



Implicació de factors antiangiogènics endògens en la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica

Laura Coch Torres

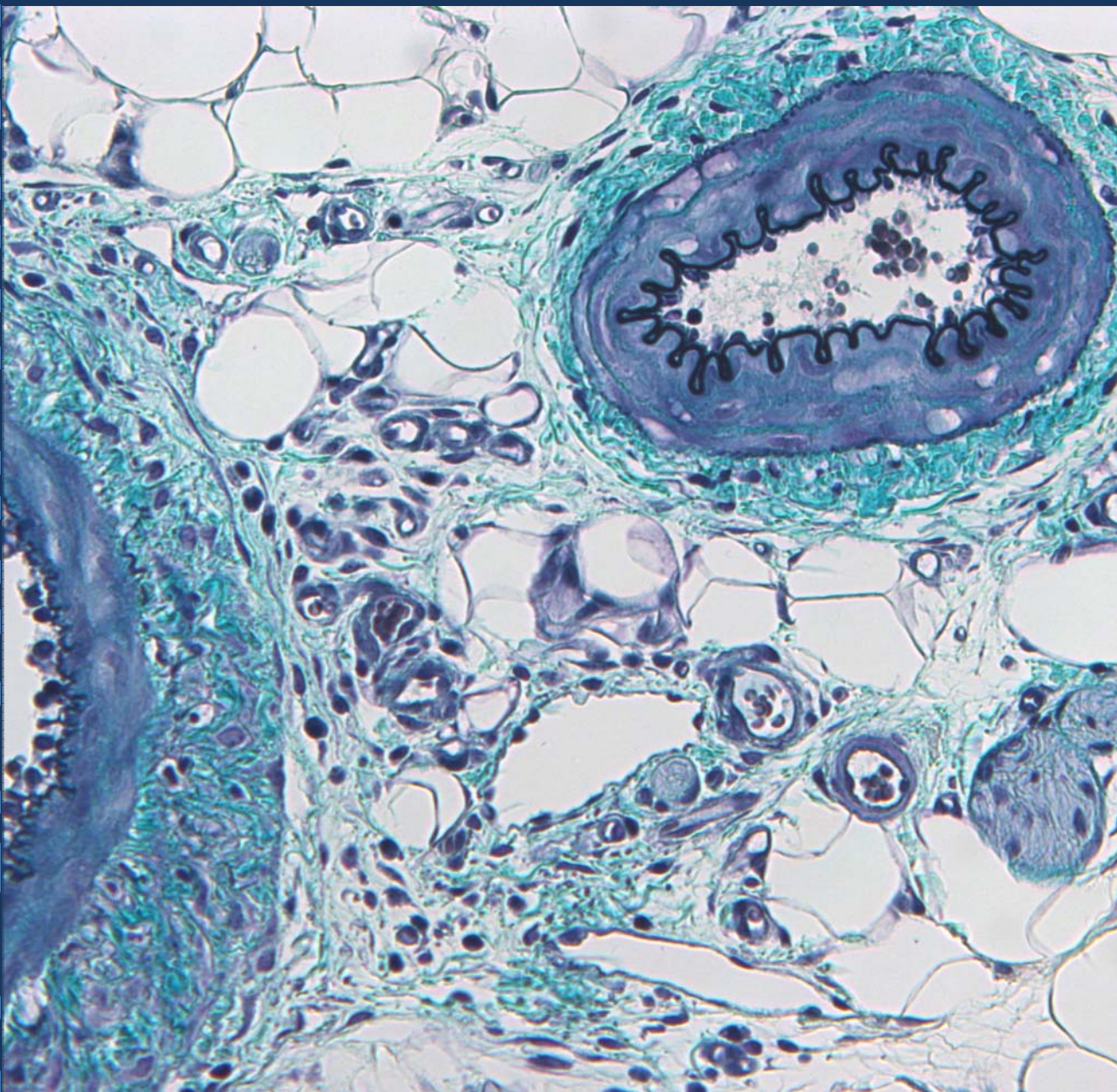
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual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

Implicació de factors antiangiogènics endògens en la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica

Tesi Doctoral



Tesi doctoral presentada per
Laura Coch Torres



Tesi doctoral
UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Medicina

Implicació de factors antiangiogènics endògens en la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica

Tesi presentada per
Laura Coch Torres
Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors de tesi:
Dra. Mercedes Fernández Lobato
Prof. Jaume Bosch Genover

Tesi realitzada als laboratoris d'Angiogènesi en Malalties Hepàtiques i Hemodinàmica Hepàtica i Hipertensió Portal de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer - Hospital Clínic de Barcelona – CEK Barcelona, 2014

Als meus pares.
Al laco.

INDEX

	pàg
Informe dels directors de tesi	5
Agraïments	7
Abreviacions	15
1. Resum	21
2. Introducció	25
2.1 Hipertensió portal i cirrosi hepàtica	27
2.1.1 Augment de la resistència vascular intrahepàtica: dos factors principals	31
2.1.2 Circulació hiperdinàmica esplàncnica i sistèmica	32
2.1.3 Altres complicacions de la cirrosi i hipertensió portal	34
2.2 Angiogènesi	35
2.2.1 Procés angiogènic	36
2.2.2 Factors angiogènics	38
2.2.2.1 El factor de creixement endotelial vascular: VEGF	39
2.2.3 Angiogènesi en la cirrosi i la hipertensió portal	42
2.2.3.1 Relació entre angiogènesi, fibrogènesi i inflamació	45
2.2.4 Teràpia anti-VEGF: beneficis i problemàtica	48
2.2.5 Factors antiangiogènics endògens	49
2.3 Vasohibin (VASH)	53
2.3.1 Estructura, gens homòlegs i isoformes de Vasohibin	54
2.3.2 Expressió i regulació de Vasohibin	56
2.3.4 VASH1 en diferents patologies	58
2.3.4.1 En arteriosclerosi	58
2.3.4.2 En càncer	58
2.3.4.3 En patologies de l'ull	60
2.3.4.4 En fibrosi pulmonar	60
2.3.4.5 En nefropaties	61
2.4 Factor derivat de l'epiteli pigmentari (PEDF)	61
2.4.1 Estructura i homologies de PEDF	62
2.4.2 Regulació, senyalització i funció de PEDF	64
2.4.2.2 Possibles receptors de PEDF	68

2.4.3 PEDF en diferents patologies	69
2.4.3.1 En malalties hepàtiques cròniques	70
2.4.3.2 En patologies de l'ull	71
2.4.3.3 En càncer	72
2.4.3.4 En patologies cardiovasculars	73
3. Justificació i objectius	75
3.1. Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques	
Objectiu 1.1	78
Objectiu 1.2	78
3.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)	
Objectiu 2.1	79
Objectiu 2.2	79
4. Còpies dels articles originals	81
4.1 Estudi 1: <i>Disruption of negative feedback loop between Vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats</i>	83
4.2 Estudi 2: <i>Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats</i>	133
5. Resum de resultats	181
5.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques	183
5.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)	187
6. Discussió	191
6.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques	194

6.1.1 Relació de l'expressió de VASH1 i VEGF en mesenteri i en fetge durant la hipertensió portal cirròtica i precirròtica	194
6.1.2 Sobreexpressió de VASH1 usant transferència gènica adenoviral	195
6.1.3 Efecte de la sobreexpressió de VASH1 mitjançant transferència gènica adenoviral en la hemodinàmica de rates BDL derivats de l'efecte en l'angiogènesi i la fibrogènesi en fetge i mesenteri	197
6.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)	201
6.2.1 Patró d'expressió de PEDF en fetges cirròtics humans i en fetge i mesenteri de rates BDL	201
6.2.2 Sobreexpressió de PEDF usant transferència gènica adenoviral	202
6.2.3 Efectes en l'angiogènesi, la fibrogènesi i l'hemodinàmica per la sobreexpressió de PEDF mitjançant transferència gènica adenoviral en rates BDL	203
7. Conclusions	209
7.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques	211
7.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)	212
8. Bibliografia	213
Annex	
Article editorial sobre l'estudi 1: <i>Disruption of negative feedback loop between Vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats.</i>	233

Barcelona, 7 de maig 2014

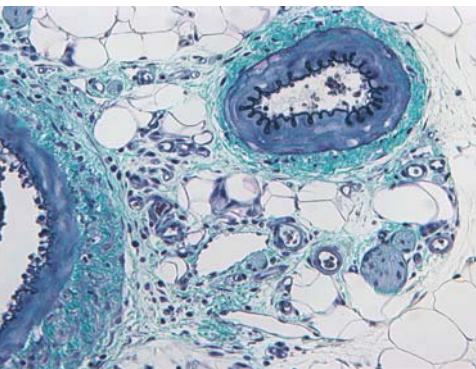
Dra. Mercedes Fernández Lobato, Cap del Grup de Recerca "Angiogènesi en Malalties Hepàtiques" de l'IDIBAPS, i Prof. Jaume Bosch Genover, catedràtic de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i Consultor Sènior del Servei d'Hepatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral *IMPLICACIÓ DE FACTORS ANTIANGIOGÈNICS ENDÒGENS EN LA HIPERTENSIÓ PORTAL I LA CIRROSI HEPÀTICA*, presentada per Laura Coch Torres per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona s'ha realitzat sota la nostra direcció i compleix tots els requisits necessaris per ser defensada davant el Tribunal d'avaluació corresponent.

Dra. Mercedes Fernández Lobato

Prof. Jaume Bosch i Genover



Agraïments

M'agradaria dir que intentaré ser breu, però ja veig a venir que no serà així. Han estat 3 anys i mig molt intensos, on he tingut la sort de tenir gent al costat, que d'alguna manera o altra, han fet possible aquesta tesi doctoral, i ha arribat el moment de donar-los les gràcies.

Primer de tot, vull donar les gràcies als meus directors de tesi, a la **Mercedes** i al **Jaume**, per donar-me la oportunitat d'iniciar aquest projecte i formar part del grup de l'Hemodinàmica Hepàtica. Per confiar i creure en mi, per obrir-me les portes al món de la investigació i animar-me a continuar, per permetre'm formar-me com a científica i créixer com a persona. També donar les gràcies als altres investigadors principals del grup, el **Jordi** i el **Joan Carles**, per tenir sempre les portes obertes i per tot el suport i ajuda que m'heu donat.

Javi, Ester i Marc tinc tantes i tantes coses per les què donar-vos les gràcies... que no sé si podré trobar les paraules per agrair-vos tot el que heu fet per mi. Al llarg de la tesi he pensat tants cops com trobar la manera de mostrar la meva gratitud que espero com a mínim acostar-m'hi una mica. Tinc clar que aquesta tesi doctoral no l'hagués pogut fer sense vosaltres (i menys amb tan poc temps!!!). Heu sigut els que heu estat al meu costat dia a dia, que heu compartit amb mi els alts i baixos que comporta fer una tesi i els que sempre m'heu animat a tirar endavant. Gràcies per sentir el projecte com si fos vostre, per les llargues discussions de resultats, correccions de la tesi (a tí Javi te agradezco un plus por leerla en inglés jaja), per trencar-vos el cap amb mi amb cada experiment. Sé que enlloc hagués pogut trobar millors companys, i que serà molt difícil que en torni a trobar.

Ester, gràcies pel teu recolzament incondicional, per ensenyar-me tantes i tantes coses i per estar sempre disposada a donar un cop de mà. Gràcies per preocupar-te tant per mi, no només per les coses del laboratori sinó també per les de fora. Perquè sé que al teu costat puc riure i plorar sense reserves, per preguntar sempre pels meus avis i per la meva mare... perquè tenir-te al costat ho ha fet tot molt més fàcil. Tenim una química especial i potser sí que al final entendré perquè la gent ens confon jajajaja, potser si que tenim quelcom semblant. Sé que tot i que ja no estigui al lab amb vosaltres ens seguirem veient, però et trobaré taaaant a faltar... Vull veure créixer a la Valentina, eh?!!! Gràcies infinites per tot.

Javi, GUAPÍSIMO!!!, lo que me has tenido que aguantar, si es que tienes el cielo ganado!!! No sé que habría hecho sin ti en el laboratorio. Has aguantado mis días buenos y mis días malos, siempre haciéndome reflexionar y relativizar todo. Gracias por hacerme reír siempre, por tu cariño, porque contigo puedo sincerarme cómo con poca gente. Gracias por ser mi input y

comerte la cabeza conmigo con cada experimento y cada resultado, por preocuparte tanto por mi y saber en cada momento lo que necesito. A tu lado he aprendido mucho, y no sólo de ciencias (gracias también por culturizarme jejeje ;). Me encantas y lo sabes. Echaré mucho de menos compartir el día día contigo, pero... no te vas a librar tan fácilmente de mi jijijijiji (continuará....). Gracias por ser cómo eres, sé que me llevo un gran amigo.

Marc, el meu company de batalles! La meitat d'aquesta tesi és teva, i sóc molt conscient que sense tu no hagués estat possible. Gràcies per ensenyar-me tantíssim! Vaig arribar al laboratori que no sabia ni com trobar la vena porta i ara ja m'atreveixo amb qualsevol estudi hemodinàmic que se'm posi davant jajaja. Sort que vaig tenir un gran expert al costat ☺. Gràcies per compartir aquest projecte amb mi, per fer-lo tant teu com meu, han estat tantes i tantes hores a l'estabulari i a la sala d'animals, fent *westerns* que no sortien, desesperant-nos i celebrant les petites victòries junts! Encara m'enrecordo aquell divendres a la tarda a última hora analitzant el matrigel... compartint una alegria que poca gent més podia entendre. Al llarg d'aquests tres anys hem passat moments de tot, però el balanç de tot plegat és sense dubte positiu! Gràcies per la teva paciència i comprensió, per aguantar els dies d'estrès i per ajudar-me a veure-ho tot més clar en els moments d'ofuscació. Ho hem aconseguit!!!!

Dar infinitas gracias también a **Annalisa**. Gracias por todo tu apoyo y ayuda al largo de este tiempo. Has vivido todo el proceso con la misma alegría y sufrimiento que nosotros. Gracias por las horas en el laboratorio luchando con las inmunos, westerns y demás, con nosotros. Por todos tus consejos y sugerencias, por aportar tu punto de vista clínico, tan necesario en un proyecto traslacional, y por todos tus conocimientos estadísticos. Siempre dispuesta a echar una mano. También gracias a nivel más personal por animarme siempre, por tener siempre una sonrisa y transmitirme tu positividad. También gracias por tu interés en momentos familiares difíciles.

Vull donar gràcies també a la resta de companys de la hemodinàmica, per totes les hores i hores compartides al laboratori, perquè són moltes les experiències viscudes, i tenir-vos al costat ho ha fet tot més senzill.

Monste, gràcies per ser com ets, per sempre tenir un somriure als llavis i transmetre aquest bon rotllo al lab! Gràcies per oferir-me la teva ajuda en tot moment i tenir aquest cor tant immens, la hemo no sobreviuria sense tu!! Encara m'enrecordo aquell Sant Jordi juntes fent aïllament i jo marejada a més no poder per la intoxicació del EASL jajajaja!! Espero no perdre el contacte amb tu perquè ets de la gent que val la pena conservar!!

Diana, gràcies per aquesta energia positiva que no se d'on treus jajaja, per escoltar-me sempre i animar-me en els moments de “bajón”, per ser tan bona companya i interessar-te en tot moment per mi. Ànims que aviat seràs tu la que arribarà aquí!!!

Giusi! Ma que cosa!! Que duro se ha hecho este final... pero compartirlo contigo lo ha hecho más fácil. Hemos ido pasando cada fase de esta etapa final juntas y creo que después de todo podemos estar muy contentas. Gracias por todo tu apoyo y por las largas charlas filosofando sobre que hacer con nuestras vidas!! Te deseo lo mejor en Londres, vales mucho!

Héctor gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat, pels consells en la sala d'animals i també fora d'ella. Gran font de coneixement ☺. Moltes gràcies per tots els moments viscuts.

Moltes gràcies també al **Sergi Vila**, per ser un gran company i millor persona, atent en tot i disposat a donar sempre un cop de mà. També donar gràcies a la **Marina**, perquè em sento molt identificada amb el teu procés abans d'arribar aquest lab, hem pres decisions valentes i ara es veuran compensades! Ànims amb la tesi!! També gràcies als que comencen, al **Sergi Guixé** i la **Raquel**, i als més petits del lab **l'Erica i el Martí!** Us animo a continuar, perquè al final val la pena! Aunque hemos coincidido poco tiempo, también animar a **Cristina**, el nuevo fichaje, ya verás que vas a estar muy bien en la familia de la hemodinámica!

Donar les gràcies a tota la gent que ha anat passant pel laboratori aquests anys, perquè d'alguna manera o altra heu posat el vostre granet de sorra per ajudar-me a arribar fins aquí. **Vincenzo**, siempre animándome de una manera muy especial (niñoos). **Eugenio**, amb aquesta força i un somriure en tot moment. **Marcos**, per totes les rialles i xerrades en el lab. **Marta Diví**, per ajudar-me tant amb tot el “papeleo” de la tesi i sempre interessant-te per com ho portava, moltes gràcies!. **Carol**, gracias por tu ayuda durante tu estancia, siempre recordaré los apuros que pasamos juntas en el estabulario pinchando colas jeje. Gràcies a **l'Aina, la Lucia, la Federica, l'Andrea, la Cintia, el Dinesh, la Maeva...** i molts d'altres que no em vull deixar!! També a tots els companys de la planta 4, als del grup dels Forns, **Laura, Carlos, Patri, Noe...** i dels Checa, **l'Anna, Raquel, Bet...**! Compartir espai amb vosaltres ha estat genial!

També voldria donar les gràcies al personal de la part clínica, en especial a la **Virginia**, pels seus comentaris i suggeriments en la discussió dels resultats.

Gràcies també al **Raúl Méndez**, per les seves aportacions i revisió del manuscrit de l'article de VASH1.

A nivell més personal vull donar les gràcies a tota aquella gent que ha participat en aquesta tesi, potser sense saber-ho, pel simple fet d'estar allà recolzant-me en el que faig.

A les meves nenes de Castellbisbal, la **Montse**, l'**Eva**, l'**Olga**, la **Neus**, la **Meritxell**, la **Marina**, la **Laia**, i també l'**Agnès**, la **Núria** i la **Neus**. Gràcies per estar sempre allà, per animar-me sempre sempre, per estar en els bons i en el mals moments, per compartir les meves enrabiades i les meves alegries de la tesi, quan he publicat un article i quan m'he desesperat per no veure mai el final. Per entendre els "jo no puc que estic fent tesi..." o els "quan acabi la tesi...". Perquè sé que tot i que estem desperdigades pel món us sento molt a prop, i això és l'important. **Meritxell**, gràcies per la portada, sé que és una tonteria però em fa molta il·lusió que sigui teva ☺, no sé que faria sense tu, ja ho saps, no calen paraules, oi?

També donar les gràcies als nens **Pi**, **Titus**, **Roger**, **Dani**, **Aleix**, **Màkina**, **Duran**, **Armand**, **Xavi**, **Tubby** i a tots els **Garrafots!** Per sempre preguntar que feien les rates, preguntar si les curava o que els hi feia jajaja. Per fer-me riure i fer-me sortir del meu foradet.

Glòria i David, moltes gràcies per tot. Per estar sempre pendents de com anaven les coses, la tesi, la meva mare... Sou genials i estic molt contenta que formeu part de les nostres vides. Estar amb vosaltres ho fa tot més fàcil. Gràcies pels moments viscuts i pels que espero que seguirem compartint!

Donar les gràcies a tota la colla de la uni, els que sempre m'han entès i hem compartit aquest camí: **al Lanuza**, la **Mercè**, **Bernat**, **Ponsi**, **Irma**, **Carles**, **Rodri**, **Marc**, **Gina**, **Laureta**, **Meri**, **Pou**, **Gemma**... També els que per sort he tingut aquí ben apropet i hem pogut anar fent "Dinars al CEK", l'**Helena**, l'**Ester**, el **Borja**, la **Marta** i la **Laura**. **Helena**, mil gràcies per estar sempre a peu de canó, m'ha encantat poder baixar a la planta 3 i tenir-te allà, hem rigut i plorat molt juntes aquests tres anys i només et vull dir que no defalleixis, que això ja ho tenim!!!! Sobretot vull donar les gràcies a les meves nenes de la uni, **Alba**, **Laia** i **Helena**, perquè tot i els anys, sembla que no passi el temps, per fer-me sentir tan acompanyada en aquest procés, per tots els sopars i moments viscuts, i perquè sé que passi el que passi puc comptar amb vosaltres.

No m'oblido tampoc de la gent amb la qui vaig començar a saber que era el món científic, a Anatomia Patològica de Vall d'Hebrón. Allà és on vaig aprendre a fer el meu primer western, la primera Real time, els primers passis de cèl·lules. **Berta**, **Laura**, **Alba**, **Ana**, **Rosó**, **Andrea**, **Cris**, i també **M^aAngeles** i **Cristina**. Gràcies per ensenyar-me com funcionava un laboratori, gràcies per tot el que ha vingut després, birres, rialles, sopars, festes, xerrades... perquè malgrat tot me'n alegro molt d'haver passat per Vall d'Hebrón, i no me'n arrepenixo de res, així ens hem conegut! Gràcies també a la **Teresa**, la **Rosa** i la **Laura**, veu ser un punt de recolzament importantíssim durant els meus anys a Vall d'Hebrón, moltes gràcies per ser com sou, penso molt en vosaltres. **Núria**, ai la meva Núria, gràcies per tot el que vas fer per mi i has

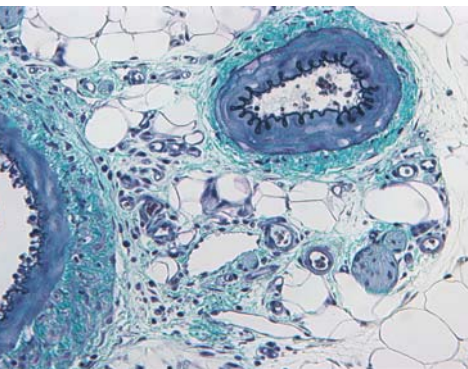
anat fent, la meva confessora, per molt que passi el temps la confiança entre nosaltres no es perd!! Encara que estiguis lluny et sento a prop!

Gràcies també a l'**Elenc teatral de Castellbisbal**, perquè tot i la mandra que fa sortir a assajar a les 10 de la nit un dia d'hivern, m'heu carregat sempre les piles. Perquè tot i "lo" malament que hagués anat el dia, aquell experiment que no surt, aquell apartat que no encaixa... sempre m'heu fet escampar les boires i m'heu arrancat un somriure, fent-me oblidar per una estoneta de la tesi. Gràcies!!

Vull agrair a la meva nova família que m'heu acollit tant i tant bé. Al **Santi i la Salvi**, per preocupar-vos per mi i celebrar les alegries com si fos filla vostra. Gràcies també a **la Sara, al Fran, a l'Iker, i al Roc, la M^aJosé i l'Aran**. Per recolzar-me en tot moment i donar-me ànims per tirar endavant!

Un agraïment molt especial a la **meva família**, als meus avis, tiets i cosins, però molt en especial als meus pares. **Papa**, gràcies per demostrar-me, amb poques paraules i molts fets, que sempre et tinc al costat, per recolzar-me en totes les decisions i tenir paciència en les èpoques difícils, per animar-me a tirar endavant i fer-m'ho tot més fàcil i planer. **Mama**, quantes coses a agrair-te, gràcies per estar sempre pendent de mi, per escoltar-me sempre i donar-me el teu recolzament incondicional. Ha estat un any dur, molt dur, però juntes ho hem superat!! Amb la teva força i actitud m'has donat una lliçó de vida, fent-me adonar de que és el que realment importa. Estic molt orgullosa de tu!! Gràcies als dos per fer-me ser una nena, una adolescent i una noia feliç, i fer de mi qui sóc. Sense vosaltres no hagués arribat fins aquí.

Per acabar, voldria donar les gràcies al **Iaco**. Per estar al meu costat cada dia i en tot moment, per aguantar els nervis d'aquests últims temps i per recolzar-me sempre. Gràcies per ser-ho tot, per compartir la teva vida amb mi i per ser el millor company de viatge que podria tenir. Hem passat moments de tot, però sempre has aconseguit fer-me sentir que no podria estar millor. Gràcies per estimar-me.



Abreviaciones

Abreviacions

AdLacZ	Adenovirus que sobreexpressa LacZ
AdPEDF	Adenovirus que sobreexpressa PEDF
AdVASH1	Adenovirus que sobreexpressa VASH1
AMD	Degeneració macular depenent de l'edat
ANG	Angiopietines
ATGL	Lipasa adiposa de triglicèrids
Bcl2	Proteïna cèl·lula B de limfoma 2
BH ₄	tetrahidrobiopterina
BUN	Nitrogen Urea en sang
CAM	Membrana corioalantoica de pollastre
CBDL/BDL	Lligadura del colèdoc
CCl ₄	Tetraclorur de carboni
CD31	Molècula d'adhesió endotelial plaquetària-1
CO	Monòxid de carboni
CTGF	Factor de creixement de teixit connectiu
ECs	Cèl·lules endotelials
ECM	Matriu extracel·lular
EGF	Factor de creixement epidèrmic
eNOS	Sintasa de l'òxid nítric endotelial
EPC-1	De l'anglès <i>Early Population Doubling cDNA-1</i>
ER	Reticle endoplasmàtic
FGF-2	Factor de creixement de fibroblasts 2
aFGF/ bFGF	Factor de creixement de fibroblasts àcid/bàsic
HCC	Carcinoma hepatocel·lular

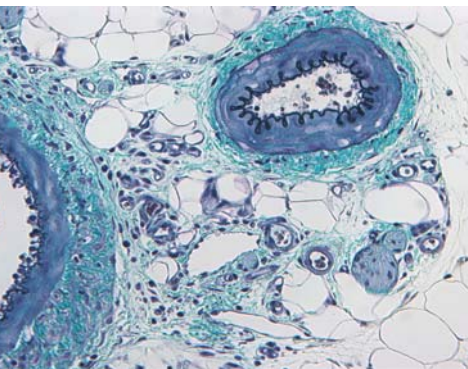
ABREVIACIONS

HGF	Factor de creixement hepatocitari
HIF1	Factor induïble per hipòxia 1
HR	Índex cardíac
HSC	Cèl·lules hepàtiques estrellades
HUVEC	Cèl·lules endotelials de vena umbilical humana
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
H ₂ S	Sulfur d'hidrogen
ICAM-1	Molècula d'adhesió intracel·lular-1
IGF	Factor de creixement insulínic
IHR	Resistència intrahepàtica
IκB	Proteïna I-kappa-B
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa de l'òxid nítric induïble
iPLA2 ζ	Fosfolipasa 2 independent de calci ζ
iRNA	RNA d'interferència
LR	Receptor de laminina
LRP6	Proteïna relacionada amb el receptor de lipoproteïna de baixa densitat 6
MAP	Pressió arterial mitjana
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MNC	Cèl·lules mononuclears derivades de medul·la òssia
MMPs	Metal·loproteinases de la matriu extracel·lular
NFκB	Factor nuclear kappa-B
NLS	Senyal de localització nuclear
NO	Òxid nítric
NRPs	Neuropilines

O ₂	Oxigen
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PDR	Retinopatia diabètica proliferativa
PEDF	Factor derivat de l'epiteli pigmentari
PGI ₂	Prostaciclina
PHD	Protil hidroxilasa
PIGF	Factor de creixement placentari
PI3K	Fosfoinositidina-3-quinasa
PKC	Proteïna quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PNPLA ₂	Família de les fosfolipases tipus patatin
PPVL	Lligadura parcial de la vena porta
PP	Pressió portal
Rb	Gen de supressió tumoral de retinoblastoma
RCL	De l'anglès <i>Reactive Center Loop</i>
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RPE	Cèl·lules d'epiteli pigmentari de retina
SEC	Cèl·lules endotelials sinusoïdals
SERPINF1	Inhibidor de serina proteasa membre F
SIRT1	Sirtuina 1
SMABF	Flux sanguini de l'artèria mesentèrica superior
SMCs	Cèl·lules musculars llises
SOD2	Superòxid dismutasa 2
SVBP	Proteïna petita d'unió a Vasohibin
sVEGFR	Receptor soluble del factor de creixement endotelial vascular

ABREVIACIONS

TNF α/β	Factor de necrosi tumoral alfa/beta
TGF α/β	Factor de creixement transformant alfa/beta
TSPs	Trombospondines
VASH1	Vasohibin 1
VASH2	Vasohibin 2
VCAM-1	Proteïna d'adhesió cel·lular vascular-1
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de creixement endotelial vascular
α -SMA	alfa-actina de múscul llis



Resum

1. Resum

Antecedents: La síndrome de la hipertensió portal és la més greu complicació de les malalties cròniques del fetge. Estudis anteriors del nostre grup i altres grups de recerca en models experimentals d'hipertensió portal i cirrosi han demostrat l'existència d'un procés actiu d'angiogènesi en l'establiment d'aquesta malaltia. Aquests processos angiogènics estan regulats per factors proangiogènics, com VEGF, entre d'altres, i factors antiangiogènics.

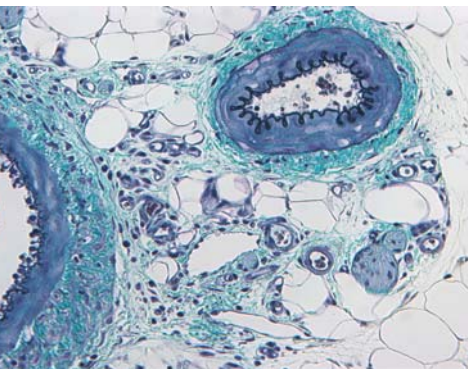
Hipòtesi: L'ús de factors antiangiogènics endògens pot ser una estratègia d'inhibició de l'angiogènesi patològica en malalties com la hipertensió portal i la cirrosi més segura i efectiva que els tractaments antiangiogènics tradicionals.

