medula renal, cardiomiocitos y plaquetas.

En el riñón los receptores V_{1a} se encuentran sobre todo en las células intersticiales medulares y en las células epiteliales túbulo colector. La vasopresina actúa en los vasos de la médula a través del receptor V_{1a} y reduce el flujo sanguíneo de la médula interior sin afectar el flujo sanguíneo de la médula exterior.

Regulación negativa del receptor de la vasopresina

Una vez unido al ligando, el GPCR se activa pero seguidamente sufre una reducción de su respuesta al ligando (desensibilización). La desensibilización dependiente del agonista de estos receptores puede reducir la respuesta a una estimulación máxima hasta en un 70-80 %. La desensibilización del receptor ocurre cuando los receptores activados se fosforilan y se unen a proteínas arrestinas-β, inhibiendo una futura interacción con las proteínas G. La respuesta de los receptores también se limita por la degradación de AMPc por las fosfodiesterasas. Las arrestinas-β coordinan tanto la fosforilación de los receptores como el grado de degradación del AMPc por las fosfodiesterasas.

3.2. Efectos relevantes de la vasopresina mediados por el receptor V_{1a}

Estudios han demostrado que la vasopresina constriñe las arterias mesentéricas. En línea con esto, la vasopresina y la terlipresina (análogo sintético de la vasopresina), pueden reducir la severidad de la hemorragia por varices esofágicas. Estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con vasopresina y terlipresina puede controlar estas hemorragias (Söderlund et al., 1990; D'Amico et al., 1994).

La terlipresina reduce la presión portal, el flujo sanguíneo portal y las resistencias vasculares en el territorio portal en ratas con hipertensión portal inducida por BDL. La terlipresina y el F-180 (agonista selectivo V_{1a}) también reducen el flujo sanguíneo de la arteria mesentérica y aumentan la presión arterial media y las resistencias mesentéricas vasculares de manera dosis dependiente en ratas con hipertensión portal, lo que confirma su efecto vasoconstrictor a nivel esplácnico (Petersen, 2006).

La administración de vasopresina a pacientes con vasodilatación e hipotensión por shock séptico incrementa la presión arterial debido a una vasoconstricción periférica (Patel et al., 2002). Este efecto vasopresor de la vasopresina en la sepsis y en el shock séptico también se ha demostrado en modelos animales. Por ejemplo, la administración de vasopresina a ratas endotoxémicas restablece la presión arterial media a los niveles basales (Levy et al., 2004).

Hipótesis de trabajo

La hipertensión portal es un síndrome clínico presente en diversas enfermedades hepáticas, caracterizado por el aumento patológico de la presión hidrostática en el territorio venoso portal por encima de su valor normal de 1-5 mmHg, lo que origina la formación de una extensa red de vasos colaterales portosistémicos que derivan parte del flujo sanguíneo portal hacia la circulación sistémica e impiden su paso a través del hígado. Las complicaciones que se desarrollan como consecuencia de este síndrome, como la hemorragia por varices esofágicas, ascitis e insuficiencia renal, encefalopatía portosistémica, alteración del metabolismo de fármacos y sustancias endógenas, hiperesplenismo, síndrome hepatopulmonar e infecciones, constituyen el aspecto clínico dominante y más severo de la enfermedad hepática. Es por ello que en pacientes con cirrosis hepática, la hipertensión portal es la principal causa de muerte y de trasplante de hígado (Bosch et al., 2015).

En el desarrollo de la hipertensión portal intervienen trastornos estructurales del hígado como la fibrosis y la formación de nódulos de regeneración, y de los vasos espláncnicos como la remodelación vascular (Fernández-Varo et al., 2003). Pero también intervienen trastornos funcionales, que son secundarios a cambios en el tono vascular hepático y espláncnico, en el volumen plasmático y en el gasto cardíaco. Estos trastornos funcionales tienen una doble importancia en la cirrosis, pueden variar de forma aguda ante diversos factores y contribuir al desencadenamiento de complicaciones como la hemorragia por varices o insuficiencia renal (Follo et al., 1994). Por otra parte, constituyen la diana terapéutica más inmediata en el tratamiento de los pacientes con cirrosis.

En cuanto a los cambios estructurales del hígado, el estrés oxidativo, a través de la generación de ROS, juega un papel importante en la producción del daño hepático e iniciando la fibrogénesis hepática. La disrupción oxidativa de los lípidos, proteínas y DNA induce necrosis y apoptosis de los hepatocitos, lo cual amplifica la respuesta inflamatoria, resultando en la iniciación y progresión de la fibrosis (Guimaraes ELM, et al. 2006). A su vez en el proceso inflamatorio existe un aumento del estrés oxidativo mediado por la secreción de ROS entre otras moléculas por parte de las células inmunes, lo cual perpetúa el desarrollo de la fibrosis. Cuando este daño hepático persiste, los hepatocitos son sustituidos por abundante matriz extracelular, derivando en la formación de nódulos hepáticos separados por fibras (nódulos de regeneración), que es el proceso final conocido como cirrosis (Bataller & Brenner, 2005). La causa de estos trastornos estructurales constituye el factor más importante en el aumento

de la resistencia hepática en la cirrosis. En este sentido, la primera hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral es la siguiente:

Primera hipótesis: *Las nanopartículas de óxido de cerio tienen efecto antioxidante, anti-inflamatorio y reducen la hipertensión portal en ratas con fibrosis hepática.*

En los estadios avanzados de la cirrosis, cuando los pacientes presentan síntomas y la presión portal supera un umbral crítico, aumenta la concentración de óxido nítrico, se produce una vasodilatación sistémica y, como consecuencia, una disminución de la volemia efectiva que activa los mecanismos de compensación, como el eje renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nervioso simpático y la secreción no osmótica de vasopresina. La vasodilatación esplácnica es responsable de la circulación hiperdinámica, que se manifiesta por un descenso de la presión arterial y de la resistencia vascular periférica, aumento del gasto cardíaco y elevación del flujo de sangre al territorio portal. Este hiperflujo contribuye a elevar y mantener la hipertensión portal en fases avanzadas de la cirrosis. En estas fases, el trastorno hemodinámico se agrava de manera que los mecanismos mencionados resultan inadecuados para mantener la homeostasis circulatoria. Ello provoca una exacerbada retención de sodio y agua, fenómeno que, unido a la trasudación linfática secundaria a la hipertensión portal, explica la formación de ascitis.

El conocimiento de estos mecanismos resulta de gran importancia, dado que el componente dinámico de la resistencia vascular intrahepática es reversible y, por tanto, una diana terapéutica. De hecho, la mayoría de los tratamientos existentes para la hipertensión portal se centran en la corrección de las alteraciones hemodinámicas mediante fármacos vasoactivos (terlipresina, somatostatina, betabloqueantes no selectivos).

La vasopresina es una hormona peptídica sintetizada en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. La función más importante de esta hormona es inducir la reabsorción de agua en los túbulos colectores del riñón, de ahí su nombre alternativo de hormona antidiurética. Esta función la realiza a través de los receptores V_2 presentes en el riñón. Sin embargo, la vasopresina a través de sus receptores V_{1a} localizados en las células musculares lisas ejerce una función diferente, tiene un efecto vasopresor por medio de la contracción muscular. Numerosos estudios han demostrado que la vasopresina puede

constreñir las arterias mesentéricas reduciendo la hipertensión portal y las complicaciones que derivan de esta, como las hemorragias de las várices esofágicas (Petersen, 2006). En este contexto, la segunda hipótesis de trabajo es la siguiente:

Segunda hipótesis: *El agonismo parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina mediante su efecto vasoconstrictor a nivel esplácnico reduce la hipertensión portal en ratas con cirrosis y ascitis.*

Objetivos

El **primer objetivo** de la presente tesis doctoral fue *investigar el efecto antioxidante de las nanopartículas de óxido de cerio en ratas con fibrosis hepática, así como el papel que ejerce esta propiedad terapéutica en la inflamación y en la consecuente hipertensión portal*. Específicamente, este objetivo se alcanzó por medio de los siguientes estudios:

1. Investigar la morfología y biodistribución de las CeO₂NPs después de su administración intravenosa a ratas con fibrosis hepática inducida por inhalación de CCl₄, tanto a nivel tisular como subcelular.
2. Analizar el efecto del tratamiento con CeO₂NPs sobre la esteatosis, los marcadores séricos de función hepática y la presión portal en el modelo experimental de fibrosis hepática.
3. Evaluar el efecto del tratamiento con CeO₂NPs en la activación de las CHE, en la inflamación, en la apoptosis y en el estrés oxidativo y del RE que tienen lugar en las ratas con fibrosis hepática.

El **segundo objetivo** de esta tesis doctoral se dirige a *investigar el potencial terapéutico de un nuevo agonista parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina con efecto vasoconstrictor preferencial a nivel esplácnico en ratas con cirrosis y ascitis*. Específicamente, este objetivo se alcanzó por medio de los siguientes estudios:

1. Evaluar el efecto de la administración de dosis crecientes del agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP, FE 204038, en la hemodinámica sistémica y en la presión portal en ratas con cirrosis y ascitis inducida por inhalación de CCl₄.
2. Analizar el efecto de la administración del agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP a largo plazo en la hemodinámica sistémica, la presión portal y la función renal excretora en ratas cirróticas y con ascitis.
3. Investigar la expresión diferencial de genes relacionados con sustancias vasoactivas, incluyendo el receptor V_{1a} de la AVP, en la circulación sistémica y mesentérica de ratas con cirrosis y ascitis.

La presente tesis doctoral está compuesta por los dos objetivos generales mencionados, los cuales se corresponden con un artículo cada uno.

Resultados

Artículo 1: Las nanopartículas de óxido de cerio reducen la esteatosis, la hipertensión portal y muestran propiedades anti-inflamatorias en ratas con fibrosis hepática.

La inflamación es una respuesta presente en todas las enfermedades hepáticas, independientemente de cual sea su etiología, y que después de evolucionar a una inflamación crónica conduce a un remodelado tisular, a cirrosis y eventualmente, a un fallo hepático (Friedman, 2008). De la misma manera, la evidencia de estrés oxidativo se ha detectado en casi todas las enfermedades crónicas del hígado clínicas e experimentales. Las moléculas relacionadas con el estrés oxidativo pueden actuar como mediadores capaces de modular la inflamación y el daño celular responsable de la progresión de la fibrosis (Parola & Robino, 2001). Durante los últimos años, se ha promovido la idea de que la inflamación es una respuesta activa que puede ser facilitada por mediadores pro-resolutivos (Serhan, 2014). Por tanto, estas sustancias pro-resolutivas podrían utilizarse como nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, se ha demostrado que muchas aplicaciones de las nanopartículas de óxido de cerio (CeO₂NPs), incluyendo su uso como mediador pro-resolutivo en biomedicina, están basadas en su actividad redox. Las CeO₂NPs son capaces de eliminar los radicales libres que se producen en situaciones de estrés oxidativo (Heckert et al., 2008). Estas nanopartículas pueden reducir *in vitro* las ROS y en consecuencia, muchos mediadores inflamatorios como la iNOS, el NF-kappa β , el TNF α e interleucinas (Estevez et al., 2011). En consecuencia, numerosos estudios han planteado el uso de las CeO₂NPs como prevención y/o tratamiento de la cardiomiopatía diabética, enfermedad pulmonar, degeneración de la retina y trastornos neurodegenerativos (Niu et al., 2011). A pesar de ello, aún no se ha explorado si las CeO₂NPs tienen valor terapéutico en la enfermedad hepática. Por este motivo, en este estudio se investigaron las CeO₂NPs como potenciales agentes anti-inflamatorios pro-resolutivos en la enfermedad hepática crónica experimental, estudiando su distribución tisular, subcelular, y sus efectos sistémicos y hepáticos. Los resultados más importantes derivados de este estudio se enumeran a continuación:

1. El hígado y el bazo son las dianas preferentes de las CeO₂NPs en ratas con fibrosis hepática inducida por inhalación de CCl₄.

En primer lugar, se analizó la morfología de las CeO₂NPs por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y se observó que presentaban una morfología esférica y un tamaño dentro del rango de 4-20 nm (Figura 1, artículo 1).

Es bien sabido que las nanopartículas inorgánicas después de distribuirse por la circulación sistémica se acumulan en el hígado y bazo (Comenge et al., 2012). Esto fue confirmado en nuestro laboratorio utilizando imagen por resonancia magnética (MRI), la acumulación de nanopartículas en esos tejidos fue aparente a los 30 minutos de haberlas administrado de forma intravenosa (Anexo 1). Para corroborar estos resultados, se analizó cuantitativamente por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) la acumulación de cerio en hígado, bazo, pulmón, riñón, corazón y cerebro después de la administración intravenosa de CeO₂NPs en ratas fibróticas (Figura 2a, artículo 1). El porcentaje de cerio encontrado en el hígado respecto la cantidad total cuantificada fue de un 84 %, mientras que en el bazo se acumuló un 12 %. En los pulmones y en los riñones se depositó considerablemente menos cerio (2,25 % y 0,63 %, respectivamente), y aún menos cantidad en el corazón y en el cerebro. Sorprendentemente, se detectó cerio en estos órganos a lo largo de las 8 semanas de estudio.

Para establecer la localización subcelular de las CeO₂NPs se recogieron muestras de hígado de ratas fibróticas para ser analizadas por microscopía electrónica de transferencia (TEM) (Figura 2b, artículo 1). La administración de CeO₂NPs no indujo alteraciones perceptibles en la morfología celular comparando las muestras de las ratas inducidas a fibrosis con CCl₄ con las muestras de las ratas que recibieron vehículo. Las CeO₂NPs se localizaron en forma de aglomerados de diferentes tamaños en el espacio intracelular del parénquima hepático. También se encontraron CeO₂NPs en orgánulos de membrana simple, identificados ultraestructuralmente como lisosomas. Los aglomerados de nanopartículas tenían un tamaño de alrededor de 30 nm, aunque algunos eran considerablemente grandes (250-270 nm). No se observaron CeO₂NPs en otros orgánulos de los diferentes tipos celulares hepáticos.

2. El tratamiento con CeO₂NPs disminuye la esteatosis, los niveles circulantes de biomarcadores de daño hepático y la presión portal en las ratas con fibrosis inducida con CCl₄.

Las biopsias hepáticas de las ratas con fibrosis hepática presentaron histológicamente las alteraciones características de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA): hepatocitos con grandes gotas de grasa citoplasmáticas bien definidas desplazando el núcleo, con esteatosis microvesicular con el núcleo central y con gran cantidad de infiltrado inflamatorio. El tratamiento con CeO₂NPs disminuyó todas estas alteraciones en las ratas inducidas a fibrosis con CCl₄, por ejemplo redujo en casi un 50 % la esteatosis total (Figura 3a, artículo 1). Sin

embargo, no se observaron diferencias en el contenido hepático de colágeno entre las ratas fibróticas que recibieron CeO₂NPs o vehículo.

Cómo cabía esperar, las ratas fibróticas mostraron alteraciones en la hemodinámica esplácnica y en los marcadores séricos de función hepática en comparación con los animales control (Tabla 1, artículo 1). Las ratas fibróticas mostraron una disminución de albúmina y proteínas totales en sangre, así como un incremento de bilirrubina total y de marcadores de daño hepático como la aspartato aminotransferasa (AST) y la gamma glutamil transferasa. Todas estas alteraciones bioquímicas se asociaron a una marcada hipertensión portal. Sin embargo, el tratamiento con CeO₂NPs redujo los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), AST y la presión portal.

3. El tratamiento con CeO₂NPs reduce significativamente la activación de las CHE, la infiltración inflamatoria y la apoptosis en las ratas fibróticas.

Para evaluar el efecto del tratamiento con CeO₂NPs en la activación de las CHE, cuantificamos la expresión de su marcador α -SMA por tinción inmunohistoquímica. En los animales fibróticos la señal de α -SMA se detectó como una tinción lineal en los tractos portales y en los septos fibróticos. No obstante, el porcentaje de α -SMA disminuyó en los animales tratados con CeO₂NPs (Figura 3b, artículo 1). Teniendo en cuenta que las CHE producen una serie de quimiocinas que amplifican la infiltración inflamatoria, pensamos que quizás el tratamiento también podría reducir este infiltrado (Friedman, 2008). Para analizar esto, se cuantificaron las células positivas para CD68 (marcador de macrófagos) en las biopsias hepáticas. Como cabía esperar, se observó un aumento del infiltrado inflamatorio en las ratas fibróticas en comparación con los animales control. Nuevamente, el tratamiento con CeO₂NPs se asoció a una reducción del número de células positivas para CD68 en las ratas fibróticas (Figura 3c, artículo 1).

Estudios previos demuestran que la apoptosis de hepatocitos en pacientes con EHNA se correlaciona con la inflamación hepática, así que quisimos estudiar el efecto del tratamiento con CeO₂NPs en la apoptosis (Wang et al., 2008). Tanto por ensayo TUNEL en las biopsias de hígado como por la cuantificación proteica (Western Blot) de caspasa-3 (otro marcador de apoptosis) en homogenado hepático, observamos que el tratamiento con CeO₂NPs reduce significativamente la apoptosis en el hígado de las ratas fibróticas (Figura 4, artículo 1).

4. La administración de CeO₂NPs reduce la sobreexpresión de genes inflamatorios y modifica la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y del RE en las ratas fibróticas.

Para profundizar más en el efecto que tienen las CeO₂NPs sobre la inflamación en el hígado, analizamos la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios (Tabla 2, artículo 1). El tratamiento con CeO₂NPs redujo significativamente la sobreexpresión de muchos de estos genes en los animales fibróticos incluyendo IL-1 β , TNF α , iNOS y COX-2. Además, la administración de CeO₂NPs se asoció a una disminución de la ET-1, un potente vasoconstrictor producido por las células endoteliales y las CHE implicado en la hipertensión portal. Por otro lado, el tratamiento con CeO₂NPs reestableció la expresión de PPAR γ . Finalmente, la expresión de los marcadores de macrófagos M1 (pro-inflamatorios; genes TNF α e iNOS) fue inferior en el hígado de las ratas fibróticas tratadas con CeO₂NPs, mientras que los marcadores de macrófagos M2 (función inmunoreguladora; genes CD163, Arg1 y MRC2) no se modificaron con el tratamiento. Muchos de estos cambios observados a nivel de expresión génica fueron paralelos a los observados a nivel proteico (Figura 5, artículo 1).

Para evaluar los efectos del tratamiento con CeO₂NPs en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y del RE en el hígado, realizamos un array de PCR que incluía 86 genes representativos de estas vías biológicas (Tabla 3, artículo 1). De los 86 genes analizados, 14 se encontraron sobreexpresados (al menos 2,5 veces respecto los animales control) mientras que 11 estaban infraexpresados en el hígado de los animales fibróticos. El tratamiento con CeO₂NPs inhibió significativamente la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo (*Epx*), del metabolismo del superóxido (*Ncf1* y *Ncf2*) y de estrés del RE (*Atf3* y *Hspa5*).

5. Las CeO₂NPs reducen la producción de ROS inducida con H₂O₂ en una línea celular de hepatocitos humanos (células HepG2).

Para investigar el efecto antioxidante de las CeO₂NPs en hepatocitos humanos, tratamos células HepG2 con H₂O₂ durante 60 minutos en presencia de CeO₂NPs o vehículo. Determinamos la producción de ROS con espectrofotometría de fluorescencia utilizando el colorante sensible a la oxidación 2',7' DCF-DA. En las células tratadas con H₂O₂ se detectaron grandes cantidades de ROS (Figura suplementaria 1a, artículo 1). Sin embargo, cuando las células se incubaron con H₂O₂ en presencia de CeO₂NPs la producción de ROS se redujo significativamente. Estos resultados también los confirmamos al analizar por microscopía

óptica de fluorescencia microfotografías obtenidas después de tratar los hepatocitos con H_2O_2 en presencia de CeO_2NPs o vehículo. En las células HepG2 tratadas CeO_2NPs la intensidad de fluorescencia emitida por el DCF fue mucho más débil en comparación con las células incubadas únicamente con H_2O_2 (Figura suplementaria 1b, artículo 1).

Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis

Denise Oró¹, Tetyana Yudina², Guillermo Fernández-Varo^{1,5}, Eudald Casals², Vedrana Reichenbach¹, Gregori Casals¹, Bernardino González de la Presa¹, Silvia Sandalinas¹, Silvia Carvajal¹, Victor Puentes^{2,3,4,*}, Wladimiro Jiménez^{1,5,*}

¹Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clínic Universitari, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain; ²Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2), Bellaterra, Spain; ³Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, (ICREA), Barcelona, Spain; ⁴Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Barcelona, Spain; ⁵Department Ciències Fisiològiques I, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Background & Aims: Cerium oxide nanoparticles (CeO₂NPs) have proven to behave as free radical scavengers and/or anti-inflammatory agents. The aim of the study was to determine whether CeO₂NPs display hepatoprotective properties in experimental chronic liver disease.

Methods: Systemic and hepatic effects of nanoparticles were assessed in CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs or vehicle twice weekly for two weeks and CCl₄ treatment was continued for 8 additional weeks. Thereafter, mean arterial pressure and portal pressure (PP) were assessed and serum samples obtained to measure standard hepatic and renal function tests. Organ and subcellular distribution of NPs were assessed using mass spectrometry (ICP-MS) and transmission electron microscopy. Liver samples were obtained to evaluate steatosis, α -SMA expression, macrophage infiltration, apoptosis and mRNA expression of oxidative stress, inflammatory or vasoactive related genes.

Results: Most CeO₂NPs were located in the liver and it reduced hepatic steatosis, ameliorated systemic inflammatory biomarkers and improved PP without affecting mean arterial pressure. In addition, a marked reduction in mRNA expression of inflammatory cytokines (*TNF α* , *IL1 β* , *COX-2*, *iNOS*), ET-1 and messengers related to oxidative (*Epx*, *Ncf1*, *Ncf2*) or endoplasmic reticulum (*Atf3*, *Hspa5*) stress signaling pathways was observed in the liver

of rats receiving CeO₂NPs. This was associated with reduced macrophage infiltration and reduced abundance of caspase-3, α -SMA and inflammatory cytokines.

Conclusions: CeO₂NPs administration to CCl₄-treated rats protects against chronic liver injury by reducing liver steatosis and portal hypertension and markedly attenuating the intensity of the inflammatory response, thereby suggesting that CeO₂NPs may be of therapeutic value in chronic liver disease.

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

Introduction

Deregulated inflammation is thought to be a common step of many pathological processes including vascular, metabolic and neurological diseases [1]. In this context, liver diseases are not an exception. In fact, regardless of whether its viral, metabolic or toxic etiology, acute inflammation is a common event that after evolving to chronic inflammation, leads to extracellular matrix remodeling, cirrhosis and eventually, liver failure [2]. Resolution of inflammatory response has classically been considered a passive process resulting from the progressive dilution of cell mediators involved in inflammatory response such as cytokines and chemokines [3]. However, during the last few years the concept that inflammatory resolution is an active response that can be modulated and facilitated by specialized pro-resolving mediators has gained increased attention [4]. These findings raised the possibility of using pro-resolving substances as a novel therapeutic strategy.

In the current investigation we explored the possibility that engineered ceria nanoparticles (CeO₂NPs) may behave as exogenous pro-resolving mediators in liver disease. Actually, such nanoparticles have already demonstrated their utility for local targeting and delivery, whereas most ceria applications are based on its redox activity, including its biomedical use [5,6]. In this regard, most therapeutic CeO₂NPs applications are proposed based on their ability to reduce *in vitro* the levels of reactive oxygen species (ROS) and consequently, most inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear

Keywords: Experimental fibrosis; Oxidative stress; Cerium oxide nanoparticles; Portal pressure; Hepatic inflammation.

Received 25 March 2015; received in revised form 1 October 2015; accepted 23 October 2015; available online 28 October 2015

* Corresponding authors. Addresses: Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic Universitario, Villarroya 170, Barcelona 08036, Spain. Tel.: +34 93 2275400x3091; fax: +34 93 2275697 (W. Jiménez) or Inorganic Nanoparticles Group, Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), Spain. Tel.: +34 93 737 4619 (V.F. Puentes).

E-mail addresses: victor.puentes@icn.cat (V. Puentes), wjimenez@clinic.ub.es (W. Jiménez).

Abbreviations: α -SMA, α -smooth muscle actin; HSCs, hepatic stellate cells; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; iNOS, inducible nitric oxide synthase; ROS, reactive oxygen species; NF- κ B, nuclear factor κ -B; TNF- α , tumor necrosis factor α ; TMAOH, tetramethylammonium hydroxide; TEM, transmission electron microscopy; MRI, magnetic resonance imaging; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALT, alanine transaminase; ER, endoplasmic reticulum; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; SOD, superoxide dismutase.



ELSEVIER

Research Article

factor κ - β (NF- κ B), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukins [7]. Consequently, suggestions have been raised indicating that CeO₂NPs may be useful in the prevention and/or treatment of diabetic cardiomyopathy, lung disease, retinal degeneration, stroke and neurodegenerative disorders [8]. However, whether CeO₂NPs are of therapeutic value in liver disease is not known. We assessed the organ distribution, subcellular localization, systemic and hepatic effects of intravenous administration of CeO₂NPs to CCl₄-treated rats. The aim of the study was to determine whether CeO₂NPs display inflammatory pro-resolving activity and hepatoprotective properties in experimental chronic liver disease.

Materials and methods

Synthesis and characterization of CeO₂NPs

CeO₂NPs were synthesized by the chemical precipitation of cerium (III) nitrate hexahydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a basic aqueous solution [9]. Modifying the pH conditions, different sizes can be obtained. Here, we used a mixture of different sized nanoparticles (from 4 to 20 nm), at a concentration of 1 mg/ml. For 4 nm CeO₂NPs; in a first step, 10 mM of cerium (III) nitrate hexahydrate was dissolved in 100 ml of absolute ethanol at room temperature. The solution was left under stirring for about 30 min. To the 100 ml solution was added 1 ml of tetramethylammonium hydroxide solution (TMAOH, 1.0 ± 0.02 M in H₂O) at a final concentration of 10 mM, and the mixture was left under stirring. For 10 nm CeO₂NPs; in a first step, 10 mM of cerium (III) nitrate hexahydrate was dissolved in 90 ml of absolute ethanol at room temperature. To this solution 10 mL of hexamethylenetetramine (HMT, 1 M) was added at a final concentration of 100 mM, and the solution was left under stirring. For all samples, NPs were purified by centrifugation and resuspended in aqueous solution of 10 mM TMAOH, which acts as a stabilizer. CeO₂NPs were kept at 4 °C until administration to animals. The surface charge of the NPs was characterized in a Z-sizer (Malvern, Worcestershire, UK), while the crystal size was characterized by high-resolution (HR-TEM) in the Tecnai G2 F20 at 200 kV (FEI, Oregon, USA). The crystal structure was analyzed by HR-TEM (Tecnai 200 kV) and XRD (Xpert Pannalytical, MA, USA), and the light interaction by UV-VIS spectroscopy (Shimadzu, Kyoto, Japan). Size distribution was computer analyzed by ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Induction of hepatic fibrosis in rats

See [Supplementary material and methods](#).

Organ distribution of Ce in CCl₄-treated rats

Organs were collected from 24 CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs. Once 5 min of CCl₄ inhalation was reached the animals received CeO₂NPs (0.1 mg/kg bw) twice weekly for two weeks and CCl₄ treatment was maintained thereafter. CeO₂NPs were dispersed in saline solution and intravenously given as a bolus (500 µl) through the tail vein. Animals were euthanized at day 1, 21, 42 and 56 after the last administration of CeO₂NPs and organs dissected and kept at -80 °C for further analysis. Samples were diluted with an aqueous solution of HNO₃ 2% w/w (Trace Metal Basis; Sigma-Aldrich) and analyzed for cerium concentration by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500; Agilent Technologies, California, USA). The quantification is done by interpolation in a standard curve obtained from a commercial 1000 ppm Ce standard (Sigma-Aldrich).

Subcellular location of CeO₂NPs in the liver of CCl₄-treated rats

Location of CeO₂NPs was assessed using transmission electron microscopy (TEM). Two rats were intravenously injected (500 µl) with CeO₂NPs (0.1 mg/kg bw) or vehicle (saline solution containing TMAOH ammonium salts 0.8 mM) twice a week for 2 weeks starting at 8 weeks of fibrosis induction as described. The rats were euthanized 90 min after the last administration and liver samples were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde for further ultrastructural

examination. Tissues were embedded in Spur's resin and thin sections (50–55 nm) were cut and placed on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. After staining, the sections were examined at low electron power microscope to increase contrast in a JEOL-1010 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV and equipped with a BioScan camera (Gatan, CA, USA) and digital photomicrographs were taken.

Systemic and hepatic effects of CeO₂NPs in CCl₄-treated rats

The hemodynamic and gene expression effects of CeO₂NPs were assessed in CCl₄-induced fibrosis rats receiving CeO₂NPs (0.1 mg/kg.bw, n = 10) or vehicle (TMAOH ammonium salts 0.8 mM, n = 15) as previously described. Following NPs administration the fibrosis induction protocol was maintained for 8 additional weeks. Thereafter, animals were instrumented as described below and a blood sample was obtained to measure standard liver and renal function tests in baseline conditions. A hemodynamic study was performed to measure mean arterial pressure, portal pressure (PP), heart rate and splanchnic perfusion pressure. The animals were sacrificed by isoflurane overdose. Liver specimens were obtained from each animal, immediately frozen in dry ice, and stored at -80 °C or fixed in 10% buffered formalin for further hematoxylin and eosin (H&E) and immunostaining analysis.

Additional materials and methods are provided in the [Supplementary material section](#).

Results

Characterization of CeO₂NPs

HR-TEM analysis of CeO₂NPs revealed that the particles had a spherical morphology (Fig. 1A–C) and were predominantly in the size range of 4–20 nm. See [Supplementary Results](#).

Liver and spleen are major targets for CeO₂NPs in CCl₄-treated rats

It is well known that after systemic distribution small inorganic NPs accumulate in the liver and spleen [10]. This was confirmed in our laboratory using MRI (Oró *et al.*, data not shown). NPs accumulation in these tissues was apparent as early as 30 min following intravenous injection. We further confirmed these findings by analyzing tissue Ce accumulation by ICP-MS following intravenous CeO₂NPs injection in fibrotic rats (Fig. 2A). We found that 90 min after the administration of NPs, 84% and 12% of the total dose of Ce collected was accumulated in the liver and spleen, respectively. Considerably less Ce accumulated in the lungs and kidneys (2.25% and 0.63%, respectively), with very little in the heart and brain (data not shown). Interestingly, Ce was detected in these organs for over 8 weeks.

Subcellular localization of CeO₂NPs

Under TEM, following CCl₄ administration, hepatocytes became swollen and the mitochondria appeared as broken crests. CeO₂NPs 90 min after injection did not induce noticeable alterations in cell morphology in comparison to CCl₄-treated rats receiving vehicle. CeO₂NPs were present in the form of agglomerates of different sizes in the intracellular space of the liver parenchyma (Fig. 2B). CeO₂NPs were also observed within intracellular single-membrane organelles. From the ultrastructural appearance, these organelles were identified as lysosomes. NPs agglomerates had sizes of around 30 nm, although some NPs agglomerates were considerably large (250–270 nm). CeO₂NPs were not observed in the other organelles of the different liver cell types.

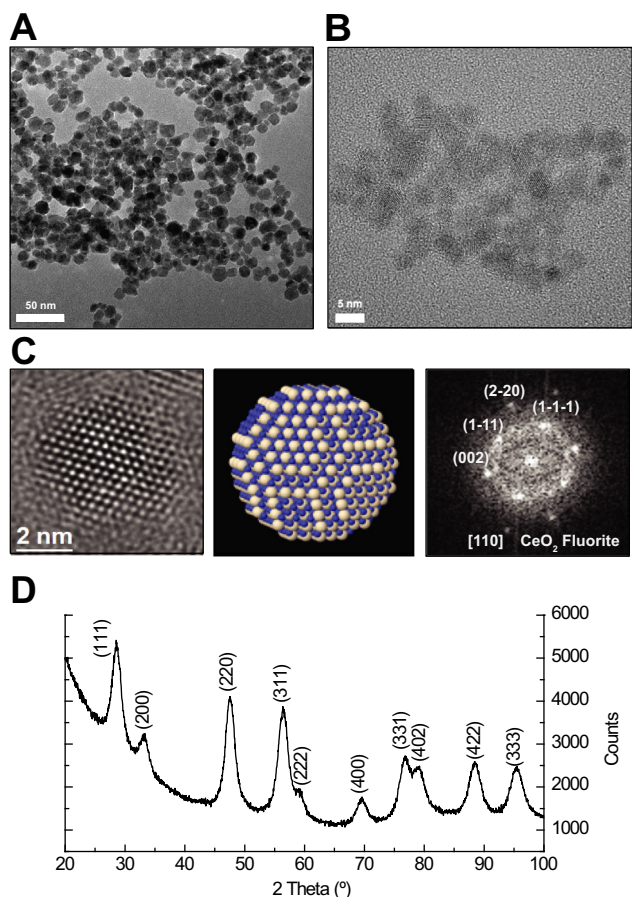


Fig. 1. Characterization of CeO₂NPs. (A) HR-TEM photomicrograph at low (43,000×) magnification revealing loose CeO₂NPs agglomerates; the average diameter of these particles was 4–20 nm. (B) High magnification image (400,000×) of individual 4 nm CeO₂NPs with spherical shape. (C) (Left) HR-TEM of single CeO₂NP showing the spherical morphology; (middle) atomistic simulation of CeO₂NP with a characteristic fluorite-like electronic structure; (right) FFT of the selected nanoparticle with indicated atomic planes. (D) X-ray diffraction pattern of CeO₂NP showing the characteristic peaks of the crystal. The Miller indices demonstrate the high purity of the synthesized nanoparticles.

Histological examination of liver tissue

Liver biopsies obtained from CCl₄-treated rats had a finely granulated surface macroscopically. Based on Sirius Red analysis, no significant differences in hepatic collagen content were found between CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs or vehicle (6.8 ± 0.23% vs. 6.1 ± 0.16%, respectively).

CCl₄-treated rats receiving vehicle also showed single large fat droplets or smaller well defined intracytoplasmic droplets displacing the nucleus. Hepatocytes with microvesicular steatosis were also observed, in these cases the cytoplasm was filled with tiny lipid droplets, with the nucleus remaining central. In addition, a pronounced inflammatory cell infiltrate was also observed. All these alterations, consistent with a well defined histological pattern of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), were markedly less pronounced in CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs. Actually, the morphometric measurement of fat revealed an almost 50% reduction of total steatosis in fibrotic rats receiving CeO₂NPs than those receiving vehicle (Fig. 3A).

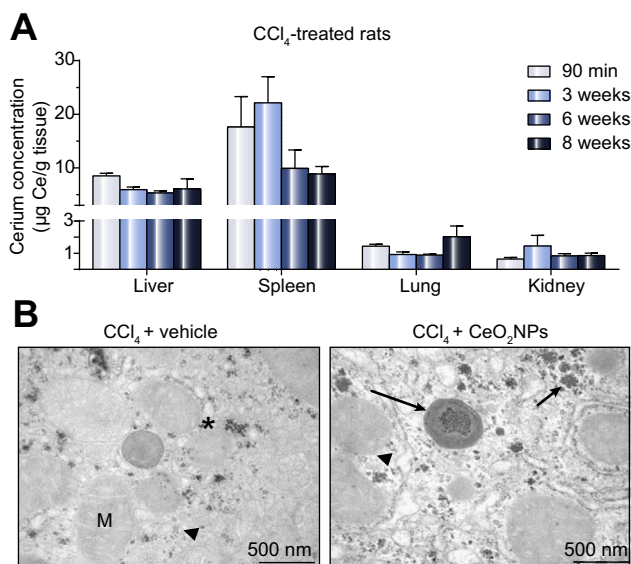


Fig. 2. Liver and spleen are major targets for nanoparticles in CCl₄-treated rats. (A) Biodistribution of cerium in tissues of CCl₄-treated rats receiving CeO₂-NPs. Major organs were collected 90 min, 3, 6 and 8 weeks after last CeO₂NPs administration and were evaluated for cerium concentration using ICP-MS. Results are given as means ± SE. (B) TEM of liver tissue obtained from a CCl₄-treated rat receiving vehicle and a CCl₄-treated rat receiving CeO₂NPs. Hepatocyte intracellular space containing mitochondria (M), organelles, fat droplets (asterisk) glycogen inclusions (arrow head) and aggregates of CeO₂NPs (arrows). Some aggregates of CeO₂NPs uptaken by lysosomes can also be observed (large arrow).

CeO₂NPs decrease portal pressure and the circulating levels of liver injury biomarkers in CCl₄-treated rats

As anticipated, CCl₄-treated rats showed significant alterations of splanchnic hemodynamics and serum markers of liver function in comparison to the group of healthy rats (Table 1). The biochemical analysis revealed decreased albumin and total protein levels and high levels of total bilirubin and increased activity of markers of liver injury such as aspartate transaminase (AST) and gamma-glutamyl transferase, being these alterations associated with remarkable portal hypertension. Besides, in fibrotic rats receiving CeO₂NPs alanine transaminase (ALT), AST and PP were significantly lower compared with those receiving vehicle.

Effect of CeO₂NPs on α-SMA expression and infiltrating cells in CCl₄-treated rats

α-SMA expression was detected as linear staining in the portal tracts and fibrous septa of CCl₄-treated rats. However, the percentage of α-SMA was significantly reduced in rats receiving CeO₂NPs as compared to fibrotic animals receiving vehicle (Fig. 3B). In addition, it is known that hepatic stellate cells (HSCs) also produce a host of chemokines that amplify infiltration by inflammatory cells [2]. To assess the density of infiltrating macrophages/monocytes in the liver tissue, CD68-positive cells were quantified. As anticipated, the amount of infiltrated cells was significantly higher in CCl₄-treated rats in comparison to control animals. However, CeO₂NPs administration was associated with a significant reduction in the number of CD68-positive cells (Fig. 3C).

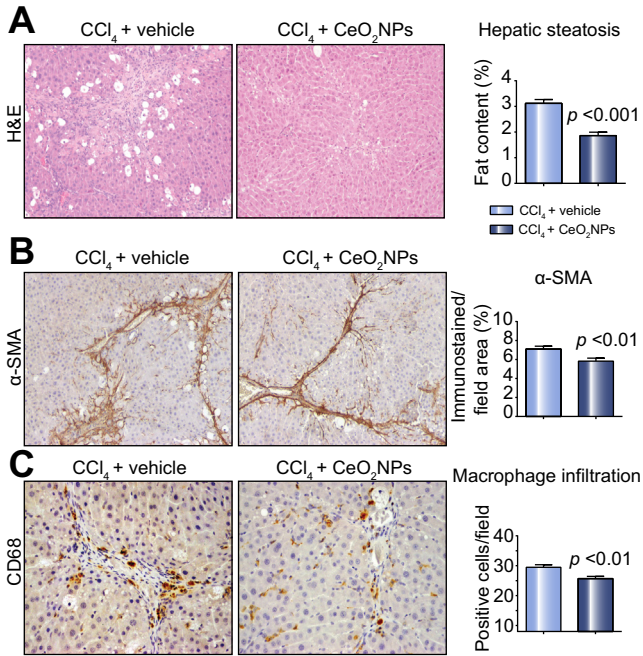


Fig. 3. Effect of CeO₂NPs on hepatic steatosis (A), fibrogenic (B) and infiltrating cells (C). (A) H&E staining of representative liver sections obtained from CCl₄-treated rats receiving vehicle or CeO₂NPs. Original magnification, 100×. Bars on the right show the quantitative measurement of relative fat content in all the animals. (B) α-SMA staining in hepatic tissue of CCl₄-treated rats receiving vehicle or CeO₂NPs. Original magnification, 100×. The quantitative measurement in all animals is shown at the right of the figure. (C) CD-68 staining of a representative liver section obtained from a fibrotic rat receiving vehicle or CeO₂NPs. Original magnification, 200×. The quantitative measurement in all animals is shown at the right of the figure.

Table 1. Body weight, systemic hemodynamics and standard liver and renal function test results in control and CCl₄-treated rats.

	Control (n = 6)	CCl ₄ -rats	
		Vehicle (n = 15)	CeO ₂ NPs (n = 10)
Body wt (g)	425 ± 14	418 ± 13	427 ± 17
Mean arterial pressure (mmHg)	121 ± 1	116 ± 2	118 ± 3
Heart rate (beats/min)	375 ± 24	366 ± 7	398 ± 12
Portal pressure (mmHg)	5.6 ± 0.2	9.9 ± 0.4***	8.2 ± 0.4***†
Splanchnic perfusion pressure (mmHg)	117 ± 2	106 ± 2*	110 ± 3
Alanine transaminase (U/L)	81.5 ± 7.2	1008 ± 243*	304 ± 40†
Aspartate transaminase (U/L)	273 ± 22	566 ± 81*	356 ± 47†
Total bilirubin (mg/dl)	<0.12	0.28 ± 0.13*	0.12 ± 0.04
Total proteins (g/L)	62.8 ± 1.3	54.1 ± 2.7*	50.6 ± 1**
Albumin (g/L)	38.7 ± 0.5	31.5 ± 0.8***	31.2 ± 0.7***
GGT (U/L)	0.13 ± 0.1	3.55 ± 1.2*	2.8 ± 1.4
Serum creatinine (mg/dl)	0.50 ± 0.02	0.51 ± 0.06	0.54 ± 0.04
Serum Na (mEq/L)	142.7 ± 0.7	140.8 ± 0.7	140.2 ± 0.9
Serum potassium (mEq/L)	5.99 ± 0.14	5.16 ± 0.26*	4.58 ± 0.21**

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with control group; †p < 0.05, ††p < 0.01 compared with vehicle group (one-way ANOVA with the Newman-Keuls post hoc test and the Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test when appropriate).

Effect of CeO₂NPs on activated caspase-3 and apoptosis in CCl₄-treated rats

Human studies have shown a high rate of hepatocyte apoptosis in NASH patients, with the magnitude of apoptosis correlating with hepatic inflammation [11]. To explore whether CeO₂NPs treatment may also modify apoptosis, we performed TUNEL assays. Hepatic sections showed TUNEL-positive cells localized to the margin of the fibrous septa and parenchyma (Fig. 4A, left). However, the number of TUNEL-positive cells significantly decreased in animals receiving CeO₂NPs compared with the vehicle group (Fig. 4A, right). Finally, we measured the amount of active caspase-3, another marker of apoptosis. As shown in Fig. 4B, the amount of activated caspase-3 was significantly higher in fibrotic rats than in controls. Interestingly, CeO₂NPs significantly reduced activated caspase-3 expression in the hepatic tissue of fibrotic rats. These findings indicate that CeO₂NPs reduce both cell infiltration and apoptotic phenomena in the liver of CCl₄-treated fibrotic rats.

Reduced overexpression of inflammatory genes in CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs

Table 2 shows that marked differences were found between control and CCl₄-treated rats. As anticipated, genes involved in inflammatory processes or vasoactive activity were significantly upregulated in fibrotic animals. Of note, is that CeO₂NPs administration was accompanied by an acute diminution in messenger overexpression of most genes related to inflammation including, *IL-1β*, *TNF-α*, *iNOS* and *COX-2*. In addition, CeO₂NPs administration was also associated with decreased expression of the powerful vasoconstrictor, endothelin-1 (ET-1), produced by endothelial cells and HSCs involved in portal hypertension. CeO₂NPs treatment also rescued messenger expression of *PPARγ*. Finally, CeO₂-NPs significantly reduced hepatic macrophages M1 abundance

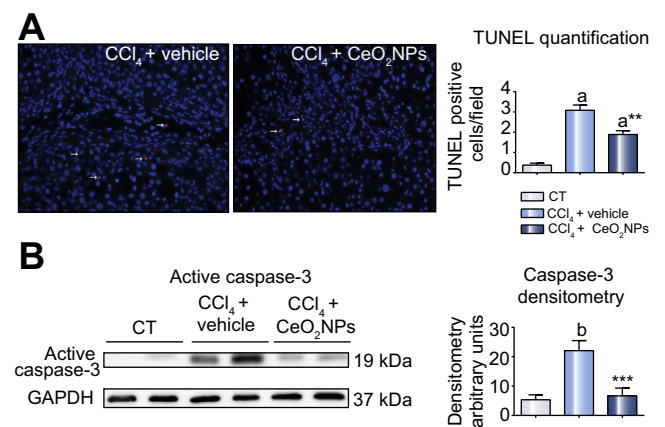


Fig. 4. Effect of CeO₂NPs on apoptosis in CCl₄-treated rats. (A) Representative TUNEL assay in hepatic tissue of fibrotic rats receiving vehicle (CCl₄ + vehicle) or treated with CeO₂NPs (CCl₄ + CeO₂NPs). Original magnification, 200×. Bars on the right show the measurement of TUNEL-positive cells in all animals. (B) Western blot for activated caspase-3 on liver tissue of control rats (CT), fibrotic rats receiving vehicle or treated with CeO₂NPs. Bars at the right show the densitometric analysis of all the samples normalized to GAPDH. Results are given as means ± SE; a, p < 0.001; b, p < 0.001 vs. control; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. CCl₄ + Vehicle.

Table 2. CeO₂NPs reduce inflammatory gene overexpression in CCl₄-treated rats. Messenger expression of inflammatory, macrophage phenotype, cell growth and vasoactive genes in the liver of control and CCl₄-treated rats.

	Control (n = 10)	CCl ₄ -rats	
		Vehicle (n = 15)	CeO ₂ NPs (n = 10)
Inflammation			
<i>IL1β</i>	1.02 ± 0.08	61.6 ± 10.52***	33.71 ± 4.7**
<i>IL6</i>	1.29 ± 0.32	1174 ± 246***	647 ± 133*
<i>IL10</i>	1.09 ± 0.15	91.5 ± 21.1***	54.4 ± 11.1**
<i>TNFα</i>	1.06 ± 0.12	60.4 ± 11.4***	19.7 ± 5.1††
<i>iNOS</i>	1.04 ± 0.12	1139 ± 287**	141 ± 56††
<i>COX-2</i>	1.14 ± 0.17	121.2 ± 28.3***	31.1 ± 5.1††
Macrophage phenotype			
<i>MRC2</i>	1.06 ± 0.13	10.9 ± 2.17***	6.49 ± 1.29*
<i>CD163</i>	1.01 ± 0.05	1.09 ± 0.1	0.85 ± 0.17
<i>Arg1</i>	1.03 ± 0.08	1.33 ± 0.16	1.78 ± 0.23*
Cell growth and differentiation			
<i>VEGF</i>	1.02 ± 0.07	0.75 ± 0.07	0.87 ± 0.09
<i>Apelin</i>	1.15 ± 0.24	1.6 ± 0.26	1.13 ± 0.26
<i>PPARγ</i>	1.04 ± 0.11	0.63 ± 0.07*	1.19 ± 0.19††
Vasoactive activity			
<i>ET-1</i>	1.05 ± 0.11	14.8 ± 2.85***	6.91 ± 1.98†
<i>eNOS</i>	1.04 ± 0.09	1.56 ± 0.14	1.47 ± 0.24
<i>COX-1</i>	1.06 ± 0.15	2.77 ± 0.38**	2.72 ± 0.55*

Fold over HPRT. IL1β, interleukin 1 β; IL6, interleukin 6; IL10, interleukin 10; TNFα, tumor necrosis factor α; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase type 2; MRC2, mannose receptor C type 2; CD163, cluster of differentiation 163; Arg1, arginase 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; PPARγ, peroxisome activated receptor γ; ET-1, endothelin 1; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; COX-1, cyclooxygenase type 1.

p* <0.05, *p* <0.01, ****p* <0.001 compared with control group; †*p* <0.05, ††*p* <0.01 compared with vehicle group (one-way ANOVA with the Newman-Keuls post hoc test and the Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test when appropriate).

(pro-inflammatory function; genes *TNF-α* and *iNOS*) but did not modify M2 marker expression (macrophages with immunoregulatory function; genes *CD163*, *Arg1* and *MRC2*). Most changes observed at assessing mRNA expression were paralleled by qualitatively similar modifications at the level of protein expression (Fig. 5). These results indicate that CCl₄-treated rats display steatosis and liver injury which is associated with a predominant M1 response that is markedly attenuated by CeO₂NPs administration (Table 2).