Objectiu: Determinar la implicació dels factors antiangiogènics endògens VASH1 i PEDF com a reguladors de l'angiogènesi patològica en la hipertensió portal i cirrosi hepàtica, i avaluar experimentalment noves estratègies terapèutiques pel tractament d'aquesta malaltia basades en aquests factors.

Metodologia: Anàlisi de l'expressió de PEDF i VASH1 en fetge i mesenterí en diferents models experimentals (CBDL, PPVL i/o CCl₄) i en mostres de fetges cirròtics humans, determinant la seva implicació durant el procés de la malaltia i comparant amb l'expressió de factors proangiogènics com VEGF. A continuació, estudi dels efectes de la sobreexpressió de VASH1 i PEDF en les alteracions vasculars i hemodinàmiques de rates amb hipertensió portal i cirrosi biliar secundària, fent servir pautes de tractament profilàctiques (prevenció) i terapèutiques (intervenció).

Resultats obtinguts: Caracterització del patró d'expressió de VASH1 i PEDF en relació al factor VEGF, observant un augment d'aquests factors tan en fetge com en mesenterí de diferents models animals i en fetges cirròtics humans. Demostrant, en el cas de VASH1, una regulació per retroalimentació negativa de VASH1/VEGF, i en el cas de PEDF, suggerint un mecanisme compensatori dirigit a reduir els efectes patològics de VEGF. Per altra banda, la sobreexpressió de factors antiangiogènics endògens com PEDF i VASH1 es tradueix en efectes beneficiosos, tant esplànctics com intrahepàtics, en animals amb hipertensió portal i cirrosi com són baixada de la pressió portal, disminució en la formació de vasos col·laterals portosistèmics, reducció de la fibrogènesi en fetge i disminució de l'angiogènesi en fetge i mesenterí.

Conclusions: Els estudis realitzats en la present tesi doctoral evidencien que els factors antiangiogènics VASH1 i PEDF poden ser noves estratègies terapèutiques contra la hipertensió portal i cirrosi hepàtica gràcies a les seves propietats antiangiogèniques i antifibròtiques.



Introducció

2. Introducció

2.1 Hipertensió portal i cirrosi hepàtica

La síndrome de la **hipertensió portal** és una de les principals conseqüències de la cirrosi hepàtica i és la responsable de la majoria de les seves complicacions sent la primera causa d'hospitalització, mort, i transplantament en pacients amb cirrosi. Aquesta es caracteritza per un increment patològic del gradient de pressió portal, és a dir, la diferència de pressió entre la vena porta i la vena cava inferior (Figura 1), i per la formació de vasos col·laterals portosistèmics els quals deriven part del flux sanguini portal directament a la circulació sistèmica sense passar pel fetge (1). Els valors normals del gradient de pressió portal van d'1 a 5 mm Hg i augmenten fins a 10 mm Hg o més en pacients cirròtics, sent els valors d'entre 5 i 9 mm Hg considerats com a hipertensió portal preclínica. Pacients amb valors superiors a 12 mm Hg presenten complicacions com sagnat de varius i ascites (2).

Com en altres vasos, la pressió de la vena porta es determina pel producte del flux sanguini i la resistència que s'oposa al flux a la seva sortida, com es defineix per la llei d'Ohm:

$$\Delta P \text{ (pressió)} = Q \text{ (flux sanguini)} \times R \text{ (resistència)}$$

On ΔP és el gradient de pressió portal, Q és el flux sanguini que entra al sistema venós portal (que en la hipertensió portal també inclou les col·laterals portosistèmiques), i la R és la resistència de tot el sistema venós portal. Per tant, per tal que augmenti la pressió portal ha d'haver un increment del flux portal, un increment de la resistència vascular, o una combinació d'ambdós (3).

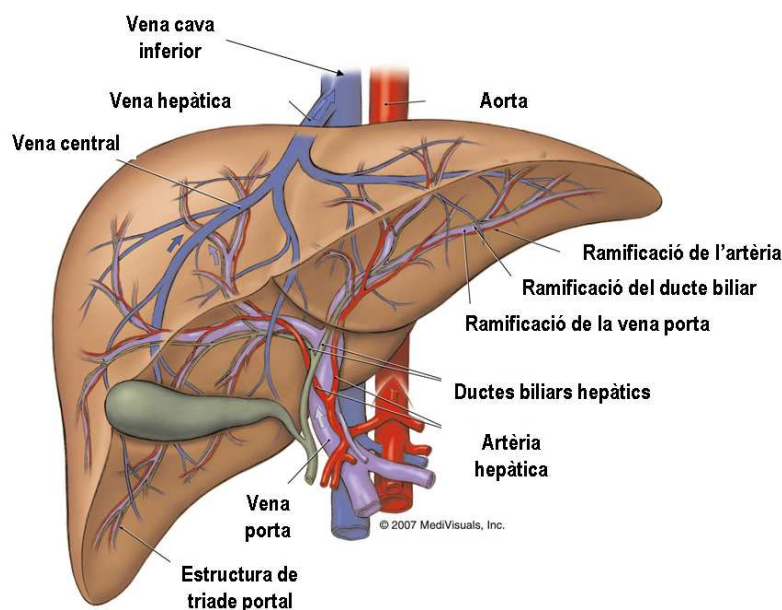


Figura 1: Anatomia interna del fetge. Esquema de la vasculatura normal del fetge (Adaptat de MediVisuals, Inc 2007).

La hipertensió portal pot sorgir de qualsevol condició que interfereixi amb el flux sanguini a qualsevol nivell en el sistema portal. Segons la localització anatòmica on es trobi l'obstacle que causa la hipertensió de la vena porta aquesta es pot classificar en prehepàtica (on es veuen involucrats la melsa, el mesenteri i/o la vena porta), intrahepàtica (per malalties del fetge), i posthepàtica (malalties que bloquegen la sortida del flux hepàtic venós) (2). La causa més comú de la hipertensió portal és la cirrosi hepàtica; no obstant, existeixen altres orígens com serien l'esquistosomiasi, i altres causes que es donarien en menys d'un 10% dels casos com ara la trombosi de la vena porta (1, 2).

En la hipertensió portal derivada de cirrosi hepàtica, inicialment es dona un augment de la pressió portal com a conseqüència d'un increment de la resistència intrahepàtica, però un cop els vasos col·laterals estan formats en un intent de descompressió, l'alta pressió portal es manté per un increment de l'afluència de sang esplàncnica cap a la vena porta com efecte en part d'un procés vasodilatador, que junt a processos de neovascularització esplàncnica, empitjoren i perpetuen la malaltia (4).

La síndrome de la hipertensió portal té una gran rellevància clínica a causa de la freqüència i severitat que presenten les complicacions que se'n deriven. Aquestes inclouen varius gastroesofàgiques i sagnat, ascites, peritonitis bacteriana espontània, síndrome hepatorenal, gastropatia portal hipertensiva, síndrome hiperinètic, síndrome hepatopulmonar i hipertensió portopulmonar, cardiomiopatia, esplenomegàlia, trombocitopènia, leucopènia i anèmia, encefalopatia hepàtica, un augment de la susceptibilitat d'infeccions sistèmiques i alteracions en el metabolisme dels xenobiòtics (1, 5).

La **cirrosi hepàtica** es defineix com un estadi avançat de la fibrosi hepàtica, caracteritzat per la formació de nòduls regeneratius en el parènquima del fetge, els quals estan separats i encapsulats per septes fibrosos vascularitzats, que generalment uneixen tractes portals uns amb els altres (6, 7). Es tracta doncs del resultat d'un procés de reparació prolongat en resposta a un dany continuat a les cèl·lules del parènquima (hepatòcits), els quals són substituïts per teixit fibrós (predominantment col·lagen de tipus I i III) i que es pot donar per diversos orígens. Es tracta d'una malaltia heterogènia, amb diferents manifestacions clíniques el pronòstic de la qual depèn de l'etiologia i la gravetat de la distorsió de l'arquitectura hepàtica (8). Per altra banda, es pot considerar una malaltia vascular del fetge, com a resultat d'una patologia crònica d'aquest òrgan, que es caracteritza per un conjunt d'anomalies en la circulació intrahepàtica.

Des d'una vessant funcional, s'observa en el fetge un augment del to vascular i una incorrecte vasorelaxació mitjançada per flux, donant un increment de la resistència mecànica al flux sanguini portal; mentre que anatòmicament hi ha un remodelatge sinusoïdal (Figura 2) i

capil·larització (procés on es perd la fenestració de l'endoteli per una acumulació de fibra fent que aquest es torni més rígid), processos d'angiogènesi, trombosi venosa i distorsió vascular; que en conjunt contribueix a l'augment de la resistència vascular hepàtica. A més a més del fetge, també s'observen canvis vasculars en òrgans esplàncics, cor, pulmons, ronyó, cervell i pell (1).

La distorsió de la circulació que es dona a nivell hepàtic impossibilita el correcte intercanvi metabòlic entre hepatòcits i el flux sanguini sinusoidal disminuint d'aquesta manera el transport d'O₂ als hepatòcits, donant així dany al fetge i fallada de la funció hepàtica (7).

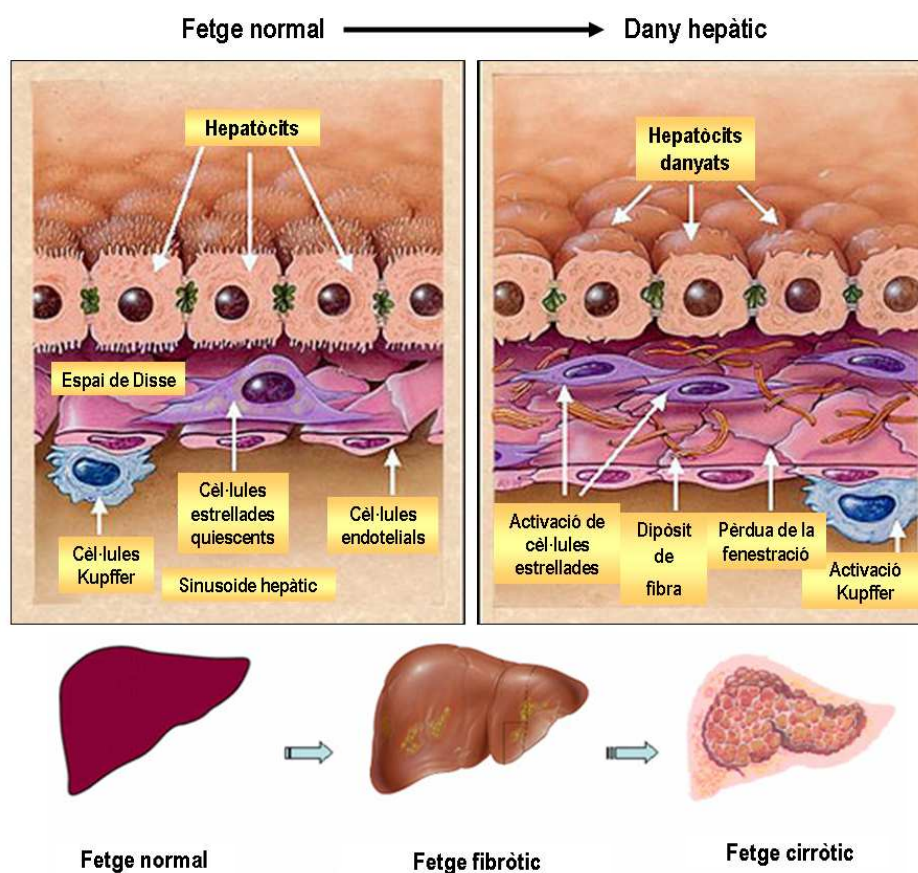


Figura 2: Progressió de fetge normal a cirròtic. El parènquima del fetge normal s'organitza en un component epitelial (hepatòcits), una línia de cèl·lules d'endotelials que es caracteritzen pel fet de presentar fenestracions o porus (sinusoidals), macròfags tissulars (cèl·lules Kupffer), i pericits específics del fetge coneguts com cèl·lules hepàtiques estrellades. Les cèl·lules hepàtiques estrellades o cèl·lules d'Ito presenten extensions citoplasmàtiques que envolten els sinusoides, fet que els permet, mitjançant contracció, regular el flux sinusoidal. Per altra banda, el sinusoides es pot definir com la unitat microvascular del fetge, el qual conté l'espai de Disse subendotelial que separa els hepatòcits de l'endoteli sinusoidal. Aquest espai, conté una matriu tipus membrana basal que és essencial per mantenir les diferents funcions de les cèl·lules que resideixen el fetge i per assegurar un òptim intercanvi metabòlic entre el flux sanguini i els hepatòcits. El sinusoides hepàtic s'origina de les estructures vasculars

(ramificacions de la vena porta i de l'artèria hepàtica) incloses en els tractes portals. Els tractes portals són les estructures clau en la formació del teixit hepàtic i inclouen també conductes biliars, conductes limfàtics i cèl·lules de l'estroma (fibroblasts i miofibroblasts portals). Un cop el fetge es torna fibròtic, hi ha una sèrie de canvis quantitius i qualitius en la composició de la matriu extracel·lular hepàtica (ECM). Hi ha un canvi en l'espai subendotelial on normalment hi ha una matriu tipus membrana basal de baixa densitat, que passa a tenir una acumulació de fibres de col·lagen. Aquests canvis qualitius i quantitius en la composició de la ECM, a més a més de les seves implicacions mecàniques i físiques, contribuirà a la formació d'un ambient bioquímic nou, funcionant com un modulador del creixement, migració i expressió gènica cel·lular, així com sent un reservori de mediadors proinflamatoris i profibròtics que permetran que en estadis més avançats acabi donant un fetge cirròtic (7). Adaptat de Friedman SL, J Biol Chem 2000, Jan 28; 275 (4):2247-2250).

Les cèl·lules majoritàries productores de fibra són els miofibroblasts els quals deriven de cèl·lules hepàtiques estrellades quiescents o de fibroblasts perivasculars activats. No obstant, hi ha altres tipus cel·lulars productors de fibra com miofibroblasts del tracte portal, cèl·lules del múscul llis de les parets dels vasos i miofibroblasts de les venes centrolobulars, a més a més també hi ha indicis que cèl·lules estromals derivades de la medul·la òssia (*bone marrow*) poden ser reclutades en el lloc del dany hepàtic i contribuir també a la població de cèl·lules fibrogèniques (7, 9). L'activació dels miofibroblasts es dona principalment per via de citocines profibròtiques com el factor de creixement transformant TGF β (de l'anglès *transforming growth factor*) i factors de creixement com el PDGF (de l'anglès *platelet-derived growth factor*), que són alliberats per macròfags activats (cèl·lules Kupffer), altres cèl·lules inflamatòries i epitelis de ductes biliars (6).

Les principals causes de la cirrosi inclouen hepatitis per virus B, hepatitis per virus C crònica, hepatitis autoimmune, fetge gras, malalties cròniques biliars, diversos desordres metabòlics heretats i per ingesta d'alcohol o altres agents com el ferro (8).

Les principals conseqüències de la cirrosi són una alteració en la funció dels hepatòcits i per tant del fetge, un increment de la resistència vascular intrahepàtica derivant a hipertensió portal, així com conseqüències associades a la circulació general anòmala com són la vasodilatació esplàncnica, vasoconstricció i hipoperfusió dels ronyons, retenció d'aigua i sal, increment de l'índex cardíac, una disminució de la pressió arterial mitja, i en alguns casos a llarg termini el desenvolupament d'hepatocarcinoma (Figura 3) (6).

2.1.1 Augment de la resistència vascular intrahepàtica: dos factors principals

Clàssicament l'augment de la resistència vascular hepàtica s'atribuïa al fet que el fetge cirròtic presenta una distorsió de l'estructura com efecte del procés fibròtic, de la formació de nòduls regeneratius i d'un remodelatge del sinusoides, que fan augmentar la resistència al flux portal (2, 4, 5). No obstant, a banda d'aquest fenomen, també es dona un component dinàmic basat en una vasoconstricció intrahepàtica causada per un augment del to vascular i la present disfunció endotelial en la que l'endoteli perd les seves propietats vasodilatadores, antitrombòtiques i antiproliferatives. Aquesta pèrdua de propietats es dona a causa d'un desequilibri per l'elevada producció i resposta a vasoconstrictors endògens, com endotelines, leucoppterines, norepinefrines, angiotensina II o tromboxà A₂ entre d'altres, associat a una reduïda alliberació de vasodilatadors com l'òxid nítric (NO), el qual és el principal vasodilatador endotelial involucrat en la regulació del to vascular hepàtic (1, 5). Aquest desequilibri promou la contracció de diferents cèl·lules del fetge cirròtic, com les cèl·lules hepàtiques estrellades, miofibroblasts portals, i cèl·lules musculars llises que porten a un augment del to vascular hepàtic i de la pressió portal. Les cèl·lules hepàtiques estrellades (pericits específics del fetge) es localitzen en l'espai presinusoidal de Disse, i un cop activades presenten un canvi de fenotip que resulta en una pèrdua de la vitamina A, sobreexpressió d' α -actina de múscul llis (α -SMA), hiperresposta a vasoconstrictors i una activitat proliferativa i fibròtica augmentada, produint matriu extracel·lular i col·lagen (2, 5) (Figura 2). Aquest component dinàmic participa en aproximadament un 30% de la resistència intrahepàtica en cirrosi i és una important diana terapèutica (2, 10).

Segons estudis recents, la producció insuficient del vasodilatador NO que es dona en el fetge cirròtic no és deguda a la reducció de l'expressió de la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS), sinó a una disminució de la seva activitat (1, 4, 10). Aquesta disminució de l'activitat es produeix per defectes en la seva regulació post-traduccionals com serien una reduïda fosforilació mitjançant Akt. De fet, s'ha vist que la sobreexpressió d'Akt mitjançant vectors adenovirals restableix la fosforilació d'eNOS resultant en una normalització de la pressió portal i un augment significatiu de la pressió arterial en un model de cirrosi en rates induït per inhalació amb CCl₄ (11). Aquesta disminució de l'activitat d'eNOS també seria causada per altra banda, per nivells baixos del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), per un augment de l'expressió de caveolina i per inactivadors de NO. Per altra banda, el segrest de NO per part d'anions superòxid n'inhibeixen la biodisponibilitat formant peroxinitrit, el qual és un potent factor profibròtic. Aquests nivells elevats de superòxid en fetges cirròtics es donen per un augment de la seva producció i una disminució

de la seva eliminació per part de l'enzim superòxid dismutasa (SOD) produint, a banda de la reduïda biodisponibilitat i activitat d'eNOS, una oxidació i inactivació de BH₄.(5). Per aquest motiu l'administració d'activadors de l'eNOS com serien les estatines té un efecte beneficiós per reduir la hipertensió portal (1, 4, 5).

Existeixen altres dilatadors endotelials que són deficients en cirrosi i que contribueixen a la disfunció endotelial com són CO i H₂S (1).

2.1.2 Circulació hiperdinàmica esplàncnica i sistèmica

A nivell esplànctic, hi ha una sèrie de canvis funcionals com una vasodilatació arteriolar mesentèrica, que juntament a una disminució de la capacitat de resposta a vasoconstrictors, contribueixen per una banda a l'increment de la pressió portal per un augment del flux venós portal, i per altra banda, contribueixen a una hiperdinàmia sistèmica la qual es caracteritza per una resistència vascular sistèmica i una pressió arterial mitja menor amb una major despesa cardíaca (1, 5, 10).

La vasodilatació arteriolar esplàncnica és un fenomen multifactorial que involucra mecanismes locals (endotelials) així com vies neurològiques i humorals (3). El factor més important és la producció excessiva del vasodilatador NO deguda a una activació de l'eNOS (10). Altres factors que contribueixen a l'increment de la vasodilatació a nivell esplànctic són l'augment de VEGF, glucagó, PGI₂ i CO (i els seus productors ciclooxigenasa i hemo-oxigenases), així com la producció de TNF- α (factor de necrosi tumoral alfa) i endocannabinoids a causa de translocació bacteriana. Aquesta translocació bacteriana també augmenta la vasodilatació sistèmica (4, 10). Per tant, mentre en la circulació intrahepàtica hi ha un augment del to vascular a causa d'una disminució dels vasodilatadors, com el NO, i un augment local de vasoconstrictors, per contra, en les circulacions esplàncnica i sistèmica hi ha una sobreproducció de NO i altres vasodilatadors, i una resposta deficient a vasoconstrictors. Aquestes situacions inverses, conegut com la paradoxa de l'òxid nítric en la cirrosi i hipertensió portal (12), s'han de considerar quan es desenvolupen noves estratègies de tractament de la hipertensió portal. De fet l'administració de vasodilatadors per reduir l'augment del to vascular intrahepàtic pot produir un increment perjudicial de la vasodilatació esplàncnica i sistèmica. De manera similar, l'ús de vasoconstrictors per reduir la vasodilatació esplàncnica i sistèmica pot empitjorar l'augment de to vascular intrahepàtic (5).

A més a més dels canvis funcionals esmentats, també es donen canvis estructurals com són la formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi), per tal de suportar l'increment del flux

sanguini esplàncnic, i la formació de vasos col·laterals portosistèmics. Aquesta formació de vasos col·laterals portosistèmics o *shunting* portosistèmic, s'estableix en un intent, en principi beneficiós, de descomprimir el territori portal. No obstant, aquest fenomen comporta una sèrie de complicacions associades, com són gastropatia portal hipertensiva i colopatia, i la formació de varius gastroesofàgiques, la ruptura de les quals agreuja el pronòstic del pacient i inclòs pot ser mortal (13, 14). Per altra banda, la formació d'aquests vasos col·laterals fa que es derivi fins a un 90% del flux portal cap a la circulació sistèmica sense passar pel fetge, de manera que produeix el pas de substàncies que normalment serien metabolitzades pel fetge, com toxines, hormones, drogues i bacteries, directament a la circulació sistèmica donant complicacions com l'encefalopatia i la sèpsia (1, 10, 13, 14).

Tradicionalment s'ha associat la formació d'aquests vasos col·laterals portosistèmics a un procés complex, que implica l'obertura, dilatació i hipertròfia de canals vasculars preexistents en les àrees on hi ha comunicació anatòmica entre els sistema portal i la circulació sistèmica com a conseqüència mecànica de l'augment de la pressió portal (15, 16). No obstant, els darrers anys s'ha observat que també es donen processos angiogènics dirigits per factors proangiogènics com són el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), el receptor de VEGF de tipus II (VEGFR2), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i el factor de creixement placentari PIGF. De fet, s'ha vist en diversos estudis en models murins d'hipertensió portal que la inhibició de les vies de senyalització regulades per aquests factors, (17-22) poden resultar en una efectiva disminució de la formació d'aquests vasos col·laterals portosistèmics.

En el cas de l'augment del flux sanguini portal per vasodilatació a nivell esplàncnic, es pot corregir farmacològicament mitjançant vasoconstrictors com vasopressina i els seus derivats, somatostatina i els seus anàlegs, i beta-bloquejants no-selectius els quals produeixen vasoconstricció arteriolar mesentèrica reduint així la hipertensió portal. De fet, els beta-bloquejants no-selectius són el principal tractament per disminuir el risc de sagnat per varius en la hipertensió portal (2, 5).

Per altra banda, la vasodilatació esplàncnica produeix una disminució de la pressió arterial (hipotensió), la qual promou l'activació de sistemes neurohumorals endògens, la retenció de sodi, i un augment del volum del plasma (hipervolemia), seguit d'un increment de l'índex cardíac i una disminució de la resistència vascular sistèmica que en conjunt anomenem síndrome hiperdinàmic (1). Aquesta hiperdinàmia sistèmica, contribueix al seu torn, a un major augment del flux sanguini esplàncnic i de la pressió portal i un desenvolupament d'ascites, que es dona en un intent de normalitzar els valors de pressió arterial, i disfunció circulatòria (1, 5). La

vasodilatació esplàncnica i sistèmica, i el subseqüent establiment d'un estat d'hiperdinàmia sistèmica, porta doncs a un empitjorament de les complicacions de la cirrosi (Figura 3).

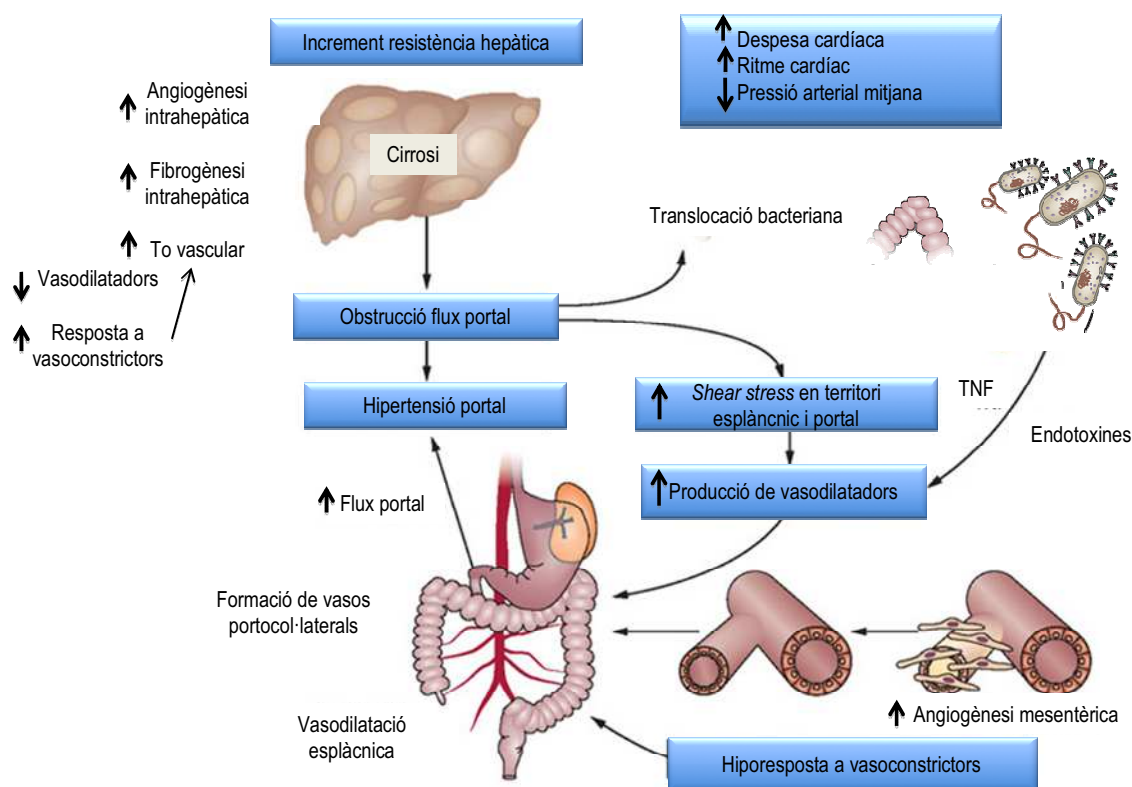


Figura 3: Fisiopatologia de la cirrosi i la hipertensió portal. Principals esdeveniments que es donen durant la cirrosi i la hipertensió portal a nivell intrahepàtic, esplàncnic i sistèmic. (Adaptat de Wong F, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012 May 22;9(7):382-91).

2.1.3 Altres complicacions de la cirrosi i hipertensió portal

Altres complicacions de la cirrosi i la hipertensió portal inclouen: ascites, la qual està causada per un increment de la pressió sinusoïdal hepàtica, vasodilatació arteriolar i per la retenció de sodi (4, 10); peritonitis bacteriana espontània, causada per la translocació de bacteries entèriques a l'intestí (2); síndrome hepatorenal, el qual resulta en una vasodilatació severa perifèrica i esplàncnica que dona una vasoconstricció renal i resulta en una fallada renal (4); síndrome hepatopulmonar, que resulta en una vasodilatació arterial pulmonar severa donant hipoxèmia. (4, 6); encefalopatia hepàtica, a causa d'una derivació de la sang directament a la circulació sistèmica per la formació de vasos col·laterals portosistèmics; i disfunció cardíaca, en la que els pacients amb hipertensió portal presenten una disfunció diastòlica i un increment crònic de l'índex cardíac, entre d'altres (4, 6).

2.2 Angiogènesi

Els vasos sanguinis formen una xarxa complexa de artèries, capil·lars i venes que permeten l'aportació d'O₂ i nutrients a tot l'organisme, l'eliminació de residus, així com la vigilància per part del sistema immune (23-25). En quant a la seva estructura, varia segons el tipus (artèria o vena) i segons la mida. Tot i això, el patró estructural dels vasos és comú i es troba present en tots els vasos sanguinis excepte els capil·lars (veure Figura 4).