Effect of CeO₂NPs on oxidative and ER stress-associated gene expression

A quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed to assess whether CeO₂NPs modulate hepatic oxidative or ER stress. Total RNA obtained from liver tissue of CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs or vehicle was analyzed using a commercially available PCR array that includes 86 representative genes from several biological pathways involved in oxidative as well as ER stress. Of the 86 genes assessed in this array, 25 genes demonstrated at least a 2.5-fold difference between CCl₄-treated rats receiving vehicle and control animals as shown in Table 3, 14 genes were upregulated by a >2.5-fold change while 11 appeared to be downregulated in the liver of CCl₄-treated rats. However, statistical differences were only reached in 9 upregulated and 10 downregulated genes, respectively. Interestingly, a significant gene expression inhibitory effect of CeO₂NPs was seen in oxidative

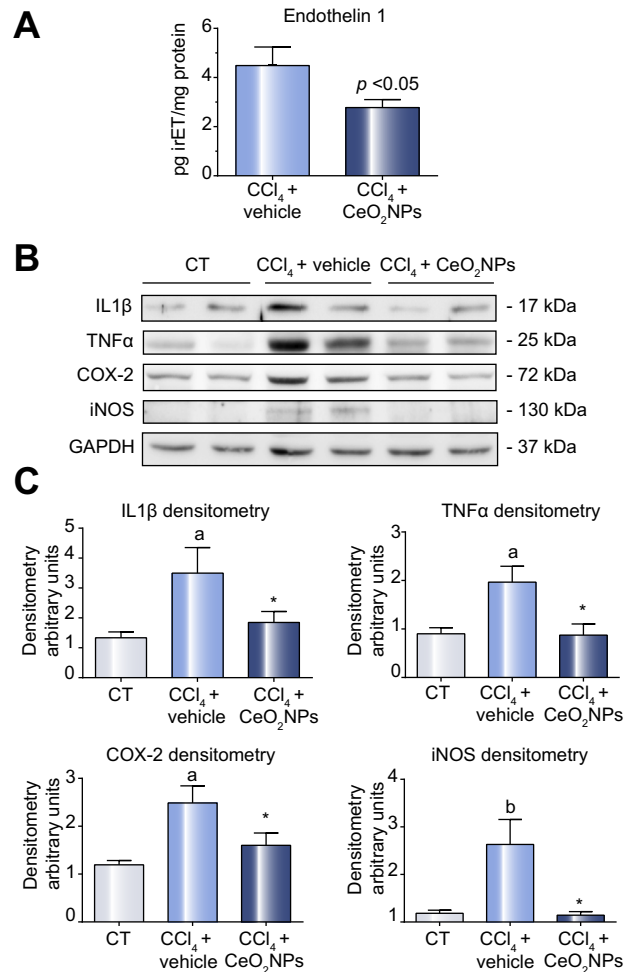


Fig. 5. Effect of CeO₂NPs on liver concentration of irET and hepatic inflammation in CCl₄-treated rats. (A) Tissue irET-1 concentration in the liver of fibrotic rats receiving vehicle (CCl₄ + vehicle) or treated with CeO₂NPs (CCl₄ + CeO₂NPs). irET-1 was measured in the supernatant by radioimmunoassay. (B) Representative Western blot for IL-1β, TNFα, COX-2 and iNOS in liver tissue of control rats (CT), fibrotic rats receiving vehicle (CCl₄ + vehicle) and fibrotic rats treated with CeO₂NPs (CCl₄ + CeO₂NPs). Fifty micrograms of protein was loaded per lane. (C) Bars at the bottom show the densitometric analysis of all the samples normalized to GAPDH. Results are given as means ± SE; a, *p* <0.05; b, *p* <0.01 vs. control; **p* <0.05 vs. CCl₄ + vehicle.

stress responsive (*Epx*), superoxide metabolism (*Ncf1* and *Ncf2*) and ER stress (*Atf3* and *Hspa5*) genes.

CeO₂NPs reduce ROS levels in HepG2 cells

To investigate the ROS scavenging effects of CeO₂NPs in human hepatocytes, HepG2 cells were treated with H₂O₂ for 60 min in the presence of CeO₂NPs or vehicle. Supplementary Fig. 1A shows the result of extracellular ROS levels as determined by fluorescence spectrophotometry using the oxidant-sensitive dye 2',7'-DCF-DA. Higher ROS levels were detected in the supernatant of HepG2 cells after treatment with H₂O₂. However, when the cells were treated with H₂O₂ in the presence of CeO₂NPs the induction of ROS formation was significantly inhibited. We also analyzed the intracellular level of ROS by fluorescence microscopy in HepG2 cells. Supplementary Fig. 1B shows representative

Research Article

Table 3. Messenger expression of genes involved in reactive oxygen species metabolism in the liver of control and CCl₄-treated rats.

Genes	CCl ₄ -rats	
	Vehicle (n = 5)	CeO ₂ NPs (n = 6)
Antioxidants		
<i>Gpx1</i>	-2.58*	-2.00**
<i>Gpx2</i>	1.36	3.02
<i>Gpx3</i>	4.66***	5.85**
<i>Cat</i>	-3.93***	-3.15***
<i>Epx</i>	-3.14**	-1.42 [†]
<i>Mpo</i>	-4.17	-4.77
<i>Serp1b1b</i>	4.24	3.85**
<i>Vim</i>	19.0	14.7**
<i>Sod3</i>	-2.52**	-3.27***
<i>Srxn1</i>	3.84	2.45**
Reactive oxygen species (ROS) metabolism		
<i>Cyba</i>	2.63*	2.32**
<i>Ncf1</i>	5.21**	3.40***
<i>Ncf2</i>	6.43**	3.57***
<i>Nox4</i>	-11.87**	-11.1***
<i>Noxa1</i>	-28.0***	-35.2***
<i>Fmo2</i>	2.83*	3.55***
<i>ApoE</i>	-2.91**	-2.46***
<i>Gclm</i>	-2.71**	-2.39**
<i>Hmox1</i>	5.16***	4.80
<i>Prnp</i>	3.38	3.03**
<i>Idh1</i>	-2.75***	-2.16***
<i>Nfe2l2</i>	-1.80**	-2.62***
Oxygen transporters		
<i>Cygb</i>	3.51*	3.48*
ER stress		
<i>Atf3</i>	52.0*	19.8***
<i>Hspa5</i>	2.64*	1.37 [†]

Gpx1, glutathione peroxidase 1; Gpx2, glutathione peroxidase 2; Gpx3, glutathione peroxidase 3; Cat, catalase; Epx, eosinophil peroxidase; Mpo, myeloperoxidase; Serpin1b, serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1b; Vim, vimentin; Sod3, superoxide dismutase 3; Srxn1, sulfiredoxin 1 homolog; Cyba, cytochrome b-245, alpha polypeptide; Ncf1, neutrophil cytosolic factor 1; Ncf2, neutrophil cytosolic factor 2; Nox4, NADPH oxidase 4; Noxa1, NADPH oxidase activator; Fmo2, flavin containing monooxygenase 2; ApoE, apolipoprotein E; Gclm, glutamate cysteine ligase, modifier subunit; Hmox1, heme oxygenase (decycling) 1; Prnp, prion protein; Idh1, isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble; Nfe2l2, nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; Cygb, cytoglobin; Atf3, activating transcription factor 3; Hspa5, heat shock 70 kDa protein 5.

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. control rats; [†]*p* < 0.05 vs. CCl₄-treated rats receiving vehicle (unpaired Student's *t* test).

microphotographs obtained after treating the cells with H₂O₂ in the presence of CeO₂NPs or vehicle. The intensity of DCF fluorescence in HepG2 cells treated with CeO₂NPs was much weaker than that observed in cells incubated with H₂O₂ alone.

Discussion

CeO₂ is considered a chemically inert ceramic where its fluorite-like structure confers a useful capacity to be easily reduced from Ce⁴⁺ to Ce³⁺ and back, followed by the capture or release of oxygen [12]. The capacity of nanocerium to modify its oxidation state depending on the surrounding environment and, consequently,

its ability to participate in redox reactions makes it appealing in biomedicine [12,13]. As previously mentioned, the heightened levels of ROS can significantly damage cellular integrity by inducing chronic inflammation, lipid peroxidation, DNA damage, damage of oxidation sensitive proteins, or even trigger cell death by a metabolic flux disruption [14]. Therefore, the oxygen storage capacity of CeO₂NPs becomes highly useful to remove free radicals as soon as they are generated in situations of ROS disbalance [15].

Indeed different *in vitro* studies have demonstrated that CeO₂-NPs act as potent antioxidants and protect the cells from several forms of lethal stress [16]. Other studies have demonstrated that CeO₂NPs are able to confer protection to neuronal [7] and ocular [17] tissue and prevent damage produced by high energy radiation. It has also been shown that the administration of CeO₂NPs protects the heart from oxidative and inflammatory lesions induced by the specific cardiac expression of MCP-1 [18]. Lastly, it has been proposed that CeO₂NPs may act the same as superoxide dismutase (SOD), an endogenous enzyme of cellular defense against free radicals [15].

The current investigation, therefore considered the possibility that CeO₂NPs possess hepatoprotective activity *in vivo* against cellular damage thanks to their unique dual effects, highly specific local delivery (the CeO₂NPs passively accumulate in the liver) and their ability to uptake and degrade free radicals. Accordingly, we investigated the organ distribution, subcellular localization, metabolic fate and systemic and hepatic effects of intravenously given CeO₂NPs in chronically CCl₄-treated rats.

A major issue concerning the use of CeO₂NPs as a therapeutic agent could be a potential local and systemic toxicity. In fact, there are previous reports suggesting that administered CeO₂NPs may induce pathological hepatic alterations including, increased serum transaminases [19,20]. None of these effects were observed in the current investigation. On the contrary, CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs showed clearer histological and biochemical signs of improved hepatic function than CCl₄-treated rats receiving vehicle. It should be noted, however, that most of the previous investigations were performed to assess whether occupational exposures could induce harmful consequences and accordingly, the doses given to the animals were between 10 and 1000 times higher than those used in the current investigation [19,20].

The time-course study of CeO₂NPs bioaccumulation in the different organs of rodents has been previously assessed in several studies using single large amounts of different sized CeO₂NPs [20,21]. In the current study we extended these investigations to chronically treated CCl₄-rats since, in addition to having alterations in the liver architecture, these animals also develop a marked hepato-splanchic circulatory dysfunction, both being known factors that can theoretically modify the organ distribution and metabolic excretion of CeO₂NPs. Our results indicate that spleen and liver showed the most avid uptake and retention of CeO₂NPs, with trace amounts in the lung and kidney and virtually none in the brain. Our data also show CeO₂NPs to remain deposited in the liver and spleen for a period of at least 8 weeks. A gradual clearance of ceria (nearly all eliminated in feces), together with the preferential deposition in liver and spleen, is consistent with previous studies in healthy animals and points to CeO₂NPs as a potentially effective and manageable therapeutic tool for chronic liver diseases. In fact, this property suggests that CeO₂NPs may exert their effects for more than several weeks

making repeated administration over long periods of treatment unnecessary.

Our results show that in addition to decreasing hepatic fat droplet deposition and ameliorating portal hypertension, rats receiving CeO₂NPs also showed systemic signs of attenuated liver inflammation, as indicated by decreased serum AST and ALT enzymes, reduced inflammatory infiltrate and diminished apoptosis. All these changes were framed by reduced expression of genes related to pro-inflammatory cytokines, cell differentiation and vasoactive mediators. There are a number of potential mechanisms mediating the anti-inflammatory effects of CeO₂NPs in fibrotic rats, which are likely related to their ability to reduce ROS under circumstances of oxidative stress for long periods of time following administration. Indeed, several experimental evidences indicate that CeO₂NPs behave as an antioxidant interfering with the pro-inflammatory signaling activation occurring in the chronically injured liver. In this regard, the beneficial effects on portal hypertension induced by antioxidants such as vitamin C and SOD have been previously shown in human cirrhotic [22] and CCl₄-treated rats with portal hypertension [23]. However, these natural compounds are quickly oxidized (metabolized) whereas CeO₂NPs act as catalysts that do work without being consumed. This is why CeO₂NPs are expected to perform superiorly to compounds such as vitamin C and SOD. This is the novel concept of using CeO₂NPs, as a permanent vitamin C or SOD like effector.

CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs clearly differentiate those receiving vehicle in two main pathological manifestations, i.e., a marked diminution in liver fat accumulation and a less portal hypertension. Hepatic fat accumulation, results from the increased synthesis of triglycerides within the hepatocytes [24]. Regardless of the origin of the accumulation of intracellular lipids in the liver, increased free fatty acid load overwhelms the β -oxidation normally occurring in the mitochondria thus increasing the demand on the endoplasmic reticulum (ER). ER dysfunction leads to the production of ROS provoking oxidative stress and activation of the inflammatory pathway. Moreover, increased oxidative stress is also associated with hepatocellular apoptosis in rats with high fat diet-induced NASH, a phenomenon that seems to be mediated by JNK activation and imbalance between pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family [11]. In this scenario the observed reduction in *Ncf1*, *Ncf2*, *Atf3* and *Hspa5* gene expression induced by the administration of CeO₂NPs to CCl₄-treated rats is of particular interest. *Ncf1* and *Ncf2* genes encode for two subunits of NADPH oxidase, a multicomponent enzyme exploited by cells to produce superoxide anions. *Atf3* and *Hspa5*, on the other hand, are ROS-mediated ER stress molecules. *Atf3* is a member of the activation transcription factor (ATF)/cAMP responsive element binding (CREB) family of transcription factors, whereas *Hspa5* encode for a member of the heat shock protein 70 family and is involved in the folding and assembly of proteins in the ER. These data indicate that CeO₂NPs administration inhibits oxidative and ROS-mediated ER stress during CCl₄-induced liver injury. Furthermore, the intense reduction in TNF α , IL-1 β , iNOS and COX-2 expression in the liver of the CeO₂NPs animals would be in line with the concept that the beneficial effects of these nanoparticles would be secondary to their marked antioxidant effects. The recovery of PPAR γ expression will also support this concept since it is known that the decrease in expression of PPAR γ enables the quiescent adipocytes to be activated and fully differentiated into HSC [25], and that it is also

required to prevent inflammation and to maintain lipid and glucose homeostasis [26].

Portal blood flow and intrahepatic vascular resistance are the main factors determining PP. Unfortunately direct measurement of portal venous inflow or mesenteric vascular resistance was not performed in the current investigation thus precluding any definitive conclusion regarding the contributory role of this factor in the diminution of portal hypertension induced by the administration of CeO₂NPs. Concerning intrahepatic vascular resistance, some indirect evidence suggest that it can be modulated by CeO₂-NP since we observed less presence of activated HSC, as reflected by the significant reduction in hepatic α -SMA staining and substantial inhibition of ET-1 which has been reported to display intrahepatic constrictor activity [27].

In summary the results of the present investigation demonstrate that administration of CeO₂NPs to rats under a non-discontinued fibrosis induction protocol significantly reduces steatosis, PP, the degree of activation of hepatic pro-inflammatory cytokines and also attenuates the intensity of the inflammatory response. Altogether, these results suggest that CeO₂NPs could be of therapeutic value in liver diseases.

Financial support

This work was supported by grants to W. Jiménez from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF12-35979), Cofinanced by FEDER, European Union, a way of making Europe, Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2014/219) and Fundació La Marató de TV3 (Marató 120930). The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (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 any conflict of interest with respect to this manuscript.

Authors' contributions

D.O. carried out the main part of the experimental work, assisted in designing the experiments and co-wrote the manuscript. T.Y. and E.C. synthesized and characterized the nanoparticles. T.Y. performed the analytical part of the biodistribution study and optimized the LPS-free synthesis of CeO₂NPs. G.F.V. performed and designed the experiments. V.R. S.S. and S.C. participated in the experimental procedures. G.C. and B.G.P. contributed to materials/analysis tools. V.P. designed the CeO₂NPs, experimental part related to NPs and gave conceptual advice and contributed to the writing of the manuscript. W.J. directed the research and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors are indebted to Prof. Josep Antoni Bombí for his collaboration in the interpretation of TEM images.

Research Article

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.020>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428–435.
- [2] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655–1669.
- [3] Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, Rossi AG. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1001–1006.
- [4] Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014;510:92–101.
- [5] Amin KA, Hassan MS, Awad el-ST, Hashem KS. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine* 2011;6:143–149.
- [6] Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small* 2009;5:2848–2856.
- [7] Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1155–1163.
- [8] Niu J, Wang K, Kolattukudy PE. Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338:53–61.
- [9] Cafun JD, Kvashnina KO, Casals E, Puentes VF, Glatzel P. Absence of Ce³⁺ sites in chemically active colloidal ceria nanoparticles. *ACS Nano* 2013;7:10726–10732.
- [10] **Comenge J, Sotelo C**, Romero F, Gallego O, Barnadas A, Parada TGC, et al. Detoxifying antitumoral drugs via nanoconjugation: the case of gold nanoparticles and cisplatin. *PLoS One* 2012;7:e47562.
- [11] Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang X-D. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr* 2008;138:1866–1871.
- [12] Wason MS, Zhao J. Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases. *Am J Transl Res* 2013;5:126–131.
- [13] Walkey C, Das S, Seal S, Erlichman J, Heckman K, Ghibelli L, et al. Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. *Environ Sci Nano* 2015;2:33–53.
- [14] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
- [15] Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* 2008;29:2705–2709.
- [16] **Xia T, Kovoichich M**, Liang M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2008;2:2121–2134.
- [17] Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* 2006;1:142–150.
- [18] Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2007;73:549–559.
- [19] Nalabotu SK, Kolli MB, Triest WE, Ma JY, Manne NDPK, Katta A, et al. Intratracheal instillation of cerium oxide nanoparticles induces hepatic toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2327–2335.
- [20] Tseng MT, Lu X, Duan X, Hardas SS, Sultana R, Wu P, et al. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;260:173–182.
- [21] Yokel RA, Au TC, MacPhail R, Hardas SS, Butterfield DA, Sultana R, et al. Distribution, elimination, and biopersistence to 90 days of a systemically introduced 30 nm ceria-engineered nanomaterial in rats. *Toxicol Sci* 2012;127:256–268.
- [22] Hernández Guerra M, García Pagan J, 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.
- [23] Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl₄-treated rats with portal hypertension. *Gut* 2009;58:118–125.
- [24] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829–838.
- [25] Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Motomura K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000;275:35715–35722.
- [26] Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 2006;45:120–159.
- [27] Cho JJ, Hoher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000;118:1169–1178.

**Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal
hypertension and display antiinflammatory properties in rats
with liver fibrosis**

Denise Oró, Tetyana Yudina, Guillermo Fernández-Varo, Eudald Casals,
Vedrana Reichenbach, Gregori Casals, Bernardino González de la Presa, Silvia
Sandalinas, Silvia Carvajal, Victor Puentes, Wladimiro Jiménez.

Table of content

Supplementary materials and methods.....	2
Supplementary results.....	12
Supplementary Fig. 1.....	13
Supplementary Table 1.....	15
Supplementary references.....	16

Supplementary material and methods

Induction of hepatic fibrosis in rats: Studies were performed in 67 male adult Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). Rats with hepatic fibrosis (n=51) and control rats (n=16) were fed *ad libitum* with standard chow and water containing phenobarbital (0.3 g/l) as drinking fluid. Fibrosis was induced by CCl₄ inhalation as described previously [Supplementary reference 1]. Briefly, animals were exposed to a CCl₄ vapor atmosphere twice a week, starting at 0.5 minutes per exposure. The duration of the exposure was increased by 1 minute after every three sessions until it reached 5 minutes, which was used until the end of the investigation. Control rats were studied following a similar period of phenobarbital administration.

Hemodynamic studies: Rats were anesthetized with Inactin® (50 mg·kg⁻¹; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and prepared with PE-50 polyvinyl catheters in the left femoral artery and vein for blood pressure recording and blood sampling, respectively. A midline abdominal incision (2 cm) was made and the portal vein cannulated through an ileocolic vein with a PE-50 catheter to measure portal pressure. After verifying the achievement of free blood reflux, the catheter was fixed to the mesentery with cyanoacrylate glue. Hemodynamic parameters were allowed to equilibrate for 30 min, and MAP, PP and HR values were recorded. SPP was defined as MAP-PP.

Morphometric measurement of steatosis and fibrosis quantification: Liver sections (4 µm) were stained with H&E and digital images were acquired at 100× magnification with a microscope (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) and digital camera (RT-Slider Spot; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Results were analyzed using imaging software (ImageJ, National

Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The settings of the digital camera, microscope and software were kept the same for all the cases. Ten digital images were taken for each slide. Image segmentation was made by manually selecting a few distinct fat droplets which served as reference. For each object two basic parameters were measured: area and roundness. Roundness (R) was calculated by the formula $(4 \times \pi \times \text{area}/\text{perimeter}^2)$, which is equal to 1 for perfectly round objects and decreases toward 0 for more irregular objects. Filters were set to exclude exceedingly large objects ($\sim 3800 \mu\text{m}^2$) and objects with exceedingly low roundness ($R \leq 0.35$), which typically represented optically clear artifacts (cracks) or sinusoidal and vascular spaces, instead of true fat droplets. Objects identified were manually inspected to ensure quality. Fat content was calculated as the percentage of total surface area occupied by fat droplets.

Fibrosis measurement was performed using 0.1% Sirius red F3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The relative fibrosis area (expressed as a percentage of total liver area) was assessed by analyzing 32 fields of Sirius red-stained liver sections per animal. Each field was acquired as described above and the results were analyzed using imaging software (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To evaluate the relative fibrosis area, the collagen area measured was divided by the net field area and then multiplied by 100. Subtraction of the vascular luminal area from the total field area yielded the final calculation of the net fibrosis area. The amount of fibrosis measured in each animal was analyzed, and the average value was presented as a percentage.

Immunodetection of CD68 and α -SMA: Liver sections from fibrotic rats underwent microwave antigen retrieval to unmask antigens hidden by cross-linkage occurring during tissue fixation. Endogenous peroxidase activity was blocked by hydrogen peroxide pretreatment for 10 min and with 5% goat serum for 45 min. The sections were then stained with mouse anti-CD68 (1:150; AbD Serotec, Oxford, UK) or with mouse anti- α -smooth muscle actin (SMA) (1:1200; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) and incubated for 1.5 and 1 h, respectively, at room temperature. The LSAB 2 System-HRP (Dako Denmark A/S) was used for antigen detection, and antigen visualization was achieved with streptavidin peroxidase and counterstained with hematoxylin. As negative controls, immunostaining was performed without the first antibody. Macrophages (CD68-positive cells) in the middle and margin of the septa were assessed by counting 20 random fields per each section. The mean cell count for each sample was calculated. The area of α -SMA-positive staining was visualized using a digital microscope (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) in 16 random fields per animal. The percentage of immunostained/field areas of digital photomicrographs was then quantified.

Hepatic messenger expression of inflammatory, macrophage phenotype, cell growth and differentiation and vasoactive genes in fibrotic rats: Total RNA was extracted from the middle liver lobe of control and fibrotic rats using a commercially available kit (RNAeasy; QIAGEN, Hilden, Germany). The RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (ND-100 spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a cDNA synthesis kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). Specific primers and probes used for the different genes studied were designed to include intron spanning using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center through ProbeFinder version 2.5 software (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA; <http://lifescience.roche.com/shop/en/mx/overviews/brand/universal-probe-library>). A panel of selected genes dealing with inflammation, macrophage phenotype, cell growth and differentiation and vasoactive activity was analyzed. The inflammation panel included the following: interleukin 1 beta (IL-1 β) (probe 76: left 5'-CAGGAAGGCAGTGTCACTCA-3' and right 5'-TCCCACGAGTCACAGAGGA-3'), interleukin 6 (IL-6) (probe 20: left 5'-CCCTTCAGGAACAGCTATGAA-3' and right 5'-ACAACATCAGTCCCAAGAAGG-3'), interleukin 10 (IL-10) (probe 125: left 5'-AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA-3' and right 5'-TCATGGCCTTGTAGACACCTT-3'), tumor necrosis factor (TNF) (probe 68: left 5'-CGTAGCCCACGTCGTAGC-3' and right 5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGC-3'), inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) (probe 95: left 5'-AAAATGGTTTCCCCCAGTTC-3' and right 5'-CAGCTTGTCCAGGGATTCTG-3'), cyclooxygenase 1 (COX-1) (probe 78: left 5'-CCACTCGCCTCATCCTTAGA-3' and right 5'-GGAGCTCCGGGTCAAAC-3') and cyclooxygenase 2 (COX-2) (probe 125: left 5'-GATGCTATCTTTGGGGAGACC-3' and right 5'-CCATAAGGCCTTTCAAGGAGA-3'). The macrophage phenotype panel included: Mannose Receptor C type 2 (MRC2) (probe 20: left 5'-AAAACCCAACGCCACAG-3' and right 5'-GGTCACACTCCACCTTGACA-3'), Cluster Differentiation 163 (CD163) (probe 73: left 5'-

ATGGGGAAGGCACAACACTG-3' and right 5'-TCAGATCCGCTCCGTCTAA-3'), and Arginase 1 (Arg1) (probe 66: left 5'-TGGGAAAAGCCAATGAACA-3' and right 5'-TGCTTCCAATTGCCATACTG-3'). The cell growth and differentiation panel included: Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) (probe 66: left 5'-CCTGTGTGCCCTAATGC-3' and right 5'-AGGTTTGATCCGCATGATCT-3'), Apelin (probe 16: left 5'-CTCTGGCTCTCCTTGACTGC-3' and right 5'-GCCTTCTTCTAGCCCTTTCC-3'), and Peroxisome Activated Receptor γ (PPAR γ) (probe 125: left 5'-CCCAATGGTTGCTGATTACA-3' and right 5'-GGACGCAGGCTCTACTTTGA-3') and the vasoactive activity panel included: Endothelin 1 (ET-1) (probe 22: left 5'-CAAGCTGGGAAAGAAGTGTATCTA-3' and right 5'-GTTGCTGATGGCCTCCAA-3') and endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) (probe 76: left 5'-CTAGACACCCGGACAACCTC-3' and right 5'-GGTGGTCCACAATGGTCACT-3').

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (probe 95: left 5'-GACCGTTCTGTCATGTCG-3' and right 5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3') was used as the reference gene. Primers were designed according to rat sequences (GenBank codes NM_031512.2, NM_012589.1, NM_012854, NM_012675.3, NM_012611.3, NM_017043.3, NM_017232.3, NM_001024687.1, NM_001107887.1, NM_017134.2, NM_031836.1, NM_031612.2, NM_013124.3, NM_012548.2, NM_021838.2 and NM_012583.2, respectively). Real-time quantitative polymerase chain reaction was analyzed in duplicate and performed with the LightCycler 480 (Roche Diagnostics). A 10- μ l total volume reaction of diluted 1:8 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM prevalidated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary) and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) were

used in each PCR. A fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturing for 10 s at 95°C, annealing for 20 s at 60°C, and extension for 1 s at 72°C). Water was used as a negative control. Relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (C_T), which is inversely related to the abundance of mRNA transcripts in the initial sample. The mean C_T of duplicate measurements was used to calculate ΔC_T as the difference in C_T for target and reference. The relative quantity of product was expressed as fold induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T$ represents ΔC_T values normalized with the mean ΔC_T of control samples.

Oxidative stress gene expression PCR array in liver of CCl₄-treated rats: Liver samples were obtained from 4 control rats, 6 CCl₄-treated rats receiving vehicle and 6 CCl₄-treated rats CeO₂NPs to assess changes in oxidative stress pathways in the hepatic transcriptome of CCl₄-treated rats. Total RNA was extracted using a RNA extraction column kit (RNAeasy, Qiagen, Venlo, The Netherlands). To remove residual DNA, RNA preparations were treated with RNase-Free DNase set (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized from 500 ng total RNA using an RT2 first-strand kit (Qiagen) and PCR arrays were performed according to the manufacturer's protocols (SABiosciences, Frederick, MD). Real-time PCR array was performed using the rat Oxidative Stress RT2 Profiler™ PCR array, (SABiosciences) according to the manufacturer's protocol. This PCR array combines the quantitative performance of SYBR Green-based real-time PCR with the multiple gene profiling capabilities of microarray to profile the expression of 86 key genes involved in oxidative stress. PCR array plates were processed in a Light Cycler

480 (Roche Diagnostics) using automated baseline and threshold cycle detection. Gene expression was normalized to internal controls to determine the fold change in gene expression between test and control samples. The relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data were interpreted using the SABiosciences' web-based PCR array data analysis tool. Statistical significance was obtained after performing a Student's t test analysis compared to control to control samples. (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

Western blot analysis of activated caspase-3, IL-1 β , iNOS, COX-2 and TNF α : Hepatic tissue from control, treated and non-treated rats was individually homogenized as described previously [Supplementary reference 2]. To detect activated caspase-3, IL-1 β , iNOS, COX-2 and TNF α 50-80 μ g of total denatured proteins were loaded on a 7.5% (iNOS), 10% (COX-2), 12% (caspase-3 and IL-1 β) and 15% (TNF α) SDS-polyacrylamide gel (Mini-PROTEAN III; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Gels were transferred for 2 h to nitrocellulose membranes of 0.2 μ m (caspase-3, IL-1 β and TNF α) or 0.45 μ m (iNOS and COX-2) and blocked with 5% nonfat milk (IL-1 β , iNOS and COX-2), 5% bovine serum albumin (TNF α) or 1% bovine serum albumin (caspase-3) in TTBS buffer at room temperature for 2 h. All membranes were stained with Ponceau S red as a control for protein loading and were then incubated at 4°C with rabbit polyclonal anti-activated caspase-3 (1:300 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti-IL1 β (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-iNOS (1:1000 dilution; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-COX2 (1:100

dilution; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), anti-TNF α (1:500 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 48h (caspase-3) or 24h (IL-1 β , iNOS, COX-2 and TNF α). Membranes were incubated with a donkey anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibody (1:2000; Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The bands were visualized by chemiluminescence (Luminata Forte Western HRP substrate; EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Quantification of apoptosis in hepatic tissue: To determine the degree of hepatic apoptosis we used the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay to detect cell death using the fluorescein-FragEL DNA fragmentation detection kit (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche) according to the manufacturer's protocol. A semiquantitative scoring method was used to quantify and compare the rates of cell death between the two groups. For each sample, the number of TUNEL-positive cells was counted per 200 \times high-power field. At least eight representative fields were evaluated for each experimental group, from which an average value was calculated.

Hepatic levels of ET-1: The hepatic tissue concentration of irET was measured in 15 CCl₄-treated rats receiving vehicle and 10 CCl₄-treated rats receiving CeO₂NPs. Samples of about 400 mg were individually homogenized in 1 mol/L acetic acid (1:3 wt/vol) and centrifuged at 15000 g for 10 minutes at 4°C. Supernatants were frozen at -20°C until analyzing the concentrations of irET and proteins.

ET was measured by radioimmunoassay (Nichols Institute Diagnostics B.V., Witjchen, The Netherlands) after ET extraction on Sep-Pak C18 cartridges

(Waters Associated, Mildford, MA, USA) as previously described [Supplementary reference 3]. Supernatants (0.5 mL) were acidified with 4% acetic acid (4.5 mL) and applied to cartridges preactivated with methanol, distilled water, and 4% acetic acid. The cartridges were then washed with distilled water and 25% ethanol, and irET was eluted twice with 1 mL 4% acetic acid in 86% ethanol. The eluted ET was then concentrated to dryness (Speed Vac Concentrator; Savant Instruments Inc, Farmingdale, NY, USA) and reconstituted for radioimmunoassay.

Culture of HepG2 cells: HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). This immortalized, stable cell line can be repeatedly frozen, thawed and propagated. HepG2 cells were seeded (4×10^5 cells per well) in 24-well plates grown to confluence for 24 h in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin and supplemented with 10% fetal calf serum, in a humidified atmosphere in 5% O_2 -5% CO_2 at 37°C. Thereafter, the cells were switched to serum-free medium for 24 h. The cells were treated with H_2O_2 (1.5 mM) for 60 min in the presence of CeO_2NPs (100 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (TMAOH, 0.17 mM).

Reactive Oxygen Species measurement: Fluorescence spectrophotometry and microscopy were used to measure ROS, with 2',7'-DCF-DA as the probe. DCF-DA readily diffuses through the membrane and is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to the nonfluorescent DCFH, which can then be rapidly oxidized to fluorescent DCF in the presence of ROS. Cells incubated alone or treated with H_2O_2 in the presence of CeO_2NPs or vehicle were washed with HBSS and incubated with 10 μM DCF-DA in DMEM for 40 min at 37 °C in the dark. The cells were trypsinized and diluted followed

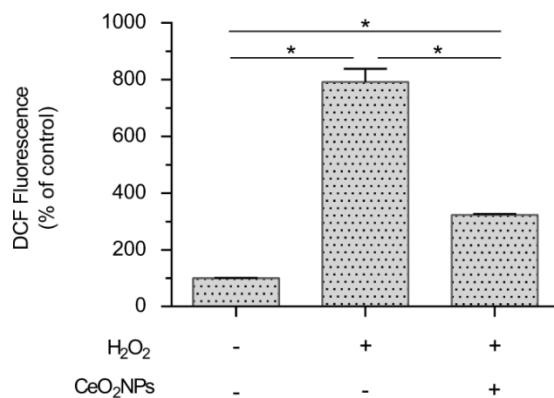
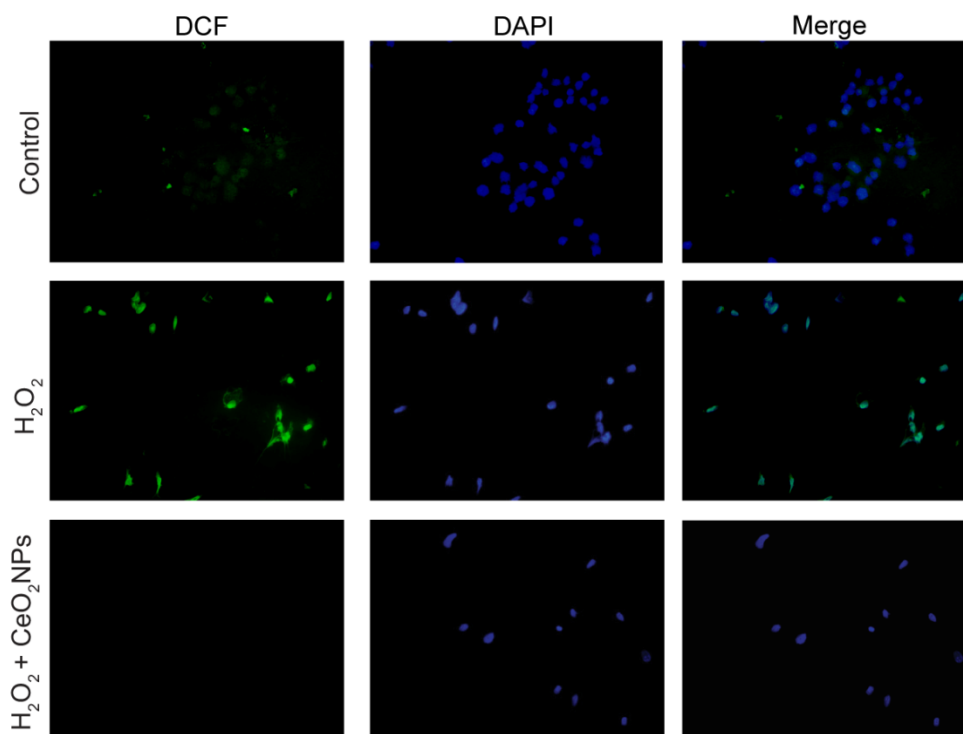
by staining with 0.02 % trypan blue. The number of cells stained with trypan blue was counted under a light microscope. The supernatant was collected to measure the extracellular production of ROS, and the intensity of fluorescence was immediately read in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar OPTIMA; BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) at 485 nm for excitation and at 520 nm for emission. For fluorescence microscopy, slides with non-treated cells or cells treated with H₂O₂ and CeO₂NPs or vehicle and DCF-DA were washed in PBS. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used to counterstain cell nuclei. The slides were covered with glass covers and observed under the fluorescence microscope.

Measurements and statistical analysis: Standard parameters of renal and liver function were measured in the BS-200E Chemistry Analyzer (Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China). Quantitative data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), and statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Newman-Keuls post hoc test and the Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test when appropriate. Results are expressed as mean±SE and considered significant at a p level of 0.05 or less. The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari of Barcelona.

Supplementary results

Characterization of CeO₂NPs: The characteristics of NPs in terms of size, shape, and other relevant chemistry are crucial for determining the functional role of nanomaterials in biology. A well dispersed colloidal sample of CeO₂NPs in 10 mM TMAOH was prepared. Measured zeta potentials of CeO₂NPs were (+) 42.8 mV (mean conductivity 0.246 mS/cm). The X-ray diffraction pattern of CeO₂NPs showed pure CeO₂NPs with the typical peak broadening characteristic of nanosize particles (Fig. 1D). These optimally engineered nanocerium were used further in our animal studies.

Supplementary figures

A**B**

Supplementary Fig. 1: CeO₂NPs inhibited H₂O₂-induced ROS production in HepG2 cells. (A) Extracellular ROS production was determined by fluorescence spectrophotometry using the oxidant-sensitive dye 2',7'-DCF-DA. Cells were treated with 1.5 mM H₂O₂ for 60 min in the presence of CeO₂NPs (100 µg/ml) or vehicle. The results were expressed as percentage of control cells for the

indicated treatments. Data are mean \pm S.E. * $p < 0.05$. (B) Representative microphotographs of DFC fluorescence (DCF, green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) at 60 min after H₂O₂ treatment (original magnification, 200X).

Supplementary Table 1. Dosing schedule and number of CCl₄-treated rats for each study protocol.

Study protocol	Time frame with CCl₄ (weeks)	Treatment with CeO₂NPs or vehicle	Time post treatment	Number of rats
Systemic and hepatic effects	16	8-9 weeks CCl ₄	8 weeks	25
ICP-MS biodistribution	9	8-9 weeks CCl ₄	90 min	6
	11		3 weeks	6
	14		6 weeks	6
	16		8 weeks	6
TEM biodistribution	9	8-9 weeks CCl ₄	90 min	2

Supplementary references

- [1] Clària J and Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease: Pathogenesis Diagnosis and Treatment. Malden, MA: Blackwell Science Inc 1998:379-396.
- [2] Reichenbach V, Ros J, Fernández-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, et al. Prevention of fibrosis progression in CCl₄-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;340:629–637.
- [3] Leivas A, Jiménez W, Lamas S, Bosch-Marcé M, Oriola J, Clària J, et al. Endothelin 1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1842–1848.

Artículo 2: El agonismo parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina incrementa la excreción de sodio y reduce la hipertensión portal y la ascitis en ratas cirróticas.

La ascitis es una de las complicaciones clínicas más importante que desarrollan los pacientes con cirrosis y se asocia a un mal pronóstico (Arroyo et al., 1999; Clària & Jiménez, 2005). La formación de la ascitis es una consecuencia de la activación de los sistemas endógenos de retención de agua y sodio con el fin de contrarrestar la disfunción circulatoria desarrollada en pacientes con enfermedad hepática avanzada (Schrier et al., 1999). Una de las características más destacada de la disfunción circulatoria es la existencia de vasodilatación esplácnica e hipertensión portal. Las estrategias terapéuticas para corregir la hipertensión portal y reducir el flujo sanguíneo mesentérico se han focalizado en la vasopresina (AVP) y sus análogos por sus efectos vasoconstrictores preferenciales en el lecho vascular mesentérico (Petersen, 2006). Se demostró que la administración de AVP tiene eficacia farmacológica en la reducción de la presión portal, pero se descartó su uso porque frecuentemente causaba complicaciones cardiovasculares y retención de agua (D'Amico, Pagliaro & Bosch, 1995). Posteriormente, se observó que la terlipresina, un análogo de la vasopresina, es más efectivo y seguro que la AVP para reducir la hipertensión portal (D'Amico, Pagliaro & Bosch, 2000).

Los receptores V_{1a} de la AVP se encuentran en gran densidad en las células musculares lisas y se ha demostrado que su agonismo disminuye el flujo sanguíneo arterial esplácnico por medio de la vasoconstricción arterial. Este efecto se ha estudiado en arterias mesentéricas aisladas humanas (Ohslein & Berkowitz, 1986) y de rata (Mackie et al., 2008). La disminución del flujo sanguíneo arterial esplácnico logra dos efectos importantes: 1) una reducción en la presión venosa portal debido a la disminución del influjo arterial y 2) la retención de líquido en el compartimento central. Este último es responsable, al menos en parte, del incremento de la perfusión y diuresis renal. A pesar de ello, el agonismo de la vasopresina en los receptores V_2 renales causa retención de agua, atenuando parcialmente el flujo de salida de líquido mediado por los receptores V_{1a} . Idealmente, para reducir la hipertensión portal sin causar retención de agua renal, el fármaco debería ser selectivo para los receptores V_{1a} .

En este segundo trabajo se analizó el potencial valor terapéutico del FE 204038, un nuevo agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP, en la reducción de la presión portal y alteraciones

renales en ratas con cirrosis y ascitis. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

1. La administración intravenosa del agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP, FE 204038, reduce la presión portal de manera dosis dependiente sin modificar la presión arterial media en ratas cirróticas con ascitis.

La administración constante de dosis crecientes del agonista parcial FE 204038 por vía intravenosa a ratas con cirrosis y ascitis produjo una disminución dosis dependiente de la presión portal sin hacer variar la presión arterial media ni la resistencia vascular sistémica (RVS) (Figura 1, artículo 2). Tampoco se observaron cambios en el peso corporal ni en los test de función hepática y renal en comparación con las ratas cirróticas con ascitis que recibieron vehículo (Tabla 1, artículo 2). En cambio, la administración de la misma dosis creciente de terlipresina (TP), agonista completo de la AVP, no indujo cambios en la presión portal en los animales cirróticos con ascitis. Además, la infusión intravenosa de TP indujo un efecto vasoconstrictor caracterizado por un aumento agudo de la presión arterial media y de la RVS.

2. La administración a largo plazo del agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP mejora la función renal excretora y reduce la ascitis en ratas con cirrosis y ascitis.

Para analizar el efecto a largo plazo del agonista FE 204038, se administró por vía subcutánea dos veces diaria durante 6 días a ratas cirróticas con ascitis. El tratamiento crónico con FE 204038 indujo un incremento en el volumen urinario, en la excreción urinaria de sodio y en la osmolaridad urinaria en las primeras 24 horas de administración en comparación con los valores basales (Figura 2, artículo 2). Por otro lado, el tratamiento también produjo una mejora en la hemodinámica sistémica debido al aumento de RVS y a la reducción del gasto cardíaco en las ratas con cirrosis (Tabla 2, artículo 2). La mejora de la función renal excretora y de la hemodinámica sistémica en los animales con cirrosis tratados crónicamente con el agonista FE 204038 se tradujo en un descenso de más del 90 % del volumen de ascitis al final del estudio.

3. La administración del agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP a largo plazo disminuye la respuesta vasoconstrictora de la terlipresina en ratas con cirrosis.

Para analizar la capacidad de respuesta del receptor de la AVP después de la administración a largo plazo del FE 204308, se administró vía intravenosa el agonista completo TP a las ratas con cirrosis y ascitis que habían sido tratadas previamente con el agonista parcial o vehículo durante 6 días. El efecto vasoconstrictor de la TP a nivel sistémico,

caracterizado por un incremento de la MAP, fue menor en los animales con cirrosis que habían recibido previamente el tratamiento crónico con el agonista parcial FE 204038 (Figura 3, artículo 2).

4. La expresión del receptor V_{1a} de la AVP está aumentada en el territorio mesentérico de las ratas con cirrosis.

Para establecer la razón por la cual el agonista del receptor V_{1a} de la AVP tiene un efecto vasoconstrictor preferencial en el lecho vascular esplácnico, se analizó la expresión de genes relacionados con sustancias vasoactivas utilizando un array comercial de PCR que incluía 84 genes, en la aorta torácica y en el mesenterio de ratas cirróticas con ascitis y de ratas sanas (grupo control).

Como cabía esperar, muchos genes relacionados con la regulación de la función cardiocirculatoria se expresaron de manera diferente dependiendo del territorio vascular analizado (Figura 4, artículo 2). Además, encontramos grandes diferencias de expresión entre las ratas con cirrosis y las del grupo control. De los 84 transcritos analizados, 16 en el caso de la aorta torácica y 12 en la circulación mesentérica mostraron una diferencia de al menos 2,5 veces respecto los animales control (Tabla 3, artículo 2). En algunos casos estas diferencias correspondían a la aorta torácica, en otros al mesenterio o en ambos territorios. En cuanto al receptor V_{1a} de la AVP, en el mesenterio de los animales con cirrosis se observó un sobreexpresión significativa del receptor respecto a los animales control, mientras que en la aorta torácica no se encontraron diferencias de expresión entre las ratas cirróticas y las control. Estos últimos resultados del array respecto a la expresión diferencial del receptor V_{1a} en ambos territorios fueron validados por real-time PCR (Figura 5a, artículo 2). De la misma manera, se analizó la expresión proteica del receptor V_{1a} mediante Western Blot para ver si estos resultados se mantenían a nivel proteico. No se detectó el receptor V_{1a} en las arterias torácicas tanto en los animales cirróticos como en los control (Figura 5b, artículo 2). Sin embargo, en el tejido mesentérico de las ratas cirróticas se detectó una banda con el peso molecular correspondiente al receptor V_{1a} , confirmando la expresión diferencial del receptor V_{1a} de la AVP dependiente del territorio vascular analizado en ratas con cirrosis y ascitis.

Vasopressin 1a Receptor Partial Agonism Increases Sodium Excretion and Reduces Portal Hypertension and Ascites in Cirrhotic Rats

Guillermo Fernández-Varo,^{1,2} Denise Oró,¹ Edward Earl Cable,³ Vedrana Reichenbach,¹ Silvia Carvajal,¹ Bernardino González de la Presa,¹ Kazimierz Wiśniewski,³ Pere Ginés,⁴ Geoffrey Harris,³ and Wladimiro Jiménez^{1,2}

Patients and rats with cirrhosis and ascites have portal hypertension and circulatory dysfunction. Synthetic arginine vasopressin (AVP) receptor agonists able to induce systemic and mesenteric vasoconstriction have shown their usefulness in reducing portal pressure (PP) in this condition. We assessed the potential therapeutic value of a new V_{1a}-AVP receptor partial agonist with a preferential splanchnic vasoconstrictor effect (FE 204038) in rats with cirrhosis and ascites. The hemodynamic effects of cumulative intravenous doses of FE 204038, terlipressin, or vehicle were investigated. Mean arterial pressure and PP were continuously recorded and cardiac output and systemic vascular resistance (SVR) assessed at 30-minute intervals for 90 minutes. Urine volume, urine osmolality, and urinary excretion of sodium and creatinine were measured in basal conditions and following twice-daily subcutaneous doses of FE 204038 or vehicle. PP, mean arterial pressure, cardiac output, SVR, and ascites volume were also measured after 6 days. The expression of an array of vasoactive genes was assessed in the thoracic aorta and the mesenteric circulation of control rats and rats with cirrhosis and ascites. FE 204038 dose-dependently decreased PP, did not modify mean arterial pressure, and increased SVR. The effect of the V_{1a}-AVP receptor partial agonist on PP was associated with an improvement in urine volume and urinary excretion of sodium during the first day of treatment. SVR was higher and cardiac output and ascites volume were lower in rats with cirrhosis and ascites treated with FE 204038. V_{1a}-AVP receptor expression in rats with cirrhosis and ascites was markedly enhanced in the mesenteric circulation compared to the thoracic aorta. **Conclusion:** FE 204038 increases sodium excretion and reduces portal hypertension and ascites in experimental cirrhosis. V_{1a}-AVP receptor partial agonism could be a useful pharmacological treatment in decompensated patients with cirrhosis. (HEPATOLOGY 2016;63:207-216)

Patients with cirrhosis develop numerous clinical complications, among which ascites is one of the most important and constitutes a sign of poor prognosis.^{1,2} Ascites formation results from the homeostatic activation of endogenous sodium and water retaining systems in order to counteract the circulatory

dysfunction developed by patients with advanced liver disease.³ One of the most prominent features of this circulatory dysfunction is the existence of marked splanchnic vasodilation and portal hypertension. Therapeutic strategies to correct portal hypertension and reduce mesenteric blood flow have focused on arginine vasopressin

Abbreviations: AVP, arginine vasopressin; bw, body weight; CO, cardiac output; EC₅₀, 50% effective concentration; E_{max}, maximum possible effect; MAP, mean arterial pressure; mRNA, messenger RNA; PCR, polymerase chain reaction; PP, portal pressure; SVR, systemic vascular resistance; TP, terlipressin.

From the ¹Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department Ciències Fisiològiques I, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Ferring Research Institute Inc., San Diego, CA; ⁴Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received May 5, 2015; accepted September 20, 2015.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28250/supinfo.

Supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF12-35979) and Ferring Research Institute (to W.J.). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

(AVP) and its analogues because of their preferential vasoconstrictor effect on the mesenteric vascular bed.⁴ AVP administration has shown pharmacological efficacy in reducing portal pressure, although it was discarded early because it frequently caused cardiovascular complications and water retention.⁵ More recently, terlipressin (TP), triglycyl lysine vasopressin, has been shown to be more effective and safer than AVP in reducing portal hypertension.⁶

AVP and analogues exert their effects by agonizing vascular and renal AVP receptors, namely, V_{1a} -AVP and V_2 -AVP. Vascular V_{1a} -AVP receptors are found at high density on smooth muscle cells and transduce their signal through the inositol 3-phosphate/diacylglycerol pathway, releasing intracellular Ca^{2+} and subsequently activating myosin.⁷ Agonism of the V_{1a} -AVP receptor decreases splanchnic arterial blood flow due to vasoconstriction of the resistance arteries. This effect has been demonstrated in isolated human⁸ and rat^{9,10} mesenteric resistance arteries. The decrease in splanchnic arterial blood flow accomplishes two important effects: (1) a reduction in portal venous pressure due to the decrease in arterial inflow and (2) a retention of fluid in the central compartment.¹¹⁻¹⁴ The latter is responsible, at least in part, for increasing renal perfusion and pressure diuresis. However, AVP and TP agonism of the renal V_2 -AVP causes water retention, partially attenuating the V_{1a} -AVP-mediated fluid efflux. Ideally, a compound would be V_{1a} -AVP-selective, to reduce portal pressure without causing renal water retention.