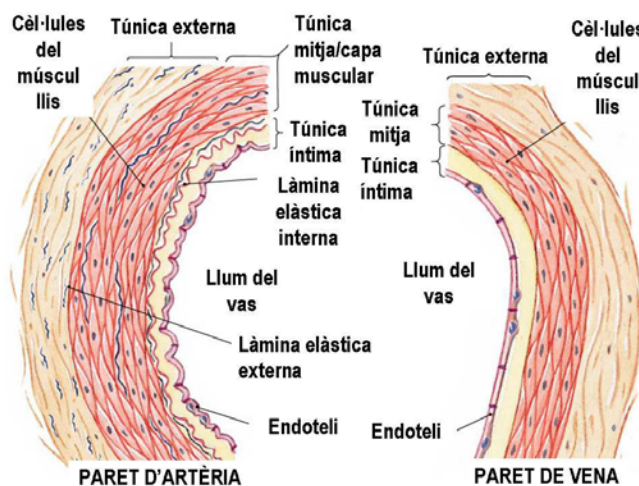


Figura 4: Estructura general dels vasos sanguinis. Els vasos sanguinis es divideixen en tres parets o túniques. La túnica íntima delimita el propi vas sanguini amb el llum del vas i consisteix en una capa de cèl·lules endotelials associada a teixit connectiu. Sota aquest teixit connectiu es troba la làmina elàstica interna (la qual està menys definida en la vena), que delimita la túnica íntima amb la mitja i està fenestrada. La túnica mitja o capa muscular està formada per una paret de cèl·lules de múscul llis en capes concèntriques i un contingut variable de teixit connectiu. Sota el múscul llis es troba la làmina elàstica externa que delimita amb l'adventícia i que és menys compacta que la interna. La túnica adventícia principalment conté fibres de teixit connectiu (col·lagen) i fibroblasts.

El terme angiogènesi es defineix com el procés pel qual es formen vasos nous a partir de vasos preexistents (26). Es tracta d'un procés molt important durant el desenvolupament embrionari i el creixement. En l'embrió, els nous vasos es formen a partir de cèl·lules endotelials progenitores derivades del mesoderm anomenades angioblasts, les quals es diferencien en cèl·lules endotelials formant una vasculatura primitiva en un procés anomenat vasculogènesi. Posteriorment els vasos formats es ramifiquen en un procés d'angiogènesi creant una xarxa que es diferencia en artèries i venes. Un cop formats aquests vasos hi ha un reclutament de pericits i cèl·lules musculars llises que envolten les cèl·lules endotelials naixents per donar-los estabilitat i regular-ne la perfusió, procés anomenat arteriogènesi (24, 27).

En l'edat adulta, però, molts d'aquests vasos sanguinis estan en estat de quiescència, i l'angiogènesi només es dona de manera regular en alguns processos fisiològics com serien la cicatrització i la reparació de teixits danyats, el cicle ovàric o en la placenta durant l'embaràs. No obstant, les cèl·lules endotelials mantenen l'habilitat de dividir-se ràpidament en resposta a estímuls fisiològics com la hipòxia o la inflamació. Malauradament, quan aquesta neoformació de vasos es desregula per un desequilibri entre estimuladors i inhibidors del procés, l'angiogènesi passa a ser contribuïdora de múltiples trastorns malignes, isquèmics, inflamatoris, infecciosos i immunes (26, 27).

De fet, l'angiogènesi, és un factor crític en situacions patològiques com la cirrosi o les neoplàsies (28) i està implicada en més de 70 malalties, ja sigui per excés o per manca, i la llista ha anat augmentant els darrers anys. Alguns exemples que es donarien per un excés serien el càncer, la psoriasi, l'artritis, la ceguesa, l'obesitat, l'asma, l'arteriosclerosi, les malalties infeccioses i les malalties proinflamatòries. Mentre alguns exemples de malalties que es donarien per creixement insuficient o regressió anòmala de vasos serien la isquèmia en infart de miocardi i la isquèmia cerebral, la neurodegeneració, la preeclàmpsia o l'osteoporosi, entre d'altres (24, 27).

2.2.1 Procés angiogènic

La formació de vasos és un procés complex, que requereix una regulació fina del balanç entre senyals estimuladores i inhibidores de l'angiogènesi, com són l'expressió d'integrines, angiopoietines, quimioquines, molècules d'unió, factors de creixement, sensors d'oxigen i inhibidors endògens, entre d'altres (29).

En els vasos adults sans, les cèl·lules endotelials formen una barrera entre la sang i el teixit del voltant per controlar l'intercanvi de fluids i soluts, i la transmigració de les cèl·lules del sistema immune. Aquestes es troben en un estat de quiescència de vida mitja llarga, que les protegeix d'estímuls per una acció autocrina de senyals de manteniment com són el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), la via de Notch, les angiopoietines (ANG1) i els factors de creixement de fibroblasts (FGFs). No obstant, en certes condicions, com ara una situació d'hipòxia, s'estimula l'expansió de la xarxa vascular. Per tal que aquest procés es porti a terme correctament, les cèl·lules endotelials estan equipades amb sensors d'oxigen i factors de transcripció induïbles per hipòxia (HIFs), els quals permeten el reajust de la forma dels vasos per optimitzar-ne el flux sanguini i assegurar un òptim aport d'O₂ a tots els òrgans (23, 24).

Aquests factors induïbles per hipòxia activaran llavors múltiples gens angiogènics, sent el VEGF el més rellevant (27).

En el procés de formació de vasos a partir de vasos preexistents (Figura 5, A), estímuls com la hipòxia (30, 31), la inflamació (32, 33), l'estrès oxidatiu (34-36) o estrès per fricció (*shear stress*) (37, 38), activen les cèl·lules a produir factors angiogènics com VEGF, neuropilines (NRPs), angiopoietines, FGFs, quimioquines, lligands de Notch, semaforines o efrines. Aquest fet produeix una dilatació dels vasos quiescents. A continuació, els perícits que envolten les cèl·lules endotelials es desenganxen de la paret del vas, produint d'aquesta manera l'alliberació de les endotelials de la membrana basal per degradació proteolítica, la qual està regulada per metal·loproteinases de la matriu extracel·lular (MMPs), i la pèrdua de les unions cel·lulars. En aquesta situació les cèl·lules endotelials adopten mobilitat i capacitat invasiva. Per tal que totes les cèl·lules endotelials no surtin en massa degut al senyal angiogènic, se seleccionen algunes cèl·lules, anomenades cèl·lules punta (*tip*), les quals presenten molts fil·lopodis i que seran les que lideraran el procés en resposta als factors anomenats anteriorment (Figura 5, B). Aquestes s'adhereixen a la matriu extracel·lular mitjançant integrines per assegurar la formació de la ramificació. Les cèl·lules *tip* contactaran i fusionaran amb altres cèl·lules *tip* per afegir nous vasos a la xarxa preexistent i així formar la llum del vas per tal que s'iniciï el flux sanguini. Les cèl·lules veïnes de les cèl·lules *tip* assumeixen una posició subsidiària com a cèl·lules de suport o *stalk*. Aquestes cèl·lules *stalk* formen menys fil·lopodis però permeten l'establiment de la llum del neovas i proliferen per tal d'elongar-lo. També estableixen unions amb les cèl·lules veïnes i produeixen components de la membrana basal per assegurar la integritat del nou vas. A més a més de les cèl·lules *tip* i les cèl·lules *stalk* també hi ha les cèl·lules *phalanx* les quals són cèl·lules amb un fenotip quiescent no proliferatiu que controlen i regulen la perfusió en el nou vas. A continuació, per tal que s'estableixi una xarxa vascular funcional es requereix que els vasos naixents madurin per donar vasos duradors. Aquesta estabilització, maduració i consolidació com a vas funcional dels nous vasos naixents passa per una sèrie de processos. Aquests processos són: el reclutament dels perícits, en vasos de mida mitjana, i de cèl·lules musculars llises (SMCs) en vasos de calibre més gran, atrets per les cèl·lules *stalk*, l'establiment de la membrana basal i de la matriu extracel·lular, l'estretament de les unions cel·lulars, la inducció de la quiescència i el pas del flux sanguini (27). Els perícits estableixen un contacte directe cèl·lula-cèl·lula amb les cèl·lules endotelials en capil·lars i vasos immadurs, mentre que les cèl·lules musculars llises que recobreixen les artèries i venes estan separades de les cèl·lules endotelials per làmina elàstica (24).

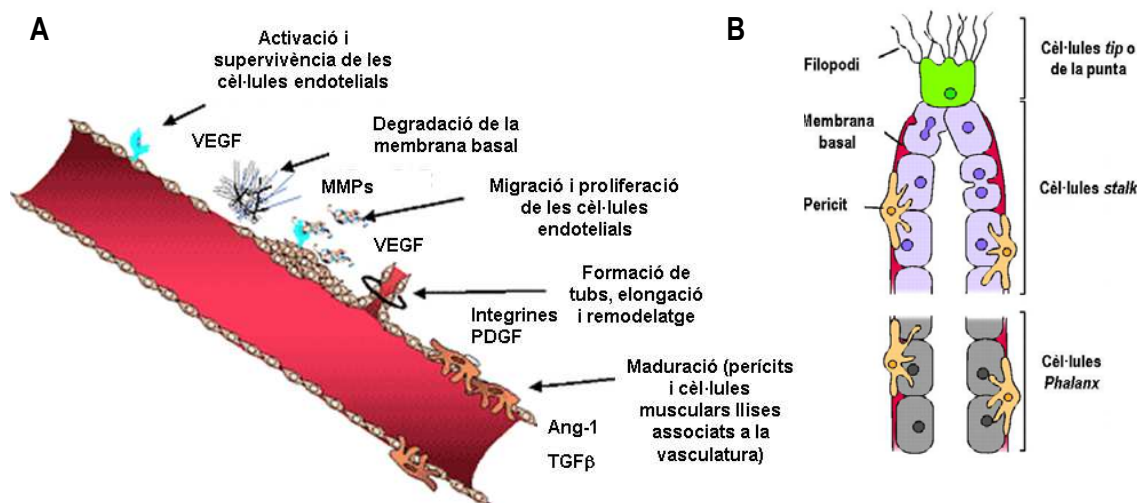


Figura 5: A) Fases del procés angiogènic. B) Tipus de cèl·lules endotelials durant el procés de formació de l'sprout. Esquema representatiu de l'estructura d'un sprout i el tipus de cèl·lules endotelials que el conformen, cèl·lules tip o de la punta, cèl·lules stalk i cèl·lules phalanx.

No obstant, hi ha diferències entre els vasos formats durant processos fisiològics i aquells formats per una neovascularització patològica (com per exemple en tumors). Els vasos sans es poden diferenciar en arterioles, capil·lars i vènules, mentre que la vasculatura patològica és primitiva, desorganitzada, amb poc recobriment de pericits, morfològicament aberrant i caòtica. A més a més, els vasos sans estan ben perfosos i en canvi els vasos patològics presenten oclusions parcials o totals donant un flux sanguini alterat (39-41). Aquesta organització irregular també s'ha observat en la neovascularització formada en model animals de cirrosi i hipertensió portal (PPVL i CBDL) (42).

2.2.2 Factors angiogènics

Múltiples factors estan implicats com a reguladors positius de l'angiogènesi. El principal factor proangiogènic, VEGF, és un dels reguladors clau en la proliferació de cèl·lules endotelials vasculares i limfàtiques, mentre que per exemple el factor de creixement derivat de plaquetes PDGFBB i l'angiopoietina-1 (ANG1) recluten les cèl·lules murals que envolten els tubs endotelials (29). També estan inclosos en el procés angiogènic el factor de creixement de fibroblast àcid (FGFa), el factor de creixement de fibroblast bàsic (FGFb), els factors de creixement transformant (TGFα i TGFβ), el factor de creixement hepatocitari (HGF), el factor de necrosi tumoral-α (TNFα), angiogenines, interleuquines (IL8) i angiopoietines, entre d'altres (43).

A continuació descriurem amb més detall un dels factors proangiogènics més importants tan en la fisiopatologia de la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica com en altres patologies, el VEGF.

2.2.2.1 El factor de creixement endotelial vascular: VEGF

L'angiogènesi, tan fisiològica com patològica, està dirigida principalment pel factor de creixement endotelial vascular, VEGF. És un dels factors més importants en la regulació de la formació dels vasos sanguinis i limfàtics durant el desenvolupament embrionari, així com en processos angiogènics postnatsals com la cicatrització, en funcions reproductives com ovulació, menstruació i embaràs, i en el manteniment de la homeòstasi dels vasos en adults. També està implicat en la neovascularització associada a malalties ja que es troba sobreexpressat en tumors sòlids i algunes neoplàsies hematològiques, en retinopatia diabètica, en artritis reumatoide, en psoriasi o en trastorns neovascular intraoculars, entre d'altres (27, 43, 44). VEGF, a més a més, té un paper important en el desenvolupament del sistema nerviós actuant com un potent factor de neurogènesi i plasticitat neuronal (25). A causa d'aquesta implicació de VEGF en processos patològics, s'ha avaluat la regulació de la seva expressió com a possible teràpia tan pro- com anti-angiogènica.

La família de VEGF (Figura 6) consisteix en set glicoproteïnes que es designen com, VEGFA (la més important en angiogènesi), el VEGFB, el VEGFC, VEGFD, el VEGFE, VEGFF, i també estaria inclòs en aquesta família el Factor de Creixement Placentari (PlGF) (25, 44-46). Existeixen diversos receptors dels membres de la família de VEGF (VEGFR), els quals són receptors transmembrana del tipus tirosina quinasa, que un cop units amb els seus corresponents lligands en el domini extracel·lular del receptor, dimeritzen i s'activen a través d'una transfosforilació de la tirosina del domini intracel·lular donant una senyal a través de les vies de MAPK i Akt, i activant d'aquesta manera les diferents cascades de senyalització que resulten en processos angiogènics. Aquests receptors són VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1), els quals s'uneixen a VEGFA; VEGFR3, el qual s'uneix a VEGFC i VEGFD; i les neuropil·lines 1 i 2 (NRP1 i NRP2) les quals actuen com a coreceptors i s'expressen a l'endoteli vascular i en neurones (43, 44, 47). Existeix per altra banda una forma soluble de VEGFR1 (sVEGFR1) que inhibeix la proliferació de cèl·lules endotelials induïdes per VEGF, segrestant el VEGF i impedit que s'uneixi a VEGFR2. Aquest receptor soluble podria actuar com antagonista específic de VEGFA o PlGF (25, 44, 47, 48).

El receptor VEGFR2 (Flk1), s'expressa predominantment en cèl·lules endotelials vasculares (tot i que també en altres tipus cel·lulars) i és el mediador més important de les

respostes cel·lulars al VEGF, sent la via de senyalització a través de VEGFR2 bàsica per l'activitat vasodilatadora, de migració i proliferació cel·lular de VEGF (47). Per altra banda, el receptor VEGFR1 (Flt1), el qual s'expressa en cèl·lules endotelials, perícits, monòcits/macròfags entre d'altres, té poc efecte proliferatiu sobre les cèl·lules endotelials però pot formar heterodímers amb VEGFR2 augmentant la senyal angiogènica.

VEGF doncs és un mitògen específic de les cèl·lules endotelials vasculars, el qual actua a través dels seus receptors per activació de la cascada de senyalització (Raf-MEK-ERK) induint la proliferació, per via p38MAPK promovent la migració i per via PI3K/Akt promovent la supervivència d'aquestes cèl·lules tot inhibint l'apoptosi, així com estimulants la síntesi de vasodilatadors com eNOS (43, 44, 46). També és un factor involucrat en la permeabilitat vascular via PI3K/Akt per la seva capacitat de fenestració de l'endoteli. VEGF està regulat pels nivells d'oxigen a través del factor de transcripció induïble per hipòxia HIF1, i per l'expressió de varis factors de creixement com EGF, TGF α , TGF β , IGF, FGF o PDGF, òxid nítric, citoquines com IL1 α o IL6 i oncògens com mutació o amplificació de Ras, entre d'altres (43, 44).

De les isoformes esmentades, el VEGFA, és el component més important per a l'angiogènesi i interacciona amb els receptors VEGFR1 (Flt-1) i VEGFR2 (Flk-1 o KDR1) i amb les neuropil·lines (NRP1 i NRP2). El gen del VEGFA en humans es troba al cromosoma 6p21.3 i està compost per 8 exons i 7 introns que a través d'un procés d'*splicing* donen lloc a les quatre isoformes madures: VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆. També existeixen dues isoformes menys freqüents, la VEGF₁₄₅ i la VEGF₁₈₃. Totes aquestes isoformes tenen propietats biològiques diferents però superposades en l'angiogènesi a causa de la seva unió diferencial a les neuropil·lines i als proteoglicans heparan sulfat que es troben a la superfície cel·lular (43-47). La VEGF₁₆₅ és la isoforma més predominant i es tracta d'una glicoproteïna de 45 kDa homodimèrica d'unió a heparina, produïda per cèl·lules endotelials, macròfags o cèl·lules T activades, entre d'altres, amb efectes proangiogènics específicament per les cèl·lules endotelials. La VEGF₁₂₁ és un polipèptid acídic que no s'uneix a heparina, mentre que les isoformes VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, són bàsiques i tenen molta afinitat per l'heparina. Per aquest motiu, VEGF₁₂₁ és una proteïna completament soluble, mentre que VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ es troben quasi totalment retingudes a la matriu extracel·lular (46). La isoforma VEGF₁₆₅ presenta propietats intermèdies ja que és secretada però una fracció important es manté retinguda a la superfície cel·lular i a la matriu extracel·lular. Les isoformes VEGF₁₄₅ i la VEGF₁₈₃ s'uneixen a heparina més fortament i es troben segrestades a la matriu extracel·lular i la superfície cel·lular, i per aquest motiu són menys actives que VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅ *in vivo* (43, 44).

Tot i que l'expressió de VEGF, tan sigui per excés com per defecte, està associada a múltiples patologies, VEGF també té un paper clau en l'angiogènesi fisiològica i la homeòstasi dels vasos sanguinis en l'adult (49). Així doncs, VEGF actua com a potent factor de supervivència endotelial ja que indueix l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques com Bcl2 i A1 en aquestes cèl·lules a través de la via PI3K-Akt (43, 47). Per tant, s'observa una acció paracrina del VEGF que actua en les cèl·lules endotelials adjacents, i una funció autocrina de VEGF expressat per les pròpies cèl·lules endotelials per assegurar-ne la supervivència i mantenir la homeòstasi vascular (45).

Com s'ha esmentat anteriorment, el Factor de Creixement placentari, PIGF (de l'anglès *placental growth factor*) també és un membre de la família de VEGF. Es va identificar inicialment en placenta però també s'ha vist expressat en altres òrgans com cor i pulmons. Les seves funcions proangiogèniques es donen principalment durant l'embaràs i cicle ovàric, i no es troba sobreexpressat en teixits normals ni durant l'embriogènesi, de manera que en condicions sanes no té efectes sobre vasos quiescents.

El gen humà de PIGF es localitza al cromosoma 14q24 i està format per 8 exons. Existeixen 4 isoformes de PIGF (PIGF-1,-2,-3 i -4) les quals difereixen en mida i afinitat d'unió a heparina i que se secreten com a homodímers glicosilats. El PIGF s'uneix a Flt1(VEGFR1) i a NRP1 i NRP2 però no a Flk1 (VEGFR2). PIGF participa en el procés angiogènic estimulando el creixement de les cèl·lules endotelials, la seva migració i supervivència, així com la subseqüent estabilització i maduració del nous vasos formats reclutant cèl·lules del múscul llis i promovent la proliferació de fibroblasts. Aquests efectes es donen tan de manera directe per la inducció de la seva pròpia via de senyalització, com estimulant l'alliberament i la disponibilitat de VEGF, desplaçant-lo de la unió amb VEGFR1, i d'aquesta manera amplificant la via de senyalització de VEGFR2. Per altra banda, PIGF augmenta l'expressió de varis factors proangiogènics com VEGFA, FGF2, PDGFb, MMP, entre d'altres (20, 27, 29, 44, 47, 48, 50, 51). També es creu que PIGF té un paper rellevant en el procés d'arteriogènesi i limfangiogènesi (45, 47, 51).

S'ha vist que PIGF es troba sobreexpressat en diverses condicions patològiques entre elles la cirrosi i hipertensió portal, tal i com es descriurà a l'apartat 2.2.3.

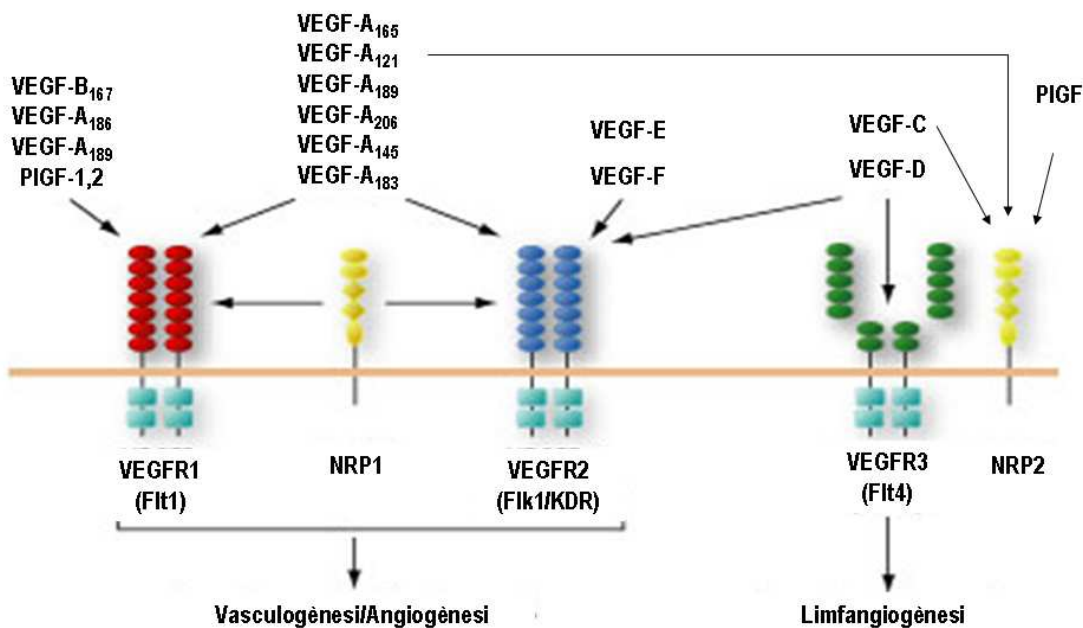


Figura 6: Família de VEGF i els seus receptors. (Adaptat de Rodríguez E, The Molecular Oncology Report, Vol 1, number 2, 2007).

2.2.3 Angiogènesi en la cirrosi i la hipertensió portal

Estudis realitzats en el nostre grup de recerca (17-19, 21) i en altres laboratoris (20, 42, 52) han demostrat una implicació rellevant de processos angiogènics, tan a nivell intrahepàtic com a nivell extrahepàtic, en la progressió de malalties del fetge, com la cirrosi hepàtica, i en l'agreujament de la hipertensió portal.

Aquests estudis recents en models animals amb hipertensió portal prehepàtica per lligadura parcial de la vena porta (PPVL), i models amb cirrosi i hipertensió portal per lligadura del colèdoc (CBDL), han demostrat un increment de l'angiogènesi en la microvasculatura del mesenteri així com un augment de la permeabilitat (42, 53, 54). Aquests fets indiquen una implicació de l'angiogènesi en l'increment del flux sanguini esplàncnic i el manteniment de la circulació hiperdinàmica esplàncnica, així com en el desenvolupament dels vasos col·laterals portosistèmics en la síndrome de la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica, complementant, d'aquesta manera els mecanismes anteriorment descrits, com la sobreproducció de vasodilatadors endògens i una disminució de la reactivitat vascular als vasoconstrictors al territori esplàncnic o l'obertura de canals vasculars preexistents per donar lloc al "shunting" portosistèmic (17-22, 42, 55, 56).

Aquest augment patològic de l'angiogènesi en la cirrosi i hipertensió portal s'ha demostrat, tal i com s'ha observat en models animals amb hipertensió portal i cirrosi (19, 20, 42, 57-61) i en pacients cirròtics (57, 62, 63), que és causat per la sobreexpressió, tan en territori esplàncnic com també a nivell intrahepàtic, de varis factors proangiogènics com són VEGF, el PDGF, FGF-2 i/o PIGF, sent el VEGF el factor principal. El VEGF s'ha vist sobreexpressat de manera predominant en les cèl·lules endotelials però també en les cèl·lules de múscul llis dels vasos sanguinis del mesenteri, en cèl·lules hepàtiques estrellades, leucòcits, macròfags hepàtics, hepatòcits i cèl·lules Kupffer (42, 64, 65). En pacients cirròtics també s'ha observat una expressió de VEGF en macròfags peritoneals actius (57). De fet, es va observar en un model de cirrosi biliar secundària (BDL) que després de dues setmanes post-cirurgia, l'expressió de VEGF en els hepatòcits passava de ser de menys del 3% (rata control) a ser detectada en més del 95% del hepatòcits, acompanyat per un increment de la proliferació de cèl·lules endotelials en àrees periportals i en àrees fibròtiques. En aquest mateix model també és va observar un augment de FGF-2 en hepatòcits, tot i que de manera posterior que VEGF, indicant la implicació d'aquests factors en l'angiogènesi que es produeix en aquest model d'hipertensió portal i cirrosi (58).

També s'han vist incrementats els receptors de VEGF (VEGFR2 i VEGFR1) i el marcador endotelial CD31 en el mesenteri de dos models de hipertensió portal (PPVL i CBDL) en comparació amb les rates control (42), a més a més de l'augment de l'expressió d'integrines, β -catenines, efrines i altres molècules d'adhesió involucrades en el remodelatge de la matriu extracel·lular del fetge (55, 65). Aquests factors estarien implicats tan en la iniciació com en l'estabilització de la hipertensió portal, la circulació hiperdinàmica esplàncnica i la formació de vasos col·laterals portosistèmics (19, 21, 66, 67).

Entre els mecanismes responsables de la sobreexpressió de VEGF es troba la hipòxia tissular (30, 31, 43, 58), l'expressió de citoquines, per processos inflamatoris (32), per increments de la pressió portal *per se* (68) o per mecanismes d'estrès com estrès per fricció (*shear stress*) (37, 38) o l'estrès oxidatiu (34-36). Per exemple, un dels processos que donen aquest estrès oxidatiu és per activació de NAD(P)H oxidasa (una de les principals fonts d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) en la vasculatura esplàncnica) l'activitat del qual s'ha descrit augmentada en els òrgans esplàncnics de rates amb hipertensió portal. Un altre procés és per la sobreexpressió del factor hemo oxigenasa, induït durant la hipertensió portal (66, 69). Tots aquests mecanismes promouen l'expressió de VEGF en varis teixits i tipus cel·lulars, i d'aquesta manera indueixen a processos angiogènics (55, 56). També hi ha evidències que indicarien que l'òxid nítric (NO) pot estar involucrat en regular l'angiogènesi mitjançant la sintasa de l'òxid nítric endotelial (eNOS) i en menys mesura la sintasa de l'òxid nítric induïble (iNOS), i la permeabilitat vascular

(predominantment per eNOS) ja que s'ha observat que la inhibició de NO produeix una disminució de l'angiogènesi en el mesenteri de rates amb hipertensió portal (53, 70) i en altres models (71).

Estudis recents dirigits a actuar, tan de manera profilàctica com terapèutica, sobre l'expressió d'aquests factors proangiogènics han manifestat una millora en les complicacions associades a la hipertensió portal i la cirrosi en models animals experimentals. De fet, el bloqueig de la via de senyalització de VEGF i el seu receptor (VEGFR2) mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals o inhibidors específics contra VEGFR2 i la seva fosforilació (17, 18), així com l'ús de fàrmacs que disminueixen l'expressió de VEGF com la rapamicina (19, 72), ha demostrat la reducció de la neoangiogènesi mesentèrica i el flux sanguini esplàncnic, augmentant la resistència esplàncnica arteriolar, així com la inhibició de la formació de vasos col·laterals portosistèmics, en models d'hipertensió portal (PPVL). Per altra banda, el bloqueig del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), utilitzant el fàrmac Gleevec, junt a la inhibició de VEGF mitjançant rapamicina, resulta en una reducció encara més gran que bloquejant VEGF sol de la neovascularització esplàncnica, una reducció de la formació de vasos col·laterals portosistèmics, així com una baixada de la pressió portal, un increment de la resistència de l'artèria mesentèrica superior i una disminució del flux de la mateixa, en el mateix model (PPVL) (21, 22). En el cas del factor de creixement placentari PIGF, s'ha observat que la inhibició d'aquest factor amb l'ús d'un anticòs monoclonal contra aquest, reduïa la densitat vascular en mesenteris, la formació de vasos portocol·laterals, el flux mesentèric arterial i la pressió portal en un 32%. Aquests efectes es van donar tan en una estratègia de prevenció com una estratègia terapèutica en models d'hipertensió portal per lligadura parcial de la vena porta, de la mateixa manera que s'ha observat en un model de ratolí *knockout* per aquest factor. A més a més, aquesta inhibició del PIGF va tenir un efecte antiangiogènic i antifibròtic en fetges de ratolins cirròtics per inducció amb CCl₄, indicant un paper rellevant de PIGF en l'angiogènesi que es dona en la cirrosi i hipertensió portal (20, 44, 48, 51).

Per altra banda, l'angiogènesi té una contribució a nivell intrahepàtic important en el desenvolupament de malalties cròniques del fetge ja que provoca l'establiment d'una angioarquitectura anormal en aquest òrgan, i està íntimament lligada a la fibrogènesi, la qual pot finalitzar en complicacions com serien la cirrosi, la hipertensió portal i el carcinoma hepatocel·lular (veure apartat 2.2.3.1).

En resum, l'angiogènesi anormal associada a la hipertensió portal i cirrosi contribueix, junt al remodelatge sinusoïdal, a la inflamació i fibrogènesi del fetge, a la circulació hiperdinàmica esplàncnica i a la formació de vasos col·laterals i varius (1, 28, 55, 56).

Per aquest motiu és coherent pensar que el control de la formació d'aquests neovasos pot ser una bona diana terapèutica en pacients amb hipertensió portal i malalties cròniques del fetge.