The beneficial effects of V_{1a} -AVP agonists in portal hypertension have been demonstrated in multiple animal models and in humans. For example, the V_{1a} -AVP agonist F-180 demonstrated its capacity in reducing portal pressure (PP) in portal vein-ligated rats¹⁵ and subsequent beneficial effects on portal hypertension-related bleeding in hypovolemic rats by rapid recovery of arterial pressure and decreased blood loss and mortality.¹⁶ TP induces systemic and mesenteric vasoconstriction and reduces PP in patients with cirrhosis.^{11,12,17} Importantly, TP also improved renal function in patients with cirrhosis and ascites without hepatorenal syndrome.¹⁸

The aim of the present study was to investigate the potential therapeutic value of FE 204038, a new partial

V_{1a} -AVP receptor agonist in rats with cirrhosis and ascites. The concept in the design of FE 204038 was to produce a selective V_{1a} -AVP receptor agonist with a capped E_{max} (maximum possible effect). V_{1a} -AVP receptor selectivity should improve water efflux and decrease the risk of hyponatremia.¹⁹ The capped E_{max} effect should limit the amount of vasoconstriction and decrease the risk of ischemia while maintaining the reduction of mesenteric blood flow and subsequent reduction in portal pressure. The studies were designed to test the efficacy of FE 204038 in an established model of portal hypertension with ascites and circulatory dysfunction.

Materials and Methods

Induction of Cirrhosis in Rats. The study was performed in 50 male Wistar rats with cirrhosis and ascites and six control healthy rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). Cirrhosis was induced by repetitive carbon tetrachloride inhalation.²⁰ Carbon tetrachloride treatment replicates key features observed in human disease: significant cirrhosis, portal hypertension with systemic hypotension, and impaired renal function.²⁰

FE 204038. FE 204038 was synthesized at Ferring Research Institute Inc. and has the following rat vasopressin receptor profile: V_{1a} receptor partial agonist 50% effective concentration (EC_{50}) = 0.74 nM, E_{max} = 38%; for comparison AVP EC_{50} = 0.10 nM, E_{max} = 100%; V_2 receptor EC_{50} = 7.13 nM, for comparison desmopressin EC_{50} = 0.03 nM.

Effect of the Administration of Increasing Doses of a V_{1a} -AVP Receptor Partial Agonist on Systemic Hemodynamics and PP in Rats With Cirrhosis and Ascites. Animals included in this protocol were randomly assigned to one of the following groups: group A, 10 rats with cirrhosis and ascites received during 90-minute subsequent cumulative intravenous infusion of three doses (300, 1000, and 3000 pmol min^{-1} kg body weight [bw]⁻¹) of the partial agonist FE 204038 administered respectively in three periods of 30 minutes after starting the study; group B, nine rats with cirrhosis and ascites were administered during 90-minute subsequent cumulative intravenous infusion of three doses (300,

Address reprint requests to: Dr. Guillermo Fernández-Varo, Centro de Investigación Biomédica en Red, de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), IDIBAPS, edificio Centre Esther Koplowitz, Rosselló 149-153, Barcelona 08036, Spain. E-mail: guillermo.fernandez@ciberehd.org; tel: +34 93 2275400, ext 4539; fax: +34 93 2275697.

Copyright © 2015 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.28250

Potential conflict of interest: Dr. Gines consults and received grants from Ferring and Sequana. He consults for Ikaria. Dr. Harris is employed by Ferring. Dr. Cable is employed by Ferring. Dr. Wisniewski is employed by Ferring.

Table 1. Body Weight and Standard Liver and Renal Function Test Results in Baseline Conditions in Rats With Cirrhosis and Ascites Included in the Acute Protocol

	Control		Cirrhosis	
	Vehicle (n = 6)	Vehicle (n = 9)	FE 204038 (n = 10)	TP (n = 9)
Body weight (g)	425 ± 14	425 ± 10	419 ± 15	393 ± 19
Alanine transaminase (U/L)	45 ± 10	232 ± 47*	276 ± 58*	259 ± 47*
Aspartate transaminase (U/L)	158 ± 43	1335 ± 301*	1257 ± 293*	1011 ± 139*
Lactate dehydrogenase (U/L)	619 ± 117	1079 ± 246	768 ± 201	613 ± 110
Total bilirubin (mg/dL)	<0.12	2.38 ± 0.37**	1.51 ± 0.30**	1.96 ± 0.45**
Albumin (g/L)	36.4 ± 0.9	23.4 ± 1.4***	23.5 ± 1.3***	24.8 ± 1.3***
γ-Glutamyltransferase (U/L)	0.05 ± 0.03	11.89 ± 1.59*	9.69 ± 2.51*	11.53 ± 3.51*
Total proteins (g/L)	68.3 ± 1.1	42.5 ± 2.6***	42.2 ± 2.5***	45.5 ± 1.6***
Serum creatinine (mg/dL)	0.54 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.67 ± 0.02	0.57 ± 0.03
Serum sodium (mEq/L)	142.3 ± 1.0	143.5 ± 0.9	144.6 ± 1.7	142.2 ± 0.8
Serum potassium (mEq/L)	6.30 ± 0.13	4.25 ± 0.14***	4.22 ± 0.23***	4.84 ± 0.25***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared to control values (one-way analysis of variance and Newman-Keuls post hoc test).

1000, and 3000 pmol min⁻¹ kg bw⁻¹) of TP administered respectively in three periods of 30 minutes after starting the study; and group C, nine rats with cirrhosis and ascites received intravenous infusion of saline solution (vehicle) administered for 90 minutes after starting the study (2 mL h⁻¹ kg bw⁻¹). A hemodynamic study was performed to measure mean arterial pressure (MAP), PP, cardiac output (CO), heart rate, systemic vascular resistance (SVR), and splanchnic perfusion pressure, at baseline conditions and following the A, B, or C administration protocol.²¹ At the end of the study, the animals were sacrificed by isoflurane overdose.

Effect of Long-Term Administration of a V_{1a}-AVP Receptor Partial Agonist on Systemic Hemodynamics, PP, and Renal Excretory Function in Rats With Cirrhosis and Ascites. This study included 16 rats with cirrhosis and ascites. Rats developing and maintaining ascites for 1 week were placed in metabolic cages. After a habituation period of 5 days to the metabolic cages, animals were randomly assigned to one of the following groups: group A, subcutaneous bolus injection (126 nmol kg bw⁻¹ equivalent to the three cumulative doses of the first protocol) of V_{1a}-AVP receptor partial agonist administered twice daily for 6 days (n = 8); group B, subcutaneous bolus injection (2 mL kg bw⁻¹) of vehicle (saline solution) administered twice daily for 6 days (n = 8). Measurements of body weight, urine volume, urine osmolality, and urinary excretion of sodium and of creatinine were made 1 day prior to starting the protocol and during the 6 consecutive days of chronic administration. An aliquot of each 24-hour urine was also collected. On day 6, MAP, PP, CO, heart rate, and SVR were measured as described. The values were recorded after a 30-minute stabilization

period. Serum samples were also obtained and kept at -20°C until further analysis.

Effect of Acute Administration of TP on Systemic Hemodynamics in Rats With Cirrhosis and Ascites After Long-Term Administration of a V_{1a}-AVP Receptor Partial Agonist. To examine the effect of a full agonist following long-term administration of FE 204038, we analyzed the effect on MAP induced by intravenous administration of TP in rats with cirrhosis and ascites previously treated with the V_{1a}-AVP receptor partial agonist or vehicle for 6 days. Rats developing and maintaining ascites for 1 week were randomly assigned to one of the following groups: group A, three rats with cirrhosis and ascites received a subcutaneous bolus injection (126 nmol kg bw⁻¹) of V_{1a}-AVP receptor partial agonist administered twice daily for 6 days; group B, three cirrhotic rats with ascites received a subcutaneous bolus injection (2 mL h⁻¹ kg bw⁻¹) of vehicle (saline solution) administered twice daily for 6 days. On day 6, MAP and heart rate were measured in basal conditions and following intravenous administration of TP (300 pmol min⁻¹ kg bw⁻¹) as described. Values were recorded after a 30-minute stabilization period.

For further information on hemodynamic studies, vasoactive gene expression polymerase chain reaction (PCR) array in aorta and mesenteric circulation of cirrhotic rats, messenger RNA (mRNA) expression of AVPR1a, western blot analysis of AVPR1a, measurements, and statistical analysis, see [Supporting Information](#) and methods.

Ethical Approval. The study was performed according to the criteria of the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari.

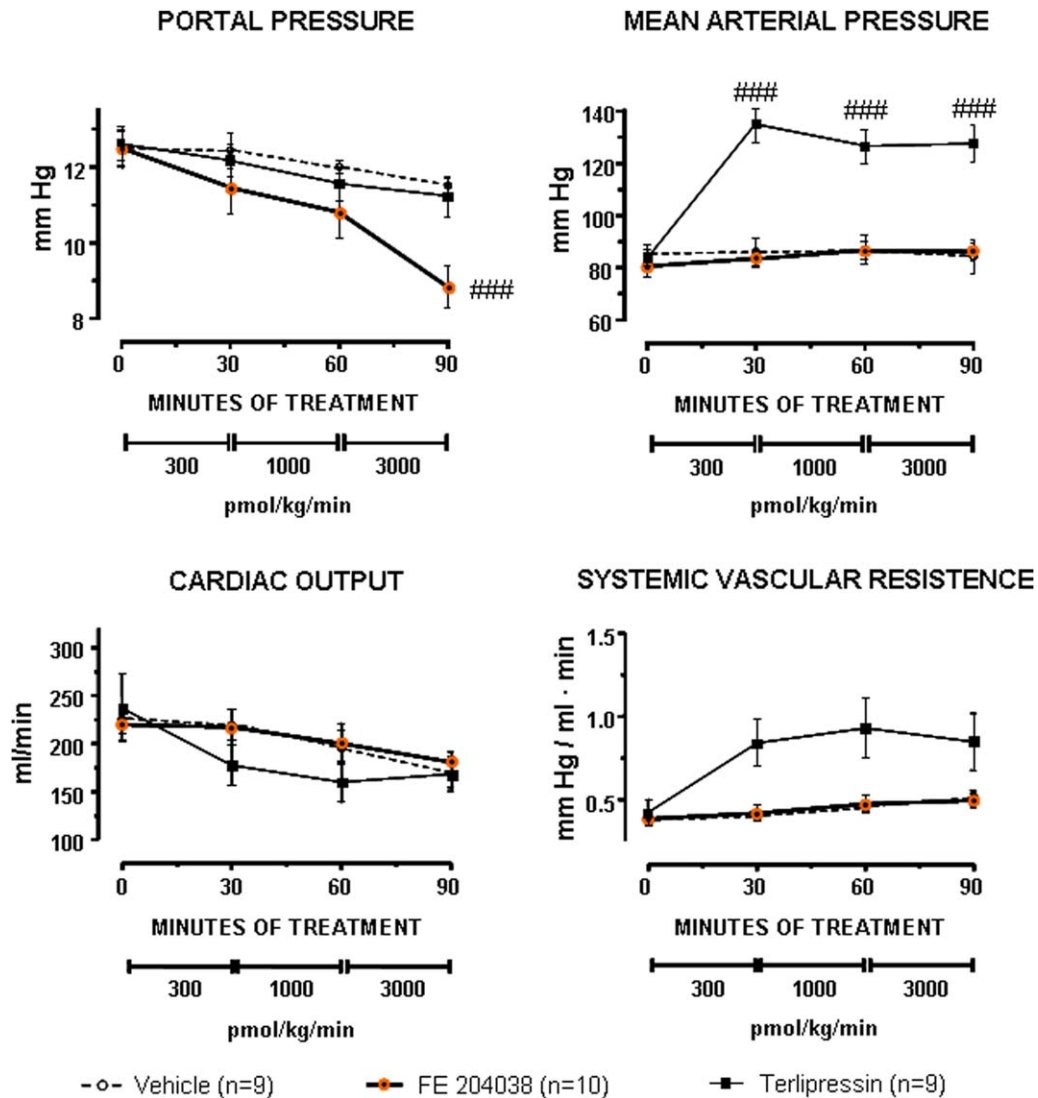


Fig. 1. Hemodynamic effects induced by the administration of increasing cumulative doses of the V_{1a} -AVP receptor partial agonist in rats with cirrhosis and ascites. Changes in portal pressure, mean arterial pressure, cardiac output, and systemic vascular resistance were recorded in baseline conditions and 30, 60, and 90 minutes during the intravenous administration of the successive doses (300, 1000, and 3000 $\text{pmol min}^{-1} \text{kg bw}^{-1}$; 30 minutes each) of the V_{1a} -AVP receptor partial agonist FE 204038, TP, or vehicle to rats with cirrhosis and ascites. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. If the treatment effect tested positive ($P < 0.05$) for one-way analysis of variance and Newman-Keuls post hoc test to compare with the baseline value, then a Student t test compared to the vehicle group was performed for each time point. $###P < 0.001$.

Results

Liver specimens obtained from carbon tetrachloride-treated rats showed cirrhosis in all animals, with no significant differences between rats receiving the partial agonist FE 204038, TP, or vehicle.

Effect of Administration of Increasing Doses of a V_{1a} -AVP Receptor Partial Agonist on PP and Systemic Hemodynamics in Rats With Cirrhosis and Ascites. Table 1 shows liver and renal function tests in baseline conditions of control rats and animals with cirrhosis treated with vehicle or increasing constant infusion (between 300 and 3000 $\text{pmol min}^{-1} \text{kg bw}^{-1}$) of

FE 204038 or TP. Rats with cirrhosis showed significant alterations of liver tests in comparison to a group of control, healthy rats. Biochemical analysis revealed decreased albumin and total protein levels, high levels of total bilirubin, and increased activity of markers of hepatocyte injury such as aspartate transaminase, alanine transaminase, and gamma-glutamyltransferase. No differences in body weight or standard liver and renal function tests results were found in baseline conditions among the three groups of rats with cirrhosis and ascites included in this protocol (Table 1).

The hemodynamic effects induced by intravenous administration of the FE 204038 agonist, TP, or vehicle

Table 2. Body Weight, Hemodynamic Profile, Ascites Volume, and Standard Liver and Renal Function Test Results in Rats With Cirrhosis and Ascites at the End of the Administration of Vehicle or the V_{1a}-AVP Receptor Partial Agonist for 6 Days

	Vehicle (n = 8)	FE 204038 (126 nmol kg bw ⁻¹) (n = 8)
Body weight (g)	390 ± 16	365 ± 13
Alanine transaminase (U/L)	138 ± 17	205 ± 49
Aspartate transaminase (U/L)	554 ± 69	906 ± 199
Lactate dehydrogenase (U/L)	416 ± 65	328 ± 53
Total bilirubin (mg/dL)	2.10 ± 0.49	1.08 ± 0.22
Albumin (g/L)	26.0 ± 1.1	27.1 ± 0.8
γ-Glutamyltransferase (U/L)	8.96 ± 1.93	7.20 ± 1.11
Total proteins (g/L)	49.8 ± 1.3	45.9 ± 2.1
Serum creatinine (mg/dL)	0.50 ± 0.07	0.60 ± 0.04
Serum sodium (mEq/L)	141.3 ± 0.9	138.8 ± 0.7
Mean arterial pressure (mm Hg)	81.0 ± 3.1	85.4 ± 2.7
Portal pressure (mm Hg)	15.8 ± 0.8	15.6 ± 0.8
Cardiac output (mL/min)	294 ± 11	216 ± 13**
Heart rate (beats min ⁻¹)	372 ± 15	370 ± 11
Systemic vascular resistance (mm Hg mL min ⁻¹)	0.28 ± 0.02	0.40 ± 0.02**
Splanchnic perfusion pressure (mm Hg)	67.1 ± 2.6	70.8 ± 2.7
Ascites volume (mL)	15.7 ± 4.1	1.38 ± 0.91**
Serum aldosterone (ng/dL)	123 ± 22	226 ± 44

**P < 0.01 compared to vehicle values (unpaired Student t test).

are shown in Fig. 1. As anticipated, basal values recorded before the intravenous infusion confirm that rats with cirrhosis and ascites have portal hypertension and a marked hyperkinetic circulatory syndrome characterized by arterial hypotension, high CO, and low SVR (these figures in control rats are PP 5.6 ± 0.2 mm Hg, MAP 121 ± 1 mm Hg, CO 199 ± 8 mL min⁻¹, and SVR 0.63 ± 0.03 mm Hg mL⁻¹ min⁻¹). Intravenous administration of FE 204038 (300, 1000, and 3000 pmol min⁻¹ kg bw⁻¹) dose-dependently decreased PP (from

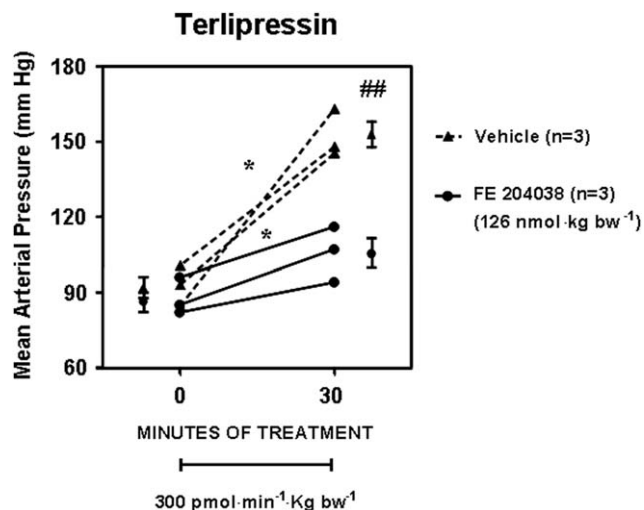


Fig. 3. Individual values of mean arterial pressure induced by administration of TP after long-term treatment with the V_{1a}-AVP receptor partial agonist in rats with cirrhosis and ascites. TP (300 pmol min⁻¹ kg bw⁻¹) was administered to two groups of rats with cirrhosis and ascites (n = 3) previously treated with the V_{1a}-AVP receptor partial agonist FE 204038 (126 nmol kg bw⁻¹) or vehicle. *P < 0.05 compared to basal values (paired Student t test), ##P < 0.01 compared to FE 204038 final values (unpaired Student t test).

12.5 ± 0.5 to 8.8 ± 0.5 mm Hg, P < 0.01) and did not modify MAP (from 81 ± 4 to 86 ± 4 mm Hg) compared to basal values. At the end of the study, PP values were significantly lower in FE 204038-treated rats than in animals receiving TP or vehicle (8.8 ± 0.5 versus 11.2 ± 0.5 mm Hg, P < 0.01, and 11.5 ± 0.5 mm Hg, P < 0.001, respectively). Administration of the FE 204038 agonist resulted in a slight increase in SVR that reached statistical significance within the first 60 minutes of its administration (from 0.39 ± 0.04 to 0.49 ± 0.04 mm Hg mL⁻¹ min⁻¹, P < 0.001). However, no differences in SVR were observed between FE 204038-treated rats

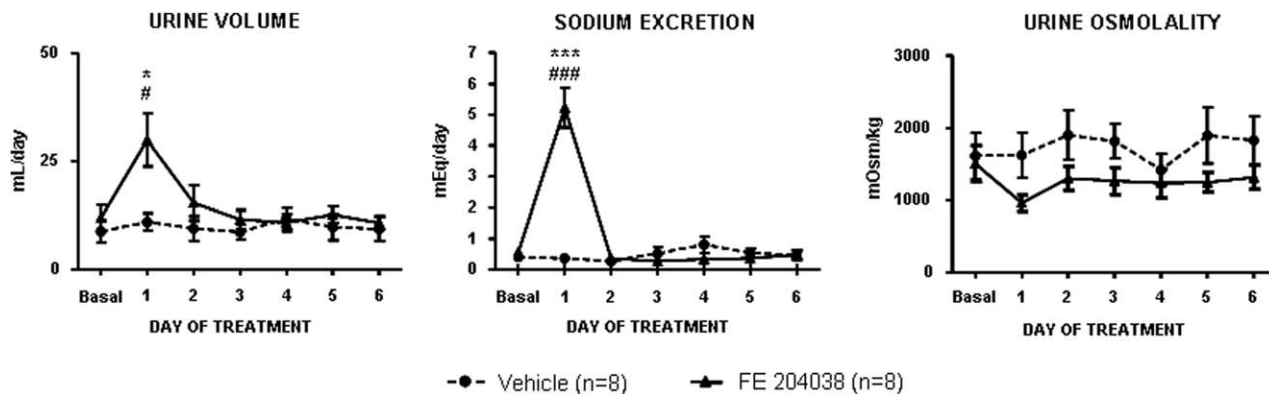


Fig. 2. V_{1a}-AVP receptor partial agonist administration improves renal excretory function in rats with cirrhosis, sodium retention, and ascites. Changes in urine volume, sodium excretion, and urine osmolality observed in the two groups of rats with cirrhosis and ascites in baseline conditions and during 6 days of treatment with the V_{1a}-AVP receptor partial agonist FE 204038 (126 nmol kg bw⁻¹) or vehicle. *P < 0.05 and ***P < 0.001 compared to basal values (paired Student t test), #P < 0.05 and ###P < 0.001 compared to vehicle group on the same day of treatment (unpaired Student t test).

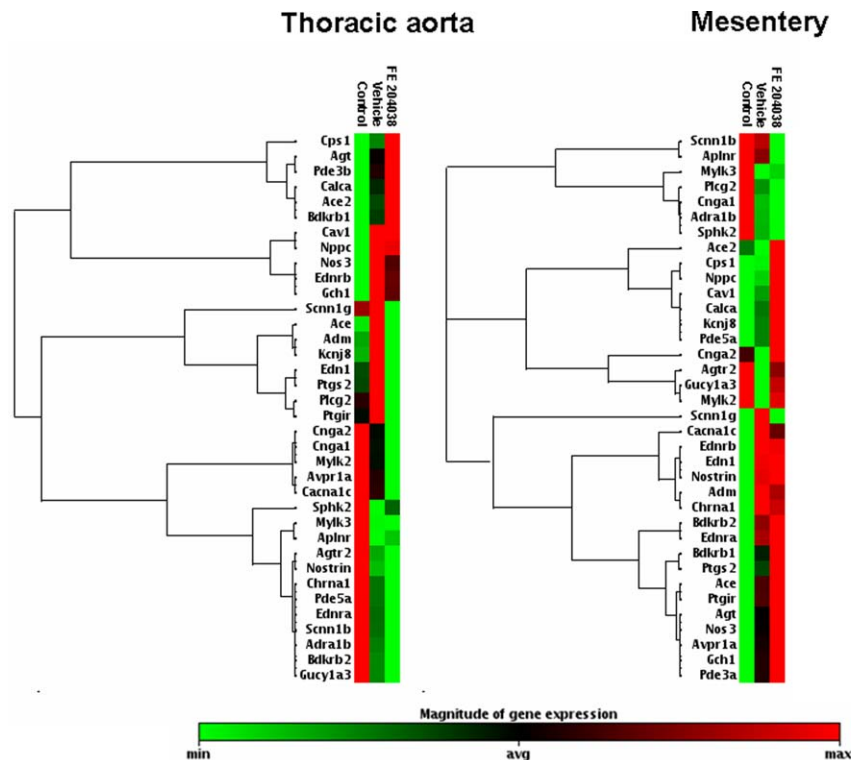


Fig. 4. Hierarchical clustering analysis of differentially regulated vasoactive genes in the systemic and mesenteric circulation of rats with cirrhosis and ascites. Hierarchical clustering was performed using the most differentially expressed genes found in the thoracic aorta and mesentery from control and rats with cirrhosis and ascites administered with vehicle or treated with the V_{1a} -AVP receptor partial agonist for 6 days. Genes with similar expression patterns are grouped together and connected by a series of branches, called a “clustering tree” or “dendrogram.” Gene regulation results are explained in the red to green code bar shown at the bottom.

and those receiving vehicle all over the investigation periods. Intravenous infusion of TP resulted in a marked vasoconstrictor effect as indicated by the acute rise of MAP and SVR. The lowest dose of TP increased MAP from 83.9 ± 3.1 to 135.1 ± 7.0 mm Hg ($P < 0.001$) and remained at similar levels at the higher, subsequent doses.

Long-Term Administration of the V_{1a} -AVP Receptor Partial Agonist Improves Renal Excretory Function and Reduces Ascites in Rats With Cirrhosis. No significant differences were found in body weight and standard liver and renal function tests between the two groups of rats with cirrhosis and ascites receiving FE 204038 or vehicle at the end of the treatment (Table 2).

The renal excretory function effects induced by chronic administration of FE 204038 or vehicle in rats with cirrhosis and ascites are shown in Fig. 2. No differences were found in baseline conditions among the two groups of rats with cirrhosis. Chronic administration of partial agonist induced a marked increase in urine volume, urinary excretion of sodium, and urine osmolality after 24 hours of administration in comparison to basal values. No changes in any of these parameters were observed in rats receiving vehicle.

The effects on systemic and portal hemodynamics induced by chronic administration of the FE 204038 agonist or vehicle are shown in Table 2. As observed in

the acute protocol, nontreated rats with cirrhosis showed a characteristic hyperdynamic circulatory syndrome. Subchronic administration of FE 204038 was associated with a significant improvement in systemic hemodynamics because these animals had significantly higher SVR and lower CO values than rats with cirrhosis receiving vehicle. Moreover, at the end of the chronic protocol the ascites volume was markedly lower in rats with cirrhosis treated with the FE 204038 agonist than in those receiving vehicle (Table 2). To ascertain the state of activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, we analyzed the serum levels of aldosterone at the end of the chronic protocol. No significant differences in serum levels of aldosterone were observed between the two groups of rats with cirrhosis receiving vehicle or treated with the V_{1a} -AVP agonist (123 ± 22 versus 226 ± 44 ng/dL) (Table 2).