2.2.3.1 Relació entre angiogènesi, fibrogènesi i inflamació

Tot i els interrogants existents entre la relació de l'angiogènesi i la fibrogènesi, i que en estudis previs es creia que eren processos moleculars independents, estudis recents han demostrat que ambdós fenòmens emergeixen sinèrgicament i estan interconnectats per diferents vies en les malalties cròniques del fetge (73). De fet, s'ha demostrat que les cicatrius del fetge fibròtic estan àmpliament vascularitzades amb un número elevat de microvasos tortuosos, i que els nous vasos derivarien de la vasculatura preexistent intrahepàtica, originant-se de les ramificacions de la vena porta, creant d'aquesta manera connexions entre el sistema portal i les venes hepàtiques (58, 74, 75). A més, aquesta neovascularització s'ha vist que va en augment durant el desenvolupament de la cirrosi tan en estudis amb models animals com en humans (52, 61).

En el desenvolupament de la fibrosi hepàtica existeixen canvis fenotípics en les cèl·lules endotelials sinusoïdals (SEC) i una progressiva capil·larització del sinusoides. Les cèl·lules hepàtiques sinusoïdals són les úniques cèl·lules endotelials que presenten fenestració i els manca membrana basal. La capil·larització sinusoïdal inclou canvis en les SEC, pèrdua de la fenestració i dipòsit de membrana basal, tornant-se més rígida, més recobrint per cèl·lules hepàtiques estrellades, així com alteracions en les interaccions cèl·lula-cèl·lula, fent que presentin més unions entre elles, i cèl·lula-matriu, en els sinusoides hepàtics. Aquesta capil·larització sinusoïdal, la qual disminueix la permeabilitat i difusió, junt a la vasoconstricció i als *shunts* intrahepàtics, acaba donant un remodelat sinusoïdal que provoca un increment de la resistència al flux sanguini i una difusió d'oxigen impedida dels sinusoides fins als hepatòcits, que acaba resultant en una situació d'hipòxia i activació de les rutes proangiogèniques (52, 67, 76). Per tant, el procés de cicatrització crònica que es dona en el fetge fibròtic està caracteritzat per una sobreexpressió de diversos factors proangiogènics com factors de creixement, citokines i metal·loproteinases (52, 58, 77). De fet, factors com PDGF, TGF- β 1, FGF i VEGF, junt a proteïnes implicades amb el remodelatge de la matriu extracel·lular com integrines, β -cadenina, efrines i molècules d'adhesió, tenen un paper proangiogènic i profibròtic molt important en les malalties cròniques del fetge.

S'ha vist que les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC) un cop activades (fenotip caracteritzat per un increment en la seva proliferació, motilitat, contractibilitat i síntesi de components de la matriu cel·lular (77)), junt a altres cèl·lules productores de matriu extracel·lular com fibroblasts portals i miofibroblasts, participen també en la neovascularització intrahepàtica. Això és degut a que en les condicions hipòxiques esmentades anteriorment, (58, 60, 64), les cèl·lules hepàtiques estrellades a través de la via que involucra el factor de transcripció induïble per hipòxia, HIF-1 α , sobreexpressen factors proangiogènics com VEGF i angiopoietina-1, i els seus receptors (VEGFR1/Flt1 i Tie-2), així com PDGF, PIGF i NO. D'aquesta manera estimulen la seva migració i quimiotaxis, i promouen l'angiogènesi en les zones de teixit hipòxic. Aquest fet permet un flux sanguini adequat per nodrir i mantenir un estat metabòlicament actiu de les cèl·lules hepàtiques estrellades i contribuir d'aquesta manera a la fibrogènesi i remodelat tissular per reclutament de cèl·lules profibròtiques i per sobreexpressió de col·lagen tipus I, en les àrees de dany crònic i inflamació. (1, 28, 55, 56, 60, 76, 78-80). Aquest estat hipòxic també s'ha demostrat que es dona en els hepatòcits abans de l'aparició de la cirrosi i precedeix immediatament la inducció de VEGF, indicant que l'expressió de VEGF induïda per hipòxia en hepatòcits podria ser un esdeveniment més en el desenvolupament de les complicacions microvasculars associades amb la fibrogènesi hepàtica i podria contribuir així a la remodelació de l'arquitectura del fetge (58). Per altra banda, l'augment d'hipòxia en els hepatòcits produeix que aquests entrin en apoptosi i alliberin citoquines que activaran encara més les cèl·lules hepàtiques estrellades (81, 81, 82).

No obstant, l'angiogènesi que es dona en el fetge cirròtic pot ser parcialment ineficaç i no contribueix a millorar la perfusió efectiva del fetge. Això és a causa de la immaduresa i permeabilitat dels nous vasos induïts per VEGF (30), els quals són estructural i funcionalment diferents als sinusoides hepàtics. Per tant, aquests són incapaços de corregir la hipòxia en el fetge, reduint encara més la quantitat d'oxigen i nutrients que arriba als hepatòcits i contribuint a agreujar encara més el dany hepàtic (60).

En un estudi d'observació de fetge fibròtic induït per injeccions subcutànies de CCl₄ en ratolí, ja a les 8 setmanes postadministració de CCl₄, s'observava un canvi en l'estructura del fetge amb septes fibròtics centro-centrals que a les 12 setmanes ja passaven a ser centro-portals, obtenint un fetge totalment cirròtic a les 16 setmanes. Aquests ratolins, a més a més, desenvolupaven un increment significatiu del número de vasos localitzats en els septes fibrosos, determinat per un augment del marcatge de CD31. A més a més, el número de cèl·lules endotelials proliferants augmentava després de la inducció amb CCl₄ (indicat per un augment del marcador de proliferació ki67), amb un màxim a les 10 setmanes. De la mateixa manera

s'observava un increment de l'expressió de VEGF en el temps. En el cas de l'estudi del fetge fibròtic en el model CBDL en ratolí, es van veure canvis fibròtics a les 3 setmanes post-lligadura amb presència de nòduls fibròtics en el parènquima ja a les 6 setmanes i un augment del número de vasos sanguinis localitzats en els septes fibrosos ja a una setmana després de la inducció, observat per un augment del marcatge de CD31, així com un augment del número de cèl·lules endotelials proliferants. Després d'una setmana de CBDL, el VEGF es detectava en la primera línia d'hepatòcits al voltant de les venes centrals i portals, com en els ratolins control, i a més a més, se sobreexpressaven també en múltiples línies dels hepatòcits més allunyades de les venes centrals i portals. La màxima expressió s'aconseguia a les 3 setmanes després de la inducció de la CBDL. També es va observar un augment del marcatge d' α SMA en la zona periportal i del número de leucòcits i macròfags hepàtics. En estadis més avançats on la cirrosi ja es trobava establerta, s'observava una marcada distorsió i estretament del sinusoides en ambdós models de ratolí incrementant d'aquesta manera la resistència intrahepàtica (52).

Per altra banda, cal tenir en compte que molts mediadors inflamatoris, que presenten una activitat angiogènica directa, també poden estimular de manera indirecta altres cèl·lules per produir factors angiogènics com VEGF. De fet, mediadors proinflamatoris poden donar resposta angiogènica a través de la inducció de HIF-1 α i de l'activitat transcripcional dependent de HIF (76).

S'ha vist que l'angiogènesi, al seu torn, contribuiria a perpetuar i amplificar l'estat inflamatori degut a la expressió de molècules d'adhesió (com VCAM-1 i ICAM-1) i quimioquines en la nova vasculatura hepàtica, promovent així el reclutament de cèl·lules inflamatòries (33). Per tant, els nous vasos formats gràcies a aquesta angiogènesi participarien en les àrees amb inflamació, localitzades en els tractes portals i septes fibrosos permeten així el pas de cèl·lules inflamatòries infiltrants capaces de promoure la fibrogènesi (61).

Caldria destacar que, una relació entre la resposta inflamatòria, l'angiogènesi i la fibrogènesi quedaria encara més evidenciada pel fet que estratègies terapèutiques antiangiogèniques resulten en una supressió del desenvolupament de la fibrosi hepàtica en models animals experimentals (58). Alguns exemples serien estudis on l'ús d'inhibidors angiogènics semisintètics com el TNP-470 (83), d'inhibidors multidiària de receptor tirosina quinasa com el Sunitinib (inhibidor de VEGFRs i PDGFR) (61) o Sorafenib (inhibidor de VEGFR-2/R-3 i PDGF β) (21, 80), d'anticossos contra els receptors VEGFR1 i VEGFR2 (67), així com l'ús de fàrmacs que disminueixen l'expressió de proangiogènics com la rapamicina (84, 85), eren capaços d'inhibir la resposta inflamatòria, l'angiogènesi i la fibrogènesi en fetge de models fibròtics murins.

2.2.4 Teràpia anti-VEGF: beneficis i problemàtica

Els nostres estudis previs (17-19, 21) i d'altres grups (20, 42, 52) en diferents models experimentals d'hipertensió portal i cirrosi han demostrat, no només que l'angiogènesi juga un paper molt important a la fisiopatologia d'aquestes malalties, sinó també que la seva inhibició té múltiples efectes beneficiosos en models animals d'hipertensió portal i cirrosi. Diferents estratègies que bloquegen les rutes de senyalització del VEGF i/o del PDGF, com per exemple, anticossos monoclonals contra el VEGF receptor-2 (17), inhibidors de la fosforilació de VEGF receptor-2 (18), inhibidors de VEGF i/o PDGF (19) o inhibidors multiquinasa com el sorafenib, el qual inhibeix la via de Raf, PDGF, c-kit i VEGF (21) causen una marcada reducció de la pressió portal i el flux sanguini esplàncnic, una prevenció significativa de la formació de vasos sanguinis col·laterals portosistèmics, i una millora molt rellevant del dany hepàtic, amb reducció de la fibrosi hepàtica, l'infiltrat inflamatori intrahepàtic i la neovascularització intrahepàtica del fetge cirròtic (17-19, 21, 28) (veure Figura 7). Aquestes troballes indiquen que la inhibició terapèutica de l'angiogènesi podria ser potencialment útil per a reduir la morbiditat i mortalitat en pacients amb malalties cròniques del fetge (28, 56, 86).

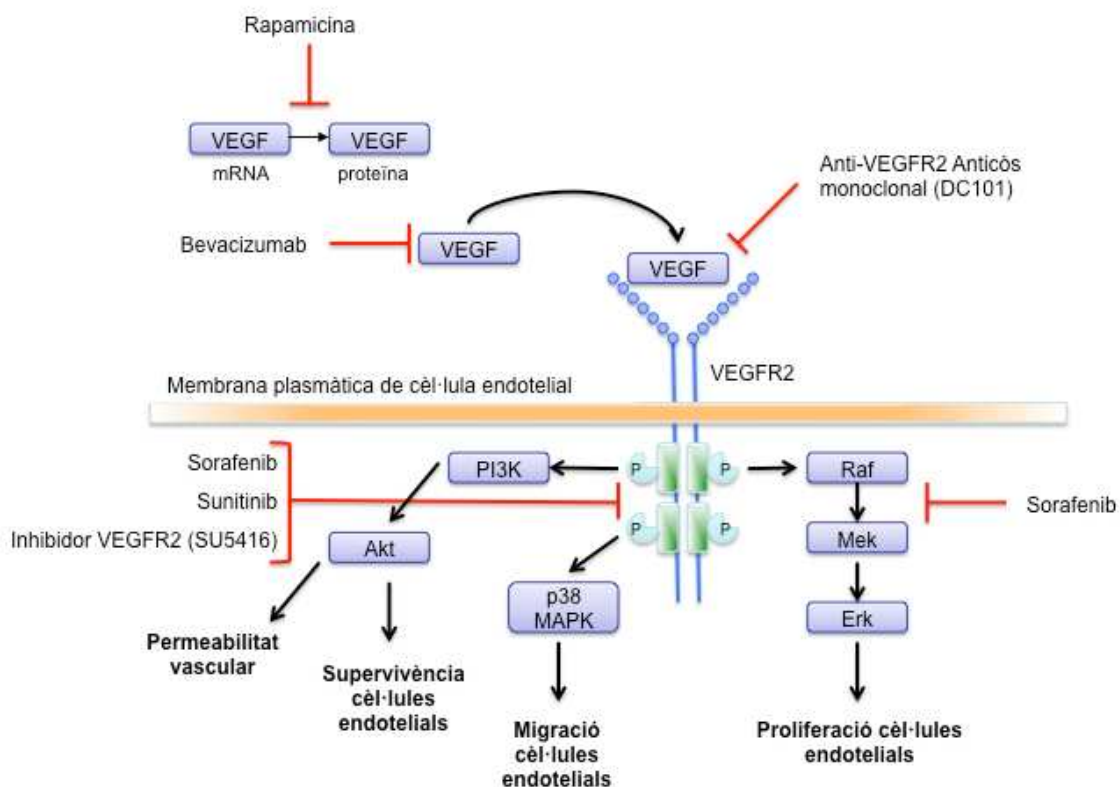


Figura 7: Diferents estratègies antiangiogèniques anti-VEGF. (Adaptat de Choueiri TK et al Semin Oncol. 2006;33:596–606).

No obstant, cal tenir en compte en l'ús d'aquestes teràpies que VEGF a banda d'estar implicat en l'angiogènesi patològica de múltiples malalties, presenta un paper beneficiós i essencial en processos fisiològics que es donen en l'adult, en el manteniment de l'homeòstasi vascular, i en la supervivència de les cèl·lules endotelials en teixits sans. Per aquest motiu és important considerar les possibles conseqüències d'una excessiva inhibició de la via de VEGF, la qual pot produir regressió de vasos preexistents en teixits sans incrementant la mort de les cèl·lules endotelials dels vasos quiescents (23, 29, 43, 56, 87). De fet, l'ús de teràpies antiangiogèniques massa intenses pot ser una de les raons per les quals alguns pacients amb carcinoma hepatocel·lular desenvolupen certes complicacions com el sagnat de varius i altres efectes adversos quan són tractats amb inhibidors multiquinases (86, 88). Aquest fenomen també s'ha observat en pacients amb hepatocarcinoma no-metàstic on el tractament amb l'anticòs monoclonal anti-VEGF bevacizumab produeix serioses complicacions de sagnat en un 11% del pacients (89).

Tot i aquests efectes adversos, la majoria de teràpies antiangiogèniques avui en dia estan dirigides a actuar contra VEGF. Com a resultat, no s'aconsegueix la supervivència de molts pacients amb càncer a llarg termini ja que molt sovint aquests pacients requereixen reduccions de dosi i períodes d'interrupció del tractament, suggerint que les teràpies antiangiogèniques actuals són insuficients i provoquen molts efectes secundaris. Per altra banda, un altre aspecte a tenir en compte és l'existència de pacients no responedors a la teràpia, o aquells que inicialment ho eren però que amb el temps presenten resistències, prolongant d'aquesta manera el període de supervivència però no la seva recuperació final (87). A més a més, molt sovint una teràpia antiangiogènica dirigida contra VEGF produeix la sobreexpressió d'altres factors angiogènics, com serien PIGF, angiopoietina-1 o FGF-2 entre d'altres factors, en un intent de compensació del bloqueig, que poden derivar a un augment encara major de l'angiogènesi en el moment que es deixa la teràpia antiangiogènica (24, 29).

Cal doncs trobar noves estratègies terapèutiques que actuïn específicament contra l'angiogènesi patològica, i els nivells patològics de VEGF, sense afectar l'angiogènesi fisiològica, mantenint el nivells de VEGF necessaris per la homeòstasi de la vasculatura preexistent.

2.2.5 Factors antiangiogènics endògens

Les teràpies antiangiogèniques usades fins l'actualitat, basades majoritàriament en antagonitzar VEGF, a banda dels efectes perjudicials que hem esmentat en l'apartat anterior, no són suficients per si soles per inhibir l'angiogènesi per varis factors com: la diversitat endotelial, la variació de l'expressió del gen que codifica VEGF depenent de teixit, la complexitat

d'isoformes i receptors de la família de VEGF, i la implicació de múltiples altres factors en la cascada antiangiogènica. Per tant, es fan necessàries estratègies alternatives, i una d'aquestes aproximacions alternatives és augmentar els factors antiangiogènics naturals de l'organisme ja que generalment l'activació del fenotip angiogènica depèn del balanç local entre factors activadors i inhibidors de l'angiogènesi (90, 91) (Figura 8).

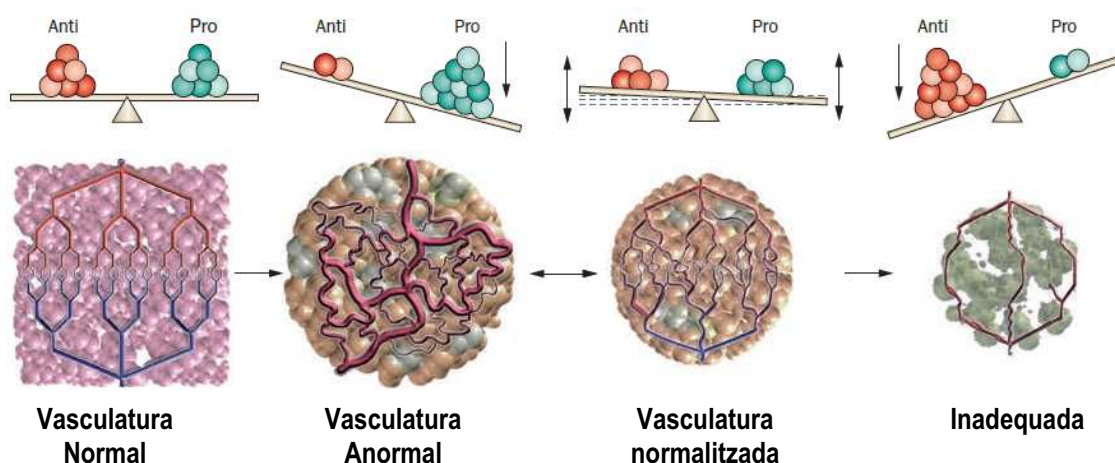


Figura 8: Diagrama esquemàtic sobre el balanç dels factors angiogènics i antiangiogènics sobre la vasculatura normal. (Adaptat de Gesternt et al Nat Rev Clin Oncol. 2009 Apr;6(4):229-36).

Tot i que la teoria de la balança entre factors angiogènics i factors antiangiogènics es basa en la idea que l'angiogènesi s'inicia quan els estimuladors estan sobreexpressats i els inhibidors estan disminuïts, s'ha d'anar amb compte, ja que sovint l'escenari no és tan simple, i alguns inhibidors angiogènics estan sobreexpressats en les cèl·lules endotelials durant l'angiogènesi regulant-ne el procés (92).

L'efectivitat de les teràpies antiangiogèniques passa per la seva especificitat de manera que actuï sobre els nous vasos associats a la patologia però mantingui intactes els vasos preexistents, de forma que es minimitzin els efectes secundaris no desitjats com les hemorràgies de vasos preexistents o una inapropiada degradació de la matriu extracel·lular que envolta els teixits sans (91).

Els principals avantatges derivats de l'ús terapèutic de factors antiangiogènics endògens són que no s'espera que activin gens de resistència a fàrmacs (fet que ofereix una estratègia potencial per teràpies antiangiogèniques a llarg termini), que són ben tolerades per l'organisme i que no s'espera que produeixin efectes adversos tòxics com fan altres inhibidors sintètics, a més a més d'actuar de manera més sensible i específica (91).

Els factors antiangiogènics endògens són molt diversos i normalment actuen inhibint la proliferació de cèl·lules endotelials, induint processos apoptòtics, impeding la formació de túbuls o

la migració de les cèl·lules endotelials (93). En general es poden classificar en dos grans categories: aquells derivats de la proteòlisi de metabòlits o fragments, el qual està subdividit en dos grups (derivat de la matriu extracel·lular o no derivat de la matriu extracel·lular), i un altre grup de productes gènics (94). Alguns exemples de factors antiangiogènics endògens són: angiostatina, antitrombina (que pertany a la família de les serina proteases i està implicat en la coagulació de la sang), arrestina i endostatina (fragments derivats de col·lagen), vasostatina, trombospondines -1 i -2 (TSPs), el receptor soluble 1 de VEGF (sVEGFR1), factor derivat de pigment d'epiteli (PEDF) i Vasohibin (VASH), entre d'altres (93-95). (Figura 9).

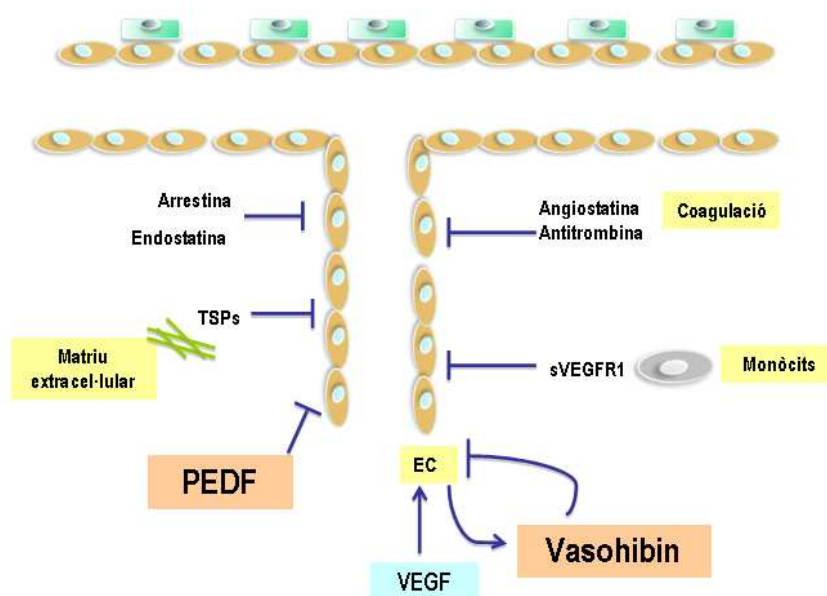


Figura 9: Esquema d'alguns inhibidors angiogènics endògens. Fragments proteolítics de matriu extracel·lular, inhibidors específics de teixit i inhibidors derivats d'endoteli. Aquests factors i altres orquestran el control de l'angiogènesi. (Adaptat de Sato Y, Endothelium. 2006 Mar-Apr;13(2):147-55).

Són molts pocs els estudis que s'han realitzat sobre la implicació d'inhibidors angiogènics endògens en cirrosi i hipertensió portal (96). No obstant, dos factors antiangiogènics endògens recentment identificats presenten característiques interessants pel seu ús com a teràpia antiangiogènica en la hipertensió portal i cirrosi.

Un d'aquests factors antiangiogènics és Vasohibin. L'origen de la majoria d'inhibidors angiogènics descrits fins ara eren extrínsecs a la vasculatura, no obstant, recentment s'ha vist que les cèl·lules endotelials poden produir inhibidors endògens per elles soles. Junt a aquest fet, no s'havia descrit cap factor induït com a conseqüència d'una resposta específica, autoreguladora d'inhibició per retroalimentació negativa. En canvi, en el cas de Vasohibin s'ha

observat que és expressat per les cèl·lules endotelials, està selectivament induït i sembla funcionar com un inhibidor altament específic per retroalimentació negativa en el procés de l'angiogènesi (Figura 10). Per tant, una estratègia terapèutica basada en Vasohibin representa un enfocament prometedori, amb menys efectes secundaris i sense efectes en la vasculatura preexistents (92).

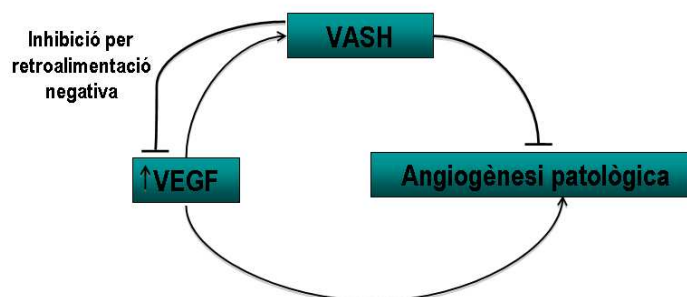


Figura 10: Esquema de mecanisme de inhibició per retroalimentació negativa VASH1/VEGF.

El segon factor descrit és el Factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF, de l'anglès *pigment epithelium derived factor*). Aquest s'ha descrit com un antiangiogènic capaç d'inhibir la neovascularització i migració de les cèl·lules endotelials de manera més activa que altres antiangiogènics com angiostatines, trombospondina-1 o endostatina (97), amb l'avantatge que, tot i la seva gran capacitat inhibidora, actua només en els nous vasos i no en la vasculatura preexistent, evitant el col·lapse de la vasculatura normal, hemorràgies, i una degradació inapropiada de la matriu extracel·lular. (91, 98, 99). A més a més, s'ha vist que l'administració terapèutica de la proteïna soluble o de la transferència gènica viral en models experimentals *in vivo* és estable i no tòxica fet que suggereix PEDF com una eina excel·lent per retardar la progressió d'un ampli ventall de malalties neurodegeneratives i de malalties associades al creixement anormal de vasos en l'ull, en càncers metastàtics de varis teixits, entre d'altres (98). Per altra banda, el fet que PEDF sigui produït de forma endògena i s'expressi àmpliament en tot l'organisme preveu que tindrà menys efectes secundaris que altres agents sintètics o que desenvolupi menys resistències (100).

A banda d'aquestes característiques, Vasohibin-1 (VASH1) i PEDF presenten funcions antifibròtiques, antioxidants i antiinflamatòries (101-105). Aquest fet els converteix en dianes terapèutiques atractives pel tractament de malalties com la cirrosi i la hipertensió, on s'ha descrit anteriorment que aquests processos són importants.

Per tant, en el present projecte ens hem centrat en l'estudi d'aquests dos factors antiangiogènics endògens com estratègia alternativa per a la millora de la cirrosi i la hipertensió portal. A continuació els descriurem amb més detall.

2.3 Vasohibin (VASH)

Un dels mecanismes més importants d'autoregulació de molts processos fisiològics i patològics és el sistema de control per retroalimentació negativa (*feedback* negatiu), i es dona quan el producte final d'una ruta de senyalització suprimeix el primer factor controlant d'aquesta manera els seus propis nivells cel·lulars (106). No obstant, no s'havia descrit cap procés de regulació de l'angiogènesi seguint aquest mecanisme fins que a l'any 2004 *Watanabe K et al* es van plantejar la possibilitat que factors angiogènics com VEGF, fossin capaços d'induir la producció de factors antiangiogènics per tal d'inhibir aquesta angiogènesi de manera autocrina per retroalimentació negativa (90) (Figura 10).

La sobreexpressió fins a una certa concentració de VEGF induïx la migració de les cèl·lules endotelials, i després els nivells de VEGF tornen a baixar, fet que fa pensar que en un cert punt VEGF induïx la seva pròpia inhibició per inducció de factors antiangiogènics endògens. Seguint aquesta hipòtesi, *Watanabe et al* van realitzar un anàlisi de cDNA per *microarray* per determinar quins gens eren induïbles per VEGF en cèl·lules endotelials humanes i van caracteritzar d'aquesta manera el gen KIAA1036 (VASH1). Van observar que era un gen induïble per VEGF de manera dependent de dosi, i que actuava de manera específica sobre les cèl·lules endotelials (ECs) (90). Aquesta activació era a nivell transcripcional i no a causa d'una estabilització del mRNA (107) permetent inhibir els efectes causats per concentracions altes de VEGF mitjançant un procés de retroalimentació negativa (90).

A més a més de VEGF, VASH1 també és induïble amb la mateixa eficiència per un altre factor angiogènica, el factor de creixement de fibroblasts-2 (FGF2). Per tant, Vasohibin presenta activitat antiangiogènica que permet inhibir selectivament la migració i proliferació de les cèl·lules endotelials estimulades tan per VEGF com per FGF2 en el lloc de l'angiogènesi tan *in vitro* com *in vivo* (107).

Analitzant la seva estructura es va observar que era una proteïna secretada però de manera no convencional ja que no presentava pèptid senyal clàssic al seu extrem C-terminal. Estudis de la seva funció biològica van posar en evidència la seva capacitat antiangiogènica d'inhibició de la migració, proliferació i formació de túbuls tant *in vitro*, on van observar una reducció de la formació espontània d'estructures en xarxa de les cèl·lules endotelials HUVEC en matrigel quan s'afegia proteïna recombinant de KIAA1036, com en assajos *in vivo*, on s'observaven efectes inhibitoris de l'angiogènesi quan se sobreexpressava VASH1 de manera exògena. Alguns exemples del seu efecte serien la inhibició de l'angiogènesi induïda per FGF2 en la còrnia de ratolins on se sobreexpressa VASH1, o la inhibició de la formació de vasos en

assajos d'angiogènesi *in vivo* en membranes corioalantoïques de pollastre (CAM) on la introducció de vectors adenovirals que codificaven per VASH1 retardaven la formació de vasos respecte el control LacZ (90).

D'aquesta manera s'identificava un inhibidor de l'angiogènesi que a diferència dels antiangiogènics descrits fins el moment, s'expressava de manera intrínseca per les cèl·lules endotelials (108) i era induïble per factors angiogènics (90).

2.3.1 Estructura, gens homòlegs i isoformes de Vasohibin

El gen de la Vasohibin humana es localitza al cromosoma 14q24.3, consisteix en 8 exons i 7 introns, i codifica per una proteïna de 365 aminoàcids. El VASH1 de ratolí presenta una identitat de més del 90% en la seqüència d'aminoàcids amb el VASH1 humà, indicant la seva alta conservació entre espècies (90). No obstant, hi ha una forma menor d'*splicing* alternatiu en humans que li manca els exons 5 i 8 (109).