Administration of the V_{1a} -AVP Receptor Partial Agonist for 6 Days Decreases Pressor Response to TP in Rats With Cirrhosis. We analyzed the effect on MAP induced by intravenous administration of TP ($300 \text{ pmol min}^{-1} \text{ kg bw}^{-1}$) in two groups of rats with cirrhosis and ascites previously treated with the partial agonist FE 204038 or vehicle for 6 days. Changes in MAP induced by TP following chronic administration of FE 204038 or vehicle are shown in Fig. 3. The pressor response induced by TP was markedly lower in rats with cirrhosis receiving the V_{1a} -AVP agonist than in

Table 3. Vasoactive Genes That Exhibit at 2.5-Fold or Greater Change in Expression in Thoracic Aorta or Mesentery Between Control and Rats With Cirrhosis and Ascites Treated With FE 204038 (126 nmol kg bw⁻¹) or Receiving Vehicle

Genes	Thoracic Aorta Fold Change		Mesentery Fold Change	
	Vehicle	FE 204038	Vehicle	FE 204038
Avpr1a	-1.20	-1.66**	3.78*	6.12**
Nos3	2.62*	2.08*	2.10	3.14*
Nostrin	-3.38*	-2.96*	1.41	1.43
Aplnr	-4.91***	-4.47*	-1.10	-1.67
Edn1	1.72	-1.64*	6.04*	6.16***
EdnrB	4.34**	3.35*	3.83*	3.76**
Adm	1.60	-1.14	8.19**	7.01***
Ptgs2	-1.89	-1.70	12.45	31.98*
Bdkrb1	1.27	1.70	27.00	59.90**
Bdkrb2	-2.30**	-3.73**	2.72*	3.19*
Gch1	5.23*	3.91***	4.69*	7.51**
Sphk1	4.74	4.22***	17.43	36.37***
Adra1b	-2.07**	-3.27**	-2.72*	-3.72**
Mylk2	-1.35	-2.00	-3.90*	-1.04
Mylk3	-3.57**	-3.66**	-4.31*	-3.40*
Calca	2.56*	4.70**	1.82	4.12
Scnn1b	-2.15	-3.98*	-1.12	-4.76*
Scnn1g	1.04	-1.23	3.79*	-1.00
Cacna1c	-1.34	-2.51**	1.70	1.50

Abbreviations: Adm, adrenomedullin; Adra1b, adrenergic alpha-1B receptor; Aplnr, apelin receptor; Avpr1a, arginine vasopressin receptor 1A; Bdkrb1, bradykinin receptor B1; Bdkrb2, bradykinin receptor B2; Cacna1c, calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit; Calca, calcitonin-related polypeptide alpha; Edn1, endothelin 1; EdnrB, endothelin receptor type B; Gch1, guanosine triphosphate cyclohydrolase 1; Mylk2, myosin light chain kinase 2; Mylk3, myosin light chain kinase 3; Nos3, nitric oxide synthase 3, endothelial cell; Nostrin, nitric oxide synthase trafficker; Ptgs2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2; Scnn1b, sodium channel, non-voltage-gated 1 beta; Scnn1g, sodium channel, non-voltage-gated 1 gamma; Sphk1, sphingosine kinase 1.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control rats (unpaired Student *t* test).

those previously treated with vehicle (106 ± 6 versus 152 ± 5 mm Hg, $P < 0.01$).

Gene Expression of Vasoactive Genes in the Systemic and Mesenteric Circulation of Rats With Cirrhosis. In order to establish the rationale for the preferential vasoconstrictor effect of the V_{1a}-AVP agonist on the splanchnic vascular bed, total RNA samples were analyzed using a commercially available PCR array that includes 84 representative vasoactive genes.

Figure 4 shows a colorimetric diagram containing a selection of the vasoactively related genes whose transcription is up or down (red or green) the 2.5-fold gene expression threshold in comparison to control rats. The 36 most significantly differentially expressed genes found in thoracic aorta and in mesentery of control rats and animals with cirrhosis receiving vehicle or treated with V_{1a}-AVP receptor partial agonist are shown. As anticipated, several genes involved in the regulation of

cardiovascular function were differentially expressed according to the vascular territory; in addition, marked differences were found between rats with cirrhosis and control rats. Twelve transcripts in the thoracic aorta and 16 transcripts in the mesenteric circulation out of the 84 messengers assessed demonstrated a 2.5-fold or higher difference than those of control animals. In some cases these differences could be recorded in the thoracic aorta, in the mesentery, or in both territories according to the assessed transcript (Table 3). Concerning the V_{1a}-AVP receptor, it was noteworthy that whereas no differences were observed between rats with cirrhosis and controls on analyzing transcript expression in thoracic aorta, a significant overexpression of messenger V_{1a}-AVP receptor was found in the mesenteric territory of animals with cirrhosis compared to controls.

mRNA Expression of AVPR1a. Real-time PCR was performed to validate the results obtained by the PCR array of vasoactive genes and to confirm whether the enhanced sensitivity to AVP partial agonist in rats with cirrhosis and ascites corresponded with an increase in AVPR1a mRNA expression in the mesenteric territory. Paralleling the results obtained in the PCR array, mRNA expression of AVPR1a was similar in the thoracic aorta of nontreated rats with cirrhosis and ascites than in control animals; but, in contrast, expression of this transcript was markedly enhanced in the mesenteric tissue of rats with cirrhosis and ascites compared to that of control rats (Fig. 5A).

Protein Expression of AVPR1a. Western blot analysis was performed using an antirabbit AVPR1a polyclonal antibody (Fig. 5B). AVPR1a protein expression was not detected in thoracic arteries of either rats with cirrhosis and ascites or control rats. In contrast, mesenteric tissue from animals with cirrhosis expressed a clear band at the molecular weight corresponding to AVPR1a, thus confirming a differential expression of AVPR1a according to the vascular territory in rats with cirrhosis and ascites (Fig. 5B).

Discussion

Portal hypertension and ascites are among the major complications of patients with advanced liver disease. The pathogenesis of these disturbances is very complex, and during the last decade numerous clinical and experimental data have fueled our understanding of the close relationship existing between these two disturbances.²² Portal hypertension is a major causative factor of variceal bleeding and promotes splanchnic vasodilation.⁶ This, in turn, is at the root of many of the circulatory disturbances of these patients, including activation of

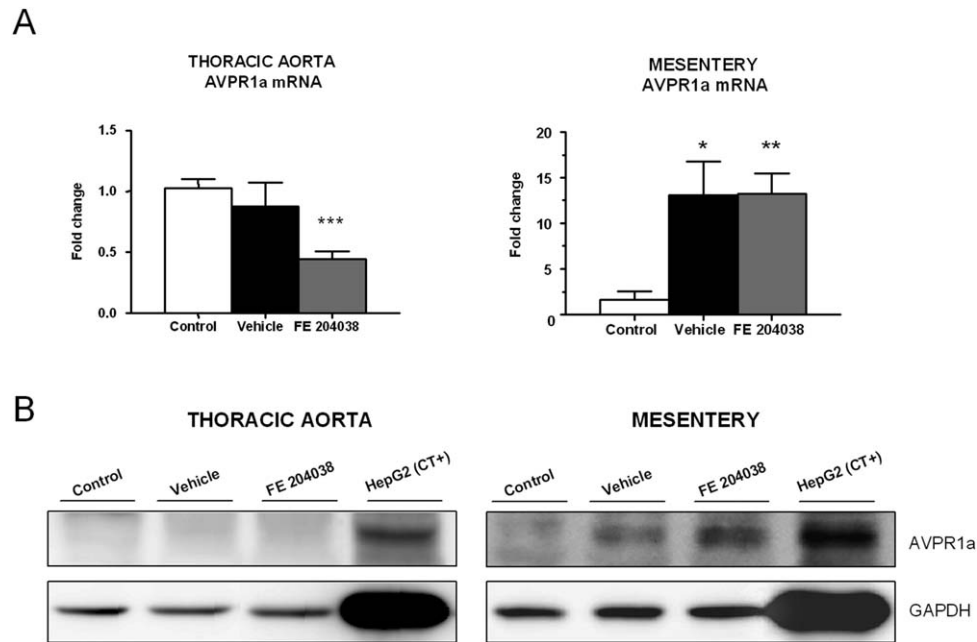


Fig. 5. Messenger RNA and protein expression of AVPR1a in thoracic aorta and in mesentery from controls and rats with cirrhosis and ascites receiving vehicle or treated with the partial agonist FE 204038. (A) AVPR1a mRNA expression was quantified by real-time PCR. *HPRT* was used as a reference gene for normalization. (B) Representative western blots of AVPR1a in thoracic aorta and in mesentery. Fifty micrograms of protein was loaded per lane. HepG2 cell lysates in normoxic conditions for 24 hours were used as positive control.

vasoactive systems, sodium and water retention, and ascites formation.²³ Under this scenario, reduction of portal hypertension and splanchnic vasodilation represent major therapeutic targets to improve prognosis in patients with advanced cirrhosis.

In the current study we investigated the impact of a new V_{1a} -AVP receptor partial agonist with preferential splanchnic vasoconstriction effects, namely, FE 204038, on PP, systemic hemodynamics, renal excretory function, and ascites volume, in rats with cirrhosis and ascites. We assessed the capability of FE 204038 to maintain the pharmacologic efficacy of a full agonist with the enhanced safety of a partial agonist.

The most relevant pharmacological effect induced by intravenous administration of cumulative doses of FE 204038 was the striking dose-dependent reduction in PP, with the figures being at the highest dose close to normal values. This pattern response markedly differs from that observed with TP. In fact, equimolar doses of the AVP analogue resulted in a moderate effect on PP and an intense peripheral vasoconstrictor response, as indicated by the rapid and sustained increase in MAP and SVR. These results further indicate that the V_{1a} receptor partial agonist exerts a preferential vasoconstriction on the mesenteric vasculature, which ultimately results in diminished portal blood inflow and PP.

Abundant experimental information indicates that extracellular volume expansion in advanced cirrhosis

mainly occurs within the mesenteric vascular territory.²⁴⁻²⁶ Accordingly, it is predictable that any drug with a preferential mesenteric vasoconstrictor activity would displace intravascular fluid from the mesentery to the central circulation and, as a consequence, promote an increase in sodium and water excretion. The results obtained following subchronic administration of the V_{1a} -AVP receptor partial agonist support this hypothesis. During the first 24 hours of treatment FE 204038 induced such an increase in urine volume and urinary excretion of sodium that the fluid accumulated in the peritoneal cavity in some animals was markedly diminished or completely evacuated. However, no further diuretic or natriuretic effect of the V_{1a} -AVP receptor partial agonist was observed during the remaining days of treatment. Although it could be interpreted that tachyphylaxis occurred and that the animals became unresponsive to treatment after day 1, this is probably unlikely. First, a statistically significant but relatively small (10%-20%) shift in the dose response occurs with repeated V_{1a} agonist treatment.⁸ This small shift would not render the animal unresponsive to repeated FE 204038 treatment. Second, the increase in pressure diuresis and natriuresis for only the first 24 hours has been described in norepinephrine-treated normal dogs.²⁷ After the initial 24 hours, urine volume and sodium excretion returned to pretreatment levels, despite a sustained increase in arterial pressure. The animal reaches a new equilibrium

of water and sodium intake that is quantitatively identical to the pretreatment condition but is actually a shift in the equilibrium consistent with the new elevated arterial pressure. In this study, it was clear that the ascites resolved within the first 24 hours and, because there was no more excess fluid available for removal, the animals reached new equilibrium. The pressor response to TP was markedly lower in rats with cirrhosis treated with the agonist than in those receiving vehicle. This is probably due to multiple factors: elevated V_{1a} -AVP receptor occupancy by FE 204038 throughout the treatment period, an attenuation (not elimination) of V_{1a} receptor responsiveness.⁸ In addition, animals showed a significantly improved cardiovascular performance with improvements in both CO and SVR. The improvement in these cardiovascular parameters represents an important disease-modifying effect and likely results from the redistribution of intravascular fluid back to the central compartment.

To gain further insight into the vascular effects induced by the V_{1a} -AVP receptor agonist in rats with cirrhosis, we used a specific rat microarray assessing biological pathways regulating blood vessel vasoconstriction and dilation in response to a wide variety of signs.²⁸ This array included genes belonging to several subsets of families that have been implicated in vascular tone and arterial pressure regulation, vascular smooth muscle contraction, and relaxation, myosin light kinases, the renin-angiotensin system, nitric oxide signaling and metabolism, osmotic regulation and hypoxic response, ion transport, lipid metabolism, and second messenger-mediated signaling. In agreement with studies that topographically assessed individual mRNA expression,^{13,29-37} of the 84 genes included in the array, four were up-regulated and five down-regulated in the thoracic aorta of rats with cirrhosis. The former are involved in the control of vascular tone (nitric oxide synthase 3, endothelin receptor type B) and arterial pressure (guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, calcitonin-related polypeptide α), whereas down-regulated genes deal with nitric oxide signaling (nitric oxide synthase trafficker), vascular tone regulation (apelin receptor, bradykinin receptor 2), myosin light chain kinases (myosin light chain kinase 3), and smooth muscle contraction (adrenergic $\alpha 1\beta$ receptor). Of note was that the altered gene pattern expressions observed in the aorta of rats with cirrhosis clearly differ from those found in the mesentery. In fact, although some of the altered transcripts were coincident in the two territories (endothelin receptor type B, guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, adrenergic $\alpha 1\beta$ receptor, and myosin light chain kinase 3), there was altered

gene expression of some genes in the aorta but not in the mesentery and overexpressed transcripts in this territory did not alter in the aorta (arginine vasopressin receptor 1A, endothelin 1, adrenomedullin, bradykinin receptors 1 and 2, sodium channel non-voltage-gated 1 γ). Most genes of the latter group belong to those involved in vasoconstriction. This finding is not novel as differential organ expression of other genes involved in vascular tone regulation has been reported in cirrhosis.^{13,35-38} The V_{1a} -AVP receptor was among the genes up-regulated in the mesentery, but not in the aorta, of rats with cirrhosis. In support of this finding, the results of mRNA expression and protein abundance of AVPR1a confirm the increase of this receptor in the mesenteric tissue of animals with cirrhosis. As far as we know, this is the first investigation describing increased expression of this receptor in the splanchnic vascular territory of rats with cirrhosis, laying the rationale to explain the preferential splanchnic vasoconstrictor activity of AVP, AVP analogues, and V_{1a} -AVP agonists in cirrhosis.³⁹

In summary, the results of this study indicate that vasopressin 1 α receptor partial agonism safely reduces portal hypertension after acute administration and subchronically increases sodium excretion and decreases ascites in experimental cirrhosis. These results indicate that V_{1a} -AVP receptor partial agonism could be a useful pharmacological treatment in decompensated patients with cirrhosis.

References

1. Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, Rodés J. Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. Oxford Textbook of Clinical Hepatology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1999:733-761.
2. Clària J, Jimenez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Ginès P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment. Malden, MA: Blackwell Science; 2005:215-226.
3. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. HEPATOLOGY 1988;8:1151-1157.
4. Petersen MB. The effect of vasopressin and related compounds at V_{1a} and V_2 receptors in animal models relevant to human disease. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2006;99:96-103.
5. D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review. HEPATOLOGY 1995;22:332-354.
6. D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J. Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. Semin Liver Dis 2000;20:399.
7. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Vasopressin and the cardiovascular system part 1—receptor physiology. Crit Care 2003;7:427-434.
8. Ohlstein EH, Berkowitz BA. Human vascular vasopressin receptors: analysis with selective vasopressin receptor antagonists. J Pharmacol Exp Ther 1986;239:737-741.

9. Altura BM. Dose-response relationships for arginine vasopressin and synthetic analogs on three types of rat blood vessels: possible evidence for regional differences in vasopressin receptor sites within a mammal. *J Pharmacol Exp Ther* 1975;193:413-423.
10. Mackie AR, Brueggemann LI, Henderson KK, Shiels AJ, Cribbs LL, Scrogin KE, et al. Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:475-483.
11. Escorsell A, Bandi JC, Moitinho E, Feu F, García-Pagan JC, Bosch J, Rodés J. Time profile of the haemodynamic effects of terlipressin in portal hypertension. *J Hepatol* 1997;26:621-627.
12. Therapondos G, Stanley AJ, Hayes PC. Systemic, portal and renal effects of terlipressin in patients with cirrhotic ascites: pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:73-77.
13. Merkel C, Gatta A, Bolognesi M, Finucci G, Battaglia G, Angeli P, et al. Hemodynamic changes of systemic, hepatic, and splenic circulation following triglycyl-lysine-vasopressin administration in alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1988;33:1103-1109.
14. Moller S, Hansen EF, Becker U, Brinch K, Henriksen JH, Bendtsen F. Central and systemic haemodynamic effects of terlipressin in portal hypertensive patients. *Liver* 2000;20:51-59.
15. Bernadich C, Bandi JC, Melin P, Bosch J. Effects of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide, compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in a rat model of portal hypertension. *HEPATOLOGY* 1998;27:351-356.
16. Morales J, Moitinho E, Abalde JG, Fernández M, Bosch J. Effects of the V1a vasopressin agonist F-180 on portal hypertension-related bleeding in portal hypertensive rats. *HEPATOLOGY* 2003;38:1378-1383.
17. Baik SK, Jeong PH, Ji SW, Yoo BS, Kim HS, Lee DK, et al. Acute hemodynamic effects of octreotide and terlipressin in patients with cirrhosis: a randomized comparison. *Am J Gastroenterol* 2005;100:631-635.
18. Martín-Llahí M, Pépin MN, Guevara M, Díaz F, Torre A, Monescillo A, et al. Terlipressin and albumin vs albumin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome: a randomized study. *Gastroenterology* 2008;134:1352-1359.
19. Solà E, Lens S, Guevara M, Martín-Llahí M, Fagundes C, Pereira G, et al. Hyponatremia in patients treated with terlipressin for severe gastrointestinal bleeding due to portal hypertension. *HEPATOLOGY* 2010;52:1783-1790.
20. Clària J, Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*. Malden, MA: Blackwell Science; 1998:379-396.
21. Reichenbach V, Fernández-Varo G, Casals G, Oró D, Ros J, Melgar-Lesmes P, et al. Adenoviral dominant-negative soluble PDGFRβ improves hepatic collagen, systemic hemodynamics, and portal pressure in fibrotic rats. *J Hepatol* 2012;57:967-973.
22. Solà E, Ginès P. Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis: current management and future perspectives. *J Hepatol* 2010;53:1135-1145.
23. Fernández-Varo G, Melgar-Lesmes P, Casals G, Pauta M, Arroyo V, Morales-Ruiz M, et al. Inactivation of extrahepatic vascular Akt improves systemic hemodynamics and sodium excretion in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2010;53:1041-1048.
24. Oliver JA, Verna EC. Afferent mechanisms of sodium retention in cirrhosis and hepatorenal syndrome. *Kidney Int* 2010;77:669-680.
25. Møller S, Henriksen JH, Bendtsen F. Ascites: pathogenesis and therapeutic principles. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:902-911.
26. Arroyo V, Jiménez W. Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000;32(Suppl. 1):157-170.
27. Hall JE, Mizelle HL, Woods LL, Montani JP. Pressure natriuresis and control of arterial pressure during chronic norepinephrine infusion. *J Hypertens* 1988;6:723-731.
28. SABiosciences. RT² Profiler PCR Array Data Analysis [computer program]. Version 3.5. Available at: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>; 2012.
29. d'Uscio IV, Smith LA, Katusic ZS. Differential effects of eNOS uncoupling on conduit and small arteries in GTP-cyclohydrolase I-deficient hph-1 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(6):H2227-2234.
30. 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 USA* 2002;99:17167-17172.
31. Fukushima H, Kobayashi N, Takeshima H, Koguchi W, Ishimitsu T. Effects of olmesartan on Apelin/APJ and Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway in Dahl rats with end-stage heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;55:83-88.
32. Reichenbach V, Ros J, Fernández-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, et al. Prevention of fibrosis progression in CCl₄-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;340:629-637.
33. Leivas A, Jiménez W, Lamas S, Bosch-Marcé M, Oriola J, Clària J, et al. Endothelin-1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1842-1848.
34. Barrière E, Tazi KA, Pessione F, Heller J, Poirer O, Lebrec D, et al. Role of small-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels in in vitro nitric oxide-mediated aortic hyporeactivity to alpha-adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;35:350-357.
35. Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, et al. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *HEPATOLOGY* 1996;24:1481-1486.
36. Angeli P, Fernández-Varo G, Dalla Libera V, Fasolato S, Galio A, Arroyo V, et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of systemic and splanchnic vasodilation in cirrhotic rats before and after the onset of ascites. *Liver Int* 2005;25:429-437.
37. Poo JL, Jiménez W, María Muñoz R, Bosch-Marcé M, Bordas N, Morales-Ruiz M, et al. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology* 1999;116(1):161-167.
38. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, et al. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *HEPATOLOGY* 2008;48:1193-1201.
39. Asfar P, Radermacher P, Calès P, Oberti F. The effects of vasopressin and its analogues on the liver and its disorders in the critically ill. *Curr Opin Crit Care* 2010;16:148-152.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28250/supinfo.

ON LINE EXPANDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Hemodynamic studies: Two weeks after the cirrhotic rats had developed ascites the animals were included in the protocol. Then, the rats were anesthetized with Inactin® (50 mg·kg bw⁻¹, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinherim, Germany) and prepared with PE-50 polyvinyl catheters in the left femoral artery and vein for blood pressure recording and blood sampling and infusion of substances, respectively. The right jugular vein was also isolated and a PE-50 catheter placed in the right atrium. A thermocouple (Columbus Instruments, Columbus, OH) was advanced to the aortic arch through a left carotid approach to monitor the intraarterial temperature during cardiac output (CO) measurement. A midline abdominal incision (2 cm) was made and the portal vein cannulated through an ileocolic vein with a PE-50 catheter to measure portal pressure (PP). After verifying the achievement of free blood reflux, the catheter was fixed to the mesentery with cyanoacrylate glue. Animals were prepared for measurements of hemodynamic parameters as described previously (9).

Hemodynamic parameters were allowed to equilibrate for 30 min. During this period, a constant infusion (2 ml·h⁻¹·kg bw⁻¹) of a Ringer solution was given through the femoral vein for equilibration. Values of MAP, PP, HR, CO and SVR were recorded in basal conditions and 30, 60 and 90 minutes after the administration of the successive doses (30 minutes each) of V_{1a}-AVP receptor partial agonist, TP or vehicle. Each value represents the average of 2 measurements. Ascites volume was measured by aspiration.

Vasoactive gene expression PCR array in aorta and mesenteric circulation of cirrhotic rats: To assess changes associated with the

development of ascites in the transcriptome of the systemic and splanchnic vasculature of cirrhotic rats, thoracic aorta and mesenteric vessels were obtained from 4 control rats, 7 cirrhotic rats receiving vehicle and 5 cirrhotic rats receiving a subcutaneous bolus injection (126 nmol·kg⁻¹·bw⁻¹) of V_{1a}-AVP receptor partial agonist administered twice daily for 6 days. Total RNA was extracted using a RNA extraction column kit (RNAeasy, Qiagen, Venlo, The Netherlands). To remove residual DNA, RNA preparations were treated with RNase-Free DNase set (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized from 500 ng total RNA using an RT² first-strand kit (Qiagen) and PCR arrays were performed according to the manufacturer's protocols (SABiosciences, Frederick, MD). Real-time PCR array was performed using the rat Hypertension RT² Profiler™ PCR array, (SABiosciences) according to the manufacturer's protocol. This PCR array combines the quantitative performance of SYBR Green-based real-time PCR with the multiple gene profiling capabilities of microarray to profile the expression of 84 key genes involved in the regulation of arterial pressure and vascular resistance. PCR array plates were processed in a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using automated baseline and threshold cycle detection. Gene expression was normalized to internal controls to determine the fold change in gene expression between test and control samples. The relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data were interpreted using the SABiosciences' web-based PCR array data analysis tool (22).

Messenger RNA expression of AVPR1a: Primers for arginine vasopressin receptor 1A (Avpr1a) (probe 107: left 5'-

CGCACTGTGAAGATGACCTTT-3' and right: 5'-TGGAAGGGTTTTCTGAATCG-3') and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT), a constitutively expressed gene used as an endogenous standard (probe 95: left 5'-GACCGTTCTGTCATGTCG-3' and right 5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3') were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center through ProbeFinder version 2.5 software (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN; <http://lifescience.roche.com/shop/en/mx/overviews/brand/universal-probe-library>) according to rat sequences (GenBank codes NM_053019.2 and NM_012583.2, respectively). Real-time quantitative polymerase chain reaction was analyzed in duplicate and performed with the LightCycler 480 (Roche Diagnostics). A 10- μ l total volume reaction of diluted 1:8 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM prevalidated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary) and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) were used in each polymerase chain reaction. A fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturizing for 10 s at 95°C, annealing for 20 s at 60°C, and extension for 1 s at 72°C). Water was used as a negative control. Relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (C_T), which is inversely related to the abundance of mRNA transcripts in the initial sample. The mean C_T of duplicate measurements was used to calculate ΔC_T as the difference in C_T for target and reference. The relative quantity of product was expressed as fold induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T$ represents ΔC_T values normalized with the mean ΔC_T of control samples.