Si es realitza un anàlisi de les modificacions post-traduccionals de VASH1 a partir d'un extracte proteic de cèl·lules endotelials HUVEC es poden identificar quatre isoformes per la tècnica de *Western blot*: dues bandes majoritàries de 42 i 36 kDa, i dues minoritàries de 32 i 27 kDa. D'aquestes, la forma majoritàriament secretada és la isoforma de 42 kDa, mentre que les isoformes 36 i 27 kDa s'acumulen dins la cèl·lula endotelial. Una de les característiques dels factors que regulen l'angiogènesi com VEGF i FGF2 és la seva capacitat d'unió als proteoglicans heparan sulfats associats a la superfície cel·lular i a la matriu extracel·lular, a través de les regions bàsiques. D'aquesta manera aquests factors queden retinguts en la matriu extracel·lular per la unió amb aquests heparan sulfat funcionant com un lloc d'emmagatzematge de factors angiogènics (46). S'ha vist que VASH1 també presenta aquesta activitat d'unió a heparan sulfat, sent el domini bàsic del C-terminal essencial per la seva afinitat a l'heparan, així com essencial per l'efecte antiangiogènic de VASH1, i que són les isoformes de 42 i 36 kDa les que inclouen aquest domini bàsic C-terminal (110). L'heparan sulfat promou la interacció entre factors angiogènics i els seus receptors en cèl·lules endotelials, i per tant, la concentració local de heparan sulfat i la seva interacció amb promotors i inhibidors de l'angiogènesi és important per modular el procés angiogènic (98).

Existeix un gen homòleg a VASH1, que s'ha anomenat VASH2 amb una seqüència de 355 aminoàcids. La homologia entre les seqüències d'aminoàcids d'ambdós gens és d'un 52,5%. El gen de la Vasohibin-2 és *FLJ12505* i està compostat per 8 exons i 7 introns localitzats al cromosoma 1q32.3 en humans (108).

Els primers estudis sobre les funcions d'aquest gen homòleg, van determinar que tan VASH1 com VASH2 presentaven efectes antiangiogènics semblants tan en assajos *in vivo* en la formació de neovasos, com *in vitro* en la formació de xarxes en matrigel. No obstant, VASH2 s'expressa en les cèl·lules endotelials a un nivell menor que VASH1 i no és induïble pels mateixos factors que VASH1 ni tampoc se sap si comparteixen la mateixa ruta de senyalització. De la mateixa manera que VASH1, VASH2 no presenta cap pèptid senyal a l'extrem C-terminal tot i que també és secretat (108). No obstant, el perfil d'expressió de VASH1 i VASH2 és completament diferent suggerint que les cèl·lules que expressen VASH1 i VASH2 són diferents (111) (Figura 10). Estudis posteriors, han descrit però que Vasohibin-1 i Vasohibin-2 presenten una localització diferent i a més a més tenen funcions oposades i complementàries (112). De fet, estudis recents sobre l'expressió d'ambdós factors, VASH1 i VASH2, han demostrat que presenten un patró espaciotemporal diferent. VASH1 està present a les cèl·lules endotelials no proliferatives quan l'angiogènesi està finalitzant, a la zona terminal, però en canvi s'expressa lleument al front d'*sprouting*. Mentre que VASH2 s'expressa principalment en les cèl·lules mononuclears derivades de medul·la òssia (MNC, de l'anglès *marrow-derived mononuclear cells*) al front d'*sprouting* i en canvi s'expressa lleument a la zona terminal (112).

Quan es va estudiar l'efecte de VASH1 i VASH2 exògens sobre l'angiogènesi, es va observar que quan es transferia VASH1 mitjançant vectors adenovirals que contenien el gen de VASH1 humà en ratolins, aquest era capaç d'inhibir l'angiogènesi en el front d'*sprouting*, però no influïa en la vascularitat a la zona terminal. Això implica que tot i que VASH1 endogen no sigui el principal regulador de la frenada de l'*sprouting*, quan s'aplica exògenament aquest és capaç d'inhibir l'angiogènesi al front d'*sprouting* on el VASH1 endogen és escàs, i en canvi tingui poc efecte a la zona terminal on el VASH1 endogen ja és abundant. En el cas de la transfecció mitjançant adenovirus de VASH2, aquest no causava canvis en el front d'*sprouting*, però sostenia l'augment de vascularitat en la zona terminal. Aquests efectes oposats de VASH1 i VASH2 van ser confirmats *in vitro* per transfeccions en cèl·lules endotelials (ECs). Per tant, VASH1 i VASH2 controlen la promoció i terminació d'angiogènesi de manera complementària, i a més a més tenen diferents punts d'acció depenen si la seva expressió es dona de forma endògena o exògena (112).

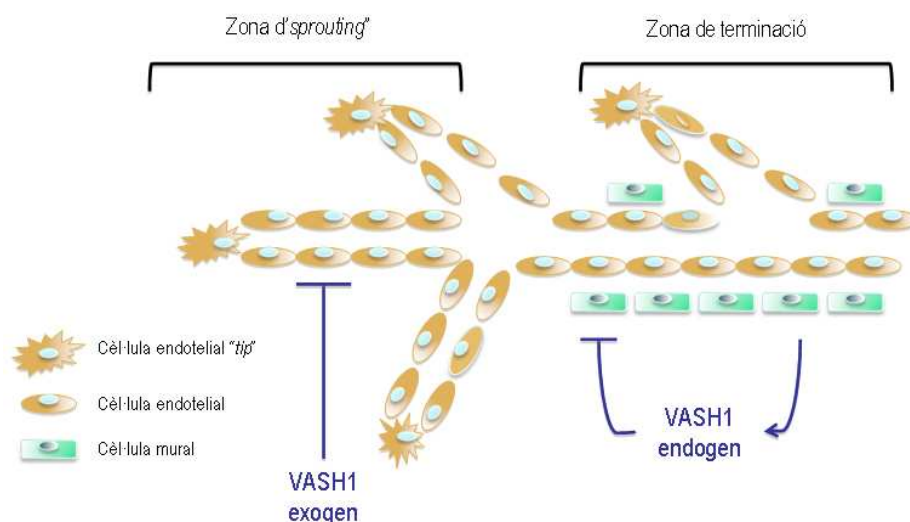


Figura 11: Actuació de la proteïna exògena o endògena de VASH1. (Adaptat de Sato Y, Eur Cytokine Netw. 2009 Dec;20(4):220-4).

Es creu que VASH1 i VASH2 deuen tenir el mateix receptor (tot i que aquest encara no ha sigut identificat) i que per tant, VASH2 sigui un agonista lleu que antagonitza VASH1 en certes condicions (112).

2.3.2 Expressió i regulació de Vasohibin

VASH1 s'expressa tan al nucli com el citoplasma de les cèl·lules endotelials (109). No obstant, estudis posteriors han demostrat que VASH1 no només s'expressa en cèl·lules endotelials sinó que també s'expressa en altres tipus cel·lulars com per exemple en cèl·lules mare hematopoètiques del moll de l'ós (de l'anglès, *bone marrow hematopoietic stem cells*) (113), i en múscul estriat, on s'ha observat una major expressió en els músculs menys vascularitzats definint VASH1 com a regulador de l'angio-adaptació del múscul en situacions tan fisiològiques com patològiques, entre d'altres (114).

Actualment, es coneix poc sobre el mecanisme de regulació de Vasohibin. No obstant, hi ha indicis que indicarien que l'activació de VASH1 endogen induïda per VEGF es donaria via el receptor VEGFR2 i no per VEGFR1, i si mirem més avall de la via, més concretament a través de PKC δ . És interessant observar que PKC δ és la isoforma que causa resposta antiangiogènica en les cèl·lules endotelials, ja que s'ha observat que quan es transfecten els gens de PKC α o PKC δ en les cèl·lules endotelials de la microvasculatura de rata, el PKC α exerceix un efecte proangiogènic, mentre que el PKC δ presenta un efecte antiangiogènic (115). A més a més, la

sobreexpressió de PKC δ en cèl·lules endotelials sinusoïdals hepàtiques de rata promou la seva apoptosi de manera independent de VEGF (116). Aquests fets podrien fer pensar que els efectes antiangiogènics de PKC δ en cèl·lules endotelials com ara les sinusoïdals de rata, podrien ser derivats en part per inducció de Vasohibin. Per altra banda, factors com TNF α , IL1 i IFN s'ha vist que redueixen l'expressió de Vasohibin induïda per VEGF (107).

S'ha identificat una proteïna d'unió tant a VASH1 com a VASH2 amb dominis *colied-coil* utilitzant la tècnica de l'anàlisi de doble híbrid de llevat (de l'anglès, *yeast two hybrid analysis*). Es tracta d'una proteïna composta per 66 aminoàcids i que han anomenat SVBP, (proteïna petita d'unió a Vasohibin, de l'anglès *Small Vasohibin Binding Protein*) (117). De la mateixa manera que VASH1 i VASH2, SVBP no presenta cap seqüència senyal clàssica a la regió C-terminal, i el seu mRNA s'expressa de manera constitutiva. L'anàlisi de les funcions de SVBP revela que s'uneix formant heterodímers amb les Vasohibines dins les cèl·lules, on s'ha vist que col·localitzen, i aquesta unió facilita la secreció de VASH. S'ha observat que la inhibició de SVBP impedeix la secreció de VASH, fent que les Vasohibines que es mantenen dins la cèl·lula siguin poliubiquitinatzades i degradades via proteosoma. Per aquest motiu, es creu que SVBP augmenta l'estabilitat de VASH, prevenint la seva ubiquitinació. SVBP actuaria doncs com a xaperona que regula la secreció de VASH en les cèl·lules endotelials i que contribueix a l'activitat antiangiogènica de VASH1 (117).

Recentment s'ha descrit que VASH1, a més a més de ser un factor antiangiogènic, també podria ser un factor antioxidant que protegeix les cèl·lules endotelials de l'estrès oxidatiu via l'activació de les proteïnes dismutasa de superòxid (SOD2) i sirtuina (SIRT1), les quals disminueixen els nivells de ROS (101). Com s'ha descrit anteriorment, l'estrès oxidatiu és un dels factors inductors de l'angiogènesi en múltiples patologies, entre elles la cirrosi i hipertensió portal, (34-36), per aquest motiu es podria pensar que una de les funcions del VASH1 endogen es frenar aquesta angiogènesi induint l'expressió de factors antioxidants que frenarien una neovascularització patològica.

Per altra banda, un dels altres factors implicats en l'angiogènesi és el factor de transcripció inductor de VEGF per hipòxia, HIF-1 α . En relació a aquest fet, s'ha descrit que Vasohibin podria en algunes situacions exercir el seu paper com a regulador per retroalimentació negativa de l'angiogènesi a través de la degradació del factor de transcripció HIF-1 α . Vasohibin elevaria els nivells de PHD (de l'anglès, *prolyl hydroxylase*), el qual regula la prolil hidroxilació de HIF i en desencadenaria la seva ubiquitinació i degradació mitjançant proteosoma, d'aquesta manera inhibint la proliferació de les cèl·lules endotelials (118).

2.3.4 VASH1 en diferents patologies

VASH1 presenta una activitat antiangiogènica en diferents situacions patològiques (111) com és el cas de creixement de tumors (119-122), arteriosclerosi (123), degeneració macular dependent de l'edat (AMD, de l'anglès *age dependent macular degeneration*), neovascularització de la retina i retinopatia diabètica (124, 125), entre d'altres. No obstant, malgrat la presència de factors antiangiogènics, com VASH1, en aquestes malalties es continua donant una angiogènesi patològica. Aquest fet és indicador que els factors promotors d'aquesta angiogènesi són massa forts per ser controlats pels inhibidors angiogènics endògens. No obstant, quan se suplementa d'una manera exògena una quantitat suficient d'antiangiogènic, llavors aquest sí que és capaç de frenar l'angiogènesi patològica, com és el cas de la suplementació de Vasohibin en l'angiogènesi tumoral (122) o la arteriosclerosi (123), la qual cosa implica possibles aplicacions clíniques d'aquesta sobreexpressió.

2.3.4.1 En arteriosclerosi

La formació de la capa neoíntima dels vasos és causa fonamental de l'estrenyiment de les artèries per diverses situacions que inclouen l'arteriosclerosi i la restenosi. L'anàlisi de l'expressió de VASH1 en la paret de les artèries ha demostrat que hi ha més expressió en les artèries amb lesions arterioscleròtiques que en artèries normals, i que la sobreexpressió exògena de VASH1 a través de vectors adenovirals redueix significativament la formació de la capa neoíntima de vasos, la infiltració de macròfags i l'angiogènesi a l'adventícia en el model de col·locació de braçalet a l'artèria femoral de ratolins (123).

2.3.4.2 En càncer

VASH1 presenta un efecte antiangiogènic i és bon marcador pronòstic en molts càncer com en càncer de mama (119, 120, 126), en càncer de cèrvix (127), en carcinoma urotelial del tracte urinari superior (128), en hepatocarcinoma (129) i en carcinoma de cèl·lula renal (130).

És ben conegut que en tumors hi ha un augment de factors angiogènics com VEGF o FGF-2, els quals indueixen l'expressió VASH1 en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis tumorals. Aquesta expressió facilita la terminació de l'angiogènesi del tumor tot i que no és capaç de bloquejar-la en l'inici. No obstant, en un model de melanoma en ratolí es va observar que quan VASH1 se subministrava de manera exògena, sí que era capaç de reduir l'àrea vascular dels tumors i la formació de vasos grans (131).

Un efecte semblant es va observar també en ratolins BALB/c on se'ls introduïen cèl·lules d'hepatocarcinoma com a tumor primari, i que posteriorment la injecció per via vena de la cua de vectors adenovirals que expressaven VASH1 (AdVASH1), suposava una reducció significativa de la vascularització tumoral, i com a conseqüència del volum del tumor, en comparació amb els ratolins control on se'ls havia injectat AdLacZ. Això indicava una potent inhibició de l'angiogènesi tumoral per part de VASH1 exogen (122).

A banda de l'efecte antiangiogènic de VASH1, també s'ha observat que la sobreexpressió exògena de VASH1 mitjançant adenovirus presenta un efecte antilimfoangiogènic en un model de xenògrafs tumoral en ratolí on se li ha inoculat una línia cel·lular de càncer de cèl·lula no-petita de pulmó com a tumor primari, amb l'avantatge que VASH1 no té efecte en la vasculatura normal (ni en vasos limfàtics ni en sanguinis) (132). Lligat amb aquestes observacions, en un altre estudi d'angiogènesi tumoral en models animals s'ha observat que el VASH1 endogen està expressat en les cèl·lules endotelials tumorals amb la finalitat d'acabar l'angiogènesi tumoral i que quan se suplementa de manera exògena, VASH1 es capaç de inhibir l'angiogènesi ja en els seus inicis, madurar els vasos restants i incrementar els efectes antitumorals de la quimioteràpia. A més a més, en ratolins *knockout* per VASH^{-/-} el creixement tumoral era major i amb una àrea vascular més gran en comparació amb els ratolins^{wt} control (121).

Aquests resultats semblen indicar que la sobreexpressió de VASH1 usant adenovirus recombinants com a teràpia antiangiogènica pot prevenir l'angiogènesi tumoral i el creixement del tumor sense efectes secundaris aparents. Això és gràcies a que l'efecte de Vasohibin exogen és suficient per inhibir les cèl·lules endotelials en l'angiogènesi tumoral, però no per inhibir el procés d'angiogènesi que es produeix en condicions fisiològiques (133). Aquesta manca d'efecte en l'angiogènesi fisiològica quedaria evidenciada pel fet que en un model de cicatrització cutània en el dors de ratolins la sobreexpressió exògena de VASH1 mitjançant adenovirus no presentava cap diferència de cicatrització en comparació amb els controls injectats amb AdLacZ. A més a més, tampoc es veien efectes en el pes, en el comportament global, rendiment neuromuscular o en l'hematopoesi d'aquests ratolins, indicant la falta d'efecte de l'adenovirus sobre la fisiologia de l'animal (122). Així doncs, aquest estudi indicaria que els tractaments amb adenovirus recombinant de Vasohibin poden ser una estratègia potencial com a teràpia contra l'angiogènesi tumoral en clínica, sense afectar la vasculatura normal (122).

2.3.4.3 En patologies de l'ull

La **neovascularització de la còrnia** és una malaltia en què es perd el privilegi immune de la còrnia produint disminució visual. Aquesta es basa en un creixement intern de nous vasos sanguinis i es creu que és a causa d'un desequilibri entre factors angiogènics i antiangiogènics. S'ha observat en un model de ratolí de neovascularització de la còrnia que la sobreexpressió de VASH1 mitjançant un vector adenoviral redueix significativament la neovascularització patològica (134).

En la **retinopatia isquèmica**, usant un model murí on es produeix isquèmia a la retina han observat que la inhibició de Vasohibin causa un increment de la neovascularització de la mateixa però que en canvi, en el mateix model, una suplementació mitjançant una injecció intraocular de proteïna recombinant o un vector adenoviral que expressi Vasohibin té un efecte supressor de la neovascularització (125).

En pacients amb **retinopatia diabètica proliferativa** (PDR, de l'anglès *proliferative diabetic retinopathy*), a causa d'una situació d'hipòxia és donen processos angiogènics per un augment de varis factors de creixement, entre ells VEGF. S'ha observat en aquests pacients, una expressió més elevada de VASH1 en comparació amb pacients control. Per tant, hi hauria una correlació entre l'expressió de VEGF i de VASH1 suggerint un paper de VASH1 com a element de fre de l'angiogènesi que es dona durant el procés d'aquesta malaltia. D'aquesta manera, i a partir dels resultats obtinguts en injectar per via intraocular VASH1 recombinant en retinopatia isquèmica, és podria considerar VASH1 com un bon candidat per el tractament també de la retinopatia diabètica (124).

Tots aquests resultats suggeririen un paper rellevant de VASH1 endogen en la frenada de la neovascularització de l'ull i que una sobreexpressió exògena del mateix podria ser beneficiós en situacions on es dona neovascularització patològica ocular.

2.3.4.4 En fibrosi pulmonar

En la progressió de la fibrosi pulmonar, tenen un paper fonamental els processos angiogènics i de remodelació vascular en el pulmó.

En un estudi recent, s'ha observat que la sobreexpressió de Vasohibin mitjançant adenovirus en ratolins amb fibrosi pulmonar induïda per bleomicina, tan en una fase d'inflamació inicial com en fases fibròtiques tardanes, dona un efecte atenuant de la fibrosi mitjançant la inhibició de l'angiogènesi per disminució de l'expressió de VEGF. A més, es va veure una reducció de la infiltració de limfòcits, de la secreció de citokines i de la proliferació de

fibroblasts, tot i que en aquest estudi no es descriuen quins serien els mecanismes responsables (135).

2.3.4.5 En nefropaties

En un model de **nefropatia diabètica de tipus I** de ratolí s'ha demostrat que la sobreexpressió de VASH1 a través de la injecció intravenosa d'un adenovirus AdVASH1 millora les alteracions renals característiques d'aquesta malaltia, entre elles una disminució de l'àrea glomerular endotelial CD31⁺, de la infiltració de monòcits/macròfags, de l'acumulació de col·lagen tipus IV, així com de l'expressió del factor profibròtic TGFβ en comparació amb els ratolins diabètics tractats amb AdLacZ (136). Aquests efectes també s'observen en un model de **nefropatia diabètica de tipus II** utilitzant el ratolí obès amb diabetis de tipus II (137).

2.4 Factor derivat de l'epiteli pigmentari (PEDF)

El factor derivat de l'epiteli pigmentari, PEDF (de l'anglès *Pigment Epithelium-Derived Factor*), també anomenat SERPINF1 (de l'anglès *serine proteinase inhibitor clade F member 1*), va ser descrit inicialment com un factor neurotròfic secretat per les cèl·lules epitelials de la retina (138-140). No obstant, posteriorment, *Dawson D.W et al* (97) el van descriure també com a un potent inhibidor endogen de l'angiogènesi.

En condicions fisiològiques normals, existeix una activitat antiangiogènica en la còrnia i la retina que permet que la vasculatura d'aquests compartiments de l'ull es mantingui quiescent. La pèrdua d'aquesta situació de quiescència, i per tant, activació de la neovascularització, produeix diverses malalties oculars que poden desencadenar ceguera. *Dawson D.W et al* van realitzar un estudi per identificar factors antiangiogènics en l'ull regulats pel gen de supressió tumoral de retinoblastoma (Rb). L'anàlisi de les proteïnes sobreexpressades en aquest context va permetre identificar una proteïna d'uns 50 kDa anomenada PEDF. Aquesta era capaç d'inhibir potentment la neovascularització en la còrnia de rata *in vivo*, i era capaç d'inhibir la migració de les cèl·lules endotelials de forma dependent de dosi *in vitro* de manera més activa que altres antiangiogènics com angiostatines, trombospondina-1 o endostatina. Per altra banda, van observar que l'absència de PEDF per neutralització amb un anticòs anti-PEDF induïa la formació de nous vasos en la còrnia de rata tot i l'absència d'inductors angiogènics. A més a més, PEDF inhibia la migració de les cèl·lules endotelials induïda per factors angiogènics com PDGF, VEGF, IL-8 i aFGF, tot suprimint la proliferació cel·lular i induint apoptosi de les cèl·lules endotelials dels neovasos en formació sense afectar els vasos preexistents ja madurs (97).

PEDF s'expressa durant el desenvolupament embrionari suggerint que pot estar involucrat en el patró cel·lular i en la vasculogenèsi inicial, a causa de la seva capacitat d'unió a la matriu extracel·lular, fet que li permet participar en la definició del desenvolupament dels vasos (91). En adults, PEDF és sintetitzat per un ampli ventall d'òrgans incloent sistema nerviós central, cervell, medul·la espinal, retina, múscul esquelètic, ós, cor, placenta, testicles, ovaris i especialment fetge (tan fetal com en adult) (141, 142). Alguns d'aquests òrgans secreten el PEDF al torrent sanguini, on el trobem a una concentració considerable de 100 nM, fet que permet que aquest sigui purificable de plasma humà (143). A nivell cel·lular, s'expressa en fibroblasts quiescents per mantenir l'homeòstasi de la vasculatura, en cèl·lules endotelials i en cèl·lules epitelials pigmentades de la retina entre d'altres (144).

2.4.1 Estructura i homologies de PEDF

PEDF és una glicoproteïna secretada de 50 kDa la qual presenta homologia tan en la seqüència com en l'estructura secundària i terciària amb la família de les serpines (proteïnes inhibidores de les serina proteases). No obstant, PEDF pertany al subgrup de serpines que no inhibeixen les proteases (91, 142, 145, 146).

La proteïna de PEDF humana està constituïda per 418 aminoàcids, codificats per un sol gen que se situa en el cromosoma 17p13.3. Aquest presenta 8 exons i 7 introns amb una alta conservació en la filogènia (142). Com altres serpines, conté una regió anomenada *Reactive Center Loop* (RCL). Tot i que no se sap ben bé quina és la seva funció, es creu que aquesta regió és una diana per a la interacció inicial amb altres factors i molècules de la matriu extracel·lular i de control del sistema del reticle endoplasmàtic (ER) que poden augmentar l'efecte antiangiogènic de PEDF i les seves funcions neuroprotectores permetent-ne la seva secreció (147). Per altra banda s'ha identificat una seqüència senyal de secreció altament conservada entre espècies de naturalesa hidrofòbica que permet el seu transport i secreció per mecanismes convencionals dependents del ER/Golgi, fet que indica que les principals funcions es donen en compartiments extracel·lulars o a la superfície de la cèl·lula diana. No obstant, sembla ser que també presenta una senyal de localització nuclear (NLS) i una glucosilació a l'extrem C-terminal, i que per tant, a part de la seva secreció, PEDF pot migrar al nucli per desenvolupar funcions com diferenciació cel·lular i regulació específica del procés de cicle cel·lular com ara la transició de G_1 a G_0 . En efecte, PEDF s'expressa en estadis de G_0 del cicle cel·lular, tot i que es perd en senescència de fibroblasts, i augmenta la supervivència i

diferenciació de les neurones en cultiu. Per aquest motiu PEDF també se l'ha anomenat EPC-1 (de l'anglès, *Early Population Doubling cDNA-1*) (148).

La seva estructura cristal·lina mostra un únic motiu inhibidor serpina proteasa i uns dominis d'unió a heparina i col·lagen, els quals són importants per les seves funcions antiangiogèniques (91, 142, 145, 146) (Figura 12).

Dominis d'unió a col·lagen i a heparina. La capacitat d'unió de PEDF a heparina o a col·lagen es dona gràcies a que presenta una càrrega asimètrica. Per una banda, té una part amb alta densitat de residus bàsics (positius) que interaccionen amb heparina i glicosaminoglicans, mentre que en el costat oposat hi ha una àrea rica en residus àcids, com el glutàmic i l'aspàrtic, carregada negativament que permet la unió per interaccions iòniques amb les àrees carregades positivament de les molècules de col·lagen de tipus I, i amb menys afinitat a les de col·lagen tipus III i tipus II, per aquest ordre (149). Aquesta unió a col·lagen permet que hi hagi un reservori de PEDF a la matriu extracel·lular d'algunes cèl·lules que pot ser clau en la regulació de la biodisponibilitat de PEDF i és essencial per a les seves activitats antiangiogèniques i neurotròpiques (143, 150, 150, 151).

Pel que fa al lloc d'unió a heparina que presenta PEDF, com passa amb altres serpinines, també és important per a la seva activitat antiangiogènica (98, 145, 146, 152). Això és degut a que la unió de PEDF a heparina li produeix un canvi conformacional que podria permetre l'exposició de l'epítip involucrat en la unió al receptor (el qual no està plenament identificat), i que per tant podria regular les interaccions amb els receptors de membrana cel·lular, com a mínim en cèl·lules de retinoblastoma (153, 154).

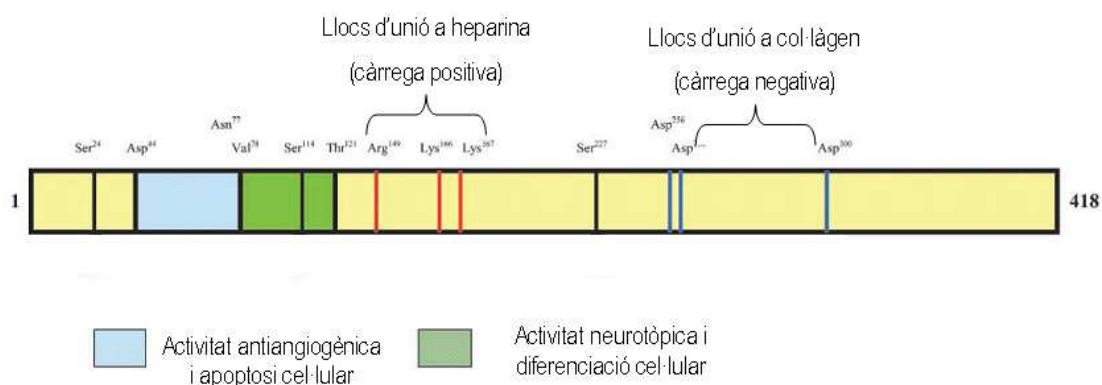


Figura 12: Diagrama esquemàtic dels dominis funcionals de PEDF (Adaptat de Ek ET et al Mol Cancer Ther. 2006 Jul;5(7):1641-6).

2.4.2 Regulació, senyalització i funció de PEDF

PEDF està associat a molts processos biològics importants: antitumorals, antiangiogènics, neurotròfics, neuroprotectors i de vasopermeabilitat, així com antiinflamatoris i antioxidants (91, 97, 98, 155, 156). Actualment, existeixen evidències que indiquen que hi ha regions separades en PEDF que porten a terme les seves dues funcions principals: neuroprotectora i antiangiogènica, respectivament (98) (Figura 12).

Tot i que no s'ha identificat la via d'actuació de PEDF, s'han proposat diferents mecanismes d'acció. Analitzant els estudis realitzats fins ara semblaria que les vies per les quals PEDF senyalitza neurones i cèl·lules endotelials activades per VEGF involucrarien principalment: 1) la via Akt/NFκB, la qual està lligada amb la neuroprotecció, 2) la via de MAPK, la qual està associada amb la diferenciació i proliferació, i 3) la via de les caspases i la via de mort cel·lular Fas/FasL, les quals estan relacionades amb els seus efectes apoptòtics, tot i que també s'han observat efectes apoptòtics de PEDF independents d'aquestes vies (91, 98).

Funció antiangiogènica. Tot i que no està clar quines són les vies implicades en els efectes antiangiogènics de PEDF, alguns autors han proposat possibles mecanismes descrits breument a continuació.

Existeixen estudis que indicarien que l'efecte antiangiogènic de PEDF seria per una banda per la seva acció sobre la ruta de senyalització de VEGF, i la seva capacitat d'inhibició de la migració cel·lular induïda per varis factors angiogènics com bFGF, PDGF, IL-8 o aFGF (97); i per l'altra, a través de la seva capacitat d'inducció de l'apoptosi de les cèl·lules endotelials proliferants (157, 158).

Aquest efecte antiangiogènic de PEDF a través de l'actuació sobre la ruta de VEGF s'ha demostrat en varis estudis. Per exemple, en una línia cel·lular d'osteosarcoma es va observar que l'addició de la proteïna de PEDF de manera exògena disminuïa VEGF tan a nivell de mRNA com de proteïna, suggerint una possible inhibició de l'angiogènesi tumoral per part de PEDF (159). En un altre estudi, usant un assaig *in vitro* amb cèl·lules endotelials de pulmó deficientes en PEDF (PEDF^{-/-}) es va veure una capacitat de migració major d'aquestes cèl·lules així com un augment de l'expressió de VEGF, VCAM-1 i iNOS, amb un concomitant increment de la producció de NO, sense afectar però l'expressió dels receptors VEGFR1 i VEGFR2 (160). Aquest efecte de PEDF sobre l'expressió de VEGF també es va observar en patologies com la retinopatia diabètica (caracteritzada per una disminució de PEDF), on la sobreexpressió exògena de la proteïna de PEDF inhibia els nivells de VEGF induïts per hipòxia en les cèl·lules endotelials

de la retina. No obstant, cal destacar que només tenia tal efecte en condicions patològiques però no en condicions fisiològiques, indicant que PEDF té un paper important en el manteniment de nivells normals de VEGF a la retina (156).

Altres autors han proposat un mecanisme de PEDF d'inhibició de l'angiogènesi mitjançant la inducció d'un tall a l'extrem C-terminal del receptor VEGFR1 en el domini transmembrana. Aquest tall es donaria per acció de la γ -secretasa, l'activitat de la qual s'ha vist augmentada per PEDF, fent que el domini intracel·lular del receptor s'alliberi de la membrana plasmàtica i no es pugui translocar al nucli impedit-ne així la cascada de senyalització. És interessant destacar que aquest mecanisme antiangiogènic de PEDF només es produeix en presència de VEGF. Això és degut a que la unió del VEGF al VEGFR1 induïx un canvi conformacional en el receptor el qual és necessari perquè la γ -secretasa pugui proteolitzar-lo (161). També s'ha observat que PEDF pot inhibir la fosforilació de VEGFR1 (161), així com disminuir la fosforilació del VEGFR2 en cèl·lules endotelials HUVEC en cultiu, reduint d'aquesta manera l'activitat angiogènica de VEGF(98). Més endavant, han demostrat que PEDF també regula la permeabilitat vascular induïda per VEGF, tan *in vitro* com *in vivo*, prevenint la dissociació de les unions estretes i les unions adherents entre les cèl·lules endotelials via γ -secretasa per translocació dels VEGFRs (162).

Per altra banda PEDF podria presentar una funció antiangiogènica a través d'un efecte apoptòtic. Quan hi ha un estímul angiogènic (per exemple; VEGF, bFGF o IL-8), les cèl·lules endotelials expressen el receptor Fas (també conegut com a CD95). D'aquesta manera les cèl·lules endotelials proliferants queden marcades per tal de sensibilitzar-les a l'apoptosi quan s'expressi el seu lligand FasL (CD95L). Factors inhibidors de l'angiogènesi com TSP-1 i PEDF induïxen un increment de l'expressió d'aquest lligand FasL; induint d'aquesta manera l'apoptosi de les cèl·lules endotelials noves que migren sota la influència de factors proangiogènics, les quals expressen nivells relativament alts del receptor Fas, i per tant, són les primeres en entrar en apoptosi (155, 163). En canvi, en les cèl·lules endotelials madures, el receptor de Fas normalment s'expressa a nivells més baixos, i per tant, aquestes cèl·lules estan protegides de l'apoptosi induïda per PEDF (155, 163). A més a més, PEDF reduiria l'expressió de l'inhibidor de l'apoptosi c-FLIP (163, 163). No obstant, s'ha observat que en un model murí de retinopatia amb ratolins deficientes en Fas o FasL, PEDF encara és capaç d'inhibir la neovascularització, i per tant, es postula que ha d'haver també altres vies implicades en l'apoptosi de les cèl·lules endotelials a més a més de la via Fas/FasL, com a mínim pel que fa a retinopaties isquèmiques (164).

Un altre mecanisme proposat és que la inducció de l'apoptosi que s'ha observat en cèl·lules HUVEC *in vitro* per part de PEDF, està associada a l'activació de la proteïna p38 MAPK, mitjançant la seva fosforilació. Un cop p38 MAPK està activada, aquesta proteïna regula el tall de múltiples caspases com la caspasa 3, 8 i 9 induint així l'apoptosi. Per tant, l'acció apoptòtica de PEDF seria dependent en part de l'activació de caspases, les quals es veuen augmentades amb l'expressió de PEDF via p38 MAPK (98, 158).

És important destacar que aquest efecte proapoptòtic s'ha descrit àmpliament però que en altres tipus cel·lulars (no endotelials) PEDF podria tenir inclús efectes antiapoptòtics (102, 165).

Funcions antifibròtiques. També s'ha descrit una funció de PEDF antifibròtica en diferents patologies gràcies a el seu paper regulador de la quiescència dels fibroblasts (148, 166-169) que el fan un factor d'estudi atractiu en la cirrosi i hipertensió portal a causa de la importància que tenen els processos fibròtics en el desenvolupament d'aquestes malalties. A continuació en descriurem alguns exemples.

Per una banda, es va observar que la sobreexpressió mitjançant vectors adenovirals de PEDF en un model de rata amb nefropatia diabètica millorava la fibrosi i la proteïnúria del ronyó d'aquests animals a través d'una disminució significativa dels nivells de fibronectina, així com de l'expressió i funció dels factors profibròtics TGF- β 1 i CTGF. A més a més, també es va observar que la sobreexpressió de PEDF augmentava un dels principals factors degradadors de matriu extracel·lular, la metal·loproteinasa-2 (MMP-2) (167). De manera similar, en un model d'infart de miocardi agut, la sobreexpressió de PEDF reduïa la fibrosi cardíaca a través de la disminució de TGF- β 1 i de l'expressió de col·lagen de tipus III, millorant d'aquesta manera l'ejecció ventricular esquerra (102). Aquests efectes antifibròtics també es van observar en dos models de fibrosi hepàtica primerenca en ratolí, mitjançant tractament amb CCl₄ i tioacetamida respectivament, on van veure que una sobreexpressió de PEDF mitjançant virus adeno-associats de PEDF millorava la fibrosi hepàtica per una disminució d' α -SMA i MCP-1, suprimint l'activació de les HSC per via de la inducció de PPAR γ i induint-ne l'apoptosi (169).

Per altra banda, en un model de pancreatitis de ratolí, el qual està associat a processos fibròtics, es va observar que l'expressió de PEDF augmentava en animals amb pancreatitis induïda, en comparació als grups control, i que aquesta expressió augmentada era encara més elevada en ratolins que havien consumit una dieta amb etanol. A més a més, es va observar que la manca de PEDF en ratolins PEDF-*null* produïa un augment de l'expressió d' α -SMA i de factors profibrogènics com TGF- β 1, PDGF, col·lagen I i FGF2, promovent d'aquesta manera una

fibrosi més primerenca en comparació amb els ratolins control PEDF^{wt}, després de la inducció de la malaltia. Malgrat això, en aquests ratolins PEDF-*null* no es veia impedida la degradació de fibra en etapes més avançades. A més a més, l'absència de PEDF s'associava amb l'expressió augmentada de TSP-1, factor activador de TGF- β 1, amb capacitat d'unió a col·lagen i regulador d'angiogènesi. Aquests resultats indicarien que l'habilitat d'inhibició de processos profibròtics podria ser regulada en part per la supressió de TSP-1, suggerint que PEDF podria tenir funcions com a protector en pancreatitis experimental, i en altres malalties caracteritzades per una resposta fibròtica, actuant com una mesura compensatòria per inhibir aquesta fibrogènesi (170).

No obstant, en casos com la fibrosi pulmonar idiopàtica o la glomerulonefritis, a diferència d'altres patologies on un excés d'angiogènesi està associat a processos fibròtics, han observat que una angiogènesi reduïda està associada a una resposta fibròtica progressiva (171, 172). En el cas de la fibrosi pulmonar idiopàtica, han descrit una densitat vascular regionalment disminuïda amb una elevada expressió de PEDF i una disminució de VEGF en els focus fibròtics (llocs on es dona una síntesi activa de matriu i una densitat vascular baixa). Aquesta expressió augmentada de PEDF està lligada a una expressió elevada de la citoquina profibròtica TGF- β i d' α -SMA en els focus fibròtics, ja que aquesta estimula l'expressió de PEDF en els fibroblasts, i per tant podria ser un dels reguladors de PEDF durant el procés fibròtic en la fibrosi pulmonar idiopàtica (171). En el cas de la glomerulonefritis, es va observar que PEDF inhibia la sobreexpressió de HIF1 α induïda per hipòxia produint una disminució de la vascularització, que en aquest cas promovia la fibrogènesi (172). Els resultats dispars en la implicació de PEDF en malalties renals, on en alguns casos sembla que presenti un efecte beneficiós i en altres que estigui associat a una reducció de la funció renal, es podria explicar segons el moment de la progressió de la malaltia i al fet que tan una falta com un excés d'angiogènesi poden desencadenar a processos fibròtics en ronyó (167). Per tant, en aquests casos concrets PEDF funcionaria com un factor profibròtic.

Funció neuroprotectora de PEDF. PEDF és un factor neurotròfic amb capacitat de protegir neurones de diferents regions del sistema nerviós central contra un ampli ventall d'accions neurodegeneratives que inclouen l'axotomia, la excitotoxicitat per glutamat i l'estrès oxidatiu (98). Aquesta neuroprotecció de PEDF estaria regulada a través del factor nuclear kappa-B (NFkB). Per exemple, en les cèl·lules de grànuls de cerebel, el tractament amb PEDF estimula la fosforilació de I κ B, donant una activació i translocació de NFkB al nucli. A continuació, NFkB indueix l'expressió de múltiples gens antiapoptòtics i neuroprotectors que controlen la supervivència cel·lular, la proliferació i mort d'aquestes cèl·lules (98, 146).

Com s'ha indicat anteriorment, PEDF també presenta **funcions antioxidants i antiinflamatòries** (102-105). En el cas de la cirrosi hepàtica, aquestes propietats es donarien en part gràcies al seu efecte inhibitori de la proteïna proinflamatòria i protrombòtica Caveolina-1, conegut inhibidor de l'activitat d'eNOS i inductor de disfunció endotelial que es troba augmentat en estadis avançats de la cirrosi hepàtica (103, 104).

2.4.2.2 Possibles receptors de PEDF

El fet que PEDF presenti efectes neurotròfics i de diferenciació en el sistema nerviós i algunes cèl·lules tumorals, i un efecte apoptòtic en cèl·lules endotelials sembla aparentment contradictori i suggeriria que PEDF pot actuar per via de múltiples receptors (146). No s'ha identificat un receptor específic de PEDF i a causa de la dificultat en identificar-lo es pot pensar que PEDF segueix una ruta de senyalització no clàssica. A continuació descriurem possibles candidats.

S'ha observat que PEDF s'uneix com a mínim a dos receptors: un receptor de 60 kDa, en cèl·lules endotelials, i un receptor de 80 kDa, el qual s'ha trobat en l'epiteli de la retina i en hepatòcits (173, 174). Per altra banda, *Filleur et al 2005* han demostrat, que existeixen dos epitops funcionals de PEDF: un pèptid 34-mer i un pèptid 44-mer. El pèptid 44-mer s'uniria al receptor de 80 kDa i induiria l'efecte neurotròfic, i el pèptid de 34-mer s'uniria al receptor de 60 kDa induint apoptosi, bloquejant la migració de cèl·lules endotelials i per tant inhibint l'angiogènesi (146). Aquests receptors sembla que correspondrien, per una banda, a un receptor de laminina (no integrina) de 37/64 kDa (LR) el qual en facilita la seva activitat antiangiogènica i per l'altra banda un receptor de 80 kDa, que han anomenat PEDF-R, iPLA₂ζ o ATGL segons l'autor. El receptor de laminina, té un paper important en proliferació cel·lular, migració, angiogènesi i metàstasi tumoral. Aquest interacciona amb PEDF en la membrana cel·lular de les cèl·lules endotelials i n'indueix l'apoptosi, n'inhibeix la migració i bloqueja l'angiogènesi induïda per factors proangiogènics com bFGF tan *in vitro* i com *in vivo* (173). Per altra banda, el receptor de membrana de 80 kDa corresponent a PEDF-R/iPLA₂ζ/ATGL és una proteïna transmembrana present a la superfície de les cèl·lules que es caracteritza per presentar una activitat fosfolipasa A₂ i el qual s'uneix amb alta afinitat a PEDF. Aquest receptor està relacionat amb la família de fosfolipases *patatin-like* (PNPLA₂/PLA₂/nutrin. PEDF estimula l'activitat PLA₂ del PEDF-R/iPLA₂ζ/ATGL, el qual catalitza els passos inicials d'hidròlisi dels triglicèrids, una activitat que pot estar relacionada tan amb la seva activitat neurotròfica i antiangiogènica, com pot implicar PEDF en la fisiopatologia de malalties per fetge gras (168, 174).

Una altra de les hipòtesis proposades, en aquest cas, per *Ren et al* és que PEDF exerceixi les seves funcions a través de la interacció amb integrines. Proposen que PEDF s'uneix a una o més integrines directa o indirectament per via de la matriu extracel·lular on es troba concentrat, de manera que s'alliberen les fosfatases unides a la integrina i aquestes interaccionin amb receptors de VEGF inhibint la via o bé inhibint l'activació de cinases com FAK o Src de manera que es bloquegi la ruta (Raf/Mek/MAPK). Ambdues alternatives bloquejarien la fosforilació o transducció de senyal inhibint així l'angiogènesi (99).

Recentment, també s'ha descrit PEDF com antagonista endogen de LRP6, un coreceptor de la via de senyalització canònica de Wnt- β catenina. Aquesta via està involucrada en processos angiogènics, inflamatoris i fibrogènics; i sembla ser que PEDF unint-se a LRP6 bloquejaria la via de Wnt inhibint d'aquesta manera l'expressió de VEGF i l'acumulació de β -catenina al nucli (175).

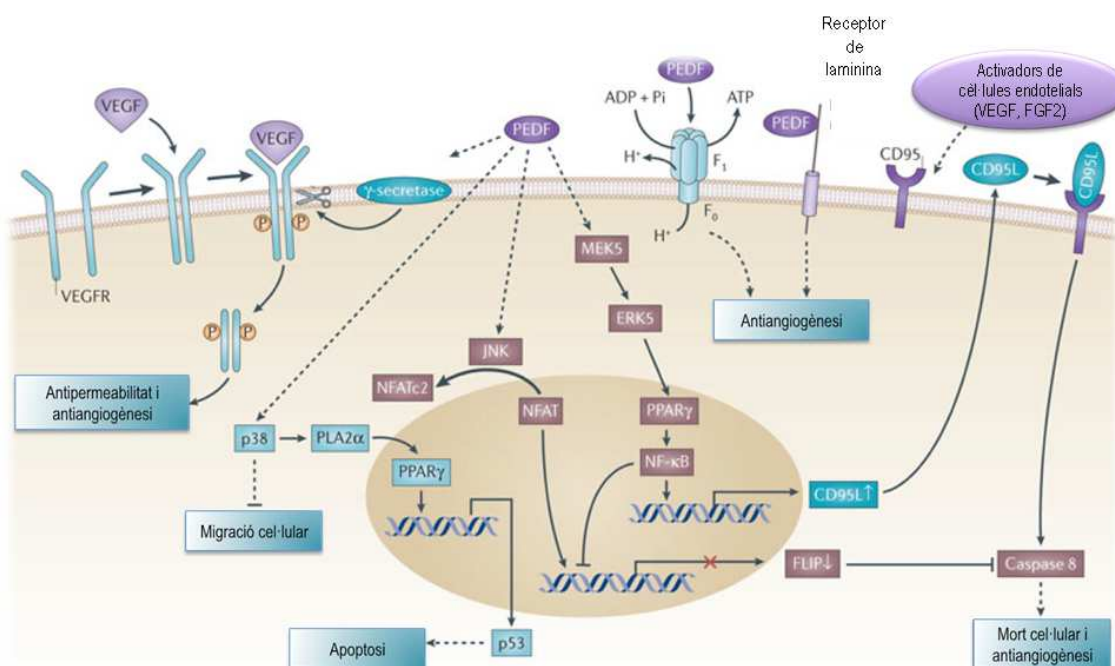


Figura 13: Possibles vies de senyalització a través de receptors candidats per donar les diferents funcions de PEDF (Adaptat de Becerra SP et al, Nat Rev Cancer. 2013 Apr;13(4):258-71).

2.4.3 PEDF en diferents patologies

PEDF contribueix a la quiescència vascular, en part, pel manteniment de l'estat diferenciado de les cèl·lules endotelials, i en part per la inhibició de senyals proangiogèniques les quals porten a una proliferació patològica d'aquestes cèl·lules en malalties neovasculares (98). El procés d'angiogènesi en condicions tan normals com patològiques involucra la participació de

VEGF, i l'increment de PEDF que s'observa en alguns teixits pot representar un intent de les cèl·lules per contrarestar l'estímul proangiogènic per part de VEGF (141).

2.4.3.1 En malalties hepàtiques cròniques

PEDF té un paper important, junt amb VEGF, durant el desenvolupament embrionari del fetge. S'expressa en totes les fases del desenvolupament però sobretot en les últimes etapes. En fetge adult, els hepatòcits sintetitzen i secreten grans quantitats de PEDF per a accions locals i sembla ser que són la principal font del PEDF que es troba en sèrum (143), junt amb la producció per part d'adipòcits. A més a més de proteïna secretada, PEDF es troba en el citoplasma i lleument en el nucli dels hepatòcits (141, 176).

PEDF en resistència a insulina hepàtica. PEDF actuaria com a factor antiinflamatori i antioxidant en el fetge, ja que és capaç de bloquejar els efectes d'AGE (de l'anglès, *advanced glycation end product*), un dels productes resultants de la modificació de proteïnes per reducció de sucres que es dona de manera extremadament accelerada en diabetis, i que és un dels reguladors principals de les complicacions vasculares que es donen en la diabetis i en la resistència a insulina. El complex AGE amb el seu receptor RAGE, provoca la generació d'estrès oxidatiu, inflamació vascular i trombosi, contribuint així al dany vascular en pacients amb diabetis (177). També estimula la producció de la proteïna C reactiva (CRP), un dels principals factors implicats en la inflamació crònica del fetge. No obstant, s'ha observat que PEDF és capaç de bloquejar l'expressió de CRP induïda per AGE de manera dosi-dependent mitjançant les seves propietats antioxidants, via la inhibició de l'activació de Rac-1. Així doncs PEDF protegiria d'aquesta manera contra la resistència a la insulina hepàtica. No obstant, existeixen algunes controvèrsies pel que fa la implicació de PEDF en aquesta malaltia (105).

PEDF en esteatosi hepàtica. Estudis recents han demostrat un possible paper de PEDF en la homeòstasi dels triglicèrids en el fetge, ja que s'ha observat que en ratolins deficients en PEDF hi ha un increment significatiu del contingut hepàtic de triglicèrids. És més, el restabliment dels nivells de PEDF mitjançant la proteïna recombinant en hepatòcits deficients en PEDF disminueix aquest contingut de triglicèrids a través d'ATGL (de l'anglès, *adipose triglyceride lipase*), receptor identificat per PEDF el qual està implicat en els passos inicials d'hidròlisi de triglicèrids, millorant d'aquesta manera el fenotip esteatòsic del fetge gras (178). Aquests resultats semblarien indicar que el metabolisme dels triglicèrids en els hepatòcits dependria en part de la interacció de PEDF amb el receptor ATGL permetent que aquest transloqui en les gotes lipídiques, i que per tant una pèrdua de PEDF impediria la mobilització

dels triglicèrids en el fetge, proposant PEDF com un factor important en la malaltia de fetge gras (176, 178).

PEDF en cirrosi i en carcinoma hepatocel·lular. Actualment està molt poc estudiat el paper de PEDF en cirrosi (169, 179) i els pocs estudis realitzats són més aviat enfocats en el seu paper antifibròtic (169) comentat anteriorment. Per aquest motiu es fa necessari un estudi més exhaustiu del paper de PEDF en aquesta patologia.

Tot i que en un primer estudi es va observar que la concentració de PEDF en sèrum estava disminuïda en pacients amb cirrosi i HCC en relació a individus sans o en pacients amb hepatitis crònica (179), estudis recents van demostrar que els nivells de mRNA i proteïna de PEDF eren més elevats en teixit tumoral d'HCC que en el teixit normal adjacent, i que a més a més els nivells de PEDF en sèrum també eren més elevats en pacients amb HCC que en els controls sans. Per altra banda, van observar que els nivells de PEDF eren elevats en dues de tres línies cel·lulars de carcinoma hepatocel·lular, malgrat segurament de manera insuficient per contrarestar la sobreexpressió de VEGF observada també en aquestes línies (165).

Per altra banda, s'ha observat que la sobreexpressió de PEDF en tumors de HCC subcutanis preestablerts en ratolins atímics resultava en una supressió eficient del creixement tumoral, suggerint que PEDF inhibia el creixement de HCC en aquests ratolins gràcies als efectes antiangiogènics de PEDF en la microvasculatura intratumoral i en el creixement tumoral (168, 179, 180). Concretament, en un estudi on s'avaluava l'efecte antitumoral d'AdPEDF en tumors de carcinoma hepatocel·lular subcutanis en ratolins atímics es va observar que el tractament amb una sola dosi d'AdPEDF resultava, ja a tres dies post-tractament, en una inhibició del creixement tumoral, comparada amb els animals tractats amb el control AdLacZ o salí (180). Aquest efecte antitumoral pot ser en part també a causa de l'acció inhibidora que s'ha observat de PEDF en l'expressió del factor antiapoptòtic c-FLIP, en una línia cel·lular d'hepatoma, indicant que a més a més de les propietats antiangiogèniques en les cèl·lules endotelials de la vasculatura tumoral, PEDF podria tenir un efecte addicional en la supervivència de les cèl·lules d'hepatocarcinoma (181). Per tant, sembla ser que PEDF pot estar involucrat com un factor rellevant en el carcinoma hepatocel·lular (HCC) d'una manera dual, actuant sobre la microvasculatura del tumor (antiangiogènic) i sobre les cèl·lules tumorals (acció antitumoral directa) (165, 180, 180).

2.4.3.2 En patologies de l'ull

L'angiogènesi patològica és un dels factors més comuns en malalties oculars (98). En els compartiments avasculars de l'ull que inclouen la còrnia, la retina i el vitri, sembla ser que el balanç entre el factor proangiogènic VEGF i el factor antiangiogènic PEDF permet el manteniment de la funció normal de l'ull i determina la formació de nous vasos. Per exemple, en les cèl·lules epitelials del pigment de retina (RPE), un cop diferenciades, augmenten significativament tan els nivells de PEDF com de VEGF (182). L'augment de VEGF permetria el manteniment del fenotip fenestrat dels vasos sanguinis coroïdals, mentre que l'augment simultani de PEDF seria requerit per frenar el potencial angiogènic de VEGF. Per tant, nivells elevats de PEDF inhibeixen el creixement i migració de les cèl·lules endotelials de la retina i atenuen la neovascularització induïda per estímuls com la isquèmia, mantenint així la avascularitat local de l'ull (156, 182-185).

No obstant, en general, en condicions patològiques com l'estrès oxidatiu relacionat amb l'edat, la hipòxia o la hiperglucèmia, els nivells de VEGF es mantenen igual o augmenten i en canvi els nivells de PEDF disminueixen, tan a nivell de mRNA com de proteïna, donant un augment de la proliferació, de l'activitat migratòria i de la formació de túbuls per part de les cèl·lules endotelials microvasculars (156, 182, 185, 186). Aquest desequilibri entre l'expressió de PEDF i VEGF contribueix al desenvolupament de patologies de l'ull com la degeneració macular relativa a l'edat (AMD) (187) o la retinopatia diabètica proliferativa (PDR) (98, 185, 188). S'ha vist però que l'increment local a través de la sobreexpressió de PEDF de manera exògena inhibeix el creixement dels vasos sanguinis a través de la disminució de VEGF (187) (156, 157, 185).

Tanmateix, s'ha observat en alguns models de patologies oculars que hi ha un augment de PEDF en paral·lel a l'augment de VEGF en un intent de compensar l'efecte produït pels alts nivells d'angiogènic, com per exemple en la retinopatia diabètica (189-191).

2.4.3.3 En càncer

Les activitats antiangiogèniques de PEDF no es limiten a malalties neovasculares de l'ull, sinó que també s'ha vist que PEDF presenta accions en la regressió tumoral, per una banda per les seves propietats antiangiogèniques i antiproliferatives induint apoptosi, i per altra pels seus efectes en la diferenciació cel·lular (98, 100, 155, 192). Estudis clínics indiquen que l'expressió de PEDF es veu significativament reduïda en varis tipus tumorals, com adenocarcinoma pancreàtic, glioblastoma, carcinoma d'ovari, càncer de pròstata i càncer de mama (100, 161,

166, 193-196). Aquesta reducció està associada a la progressió de la malaltia i la supervivència del pacient (196) (100, 161), ja que l'expressió de PEDF correlaciona amb una densitat microvascular intra-tumoral alta i amb fenotips més metastàtics (155, 193-195, 197). A més a més, a causa de que el grau de diferenciació està sovint inversament relacionat amb la velocitat de proliferació, i que per tant cèl·lules més diferenciades i madures proliferen menys, l'habilitat de PEDF de ser factor diferenciador pot ser beneficiós com a teràpia antitumoral (155).

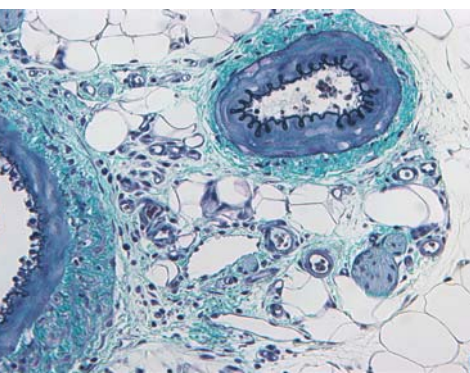
S'ha observat que PEDF recombinant redueix el creixement tumoral de xenògrafs d'una línia de carcinoma de mama endocrina resistent en ratolins atímics i restableix parcialment la seva sensibilitat a tamoxifè *in vivo* per supressió del protooncogen RET i la via de senyalització de ER α (100). A més, la sobreexpressió de PEDF mitjançant vectors adenovirals disminueixen el creixement tumoral i la densitat microvascular en tumors tan *in vitro* com *in vivo* (197).

No obstant, en alguns tumors sòlids i línies cel·lulars d'hepatocarcinoma s'ha observat un augment de PEDF en un intent contrarestar la neovascularització (165).

2.4.3.4 En patologies cardiovasculars

S'ha descrit recentment un paper protector de PEDF en arteriosclerosi, una de les principals causes de les malalties coronàries cardíques, infart de miocardi i insuficiència cardíaca a causa dels seus efectes antiinflamatoris, antioxidants, i antitrombòtics en les parets dels vasos i plaquetes (198)(199). En el cas per exemple del síndrome metabòlic s'observen nivells de PEDF en sèrum elevats que contrarestarrien els efectes produïts per aquesta malaltia gràcies al seu potencial antioxidant i antiinflamatori (200).

PEDF podria ser una bona eina terapèutica en malalties cardiovasculars per dues vies. Per una banda en el cor isquèmic el bloqueig de PEDF de manera local podria afavorir l'angiogènesi i d'aquesta manera millorar la suplementació de sang a l'àrea afectada mentre que per altra banda, la sobreexpressió local de PEDF restringida a les zones amb arteriosclerosi podria bloquejar l'angiogènesi associada a aquests punts i d'aquesta manera inhibir la inestabilitat i ruptura d'aquestes lesions causats per una angiogènesi excessiva (198). Per altra banda, el seu paper antifibròtic podria millorar la fibrosi cardíaca produïda per infart de miocardi agut (102).



Justificació i objectius

3. Justificació i objectius

La síndrome de la **hipertensió portal** és una de les principals conseqüències de la cirrosi hepàtica i és la responsable de la majoria de les seves complicacions. Aquesta es caracteritza per un increment patològic del gradient de pressió portal, per la formació de vasos col·laterals portosistèmics, els quals deriven part del flux sanguini portal directament a la circulació sistèmica amb la finalitat de descomprimir el territori portal (1), i per un increment del flux sanguini als òrgans esplànctics (4). Aquesta situació condueix a una circulació esplànctica hiperdinàmica, i contribueix a mantenir i exacerbar la síndrome de la hipertensió portal (3, 15).

Estudis realitzats en el nostre grup de recerca i en altres laboratoris en models experimentals d'hipertensió portal i cirrosi, com hem vist en la introducció, han demostrat una implicació rellevant de **processos angiogènics**, és a dir, de formació de nous vasos, en la progressió de malalties del fetge i en l'agreujament de la hipertensió portal. Això és degut a que l'angiogènesi juga un paper clau en el desenvolupament i l'establiment de les complicacions associades a aquesta malaltia (l'increment de pressió portal, l'augment del flux sanguini esplànctic, la formació de vasos sanguinis col·laterals portosistèmics i la progressió de fibrogènesi intrahepàtica).

Aquests processos angiogènics estan regulats factors proangiogènics com VEGF, entre d'altres, i per factors antiangiogènics com la vasohibin-1 (VASH1) i el factor derivat de l'epiteli pigmentari (PEDF). En una situació patològica els factors proangiogènics es troben sobreexpressats, com és el cas del VEGF, el qual se sobreexpressa en el territori esplànctic donant un augment de la neovascularització en animals amb hipertensió portal (55), d'aquesta manera donant neovascularització patològica.

Per revertir l'establiment d'una angiogènesi patològica tradicionalment s'han usat agents multidiana o la combinació d'agents que bloquegen tan VEGF com PDGF (1). No obstant, cal tenir en compte en l'ús d'aquestes teràpies que VEGF a banda d'estar implicat en l'angiogènesi patològica de múltiples malalties, presenta un paper beneficiós i essencial en processos fisiològics que es donen en l'adult (p.ex. la cicatrització i la reproducció), en el manteniment de la homeòstasi vascular, i en la supervivència de les cèl·lules endotelials en teixits sans. Per aquest motiu és important considerar les possibles conseqüències d'una excessiva inhibició de la via de VEGF, la qual pot produir regressió de vasos preexistents en teixits sans incrementant la mort de les cèl·lules endotelials dels vasos quiescents (23, 29, 43, 56, 87).