Western blot analysis of AVPR1a: Thoracic aorta and mesentery from cirrhotic rats with ascites and control rats were individually homogenized as described previously (26). To detect AVPR1a, 50 µg of total denatured proteins were loaded per lane on a 10% SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III; Bio-Rad Richmond, CA). Gels were transferred over night to nitrocellulose membranes of 0.45 µm (Transblot Transfer Medium, Bio Rad), stained with Ponceau S red as a loading control and blocked with 5% non fat milk for in TBST buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, containing 0.05% Tween 20 and 150 mmol/L NaCl) at room temperature for 2h. Membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti-AVPR1a antibody (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) at room temperature for 2h in TBST buffer with 5% non fat milk. Membranes were incubated with a donkey anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibody (1:2000; Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The bands were visualized by chemiluminescence (Luminata Forte Western HRP substrate; EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Measurements and statistical analysis: Standard parameters of renal and liver function were measured in the BS-200E Chemistry Analyzer, Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China. Serum levels of aldosterone were measured by radioimmunoassay (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Statistical analyses of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), Newman-Keuls *post hoc* test, paired and unpaired Student's t-test when appropriate. Results are expressed as mean±SE and considered significant $p \leq 0.05$.

Discusión

La hipertensión portal es la principal y más severa complicación en pacientes con cirrosis, representando la primera causa de muerte y de trasplante de hígado. El conocimiento de su fisiopatología ha cambiado dramáticamente durante las últimas décadas gracias a la disponibilidad de nuevos métodos diagnósticos, a la introducción de modelos de experimentación más fiables y a la aplicación de nuevos avances en la biología celular y molecular. Así es como los recientes progresos en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el tono vascular hepático, la disfunción endotelial, y su relación con la inflamación, fibrogénesis y la angiogénesis en la cirrosis hepática han sido, y continúan siendo, la base de terapias emergentes para la hipertensión portal.

Un ejemplo de estos progresos en el conocimiento de nuevos mecanismos moleculares son los estudios que exploran la implicación del estrés oxidativo en la progresión de la fibrosis hepática que se da en la enfermedad crónica del hígado, independientemente de cual sea su etiología (Parola & Robino, 2001). Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS) son productos del metabolismo celular, actúan como segundos mensajeros regulando diferentes funciones fisiológicas en el organismo. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio en los niveles de estas especies reactivas, debido a una sobreproducción de ROS/RNS y/o una disminución en las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas, se produce un estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un proceso deletéreo que puede ser un mediador importante del daño a estructuras celulares y, como consecuencia, de alteraciones fisiopatológicas en diferentes enfermedades. En las enfermedades crónicas del hígado el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la iniciación y progresión de la fibrosis hepática gracias a la activación de varias vías de señalización que pueden modular la activación y respuesta funcional de células diana potenciales, particularmente las CHE, o incluso producir citotoxicidad (Sid et al., 2013).

Por otro lado, los recientes avances en la nanotecnología han proporcionado nuevas formas de medir, controlar y manipular la materia en la escala nanométrica, impensable con las herramientas convencionales. En el campo emergente de la ingeniería molecular y la medicina molecular, la nanomedicina se ha centrado en el desarrollo y aplicación de materiales nanométricos (1-100 nm) tanto para el diagnóstico como el tratamiento de enfermedades humanas. Este es el caso de las nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2NPs), las cuales tienen capacidad de modificar su estado de oxidación dependiendo del ambiente

que les rodea y de esta manera, eliminar las especies reactivas que se generan en situaciones de estrés oxidativo (Heckert et al., 2008). De hecho, diferentes estudios han demostrado que las CeO₂NPs pueden actuar como potentes antioxidantes y proteger a las células de diferentes situaciones de estrés letal (Xia et al., 2008). Otros estudios han demostrado que las CeO₂NPs son capaces de proteger al tejido neuronal (Estevez et al., 2011) y al ocular del daño producido por radiación de alta energía (Chen et al., 2006). Diversas evidencias proponen que las CeO₂NPs pueden actuar de la misma manera que la SOD, una enzima endógena de defensa celular frente a los radicales libres (Heckert et al., 2008). Es por ello que el primer estudio de la presente tesis doctoral consideró la posibilidad de que las CeO₂NPs pudieran tener un efecto hepatoprotector frente al daño crónico hepático inducido con CCl₄ gracias a su capacidad antioxidante y a su biodistribución altamente específica para el tejido hepático. En este estudio confirmamos que en una situación de daño hepático, el hígado y el bazo muestran la mayor capacidad de adsorción y retención de CeO₂NPs. También encontramos pequeñas cantidades de cerio en los pulmones y riñones, y prácticamente nada en el cerebro. Las CeO₂NPs se mantuvieron acumuladas en el hígado y bazo durante 8 semanas. La eliminación gradual del cerio (casi todo eliminado en las heces) junto con la acumulación preferencial en hígado y bazo es consistente con estudios previos en animales sanos, y respalda el potencial terapéutico de las CeO₂NPs en las enfermedades crónicas del hígado. Estos resultados observados en la biodistribución también sugieren que las CeO₂NPs podrían ejercer sus efectos durante varias semanas, haciendo innecesaria su administración repetida durante largos periodos de tratamiento.

La administración de CeO₂NPs disminuyó la esteatosis, la inflamación, como se indica por la disminución sérica de las enzimas AST y ALT, el infiltrado inflamatorio y la apoptosis en el hígado de las ratas con fibrosis hepática. Probablemente en consecuencia a todos estos cambios biológicos positivos, se observó también una disminución significativa de la hipertensión portal. Todos estos cambios se correlacionaron con una reducción de la expresión de genes relacionados con citoquinas pro-inflamatorias, diferenciación celular y mediadores vasoactivos. Los potenciales mecanismos responsables de los efectos antiinflamatorios de las CeO₂NPs en las ratas fibróticas están probablemente relacionados con su habilidad de reducir ROS bajo situaciones de estrés oxidativo durante largos periodos de tiempo. De hecho, varias evidencias indican que las CeO₂NPs actúan como antioxidantes

exógenos interfiriendo con la activación de las señales pro-inflamatorias que ocurre en el daño hepático crónico. En relación a esto último, ya se han demostrado previamente los efectos beneficiosos en la hipertensión portal de los antioxidantes como la vitamina C y la SOD en pacientes con cirrosis y en ratas con fibrosis hepática, respectivamente (Hernández Guerra et al., 2006; Laviña et al., 2009). Sin embargo, estos compuestos naturales se metabolizan rápidamente una vez administrados, mientras que las CeO₂NPs actúan como catalizadores y funcionan sin agotarse.

Las ratas con fibrosis hepática tratadas con CeO₂NPs se diferenciaron de las que recibieron el vehículo principalmente en dos manifestaciones patológicas: una marcada disminución de la acumulación de grasa hepática y una menor hipertensión portal. La acumulación hepática de grasa es el resultado de un incremento de la síntesis de triglicéridos en los hepatocitos (Postic & Girard, 2008). Independientemente del origen de la acumulación de lípidos, el incremento en la cantidad de ácidos grasos libres satura la β -oxidación que normalmente ocurre en la mitocondria e incrementa la demanda en el retículo endoplasmático (RE). La disfunción del RE conduce a la producción de ROS, induciendo estrés oxidativo y la activación de las vías inflamatorias. Además, el estrés oxidativo en ratas con EHNA inducida con dieta rica en grasas está también asociado a la apoptosis hepatocelular, un fenómeno que parece estar asociado a la activación de JNK y a un desequilibrio entre proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Wang et al., 2008). En este escenario, el tratamiento con CeO₂NPs en las ratas fibróticas redujo la expresión de los genes Ncf1, Ncf2, Atf3 y Hspa5. Los genes Ncf1 y Ncf2 codifican dos subunidades de la NADPH oxidasa, una enzima celular que produce aniones superóxido. Por otro lado, Atf3 y Hspa5 son proteínas que intervienen en el estrés de RE. Atf3 es miembro de la familia de factores de transcripción activadores de elementos de respuesta a AMPc (CREB), mientras que Hspa5 o BiP codifica una proteína de shock térmico (chaperona) de 70 kD implicada en el plegado y ensamblaje de proteínas en el RE. Estos datos indican que la administración de CeO₂NPs reduce el estrés oxidativo en el RE mediado por ROS que ocurre en la fibrosis hepática inducida con CCl₄. Además, la intensa reducción de TNF α , IL-1 β , iNOS y COX-2 en el hígado de los animales tratados con CeO₂NPs iría en línea con la idea de que los efectos beneficiosos de estas nanopartículas son secundarios a sus propiedades antioxidantes. La recuperación de la expresión de PPAR γ también apoyaría esa idea, ya que se sabe que la reducción de la

expresión de este gen permite que los adipocitos quiescentes se activen y diferencien a CHE (Miyahara et al., 2000), el PPAR γ también es necesario para prevenir la inflamación y para mantener la homeostasis de lípidos y glucosa (Feige et al., 2006).

El hecho de que la administración de CeO₂NPs consiga reducir la presión portal es el dato más relevante de este primer estudio, ya que la hipertensión portal es una de las manifestaciones clínicas más graves de la cirrosis, y está asociada a un incremento de la morbilidad y la mortalidad. Por último, en relación a la resistencia intrahepática vascular, algunas evidencias indirectas sugieren que podría ser modulada por las CeO₂NPs ya que con el tratamiento se observó una reducción de las CHE (menor cantidad del marcador de activación de estas células: α SMA), y una inhibición de la ET-1, la cual se ha descrito como un potente vasoconstrictor a nivel hepático (Cho et al., 2000).

La hipertensión portal es la mayor causa de várices sangrantes y promueve la vasodilatación esplácnica (D'Amico et al., 2000). Esto a su vez, es la raíz de muchas alteraciones en la circulación de los pacientes con cirrosis, que en estados más avanzados inducen la activación de sistemas vasoactivos endógenos, la retención de sodio y agua, y finalmente la formación de ascitis. Es por ello que la reducción de la hipertensión portal y de la vasodilatación esplácnica representan las principales dianas terapéuticas para mejorar la prognosis en los pacientes con cirrosis avanzada. En este sentido los agonistas del receptor de la vasopresina, gracias a su capacidad de vasoconstricción sistémica y mesentérica, son capaces de reducir la presión portal. La vasopresina (AVP) fue el primer fármaco utilizado en este sentido, pero su uso se asoció a complicaciones cardiovasculares frecuentes y a retención de líquido (D'Amico et al., 1995). La terlipresina, análogo de la AVP, demostró ser más efectiva y segura que la vasopresina. Sin embargo, la terlipresina también ejerce sus efectos a través de los receptores vasculares V_{1a} y de los receptores renales V₂. FE 204038 es un nuevo análogo de la AVP con un efecto agonista selectivo para los receptores V_{1a}. En el segundo estudio se investigó el impacto de este nuevo agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP en la presión portal, la hemodinámica sistémica, la función excretora renal, y el volumen de ascitis en ratas con cirrosis y ascitis. El efecto farmacológico más relevante de la administración intravenosa del FE 204038 fue la reducción significativa de la hipertensión portal dependiente de la dosis. De hecho, con la dosis más alta de este análogo de la AVP se alcanzaron valores de presión portal muy cercanos a los normales. Este efecto fue muy

diferente al observado con la dosis equimolar de la terlipresina, caracterizado por un efecto moderado en la presión portal y una respuesta vasoconstrictora aguda a nivel periférico (indicado por un incremento sostenido en la presión arterial media y en la RSV). Estos resultados sugieren que el agonista parcial del receptor V_{1a} ejerce una vasoconstricción preferente en la vasculatura mesentérica, que conduce a una disminución del influjo de sangre portal, y finalmente a una reducción de la hipertensión portal.

Numerosos estudios previos describen que la expansión de volumen extracelular en la cirrosis avanzada ocurre dentro del territorio vascular mesentérico (Møller et al., 2009; Arroyo & Jiménez, 2000). Esto sugiere que cualquier fármaco con un efecto vasoconstrictor selectivo para el mesenterio podría desplazar el líquido intravascular desde el mesenterio a la circulación central, y como consecuencia, inducir un incremento en la excreción de sodio y agua. Los resultados obtenidos al administrar de manera subcutánea el agonista parcial del receptor V_{1a} de la AVP a ratas con cirrosis y ascitis confirman esta hipótesis. Durante las primeras 24 horas de tratamiento, el agonista FE 204038 indujo un incremento del volumen urinario y de la excreción de sodio tan pronunciado que incluso algunos animales evacuaron prácticamente todo el líquido acumulado en la cavidad peritoneal. Sin embargo, en los demás días de tratamiento no se observó este efecto diurético y natriurético. Podría interpretarse que se produce taquifilaxis y los animales no responden al tratamiento a partir del primer día. No obstante, esta hipótesis es poco probable ya que al repetir el tratamiento con el agonista V_{1a} ocurre un cambio estadísticamente significativo aunque relativamente pequeño (10-20%) en la respuesta en función de la dosis administrada (Ohlstein & Berkowitz, 1986). Este pequeño cambio no tendría lugar cuando los animales no responden a un tratamiento repetitivo con FE 204038. Por otro lado, en otro estudio donde analizan el efecto de la norepinefrina en perros sanos también describen un incremento en la diuresis y la natriuresis sólo en las primeras 24 horas (Hall et al., 1988). Después de estas primeras 24 horas, la excreción de sodio y el volumen urinario volvieron a los niveles iniciales a pesar del aumento sostenido en la presión arterial. El animal alcanza un nuevo equilibrio en el influjo de agua y sodio que es cuantitativamente idéntico a la condición pre-tratamiento pero que corresponde en realidad a un cambio en el equilibrio consistente con el aumento de la presión arterial. En el estudio 2 de la presente tesis, la ascitis de los animales cirróticos se evacuó en las primeras 24 horas y, al no haber más un exceso de líquido disponible para su

eliminación, los animales alcanzaron un nuevo equilibrio. Al final del tratamiento crónico con el agonista FE 204038 también se estudió la respuesta a la terlipresina. El efecto vasoconstrictor de la terlipresina fue mucho más bajo en las ratas con cirrosis y ascitis tratadas con el agonista en comparación a los animales que recibieron el vehículo. Esto ocurre probablemente debido a múltiples factores, por ejemplo a que el receptor V_{1a} de la AVP está ocupado por el agonista FE 204038 a lo largo de todo el período de tratamiento o a que existe una atenuación (no eliminación) de la respuesta del receptor V_{1a} de la AVP. Además del efecto diurético y natriurético, la administración continuada del agonista FE 204038 mejoró significativamente el rendimiento cardiovascular caracterizado por cambios en el gasto cardíaco y en la RVS. La mejora en estos parámetros cardiovasculares representa un efecto importante para esta enfermedad y probablemente ocurre gracias a la redistribución del líquido intravascular hacia el compartimento central.

El hecho de que los receptores V_{1a} de la AVP se encuentren en gran parte en el músculo liso vascular (Petersen, 2006) nos llevó a querer investigar los efectos vasculares inducidos por el agonista de este receptor en las ratas con cirrosis. Para ello utilizamos un array de expresión génica específico para rata y analizamos las vías de señalización que regulan la vasoconstricción y vasodilatación de los vasos sanguíneos en respuesta a varios estímulos. Este array incluía genes de varias familias implicadas en el tono vascular y en la regulación de la presión arterial, en la contracción y relajación del músculo liso vascular, en las miosina cadena ligera kinasas, en el sistema renina-angiotensina, en la señalización y metabolismo del óxido nítrico, en la regulación osmótica y la respuesta hipóxica, en el transporte de iones, en el metabolismo lipídico, y en la señalización mediada por segundos mensajeros. Uno de los territorios que analizamos en el estudio 2 fue la vasculatura arterial de las ratas con cirrosis y para ello examinamos una de las arterias principales: la aorta torácica. De los 84 genes que incluía el array, 4 se encontraron sobre-expresados y 5 infra-expresados en los animales cirróticos. Los genes sobre-expresados están implicados en el control del tono vascular (sintasa de óxido nítrico 3/endotelial, receptor tipo B de la endotelina) y en la presión arterial (guanosina trifosfato ciclohidrolasa 1, polipéptido α relacionado con el gen calcitonina), mientras que los infra-expresados intervienen en la señalización del óxido nítrico (NOSTRIN), en la regulación del tono vascular (receptor de la apelina, receptor 2 de la bradiquinina), en la cadena ligera de las quinasas (cadena ligera de la quinasa 3), y en la

contracción del músculo liso (receptor adrenérgico $\alpha 1\beta$). Este resultado coincide con estudios previos que analizaron topográficamente la expresión individual del RNA mensajero de estos genes. El otro territorio vascular analizado fue la circulación esplácnica por su implicación en la patogénesis de la cirrosis descrita anteriormente, y en este caso analizamos el mesenterio. Observamos que el patrón de expresión génica en el mesenterio es claramente diferente al patrón observado en la vasculatura arterial de las ratas con cirrosis. De hecho, aunque muchos transcritos alterados coinciden en ambos territorios (receptor B de la endotelina, guanosina trifosfato ciclohidrolasa 1, receptor adrenérgico $\alpha 1\beta$ y cadena ligera de la quinasa 3), algunos genes se sobre-expresaron únicamente en el mesenterio (receptor V_{1a} de la vasopresina, endotelina 1, adrenomodulina, receptores 1 y 2 de la bradiquinina, canal de sodio no-dependiente de voltaje 1γ). Muchos de estos últimos genes están implicados en la vasoconstricción. Estos últimos resultados concuerdan con estudios anteriores que observan una expresión diferencial de genes relacionados con la regulación del tono vascular en función del órgano analizado en la cirrosis. En uno de ellos, indican que existe expresión de la iNOS en la vasculatura de ratas cirróticas con ascitis a diferencia de las controles pero en mayor medida en el territorio mesentérico, además describen una sobre-expresión de eNOS en la aorta (Morales-Ruiz et al., 1996). La expresión de eNOS también puede variar en la progresión de la enfermedad hepática, siendo mayor en el mesenterio de animales cirróticos con ascitis (Angeli et al., 2005). De la misma manera, en este estudio observamos que el receptor V_{1a} de la vasopresina está sobre-expresado en el mesenterio, y no en la aorta, de las ratas con cirrosis. Este resultado lo confirmamos también a nivel proteico de modo que en el tejido mesentérico de los animales cirróticos encontramos una mayor cantidad de este receptor. El segundo estudio de esta tesis ha sido el primero en describir un aumento de la expresión del receptor V_{1a} de la vasopresina en el territorio vascular esplácnico de ratas con cirrosis. Este hecho explicaría el preferente efecto vasoconstrictor a nivel esplácnico de la vasopresina, de los análogos de la vasopresina y de los agonistas del receptor V_{1a} de la vasopresina en la cirrosis.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en los dos estudios que conforman esta tesis doctoral, se puede concluir que:

1. La biodistribución de las nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2NPs) en las ratas con fibrosis hepática es similar a la observada en estudios previos con animales sanos. Confirmando por tanto, que el hígado es uno de los órganos con mayor deposición de CeO_2NPs .

2. En el hígado fibrótico las CeO_2NPs se localizan en el parénquima hepático, concretamente en el citoplasma de los hepatocitos y en los lisosomas.

3. El tratamiento con CeO_2NPs es suficiente para disminuir la esteatosis y los biomarcadores séricos de daño hepático. Estos cambios positivos también se asocian a una reducción de la hipertensión portal en los animales con fibrosis hepática.

4. La administración de CeO_2NPs consigue disminuir la activación de las CHE, el infiltrado inflamatorio y la apoptosis de los hígados fibróticos.

5. El tratamiento con CeO_2NPs también reduce la sobreexpresión de genes tanto inflamatorios como relacionados con el metabolismo del estrés oxidativo y del RE en el hígado de las ratas con fibrosis hepática.

6. Las CeO_2NPs protegen a los hepatocitos humanos (células HepG2) incubados en un ambiente oxidante al reducir significativamente las ROS.

7. El agonismo parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina reduce la presión portal de manera dosis dependiente sin afectar la hemodinámica sistémica en las ratas cirróticas con ascitis.

8. El tratamiento crónico con el agonista parcial del receptor V_{1a} de la vasopresina mejora la función excretora renal al aumentar el volumen urinario y la excreción renal de sodio en animales con cirrosis y ascitis.

9. La mejora de la función renal excretora debida a la administración del agonista del receptor V_{1a} de la vasopresina se asocia a la reducción o a la desaparición total de ascitis en las ratas con cirrosis descompensada.

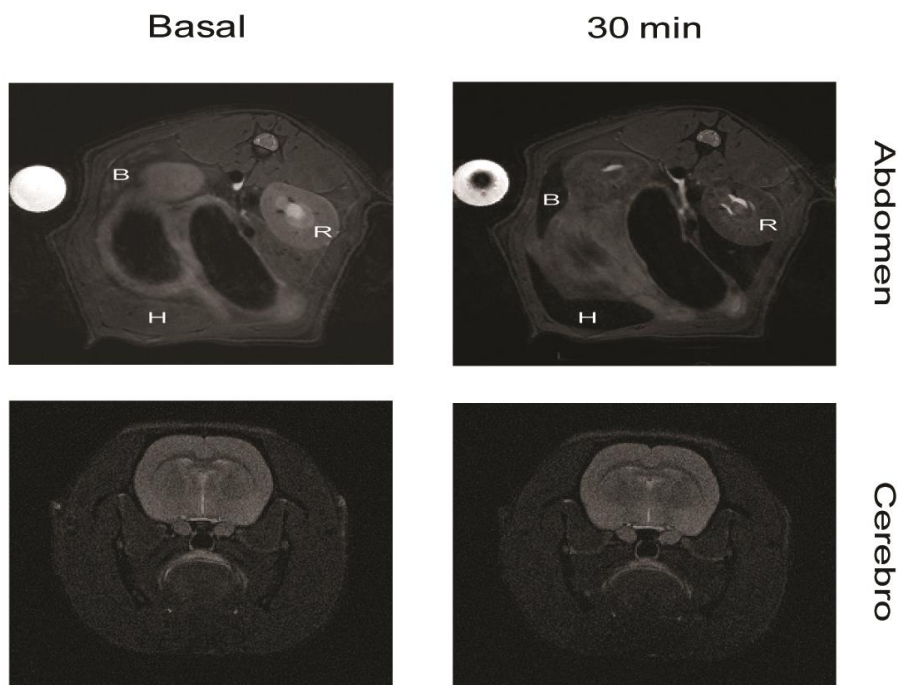
10. Existe un aumento de la expresión del receptor V_{1a} de la vasopresina en el territorio mesentérico de las ratas con cirrosis y ascitis.

11. Globalmente y según los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se puede concluir que la hipertensión portal puede ser tratada, en función del estadio de la enfermedad hepática, mediante dos novedosas y prometedoras estrategias terapéuticas. Por un lado, las nanopartículas de CeO_2 a través de sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios pueden prevenir y/o reducir de forma secundaria la presión portal en animales con fibrosis compensada. Así es como la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina podría ser una nueva estrategia para tratar en el futuro las enfermedades hepáticas crónicas. Por otra parte, en la cirrosis descompensada hay un aumento de los receptores V_{1a} de la vasopresina a nivel esplácnico. El agonismo parcial de estos receptores permite reducir la hipertensión portal al tener un efecto vasoconstrictor en el mesenterio, movilizándolo el líquido intravascular hacia la circulación central e incrementando la excreción de sodio y agua. Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que diseñar o seleccionar fármacos con efecto vasoconstrictor específicos para ciertos territorios vasculares es también una buena estrategia para tratar hipertensión portal que tiene lugar en las enfermedades hepáticas.

Anexo

ANEXO 1:

Biodistribución *in vivo* de nanopartículas de óxido de hierro ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) en ratas con fibrosis hepática inducida por inhalación de CCl_4 .



Mediante resonancia magnética se obtuvieron imágenes axiales de la zona abdominal y del cerebro antes (Basal) y después de administrar de forma intravenosa $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (30 min) a ratas con fibrosis hepática. El hígado (H), el bazo (B) y, en menor medida, el riñón (R) pierden intensidad de señal después de administrar las nanopartículas, indicando los sitios donde hay acumulación de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$. Sin embargo, no se observaron cambios de intensidad en el cerebro.

A diferencia de las CeO_2NPs , las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ tienen propiedades paramagnéticas, y esto se debe a que la acumulación del hierro en los tejidos provoca distorsión local en los campos magnéticos, con una disminución de la señal en los órganos afectados de forma proporcional a la cantidad de hierro depositado. Se sabe que la biodistribución de las nanopartículas depende principalmente de su tamaño, superficie y carga superficial. En este caso, se utilizaron $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ con una morfología similar a la de las CeO_2NPs utilizadas en el estudio 1 de la presente tesis. De manera que después de su administración intravenosa en ratas con

fibrosis hepática, estas nanopartículas se recubrieron de albúmina adquiriendo una superficie y carga similar a la observada con las CeO₂NPs.

Bibliografía

Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S and Brenneisen P (2011) Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redoxactive nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials* 32: 2918-2929.

Angeli P, Fernández-Varo G, Dalla Libera V, Fasolato S, Galioto A, Arroyo V, Sticca A, Guarda S, Gatta A, Jiménez W (2005) The role of nitric oxide in the pathogenesis of systemic and splanchnic vasodilation in cirrhotic rats before and after the onset of ascites. *Liver Int* 25:429-437.

Angulo P (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346:1221–31.

Arroyo V, Ginès P, Jiménez W, Rodés J (1999) Renal dysfunction in cirrhosis. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press 733-761.

Arroyo V, Jiménez W (2000) Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 32:157–170.

Arthur MJ (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G245–G249.

Arya A, Sethy NK, Singh SK, Das M, Bhargava K (2013) Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation. *Int J Nanomedicine* 8:4507-20.

Asati A, Santra S, Kaittanis C and Perez JM (2010) Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4:5321-5331.

Bansal R, Prakash J, Post E, Beljaars L, Schuppan D, Poelstra K (2011) Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatology* 54:586–96.

Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, Gores GJ (2005) Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G396–402.

Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-218.

- Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH (2015) Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol* 62:S121–30.
- Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2013) Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 59:583–94.
- Calleja JL, Crespo J (2015) Asociación Española para el Estudio del Hígado. Libro blanco de la hepatología en España, 1ª ed. Madrid.
- Chakraborty JB, Mann DA (2010) NF-kappaB signalling: embracing complexity to achieve translation. *J Hepatol* 52:285–91
- Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634–1635
- Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF (2006) Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* 1:142–150.
- Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D (2000) An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 118:1169–1178.
- Clària J, Jiménez W (2005) Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Gines P, Arroyo V, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden, MA: Blackwell Publishing: 174-185. En: *Ascites and renal dysfunction in liver disease*
- Comenge J, Sotelo C, Romero F, Gallego O, Barnadas A, Parada TGC, Domínguez F, Puentes VF (2012) Detoxifying Antitumoral Drugs via Nanoconjugation: The Case of Gold Nanoparticles and Cisplatin. *PLoS One* 7:e47562.
- Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU (1985) Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React* 7:137-42.
- Czaja AJ (2014) Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 20:2515–32.
- D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L (2006) Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 44:217-231.

- D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J (1995) The treatment of portal hypertension: a meta-analytic review. *Hepatology* 22:332-354.
- D'Amico G, Pagliaro L, Bosch J (2000) Pharmacological treatment of portal hypertension: an evidence-based approach. *Semin Liver Dis* 20:399.
- D'Amico G, Traina M, Vizzini G, Tinè F, Politi F, Montalbano L, Luca A, Pasta L, Pagliaro L, Morabito A (1994) Terlipressin or vasopressin plus transdermal nitroglycerin in a treatment strategy for digestive bleeding in cirrhosis. A randomized clinical trial. Liver Study Group of V. Cervello Hospital. *J Hepatol* 20:206–212.
- Day CP, James OF (1998) Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114:842–845.
- De Andrade KQ, Moura FA, Dos Santos JM, de Araújo ORP, de Farias Santos JC, Goulart MOF (2015) Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int J Mol Sci* 16:30269–308.
- Decaux G, Soupart A, Vassart G (2008) Non-peptide arginine–vasopressin antagonists: the vaptans. *Lancet* 371:1624–1632.
- Dowding JM, Das S, Kumar A, Dosani T, McCormack R, Gupta A, Sayle TXT, Sayle DC, Von Kalm L, Seal S, Self WT (2013) Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials. *ACS Nano* 7:4855–4868.
- Ebrahimkhani MR, Oakley F, Murphy LB, Mann J, Moles A, Perugorria MJ, Ellis E, Lakey AF, Burt AD, Douglass A, Wright MC, White SA, Jaffré F, Maroteaux L, Mann DA (2011) Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT(2B) receptor in chronic liver disease. *Nat Med* 17:1668–73.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
- Estevez AY, Erlichman JS (2014) The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy. *Nanomedicine (Lond)* 9:1437–40.
- Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch a, Lucky JJ, Ludington JS, Chatani P, Mosenthal WP, Leiter JC, Andreescu S, Erlichman JS (2011) Neuroprotective mechanisms of

cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med* 51:1155–63.

Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK (1998) Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 273:15639-45.

Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006) From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45:120–159.

Feng L, Xia Y, García GE, Hwang D, Wilson CB (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in Cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95:1669-75.

Fernández-Llama P, Ginès P, Schrier RW (2005) Pathogenesis of sodium retention in cirrhosis: the arterial vasodilation hypothesis of ascites formation. In: Gines P, Arroyo V, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment*. Malden, MA: Blackwell Publishing: 174-185. En: *Ascites and renal dysfunction in liver disease*

Fernández-Varo G, Melgar-Lesmes P, Casals G, Pauta M, Arroyo V, Morales-Ruiz M, Ros J, Jiménez W (2010) Inactivation of extrahepatic vascular Akt improves systemic hemodynamics and sodium excretion in cirrhotic rats. *J Hepatol* 53:1041–1048

Fernández-Varo G (2012) Serological markers of fibrosis. *Gastroenterol Hepatol* 35 Suppl 2:10-6.

Fernández-Varo G, Ros J, Cejudo-Martín P, Cano C, Arroyo V, Rivera F, Rodés J, Jiménez W (2003) Effect of the V1a/V2-AVP receptor antagonist, Conivaptan, on renal water metabolism and systemic hemodynamics in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 38:755-61.

Fernández-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Arroyo V, Sole M, Rivera F, Rodés J, Jiménez W (2003) Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol* 162:1985-93.

Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forns X, Francitorra A, Rimola A, Gassull MA, Arroyo V, Rodés J (1994) Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 20:1495-501.

Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655–69.

Gabele E, Brenner DA, and Rippe RA (2003) Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 8:D69–D77.

Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M (2010) Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology* 51:1445–9.

Ghafourifar P, Cadenas E (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 26:190-5.

Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E (1983) The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine low diet. *Am J Pathol* 113:309–14.

Ginès P, Arroyo V, Quintero E, Planas R, Bory F, Cabrera J, Rimola A, Viver J, Camps J, Jiménez W, et al. (1987) Comparison of paracentesis and diuretics in the management of tense ascites. Results of a randomized, study. *Gastroenterology* 93:234–241.

Giri S, Karakoti A, Graham RP, Maguire JL, Reilly CM, Seal S, Rattan R, Shridhar V (2013) Nanocerium: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. *PLoS One* 8:e54578.

Gluud LL, Christensen K, Christensen E, Krag A (2010) Systematic review of randomized trials on vasoconstrictor drugs for hepatorenal syndrome. *Hepatology* 51:576–584.

Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Gao H, Makuch R (2005) Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 353:2254-2261.

Guimarães ELM, Franceschi MFS, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JCF, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Guma FCR (2006) Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int* 26:477–85.

Hall JE, Mizelle HL, Woods LL, Montani JP (1988) Pressure natriuresis and control of arterial pressure during chronic norepinephrine infusion. *J Hypertens* 6:723-731.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed.; Oxford University Press: USA.

Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT (2008) The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanocerium. *Biomaterials* 29:2705–2709.

Hernández Guerra M, García Pagan J, Turnes J, Bellot P, Deulofeu R, Abalde JG, Bosch J (2006) Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 43: 485–491.

Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, Devi L a, Friedman SL (2013) Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol* 59:98–104.

Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S and Reilly CM (2013) Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol* 28:107-18.

Hollien J (2013) Evolution of the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 1833:2458–63.

Holmes CL, Landry DW, Granton JT (2003) Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* 7:427–34.

Horie M, Nishio K, Kato H, Fujita K, Endoh S, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Yamamoto K, Niki E, Yoshida Y, Hagihara Y and Iwahashi H (2011) Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *J Biochem* 150: 461-471.

Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T; MULTIVIRC Group (2001) Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 357:1069-75.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22:696-699.

Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S (2009) Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 31:399–409.

Iwakiri Y (2014) Pathophysiology of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 18(2):281-291.

Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC (2014) Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis – Current status and future directions. *J Hepatol* 61:912–924.

Javle P, Yates J, Kynaston HG, Parsons KF, Jenkins SA (1998) Hepatosplanchnic haemodynamics and renal blood flow and function in rats with liver failure. *Gut* 43:272–9.

Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R (1985) A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1:489–99.

Jiménez W, Clària J, Arroyo V, Rodés J (1992) Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 7:90–7.

Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, Rivera F, Rodés J (1985) Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 5:245–50.

Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J (1981) Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1:431-435.

Kolli MB, Manne NDPK, Para R, Nalabotu SK, Nandyala G, Shokuhfar T, He K, Hamlekhan A, Ma JY, Wehner PS, Dornon L, Arvapalli R, Rice KM, Blough ER (2014) Cerium oxide nanoparticles attenuate monocrotaline induced right ventricular hypertrophy following pulmonary arterial hypertension. *Biomaterials* 35:9951–62.

Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, García-Pagán JC (2009) Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl₄- treated rats with portal hypertension. *Gut* 58:118–125.

Lee Y a, Wallace MC, Friedman SL (2015) Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 64:830–41.

- Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1832:948–54.
- Levy B, Vallee C, Lauzier F, Plante GE, Mansart A, Mallie JP, Lesur O (2004) Comparative effects of vasopressin, norepinephrine, and L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in endotoxic shock. *Amer J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H209–H215.
- Li M, Song J, Mirkov S, Xiao SY, Hart J, Liu W (2011) Comparing morphometric, biochemical, and visual measurements of macrovesicular steatosis of liver. *Hum Pathol* 42:356–60.
- Li X, Benjamin IS, Alexander B (2002) Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 36:488–93.
- Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Huang Y, Li J (2015) Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm Res* 64:1–7.
- López-Novoa JM, Navarro V, Rodicio JL, Hernando L (1976) Cirrosis experimental de instauración rápida. Cronología de aparición de las lesiones hepáticas. *Patología* 9:233–40.
- López-Novoa JM, Rengel MA, Hernando L (1980) Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 238:F353–F357.
- Luedde T, Liedtke C, Manns MP, Trautwein C (2002) Losing balance: cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure. *Eur Cytokine Netw* 13:377–383
- Mackay IR (2002). Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol* 80:36–44.
- Mackie AR, Brueggemann LI, Henderson KK, Shiels AJ, Cribbs LL, Scrogin KE, Byron KL (2008) Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 325:475–483.
- Mallat A, Teixeira-Clerc F, Lotersztajn S (2013) Cannabinoid signaling and liver therapeutics. *J Hepatol* 59:891–6.
- Manne NDPK, Arvapalli R, Nepal N, Shokuhfar T, Rice KM, Asano S, Blough ER (2015) Cerium oxide nanoparticles attenuate acute kidney injury induced by intra-abdominal infection in Sprague-Dawley rats. *J Nanobiotechnology* 13:75.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N (1999) Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107: 450-455.

Marra F (1999) Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 31:1120–1130.

McLean EK, McLean AEM, Satton PM (1969) Instant cirrhosis, an improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of CCl₄ and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol* 50:502–6.

Melgar-Lesmes P, Tugues S, Ros J, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Rodés J, Jiménez W (2009) Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut* 58:285–92.

Meltzer J, Brentjens TE (2010) Renal failure in patients with cirrhosis: hepatorenal syndrome and renal support strategies. *Curr Opin Anaesthesiol* 23:139–144.

Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 275:35715–35722.

Møller S, Henriksen JH, Bendtsen F (2009) Ascites: pathogenesis and therapeutic principles. *Scand J Gastroenterol* 44:902-911.

Moore KP, Aithal GP (2006) Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut* 55 (Suppl. 6):vi1–vi12

Morales-ruiz M, Cejudo-martín P, Fernández-varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodés J, Sessa WC, Jiménez W (2003) Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 125:522–531.

Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, Arroyo V (1996) Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 24:1481-1486

Muriel P (2009) Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int* 3:526-26.

Nalabotu SK, Kolli MB, Triest WE, Ma JY, Manne NDPK, Katta A, Addagarla HS, Rice KM, Blough ER (2011) Intratracheal instillation of cerium oxide nanoparticles induces hepatic toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Int J Nanomedicine* 6:2327–2335.

- Nanji AA (2002) Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27:13-5.
- Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, Dannenberg AJ (1997) Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in rat. *Gastroenterology* 112:943-51.
- Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE (2007) Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 73:549–559.
- Niu J, Wang K, Kolattukudy PE (2011) Cerium Oxide Nanoparticles Inhibits Oxidative Stress and Nuclear Factor- B Activation in H9c2 Cardiomyocytes Exposed to Cigarette Smoke Extract. *Pharmacology* 338:53–61.
- Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M (2014) Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys* 548:20–37.
- Ohlstein EH, Berkowitz BA (1986) Human vascular vasopressin receptors: analysis with selective vasopressin receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 239:737-741.
- Paik YH, Iwaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B, Osterreicher CH, Kisseleva T, Brenner DA (2011) The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 53:1730–41.
- Parola M, Robino G (2001) Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 35:297-306.
- Patel BM, Chittock DR, Russell JA, Walley KR (2002) Beneficial effects of short-term vasopressin infusion during severe septic shock. *Anesthesiology* 96:576–582
- Perri RE, Langer DA, Chatterjee S, Gibbons SJ, Gadgil J, Cao S, Farrugia G, Shah VH (2006) Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G535–42.
- Petersen MB (2006) The Effect of Vasopressin and Related Compounds at V 1a and V 2 Receptors in Animal Models Relevant to Human Disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:96–103.

Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P (1996) Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 110:534–48.

Pockros PJ, Schiff ER, Shiffman ML, McHutchison JG, Gish RG, Afdhal NH, Makhviladze M, Huyghe M, Hecht D, Oltersdorf T, Shapiro DA (2007) Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 46:324–9.

Postic C, Girard J (2008) Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118:829–838.

Racanelli V, Rehermann B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54–62.

Reichenbach V, Fernández-Varo G, Casals G, Oró D, Ros J, Melgar-Lesmes P, Weiskirchen R, Morales-Ruiz M, Jiménez W (2012) Adenoviral dominant-negative soluble PDGFR β improves hepatic collagen, systemic hemodynamics, and portal pressure in fibrotic rats. *J Hepatol* 57:967–973.

Reichenbach V, Ros J, Fernández-Varo G, Casals G, Melgar-Lesmes P, Campos T, Makriyannis A, Morales-Ruiz M, Jiménez W (2012) Prevention of fibrosis progression in CCl₄-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems. *J Pharmacol Exp Ther* 340:629–37.

Reichenbach V, Ros J, Jiménez W (2010) Endogenous cannabinoids in liver disease: Many darts for a single target. *Gastroenterol Hepatol* 33:323–9.

Rocca A, Moscato S, Ronca F, Nitti S, Mattoli V, Giorgi M, Ciofani G (2015) Pilot in vivo investigation of cerium oxide nanoparticles as a novel anti-obesity pharmaceutical formulation. *Nanomedicine* 11:1725–34.

Ros J, Jiménez W, Lamas S, Clària J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J (1995) Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 21:554–60.

Runyon BA (2009) AASLD Practice Guidelines Committee. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 49:2087–2107.

Sanchez-Valle V, C. Chavez-Tapia N, Uribe M, Mendez-Sanchez N (2012) Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr Med Chem* 19:4850–4860.

Sandhir R, Yadav A, Sunkaria A, Singhal N (2015) Nano-antioxidants: An emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. *Neurochem Int* 89:209–26.

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR (2010) Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 362:1–5.

Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J (1988) Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8:1151-1157.

Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G (2000) Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* 157:1671–1683

Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, Manne NDPK, Arvapalli R, Rice KM, Asano S, Fankhanel E, Ma JJ, Shokuhfar T, Maheshwari M, Blough ER (2015) Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials* 59:160–71.

Serhan CN (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510:92–101.

Sersté T, Melot C, Francoz C, Durand F, Rautou PE, Valla D, Moreau R, Lebrech D (2010) Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 52:1017-22.

Sid B, Verrax J, Calderon PB (2013) Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic Res* 47:894–904.

Singh S, Kumar A, Karakoti A, Seal S and Self WT (2010) Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Mol Biosyst* 6:1813-1820.

Söderlund C, Magnusson I, Torngren S, Lundell L (1990) Terlipressin (triglycyl-lysine vasopressin) controls acute bleeding oesophageal varices. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 25:622–630.

Solà E, Ginès P (2010) Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis: current management and future perspectives. *J Hepatol* 53:1135–45.

Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C (2000) Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 47:309–312

Tacke F, Luedde T, Trautwein C (2009) Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 36:4–12.

Tilg H, Moschen AR (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52:1836–1846.

Tseng MT, Lu X, Duan X, Hardas SS, Sultana R, Wu P, Unrine JM, Graham U, Butterfield DA, Grulke EA, Yokel RA (2012) Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol Appl Pharmacol* 260:173–182.

Tuli HS, Kashyap D, Bedi SK, Kumar P, Kumar G, Sandhu SS (2015) Molecular aspects of metal oxide nanoparticle (MO-NPs) mediated pharmacological effects. *Life Sci* 143:71–9.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84

Vargas V (2004) Insulin resistance. A cause or consequence of liver disease? *Gastroenterol Hepatol*. 27(9):552-7

Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ (1984) Increased blood flow through portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 87:1120–6.

Walkey C, Das S, Seal S, Erlichman J, Heckman K, Ghibelli L, Traversa E, McGinnis JF, Self WT (2015) Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. *Environ Sci Nano* 2(1):33-53.

Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, Pecker F, Tran A, Gual P, Mallat A, Lotersztajn S, Pavoine C (2014) M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis:

a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59:130–42.

Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D (2011) Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4:4.

Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang X-D (2008) Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr* 138:1866–1871.

Wason MS, Zhao J (2013) Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases. *Am J Transl Res* 5:126–131.

Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C (1998) Hepatic cytochrome P-450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27:128-33

Woehlbier U, Hetz C (2011) Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci* 36:329–37.

Wynn T a, Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18:1028–40.

Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AE (2008) Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2:2121–2134.

Yokel RA, Tseng MT, Dan M, Unrine JM, Graham UM, Wu P and Grulke EA (2013) Biodistribution and biopersistence of ceria engineered nanomaterials: size dependence. *Nanomedicine* 9:398-407 2012.

Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, Reichen J (1994) Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 20:231–9.

de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, Silva LS, de Campos Mazo DF, Lima VM, Furuya CK, Mello ES, Souza FG, Rabello F, Santos TE, Nogueira MA, Caldwell SH, Alves VA, Carrilho FJ

(2008) Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 38: 159-165.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi director de tesis, el Dr. Wladimiro Jiménez, jefe del Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, por haberme dado esta oportunidad. Una oportunidad que surgió cuando aún no había terminado la carrera de Biología, gracias Dra. Dolores López por pensar en mí y recomendarme. A pesar de haber estado poquito tiempo en tu laboratorio haciendo Westerns entre clase y clase, fue mi primera experiencia en la investigación y lo que me impulsó a seguir (o más bien empezar) este camino. Gracias a ti también Dr. Guillermo Fernández-Varó, porque fuiste la conexión entre ellos y porque has estado presente en todo momento: desde la entrevista con el Dr. W Jiménez hasta la corrección de esta tesis. Me has enseñado gran parte de lo que he aprendido estos años. Y volviendo al inicio de este párrafo, gracias Dr. W Jiménez por tu apoyo en todo momento (no sólo en lo profesional), a pesar de no poder dedicarnos todo tu tiempo siempre has estado disponible cuando lo he necesitado y he podido aprender infinidad de cosas de ti.

Pasando a mis compañeros de laboratorio, que como todo en la vida ha ido cambiando año a año: Vedri: me ha encantado compartir contigo gran parte de estos años, he aprendido mucho de ti pero también me lo he pasado muy bien. Aunque nos abandonarás me alegro muchísimo de dónde has llegado. Santi: perdón Santiago! Me alegro de que vinieras al CEK (aunque el señorito quería seguir en el Hospi) porque te pude conocer un poco más, siempre tenías algo que decir al vernos para alegrarnos la mañana aun estando de mal humor. Gregori: aunque no hemos podido coincidir en el laboratorio, gracias por tus consejos y por las aportaciones en las reuniones de grupo. Manuel: gracias por todas tus aportaciones y consejos en esta tesis. Montse: cuando empecé estabas en NY, aún recuerdo los primeros días que coincidimos y pienso que conectamos desde el primer momento. Nunca me olvidaré del día que fuimos con Silvia al gym... que hora era?? Las 7 de la mañana?, nos engañaste y en realidad nos llevaste poco más que a la guerra jaja y que sepas que gracias a ti desde entonces no he dejado de ir. Disfruta de la hermosa familia que tienes y siempre has anhelado. Jon: a pesar de que en realidad viniste a medias de mi tesis tengo la sensación de que has estado presente en todo momento. Mi gran compañero de viajes al clinic para buscar la comida, gracias por enseñarme tu sistema de lavado de tupperes jaja y ni hablar de lo que me has transmitido profesionalmente. Tus ideas no tienen límite! Gracias Chicca y Aroa por las tardes de juegos frikis!! Espero podamos repetirlo algún día (aunque si era difícil cuando sólo estaba Irene ahora ya ni me imagino jaja). Tami: el último año creo que ha sido de lo mejor, y

el hecho que sea el año que coincidimos no es casualidad. Ha sido (y es) un placer escuchar todas tus historias y locuras 😊, aunque no nos hagas caso cuando te aconsejamos... sino no serías tú. Gracias por todo! sobre todo por tu apoyo a la hora de dar ese gran cambio. Sabes que eres más que "bienvenida a Dinamarca". Silvia: mi gran sucesora!! Trabajar junto a una amiga no tiene precio y me alegro de haber compartido esta etapa contigo, incluyendo las largas clases de master que se hacían más amenas comiendo chuches. Gracias por escucharme siempre que lo he necesitado, eres una gran persona con un corazón enorme y vales muchísimo, tanto personal como profesionalmente (sólo te falta creértelo😊). Jordi: difícil de explicar la relación contigo, creo que "especial" sería la palabra que mejor la definiría. De menos a más te he ido conociendo a lo largo de estos años. Ese poquito tiempo que pasábamos juntos de camino a casa era muchas veces lo mejor del día. Que el último año haya sido el mejor también tiene que ver contigo, compartir nuestras "aficiones" aunque la gente no nos entienda jejej El viaje a Londres con Silvia tiene que tener una segunda parte! que no será difícil de mejorar a la primera. El karma nunca perdona! Muchísimas gracias por todo, espero poder seguir celebrando otros fines de año a tu lado. Bibi: al final te voy a ganar por uno meses!! jeje animo en esta recta final ya no queda nada. Ana: es raro incluirte en esta parte porque en realidad apenas te conocí estando en el CEK. Mi gran amiga del gym! Quien lo iba a decir que íbamos a coincidir ahí??? El destino nos juntó en esa parte del día que nos sirve para evadirnos de todo. Gracias por ser parte de mi vida. Esther: gracias por tus consejos, eres una gran luchadora! Pepa: la mejor lab manager del CEK aunque no te gusta que te lo digamos, un gusto haberte conocido. Y sé que me dejo a muchísima gente, pero no acabaría más, así que acabo con un agradecimiento general a todos aquellos con los que he coincidido estos años porque de alguna manera u otra han formado parte de esta experiencia.

A mis amigos: Víctor, Mari, Dani, Soraya, Javi, Marc, Estela, Jose, Sergio, Alex, Cris, Carlos, Marcos. Mil gracias por estar siempre ahí, los extraño un montón!

Y por último y no menos importante, sino todo lo contrario, dar las gracias a mi familia. Locura pensar todas las idas y venidas desde que empecé esta etapa. Aun así valió la pena el poquito tiempo que hemos podido pasar juntos estos últimos años. Aunque ahora estamos separados sé que tarde o temprano volveremos a estar juntos. Gracias por la paciencia, por comprender y apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Todo lo que soy es gracias a ustedes. Los quiero muchísimo y me muero por volver a verlos!

Lourdes, Manuel, Arantxa, Iago, Tita, familia Albacete en conjunto: gracias por adoptarme 😊, por cuidarme y por el apoyo en todo momento.

Y a mi pequeña gran familia... Darío estoy muy orgullosa de vos! Empezamos este camino separados y lo acabamos juntos y a la vez. Te mereces lo mejor. No me arrepiento de la decisión que tomé sino todo lo contrario. La distancia, las horas de viaje en avión, Skype, Line... no me importaban porque sabía que iban a valer la pena. Te quiero!! Gracias por aguantarme cada día. Shivi, gracias por ser mi gran compañera de escritura de Tesis aunque intentarás desconcentrarme a ratos y lo conseguieras.