Entendre els mecanismes que regulen l'angiogènesi és essencial per desenvolupar noves estratègies terapèutiques que actuïn de manera específica sobre l'angiogènesi patològica sense afectar l'angiogènesi fisiològica. Per tant, la nostra **hipòtesi de partida** és que l'ús de factors antiangiogènics endògens pot ser una estratègia d'inhibició de la neovascularització en malalties com la hipertensió portal i la cirrosi, més segura i efectiva que els tractaments antiangiogènics tradicionals, on es veu afectada no només l'angiogènesi patològica sinó també la vasculatura preexistent. Amb aquesta finalitat se'ns va plantejar com objectiu general investigar la contribució i impacte terapèutic dels antiangiogènics endògens Vasohibin-1 i PEDF, a causa de les seves característiques antiangiogèniques, antifibròtiques i antioxidants, constatades després d'un extensiu anàlisi de la literatura sobre el seu efecte en patologies on l'angiogènesi té un paper rellevant. Els objectius concrets de la present tesi són:

3.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques

Objectiu 1.1. Caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogènic VASH1 en relació al proangiogènic VEGF per determinar la seva implicació com a regulador de l'angiogènesi en la hipertensió portal i cirrosi hepàtica:

- En el territori esplàncnic d'un model d'hipertensió portal prehepàtica mitjançant lligadura parcial de la vena porta (PPVL)
- En el territori esplàncnic i intrahepàtic d'un model d'hipertensió portal i cirrosi biliar secundària per lligadura del colèdoc.
- En fetges cirròtics humans per hepatitis de virus C.

Objectiu 1.2. Avaluar experimentalment noves estratègies terapèutiques pel tractament de la hipertensió portal i cirrosi hepàtica basades en la sobreexpressió exògena de VASH1 mitjançant transferència gènica amb l'ús de vectors adenovirals seguint dues pautes:

- Un protocol de prevenció on la sobreexpressió de VASH1 es dona de manera contemporània a la inducció de la malaltia en el model d'hipertensió portal i cirrosi mitjançant lligadura del colèdoc BDL. D'aquesta manera es pretén determinar si aquesta sobreexpressió és capaç de prevenir les complicacions associades a la malaltia com l'angiogènesi en territori esplàncnic i intrahepàtic, formació de vasos col·laterals, fibrosi intrahepàtica i alteracions hemodinàmiques.

-
- Un protocol d'intervenció on la sobreexpressió de VASH1 es dona dues setmanes després de la inducció de la malaltia establint el model de BDL, per determinar si aquesta sobreexpressió és capaç d'actuar sobre les complicacions associades a la malaltia un cop aquesta ja ha estat iniciada.

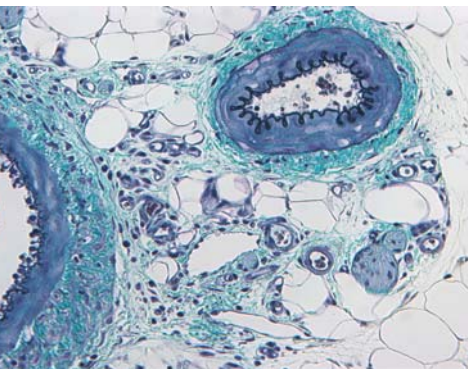
3.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)

Objectiu 2.1. Caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'angiogènec PEDF en relació a l'angiogènec VEGF per determinar la seva implicació com a regulador de l'angiogènesi en la hipertensió portal i cirrosi hepàtica:

- En el territori esplàncnic i intrahepàtic d'un model d'hipertensió portal i cirrosi biliar secundària per lligadura del colèdoc.
- En el territori intrahepàtic d'un model d'hipertensió portal i cirrosi per inhalació de CCl₄.
- En fetges cirròtics humans per hepatitis de virus C.

Objectiu 2.2. Avaluar experimentalment noves estratègies terapèutiques pel tractament de la hipertensió portal i cirrosi hepàtica basada en la sobreexpressió exògena de PEDF mitjançant transferència gènica amb l'ús de vectors adenovirals seguint dues pautes:

- Un protocol de prevenció on la sobreexpressió de PEDF es dona de manera contemporània a la inducció de la malaltia en el model d'hipertensió portal i cirrosi (BDL). D'aquesta manera es pretén determinar si aquesta sobreexpressió és capaç de prevenir les complicacions associades a la malaltia com l'angiogènesi en territori esplàncnic i intrahepàtic, formació de vasos col·laterals, fibrosi intrahepàtica i alteracions hemodinàmiques.
- Un protocol d'intervenció on la sobreexpressió de PEDF es dona dues setmanes després de la inducció de la malaltia establint el model de BDL, per determinar si aquesta sobreexpressió és capaç d'actuar sobre les complicacions associades a la malaltia un cop aquesta ja ha estat iniciada.



Còpies dels articles originals

4. Còpies dels articles originals

4.1 Estudi 1

Disruption of negative feedback loop between Vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats.

Coch L*, Mejias M*, Berzigotti A, Garcia-Pras E, Gallego J, Bosch J, Mendez R, Fernandez M.

* Coautors

Hepatology 2014 Jan 4. doi: 10.1002/hep.26995

IF: 12.003.

Disruption of negative feedback loop between Vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats

Laura Coch^{1*}, Marc Mejias^{1*}, Annalisa Berzigotti¹, Ester Garcia-Pras¹, Javier Gallego¹, Jaime Bosch¹, Raul Mendez², Mercedes Fernandez¹

(1) Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBERehd, Hospital Clinic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

(2) Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

* Joint first authors. Both authors contributed equally to this work.

Keywords: Portal hypertension, cirrhosis, neovascularization, adenoviral gene transfer, endogenous angiogenesis inhibitors.

Corresponding author:

Mercedes Fernandez, PhD

Institute of Biomedical Research IDIBAPS

Rossello 153

08036 Barcelona (Spain)

E-mail address: mercefernandez@ub.edu

Phone: 34-93-2275400

FAX: 34-93-2279348

Abbreviations: AdVASH1, replication-defective adenovirus vector encoding human vasohibin-1 reporter gene; AdLacZ, replication-defective adenovirus encoding β -galactosidase reporter gene; α -SMA, α -smooth muscle actin; BDL, common bile duct ligation; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; Flk1, fetal liver kinase 1 (VEGF receptor-2); Flt1, fms-related tyrosine kinase 1 (VEGF receptor-1); GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCV, hepatitis C virus; H&E, hematoxylin and eosin; PP, portal pressure; PPVL, partial portal vein ligation; RAPA, rapamycin; SHAM, sham-operation SMABF, superior mesenteric artery blood flow; TGF- β , transforming growth factor- β ; VASH1, vasohibin-1; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor.

Grant Support: This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2008-02461 and SAF2011-29491 to M.F.; PS09/01261 and ACI2009-0938 to J.B.; BFU2011-30121 and Consolider RNAREG CSD2009-00080 to R.M.), AGAUR (SGR1108 to J.B.), AICR (11-0086 to R.M.) and Generalitat de Catalunya (2009SGR1436 to R.M.). The CIBERehd is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III.

Disclosures: The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

Pathological angiogenesis represents a critical hallmark for chronic liver diseases. Understanding the mechanisms regulating angiogenesis is essential to develop new therapeutic strategies that specifically target pathological angiogenesis without affecting physiological angiogenesis. Here, we investigated the contribution and therapeutic impact of the endogenous angioinhibitor vasohibin-1 in portal hypertension and cirrhosis.

The spatio-temporal expression profiling of vasohibin-1 and its relationship with VEGF, angiogenesis and fibrogenesis was determined through the analysis of human cirrhotic liver specimens, widely-accepted *in vivo* animal models of portal hypertension and cirrhosis, and *in vitro* angiogenesis assays. Effects of vasohibin-1 overexpression by adenoviral-mediated gene transfer on angiogenesis, fibrogenesis, and portal hypertension-associated hemodynamic alterations were also studied in rats.

We found that vasohibin-1 and VEGF are upregulated, in mesentery and liver, in cirrhotic and precirrhotic portal hypertensive rats and cirrhotic patients. Our results are consistent with vasohibin-1/VEGF cascades being spatially and temporally coordinated through a negative-feedback loop driving pathological angiogenesis. Paradoxically, further overexpression of vasohibin-1 by adenoviral gene transfer exerts multifold beneficial effects in portal hypertension and cirrhosis: reduction of pathologic angiogenesis, attenuation of liver fibrogenesis partly mediated through inhibition of hepatic stellate cell activation, and significant decreases in portocollateralization, splanchnic blood flow, portohepatic resistance and portal pressure. The explanation to this apparent contradiction is that, unlike endogenous vasohibin-1, the ectopically overexpressed is not regulated by VEGF and therefore disrupts the negative-feedback loop thus generating constant, but lower levels of VEGF synthesis sufficient to maintain vascular homeostasis but not pathological angiogenesis.

Conclusion: Our study is the first demonstration of evidence that vasohibin-1 regulates portal hypertension-associated pathological angiogenesis and highlights that increasing vasohibin-1 might be a promising novel therapeutic strategy for portal hypertension and cirrhosis.

Liver cirrhosis is the commonest cause of death and liver transplantation worldwide (1). The most devastating complication that develops in cirrhotic patients is portal hypertension, a syndrome characterized by increased blood pressure in the portal vein, and concomitant increases in splanchnic blood flow and portosystemic collateral vessel formation (1-3). In recent years, evidence has accumulated indicating that angiogenesis, the formation of new blood vessels from preexisting vessels, is a clinically important hallmark of chronic liver disease (4-8). Thus, neovascularization plays a pivotal role supporting the increased splanchnic blood flow, which perpetuates and exacerbates portal pressure elevation, and is also a critical component for developing portosystemic collateral vessels, which are responsible for life-threatening consequences like gastroesophageal bleeding, portosystemic encephalopathy and sepsis (1-3). Excessive blood vessel growth is also crucially involved in the establishment and maintenance of the abnormal hepatic angioarchitecture distinctive of the cirrhotic liver, which is intimately linked to fibrogenesis (7,8). These prior studies also indicate that angiogenesis associated with cirrhosis and portal hypertension is mainly a vascular endothelial growth factor (VEGF)-dependent process, and that blockade of VEGF signaling, by a variety of approaches, has multifold beneficial effects on animal models of cirrhosis and portal hypertension, causing a marked reduction in portal pressure and splanchnic blood flow, significant prevention of collateralization, and a prominent improvement in liver fibrosis (4,5,7,8). The knowledge derived from these studies has highlighted that therapeutic approaches targeting VEGF-driven angiogenesis may have a great potential for clinical application in portal hypertension and cirrhosis (9-11). However, because physiological levels of VEGF are essential for vascular homeostasis, organ/tissue maintenance and repair, and many physiologic angiogenic events (12,13), careful consideration of the consequences of excessive inhibition of the VEGF pathway should be kept in mind. Indeed, the use of therapies unable to distinguish pathologic neovasculature from preexisting vasculature could be one possible reason for the complications (i.e., enhanced risk of gastrointestinal variceal hemorrhage and other adverse effects) developed in patients with hepatocellular carcinoma treated with multikinase inhibitors (14,15). The challenge therefore is to find new therapeutic strategies that specifically target pathological angiogenesis without affecting physiological angiogenesis and, for that, it is essential to gain a more precise understanding of the biology that regulates angiogenesis.

Angiogenesis is controlled in large part by the balance between proangiogenic growth factors, such as VEGF, and a diverse group of endogenous inhibitors of angiogenesis (12,13,16). As a general rule, the pathologic angiogenic phenotype results from upregulation of angiogenic stimuli and concurrent downregulation of endogenous angiogenesis inhibitors so that the balance shifts in favor of angiogenesis activators (12,13,16). However, a new endogenous angioinhibitor, called vasohibin-1 (VASH1), has been recently identified in a microarray analysis assessing genes upregulated by VEGF in endothelial cells (17-19). VASH1 differs from other classic endogenous antiangiogenic factors by being the only one selectively induced by stimulators of angiogenesis, especially VEGF, as a consequence of a specific negative-feedback regulator mechanism of angiogenesis (17-19). VASH1 is upregulated and exhibits therapeutic efficacy in diseases like tumor growth (20-23), atherosclerosis (24), and proliferative retinopathy (25,26). In addition, VASH1 does not impair healthy blood vessels in mice (27), suggesting relative safety of this factor in treating angiogenesis-dependent pathologies. Here, we addressed the therapeutic potential of VASH1 to control portal hypertension and cirrhosis progression in experimental models. This is of particular significance since cirrhosis remains a major medical problem associated with considerable morbidity and mortality for which the clinical armamentarium is limited (1-3). Therefore, there is an obvious need for development of novel treatment strategies to improve the therapeutic outcome in patients suffering from chronic liver disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Patients with liver cirrhosis. Human samples of hepatitis C virus-related cirrhotic liver (n=12) were obtained from transjugular liver biopsies or from explanted organ during liver transplantation. Clinical data of patients at the moment of liver sampling are summarized in **Supplementary Table 1**. Paraffin-embedded human normal liver tissue blocks (n=5) were commercially obtained (ref. 500028022; AMS Biotechnology, Abingdon, UK). All research protocols regarding human samples were approved by the Clinical Review Board and Ethics Committee at Hospital Clinic of Barcelona (protocol number: 2011/6723). All participating patients were thoroughly informed about the studies and signed their consent information and the suitability of the information received.

Animals. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Cambridge, MA) weighing 275-300g body weight were used. All animal experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committees of the University of Barcelona, and were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications no. 85-23, revised 1996).

Adenovirus-mediated VASH1 gene transfer to mesentery and liver *in vivo*. VASH1 overexpression was achieved by systemic administration of a single injection of a replication-defective recombinant adenoviral vector encoding human vasohibin-1 (AdVASH1; 1×10^{10} plaque-forming units, through the tail vein), either at the time of BDL or SHAM surgeries (prevention trial) or two weeks after the initial surgeries (intervention trial). An adenovirus vector encoding the β -galactosidase gene (AdLacZ) was used as negative control. Subsequent analysis were performed seven days after the viral injection because previous infectiveness experiments demonstrated that overexpression of proteins supplemented by adenovirus hardly lasted more than one week. Moreover, a second injection had no effect on the expression of the protein of interest, most likely due to rat immune response.

Hemodynamic studies. Under anesthesia with ketamine (100-mg/kg) and midazolam (5-mg/kg), PE-50 catheters were introduced into femoral artery and portal vein to measure mean arterial pressure (mmHg),

heart rate (beats/min) and portal pressure (PP, mmHg). Perivascular ultrasonic flowprobes (Transonic Systems, New York, NY) were placed around superior mesenteric artery (SMA) to measure SMA blood flow (SMABF, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$), and portal vein to measure portal vein blood flow (PVBF, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Portohepatic resistance ($\text{mmHg ml}^{-1} \text{ min}^{-1} 100\text{g}^{-1}$) was calculated as: PP/PVBF . Portosystemic shunting was quantified by injection of yellow microspheres (15- μm diameter, Dye-trak, Triton Technologies, San Diego, CA) into the spleen, as collateralization (%) = $(\text{lung microspheres})/(\text{lung microspheres} + \text{liver microspheres}) \times 100$.

Endothelial cell tube formation assay. VASH1 overexpression in HUVECs was achieved by infection with AdVASH1 at final multiplicity of infection of 100. AdLacZ-treated or untreated HUVECs were used as control. After 48h, infection medium was withdrawn. To analyze capillary tube-formation, ice-cold Matrigel (50- μl ; *In vitro* angiogenesis assay kit; Chemicon) was poured into ice-cold 96-well plate and allowed to gel for 1h at 37°C. HUVECs cells (2×10^4 /well, $n=3$ /group) were plated in non-supplemented DMEM-F12 medium and incubated for 6h at 37°C. Number of branching points was counted by inverted microscopy.

Statistical analysis. Data are presented as mean \pm S.E.M. Results that were normally distributed were compared with parametric statistical procedures (two-tailed Student *t* test and two-way ANOVA). For non-parametric data, we used Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and Mann-Whitney U test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

VASH1 and VEGF are overexpressed in mesentery and liver during cirrhotic and precirrhotic portal hypertension, in rats and humans, in a spatially and temporally specific manner

To determine whether endogenous VASH1 is a component of the angiogenic regulatory mechanism in cirrhosis and portal hypertension, we began by characterizing the spatio-temporal expression profile of VASH1 protein in the mesenteric vascular bed, a scenario in which pathologic neovascularization is critical during portal hypertension (8). Using an established and widely used animal model of portal hypertension and cirrhosis, the common bile duct ligation (BDL) model, we assessed mesenteric VASH1 expression at various stages of disease progression (days 1, 3, 7, 14 and 28 after BDL), and correlate it with VEGF expression pattern by immunohistochemistry and immunoblotting. Basal VASH1 and VEGF expressions were quite low in SHAM rats (**Fig.1A**). Upon cirrhosis induction, both proteins were upregulated in the vascular wall of preexisting vessels and newly-formed microvessels (**Fig.1A**). VASH1 and VEGF temporal expression patterns exhibited, however, distinctive trends after cirrhosis induction. Thus, VEGF reached maximal levels as early as 1-day after BDL and remained high throughout the first week, but subsequently decreased (**Fig.1B**). In contrast, VASH1 expression augmented later after BDL, with peak increases by 14-28 days (**Fig.1B**). Comparable spatio-temporal distribution was also reproduced in a different model of portal hypertension induced by partial portal vein ligation (PPVL), as ascertained by immunohistochemistry (**Fig.2A**), immunofluorescence confocal microscopy (**Fig.2B**), and immunoblotting (**Fig.2C**). These findings indicate that the promoting factor for angiogenesis VEGF was predominant in the first disease stages (**Fig.1B, Fig.2C**), coincident with maximal angiogenic activity (**Fig.1C,D, Sup.Fig.1A,B**), further documenting the importance of VEGF overexpression as an inducing signal for turning on the initial pathologic angiogenic switch. The inhibiting factor for angiogenesis VASH1 was secondary at this time (**Fig.1B, Fig.2C**). However, in advanced disease stages, the angiogenesis-promoting factor VEGF became secondary and the angiogenesis-inhibiting factor VASH1 dominated (**Fig.1B, Fig.2C**), corresponding with a period in which angiogenesis reaches a plateau (**Fig.1C,D, Sup.Fig.1A-C**).

These results also support that VEGF and VASH1 are connected forming a negative-feedback loop (17-19), where the angiogenesis activator VEGF upregulates the expression of the angiogenesis inhibitor

VASH1, and VASH1, once produced, downregulates VEGF. However, this simple two-component negative-feedback system would inevitably approach a stable, intermediate steady-state (28,29). Thus, some aspect of the circuit must be altered to allow for the generation of VEGF peaks observed during active angiogenesis. This can be accomplished by establishing a time delay or spatial constraint between VEGF synthesis and VASH1 synthesis. This kind of temporal or spatial displacement is precisely what we observed for VEGF and VASH1 ensuring a localized (in time or space) peak of VEGF expression in the mesentery upon cirrhosis and portal hypertension induction (**Fig.1B, Fig.2C**). Indeed, comparison between the spatio-temporal expression patterns of VASH1 and VEGF revealed a sequence compatible with the dynamics of a negative-feedback loop where the peak expression of the activator in that loop VEGF (**Fig.1B, Fig.2C**) and the onset of angiogenesis observed in the mesentery shortly after portal hypertension induction (**Fig.1C,D, Sup.Fig.1A,B**) preceded the overexpression of the repressor in that loop VASH1 (**Fig.1B, Fig.2C**). Further, confocal microscopy demonstrated that cells expressing the highest levels of VASH1 presented low VEGF expression (**Fig.2B**, arrowheads). This sort of regulation establishes a bistable biological system with yes-or-no behaviours (proangiogenic or not) without intermediate states, but limited in time (or space) and reversible (26,27). Furthermore, disruption of any of the components of the negative-feedback loop should result in dampening of the oscillator, but not complete inhibition of VEGF/VASH1 synthesis. In agreement with this concept, blunting VEGF upregulation (**Fig.2D**) in PPVL rats by the pharmacological agent rapamycin reduced VASH1 overexpression (**Fig.2D**) and prevented the portal hypertension-induced rise in pathological angiogenesis (**Fig.2E-F**).

Considering that excessive neovessel growth is a cardinal pathological feature also in the cirrhotic liver (8), we next sought to characterize VASH1 expression in BDL rat liver. Upon cirrhosis induction, we found a marked VASH1 overexpression predominantly located in regenerative micronodules and the pathologic angiogenic neovasculature of the cirrhotic liver (**Fig.3A**), following a similar localization pattern to VEGF (**Fig.3A**). Analysis of VASH1/VEGF temporal expression pattern revealed that VEGF upregulation in the liver was also an early event that occurred prior to VASH1 overexpression (**Fig.3B**), further supporting the idea that VEGF upregulation following portal hypertension and cirrhosis induction may be an important causative factor leading to VASH1 overexpression.

To further underscore the importance of VASH1 as a regulator of angiogenesis in cirrhosis, we also studied liver samples from healthy subjects and from patients with hepatitis C virus-related cirrhosis (**Sup.Table1**). In healthy liver, VASH1 and VEGF were uniformly expressed at very low levels by essentially all parenchymal cells (**Fig.3C**). In cirrhotic liver, VASH1 and VEGF were strongly overexpressed, especially in hepatocytes within regeneration micronodules and in the vascular wall of the numerous neovessels observed inside the thick fibrous septa, which carved the liver parenchyma into nodules (**Fig.3C**). Notably, although VASH1 expression was homogeneous through all the cirrhotic liver parenchyma, intense VEGF immunoreactive cells concentrated at the first line of hepatocytes in the interface between fibrous septa and liver parenchyma, adjacent to the VASH1-negative fibroblasts of the fibrous bands (**Fig.3C**). Again, and being both VEGF and VASH1 secreted factors, this localization pattern reflects a delayed two-component feedback system now spatially modulated (instead or in addition to temporarily regulated) at the interface between two different cell types generating distinct VEGF levels. This spatial VEGF regulation probably also exists in BDL rat livers, as evidenced by immunoblotting (**Fig.3B**), but micronodules are composed of only few cells (**Fig.3A**), and thus too small to detect a potential gradient in VASH1-VEGF expression. These findings suggest that VEGF upregulation and subsequent VEGF-dependent angiogenesis induces VASH1 overexpression as a mechanism to regulate pathological angiogenesis during cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension.

VASH1 overexpression using adenoviral gene transfer

Having established that the inhibitor of angiogenesis VASH1 is upregulated upon cirrhosis and portal hypertension induction, forming a delayed two-component feedback system with VEGF, we next reasoned that disrupting this "circuit" would result in dampened (but not reduced to the point of affecting normal vascular homeostasis), de-regulated VEGF expression. For this, we resolved to adenoviral-mediated VASH1 (AdVASH1) gene transfer to ectopically overexpress VASH1 *in vivo* by a mechanism that is not under VEGF control. This constitutive VASH1 expression should lead to disruption of the VEGF-VASH1 oscillator, dampening VEGF production to intermediate steady-state levels and reducing pathological angiogenesis. Importantly, these VEGF intermediate levels would suffice to maintain homeostasis of healthy vessels. Therefore, with this therapeutic strategy, the excessive VEGF production would be

inhibited without affecting normal, physiological VEGF levels. We explored this prospect in two different protocols designed to assess the effects of the angioinhibitor either on the initial angiogenic switch (prevention trial) or in the late stage of angiogenesis (intervention trial) in BDL rats.

First, we verified that adenovectors were successfully delivered *in vivo* to liver and mesentery after intravenous injection, as revealed by quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay (**Fig.4A**) and X-gal staining (**Fig.4B**). The relative level of transduction in both vascular beds was substantial (**Fig.4A,B**), given the 7-day interval between adenovirus administration and tissue harvest. Of particular importance was the demonstration that BDL and SHAM rats tolerated doses of adenovirus necessary to achieve significant transduction efficiency in the absence of life-threatening toxicity. Using immunoblotting, we also confirmed that AdVASH1 treatment induced VASH1 overexpression in both tissues from BDL and control rats (**Fig.4C**, **Sup.Fig.2**). We also conducted *in vitro* studies in HUVEC cells to demonstrate that AdVASH1 was able to efficiently transduce endothelial cells. Indeed, VASH1 protein was barely detectable in control HUVECs, either non-transfected cells or transfected with AdLacZ. In contrast, infection with AdVASH1 resulted in a robust and effective overexpression of VASH1 protein in HUVECs (**Fig.4D**). Furthermore, we validated that the VASH1 protein produced after AdVASH1 gene transfer was functional and effective in suppressing angiogenesis *in vitro* on Matrigel since AdVASH1-transduced HUVECs exhibited a substantial reduction in their capability to form tube-like cellular networks (**Fig.4E**), with a significant 50% decrease in branching points (**Fig.4F**), compared with untransfected or AdLacZ-transfected HUVECs.

Adenoviral-mediated VASH1 gene transfer attenuates pathological angiogenesis *in vivo*, while having no effect on physiological angiogenesis in BDL rat mesentery

Next, we determined the effects of AdVASH1 on pathological mesenteric angiogenesis in BDL rats. By immunoblotting, we found that when VASH1 was ectopically expressed from a non-regulated system (i.e., not regulated by VEGF) through exogenous AdVASH1 treatment, the negative-feedback loop was essentially disrupted in the mesentery of BDL rats, compared with AdLacZ-treated BDL rats (**Fig.5A**, **Sup.Fig.3A**). That means that VEGF did not produce the abrupt peaks of expression required for pathological angiogenesis, but settled down in the intermediate steady-state levels required for its

homeostatic function. The AdvASH1-induced VEGF downregulation, by 56%, was observed only during the prevention trial, corresponding with the early onset of the disease characterized by maximal angiogenic activity and VEGF upregulation (**Fig.1B-D**), but not during the intervention trial, coincident with later stages of disease progression when active new vessel growth and VEGF upregulation declined (**Fig.1B-D**). Accordingly, AdvASH1 treatment caused a significant 22% inhibition of pathological angiogenesis during prevention but not intervention trial (**Fig.5B,C**), suggesting that AdvASH1 targeted only newly-growing vessels but spared existing and maturing ones. To evaluate if AdvASH1 could have antiangiogenic effects in the absence of pathological angiogenesis, SHAM rats were injected with AdvASH1 or AdLacZ. We did not find any significant VEGF-reducing (**Fig.5A**) or antiangiogenic (**Fig.5B,C, Sup.Fig.4**) effect in the normal vasculature from SHAM rats, further indicating that the VASH1 angioinhibitory effects were restricted to proliferating vessels, without damaging the mature, existing ones. In addition, AdvASH1 had not significant effects on the mRNA and protein expression of the VEGF receptors Flk1 and Flt1 in the mesentery of BDL and SHAM rats (**Sup.Fig.5**). Moreover, physiological angiogenesis associated with closure/repair in skin wounds of the abdominal surgery performed in rats during bile duct ligation or sham-operation was unaffected by AdvASH1 (data not shown). These results support that the VEGF intermediate levels generated after disrupting the VEGF-VASH1 feedback loop using exogenous AdvASH1 were sufficient to maintain vascular homeostasis of healthy vessels.

AdvASH1 restricts pathological angiogenesis and fibrogenesis, and inhibits hepatic stellate cell activation in BDL rat liver

We also determined the effects of AdvASH1 in the pathological angiogenesis of the cirrhotic liver, which is intimately interconnected to fibrogenesis. Bile duct obstruction in rats resulted in distortion of the normal liver architecture, with extensive deposition of fibrillar collagen (**Fig.6A,B**; Sirius red staining), hepatic stellate cell activation (**Fig.6C**; α -smooth muscle actin (α SMA) immunoblotting) and enhanced neovascularization (**Sup.Fig.6A,B**; von Willebrand factor (vWF) immunostaining), compared with SHAM rats (**Sup.Fig.4**). We found that livers of AdvASH1-treated BDL rats presented reduced neovascularization in fibrous septa (by 23% and 48% in prevention and intervention trials, respectively; **Sup.Fig.6A,B**), compared to AdLacZ-treated BDL rats. However, total VEGF expression was not

significantly modified by AdvASH1 (**Sup.Fig.6C, Sup.Fig.3B**). The existence of a spatially regulated negative-feedback loop between VEGF and VASH1 restricted to hepatocytes located at the interface between highly neovascularized fibrous septa and liver parenchyma (described above; **Fig.3C**) provides a possible explanation for the reduction of intrahepatic pathological angiogenesis despite a lack of VEGF expression change between AdvASH1- and AdLacZ-treated BDL rats. Because this cell population likely represents only a tiny fraction of the total liver cells, immunoblotting of the whole liver tissue would not detect any AdvASH1-induced local decrease in VEGF expression. The observed reduction in pathological angiogenesis in the BDL liver suggests though that a contextual and strategically localized VEGF downregulation could be taking place in response to AdvASH1. In addition, AdvASH1 had not significant effects on the mRNA and protein expression of the VEGF receptors Flk1 and Flt1 in the liver of BDL and SHAM rats (**Sup.Fig.5**). Further, the antiangiogenic effects of AdvASH1 were not detected in SHAM rats (**Sup.Fig.4, Sup.Fig.6B**), indicating that exogenous AdvASH1 interfered with pathological but not physiological angiogenesis.

Importantly, AdvASH1 markedly decreased fibrotic area in BDL rat liver (by 38% and 27% in prevention and intervention trials, respectively; **Fig.6AD,E, Sup.Fig.4**), compared to AdLacZ-treated BDL rats. Because activated hepatic stellate cells play a key role in liver fibrogenesis, it was reasonable to speculate that AdvASH1-induced attenuation of fibrosis may occur through blockade of hepatic stellate cell activation. To address this issue, we investigated whether AdvASH1 decreased the overexpression of α SMA, which is expressed by stellate cells when they gain a myofibroblast-like phenotype in response to liver injury. We found that α SMA expression in BDL rat liver was markedly downregulated by AdvASH1 in the intervention trial (by 38%; **Fig.6F**), but was unaffected in the prevention trial (**Fig.6F**), consistent with the temporal profiling of α SMA expression after BDL (i.e., low activation in early stages after BDL and high activation at a later stage) (**Fig.6C**), and suggesting that suppression of hepatic stellate cell activation may be part of the mechanism underlying the antifibrogenic effect of AdvASH1. Such effect could also be indirectly supported through inhibition of intrahepatic angiogenesis (**Sup.Fig.6A,B**), which could explain the reduced fibrosis seen in prevention trial. Further, AdvASH1 did not significantly modify the expression

of the profibrotic transforming growth factor- β (TGF- β), suggesting that the AdVASH1 antifibrogenic effect was independent of TGF- β signaling (**Sup.Fig.7**).

Adenovirus-based delivery of VASH1 ameliorates portal hypertension, splanchnic hyperemia, portohepatic resistance and portosystemic shunting in BDL rats

We next addressed whether the antiangiogenic and antifibrogenic effects of AdVASH1 translated into amelioration of hemodynamic disturbances in BDL rats. As expected, AdLacZ-treated BDL rats exhibited increased portal pressure (PP), superior mesenteric artery blood flow (SMABF) and portohepatic resistance, compared with SHAM rats (**Fig.7**). Notably, treatment with AdVASH1 in BDL rats significantly reduced PP (by 12% and 16% in prevention and intervention trials, respectively) (**Fig.7**). This effect was most likely achieved through reduction of splanchnic neovascularization (**Fig.5A,B**) and SMABF (by 15%, **Fig.7**) in the prevention trial and to decreased liver fibrosis (**Fig.6A,B**) and portohepatic resistance (by 25%, **Fig.7**) in the intervention trial. Amelioration of portal hypertension was also associated with a 26% decrease in portosystemic shunting (**Fig.7**; intervention trial). Portosystemic collateralization was not measured in the prevention trial because it was not appreciably altered until one week post-BDL (**Fig.7**). AdVASH1 treatment did not have major systemic effects, as evidenced by the lack of change in mean arterial pressure and heart rate (**Fig.7**), renal function (**Sup.Fig.8A,B**) and spleen weight (**Sup.Fig.8C**).

DISCUSSION

The present study provides a detailed and comprehensive characterization of the spatio-temporal protein expression profiling of the endogenous angiogenesis inhibitor VASH1 and its relationship with VEGF and with the time course of neovascularization and fibrogenesis during portal hypertension and cirrhosis through the analysis of patient-derived HCV-related cirrhotic liver specimens, different *in vivo* animal models (i.e., BDL and PPVL models), two vascular beds with distinct characteristics (i.e., liver and mesentery), different stages of disease progression (i.e., early and advanced disease), and *in vitro* angiogenesis assays in HUVECs. Collectively, our data support the notion that VEGF becomes overexpressed in mesentery and liver to switch on their angiogenic phenotypes upon portal hypertension and cirrhosis induction (8). This VEGF upregulation and the subsequent VEGF-dependent angiogenesis leads to overexpression of the endogenous angioinhibitor VASH1. Our results also highlight that the VEGF/VASH1 cascades are embedded in a negative-feedback loop that regulates pathological angiogenesis in portal hypertension and cirrhosis.

Another major finding of our study was the demonstration that exogenous elevation of VASH1 exerted multifold beneficial effects in experimental portal hypertension without any apparent adverse side effect, strongly suggesting that supplementation with VASH1 might be a novel and promising therapeutic strategy for halting chronic liver disease progression. Indeed, we found that overexpressing VASH1 protein *in vivo* by gene therapy with an adenoviral vector encoding VASH1 (AdVASH1) efficiently suppressed mesenteric and intrahepatic pathological neovascularization and reduced the formation of portosystemic collateral vessels in BDL rats. The protective action of AdVASH1 was not restricted to inhibition of angiogenesis, but included a potent ability to attenuate intrahepatic fibrogenesis through suppression of hepatic stellate cell activation. These results are in accordance with previous observations that VASH1 is upregulated in tumors, retinal neovascularization, and arterial intimal thickening, and, when applied exogenously, inhibits angiogenesis *in vivo* in animal models for such vascular disorders (21-26). The exact mechanism of action associated with VASH1 is not understood completely and a functional receptor for VASH1 has not yet been identified (18,19). Our data presented here define that the inhibitory effect of AdVASH1 on angiogenesis could in part be explained by disruption of the VEGF-VASH1 negative-feedback loop with

local downregulation of the excessive expression of the proangiogenic growth factor VEGF. Paradoxically, overexpression of a factor (VASH1) that was already overexpressed in cirrhotic livers ameliorated liver disease. The key of this apparent contradiction is that endogenous VASH1 is regulated by VEGF and, therefore, contributes to reinforce the VEGF/VASH1 circuit increasing VEGF peaks of expression and, in turn, pathological angiogenesis. On the contrary, ectopically, and non VEGF-regulated, VASH1 overexpression using AdvVASH1 disrupts the circuit generating constant, but lower levels of VEGF synthesis sufficient to maintain vascular homeostasis but not pathological angiogenesis.

Interestingly, the pleiotropic protective effects of AdvVASH1 translated into a significant decrease in portal pressure in BDL rats (by 12% in the prevention trial and by 16% in the intervention trial), pointing to the potential therapeutic value of AdvVASH1 for portal hypertension and liver cirrhosis. The fall in portal pressure caused by AdvVASH1 following the prevention trial was in part due to decrease in splanchnic blood flow as a result of attenuated mesenteric neovascularization, whereas the reduction in PP observed in the intervention trial was partly mediated by a decrease in portohepatic resistance as a consequence of the AdvVASH1-induced reduction in intrahepatic fibrogenesis and angiogenesis. The importance of these findings is further underscored by the observation that the AdvVASH1 effects mirrored the pattern of pathological changes observed in mesentery and liver during disease progression. Thus, AdvVASH1 was effective in reducing mesenteric neovascularization and, in turn, splanchnic blood flow only when administered during the active growing of new blood vessels (first week after BDL/prevention trial). Further, AdvVASH1 diminished portohepatic resistance when given in the period of maximal fibrogenesis (from week 2 after BDL/intervention trial).

Another salient result was that AdvVASH1 had no angioinhibitory activity in the absence of pathological angiogenesis, that is in SHAM rats, indicating that the antiangiogenic properties of AdvVASH1 were specific for activated vessels engaged in the process of pathologic angiogenesis, sparing the normal organ vasculature. The observation that AdvVASH1 inhibited mesenteric neovascularization only when this process was maximally active also suggests that AdvVASH1 selectively targeted proliferating neovessels but not preexisting or maturing vessels. Moreover, the normal growth of healthy vessels associated with healing skin wounds was not impaired in AdvVASH1-treated animals, supporting that AdvVASH1 interfered only with pathological but not physiological angiogenesis which is required for many physiologic processes

including not only wound healing, but also organ growth and development, tissue maintenance, and reproduction (13). This was further confirmed by showing that AdvASH1 had no effect on VEGF expression in SHAM rats, and that AdvASH1 decreased VEGF levels in BDL rats back to the SHAM baseline level, but not below that level, indicating that AdvASH1 reduced the excessive but not the normal VEGF production needed for vascular homeostasis. It is likely that the use of VASH1, a molecule that is naturally present in the organism (18,19), could lead to safer treatment outcomes against pathological angiogenesis, without sacrificing efficacy. It should be noted in this regard that previous attempts at targeting pathological angiogenesis in cirrhosis by using multikinase inhibitors such as sorafenib or imatinib were successful in rats (7-10), but have little translational potential due to the many adverse effects that these agents may have by interfering with normal, physiological angiogenesis (14,15). Therefore, our results provide strong preclinical evidence suggesting that exogenous VASH1 elevation might be a much safer and effective approach to target excessive angiogenesis worthy of clinical assessment in portal hypertension and liver cirrhosis. This is further supported by our finding that VASH1 expression was markedly increased in clinical human cirrhotic livers.

REFERENCES

1. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
2. Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008;134:1715-1728.
3. Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med* 2010;362:823-832.
4. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004;126: 886-894.
5. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007;46:1208-1217.
6. Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;137:2112-2124.
7. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245-1256.
8. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-620.
9. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009;49:1066-1068.
10. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;53:976-980.
11. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-567.
12. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
13. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.

14. Llovet JM, Bruix J. Testing molecular therapies in hepatocellular carcinoma: the need for randomized phase II trials. *J Clin Oncol* 2009;27:833-835.
15. Pinter M, Sieghart W, Reiberger T, Rohr-Udilova N, Ferlitsch A, Peck-Radosavjevic M. The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:83-91.
16. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005;65:3967-3979.
17. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, *et al.* Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004;114:884-886.
18. Kerbel RS. Vasohibin: the feedback on a new inhibitor of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004;114:884.
19. Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. *J Biochem* 2013;153:5-11.
20. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, *et al.* Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci* 2008;99:914-919.
21. Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, *et al.* Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci* 2009;100:88-94.
22. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, *et al.* Vasohibin-1 expressed in endothelium of tumor vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol* 2009;175:430-439.
23. Li D, Zhou K, Wang S, Shi Z, Yang Z. Recombinant adenovirus encoding vasohibin prevents tumor angiogenesis and inhibits tumor growth. *Cancer Sci* 2010;101:448-452.
24. Yamashita H, Abe M, Watanabe K, Shimizu K, Moriya T, Sato A, *et al.* Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:919-925.
25. Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, *et al.* Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2009;52:359-361.
26. Shen J, Yang X, Xiao WH, Hackett SF, Sato Y, Campochiaro PA. Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppresses VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *FASEB J* 2006;20:723-725.
27. Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, Miyashita H, Oike Y, Takahashi T, *et al.* Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. *Am J Pathol* 2010;176:1950-1958.

28. Pomerening JR, Sontag ED, Ferrel JE Jr. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol* 2003;5:346-351.

29. Ferrell JE Jr. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:140-148.

Accepted Article

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression of VASH1 and VEGF proteins in mesentery from BDL rats. (A) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from BDL and SHAM rats (n=6/group), showing overexpression of VASH1 and VEGF in the vascular wall of preexisting mesenteric vessels, compared with control rats, as well as in the vascular wall of newly-formed mesenteric vessels (arrowheads). (B) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery over an observation period of 28 days after BDL, and densitometric quantification (n=6/group) of protein expression relative to loading controls β -actin or GAPDH. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (C) Representative photographs of H&E staining in the mesentery of SHAM and BDL rats. (D) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area) over an observation period of 28 days after BDL (n=6/group). Results are expressed as mean \pm S.E.M. * P <0.05 versus SHAM. Scale bars: 20- μ m (A), 100- μ m (C).

Figure 2: Expression of VASH1 and VEGF proteins in mesentery from PPVL rats. (A) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from PPVL and SHAM rats (n=6/group), showing overexpression of VASH1 and VEGF in the vascular wall of preexisting mesenteric vessels (arrowheads), compared with control rats, as well as in the vascular wall of newly-formed mesenteric vessels. (B) Double-immunofluorescence and confocal microscopy showing cells double-expressing VASH1 (green) and VEGF (red) in the vascular wall of mesenteric neovessels after portal hypertension induction in rats. Cell nuclei were visualized by DAPI (blue). Photograph at the right shows the merge of VASH1, VEGF and DAPI stainings. White lines delineate newly-formed vessels. Although most cells coexpressed VASH1 and VEGF, cells expressing the highest levels of VASH1 presented low VEGF expression (arrowheads). (C) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery over an observation period of 20 days after PPVL, and densitometric quantification (n=6/group) of protein expression relative to loading control β -actin. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (D) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery of PPVL rats treated with rapamycin

(RAPA, 2 mg kg⁻¹ day⁻¹; intraperitoneally) or vehicle (VEH, 700 μl NaCl 0.9%), during 5 days, starting immediately after PPVL. Densitometric quantification (n=4/group) of protein expression relative to loading controls β-actin or GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. **(E)** Representative photographs of H&E staining in the mesentery of RAPA- and VEH-treated PPVL rats. **(F)** Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area). In panels **C** and **D**, densitometric quantification (n=4/group) of protein expression is relative to loading controls GAPDH or β-actin. Results are expressed as mean±S.E.M. Scale bars: 20-μm (**A**), 25-μm (**B**), 100-μm (**E**). *P<0.05 versus SHAM (**C**), VEH-treated PPVL rats (**D,F**).

Figure 3: Expression of VASH1 and VEGF proteins in liver from BDL rats and from human patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. **(A)** Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from BDL and SHAM rats (n=6/group). Arrowheads point to micronodules or neovessels. **(B)** Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the rat liver over an observation period of 28 days after BDL, and densitometric quantification of protein expression (mean±S.E.M.; n=6/group) relative to loading control GAPDH. **(C)** Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from healthy controls (n=5) and hepatitis C-related cirrhotic humans (n=12). Arrowheads point to hepatocytes within cirrhotic regenerative micronodules in which VASH1 and VEGF were strongly overexpressed (*micronodules*), to cells with intense immunoreaction for VASH1 and VEGF located at the interface between fibrous septa and liver parenchyma (*interface*), and also to the VASH1 and VEGF expression observed in the vascular wall of newly formed microvessels inside the fibrous septa. *P<0.05 versus SHAM. Scale bars: 20-μm (**A,C-neovessels**), 50-μm (**A-parenchyma, micronodules; C-interface**), 100-μm (**C-parenchyma, micronodules**).

Figure 4: In vivo and in vitro adenoviral transfection efficiency. **(A)** β-Galactosidase activity in mesentery and liver of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6/group) and untreated controls (n=2). **(B)** Representative photographs of X-Gal staining in liver of BDL and SHAM rats treated with AdLacZ from the day of surgery. CV, central vein. **(C)** Western blotting of VASH1 protein in the mesentery and the liver of

AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (prevention trial). Densitometric quantification of protein expression relative to loading controls GAPDH or β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(D)** Western blotting of VASH1 in HUVECs untransfected or transfected with AdVASH1 or AdLacZ. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(E)** *In vitro* angiogenesis assay in HUVECs untransfected or transfected with AdVASH1 or AdLacZ. Representative photographs from three independent experiments are shown. **(F)** Quantification of *in vitro* angiogenesis assay in HUVECs (number of branching points). Results are expressed as mean \pm S.E.M (n=3/group). * P <0.05 versus AdLacZ-treated rats **(C)**, non-transfected HUVECs **(D)** or AdLacZ-transfected HUVECs **(F)**. Scale bar: 100- μ m **(B)**.

Figure 5: Effects of AdVASH1 on mesenteric angiogenesis in BDL rats. **(A)** Western blotting of VEGF protein in the mesentery of AdVASH1- and AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, and densitometric quantification of protein expression relative to loading control β -actin. Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(B)** Mesentery H&E staining in AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL rats. **(C)** Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area) in AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean \pm S.E.M. * P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. Scale bar: 100- μ m.

Figure 6: Effects of AdVASH1 on liver fibrosis in BDL rats. **(A)** Liver Sirius red staining over an observation period of 28 days after BDL. **(B)** Quantification of liver fibrosis (sirius red staining area/total area) in BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(C)** Western blotting of α SMA protein in the rat liver over an observation of 28 days after BDL. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(D)** Sirius red staining in liver of AdVASH1- and AdLacZ-treated BDL rats. **(E)** Quantification of liver fibrosis (sirius red staining area/total area) in AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(F)** Western blotting of α SMA protein in the liver of AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats. Densitometric quantification of protein

expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. * $P<0.05$ versus SHAM (A,C) or AdLacZ-treated SHAM rats (E,F). ** $P<0.05$ versus AdLacZ-treated BDL rats (E,F). Scale bars: 200- μ m.

Figure 7: Hemodynamic effects of AdvASH1. Effects of AdvASH1 and AdLacZ on mean arterial pressure, portal pressure, superior mesenteric artery blood flow, portohepatic vascular resistance, heart rate and portosystemic shunting in BDL and SHAM rats, in prevention (SHAM-AdLacZ, n=6; SHAM-AdvASH, n=5; BDL-AdLacZ, n=6; BDL-AdvASH, n=7) and intervention (SHAM-AdLacZ, n=5; SHAM-AdvASH, n=7; BDL-AdLacZ, n=6; BDL-AdvASH, n=10) trials. * $P<0.05$ versus AdLacZ-treated SHAM rats. ** $P<0.05$ versus AdLacZ-treated BDL rats. Time course of portosystemic shunting over an observation period of 28 days after BDL is also shown (* $P<0.05$ versus SHAM). All results are expressed as mean±S.E.M.

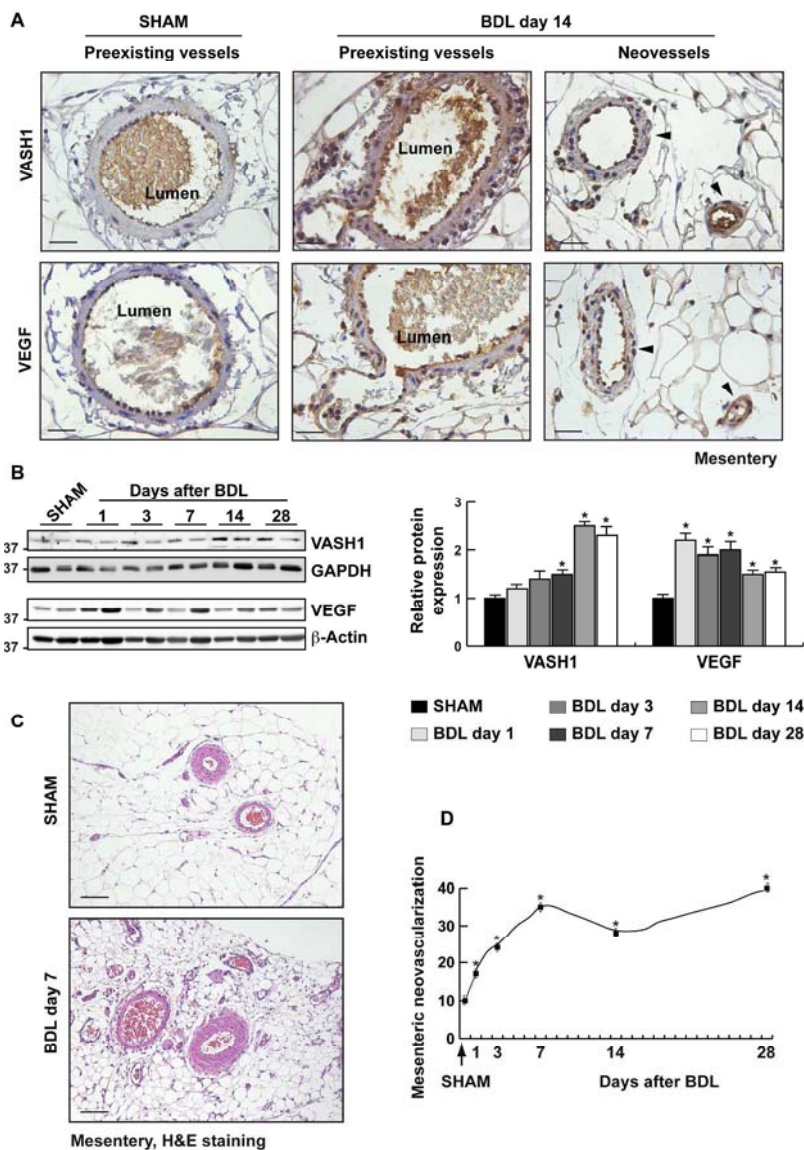


Figure 1: Expression of VASH1 and VEGF proteins in mesentery from BDL rats. (A) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from BDL and SHAM rats ($n=6/\text{group}$), showing overexpression of VASH1 and VEGF in the vascular wall of preexisting mesenteric vessels, compared with control rats, as well as in the vascular wall of newly-formed mesenteric vessels (arrowheads). (B) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery over an observation period of 28 days after BDL, and densitometric quantification ($n=6/\text{group}$) of protein expression relative to loading controls β -actin or GAPDH. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (C) Representative photographs of H&E staining in the mesentery of SHAM and BDL rats. (D) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area) over an observation period of 28 days after BDL ($n=6/\text{group}$). Results are expressed as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$ versus SHAM. Scale bars: 20- μm (A), 100- μm (C). 228x303mm (300 x 300 DPI)

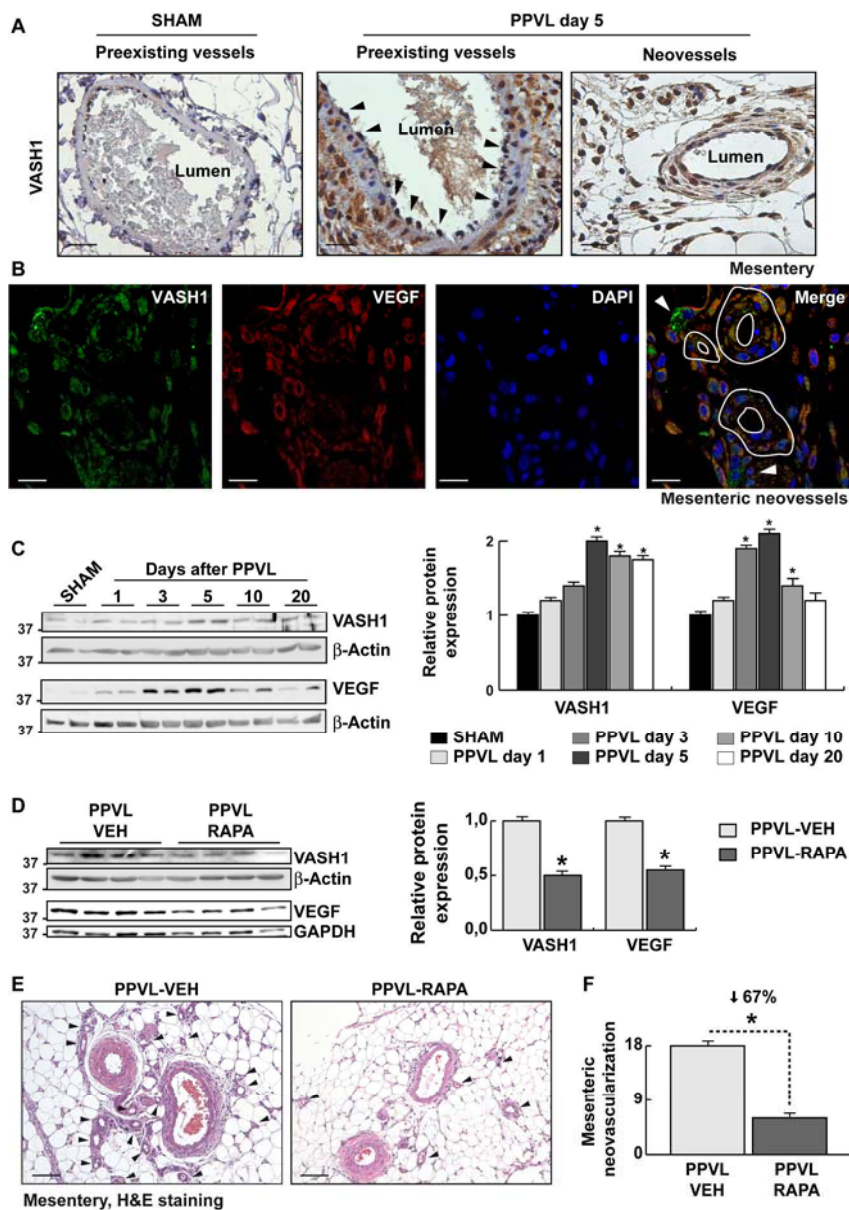


Figure 2: Expression of VASH1 and VEGF proteins in mesentery from PPVL rats. (A) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from PPVL and SHAM rats (n=6/group), showing overexpression of VASH1 and VEGF in the vascular wall of preexisting mesenteric vessels (arrowheads), compared with control rats, as well as in the vascular wall of newly-formed mesenteric vessels. (B) Double-immunofluorescence and confocal microscopy showing cells double-expressing VASH1 (green) and VEGF (red) in the vascular wall of mesenteric neovessels after portal hypertension induction in rats. Cell nuclei were visualized by DAPI (blue). Photograph at the right shows the merge of VASH1, VEGF and DAPI stainings. White lines delineate newly-formed vessels. Although most cells coexpressed VASH1 and VEGF, cells expressing the highest levels of VASH1 presented low VEGF expression (arrowheads). (C) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery over an observation period of 20 days after PPVL, and densitometric quantification (n=6/group) of protein expression relative to loading control β -actin. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (D) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the mesentery of PPVL rats treated with rapamycin (RAPA, 2 mg·kg⁻¹·day⁻¹; intraperitoneally) or

vehicle (VEH, 700 μ l NaCl 0.9%), during 5 days, starting immediately after PPVL. Densitometric quantification (n=4/group) of protein expression relative to loading controls β -actin or GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (E) Representative photographs of H&E staining in the mesentery of RAPA- and VEH-treated PPVL rats. (F) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area). In panels C and D, densitometric quantification (n=4/group) of protein expression is relative to loading controls GAPDH or β -actin. Results are expressed as mean \pm S.E.M. Scale bars: 20- μ m (A), 25- μ m (B), 100- μ m (E). *P<0.05 versus SHAM (C), VEH-treated PPVL rats (D,F).
207x295mm (300 x 300 DPI)

Accepted Article

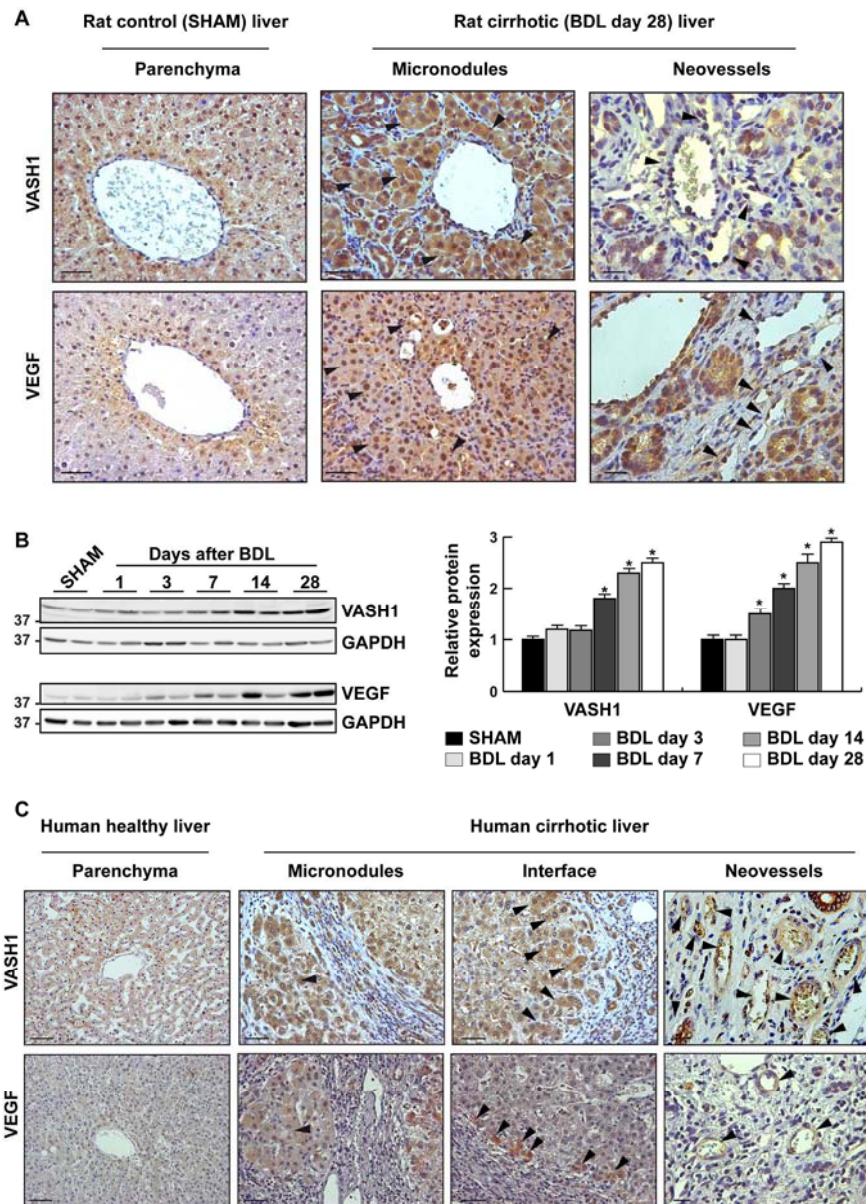


Figure 3: Expression of VASH1 and VEGF proteins in liver from BDL rats and from human patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. (A) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from BDL and SHAM rats ($n=6$ /group). Arrowheads point to micronodules or neovessels. (B) Western blotting of VASH1 and VEGF proteins in the rat liver over an observation period of 28 days after BDL, and densitometric quantification of protein expression (mean \pm S.E.M.; $n=6$ /group) relative to loading control GAPDH. (C) Representative photographs of VASH1 and VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from healthy controls ($n=5$) and hepatitis C-related cirrhotic humans ($n=12$). Arrowheads point to hepatocytes within cirrhotic regenerative micronodules in which VASH1 and VEGF were strongly overexpressed (micronodules), to cells with intense immunoreaction for VASH1 and VEGF located at the interface between fibrous septa and liver parenchyma (interface), and also to the VASH1 and VEGF expression observed in the vascular wall of newly formed microvessels inside the fibrous septa. * $P<0.05$ versus SHAM. Scale bars: 20- μ m (A,C-neovessels), 50- μ m (A-parenchyma, micronodules; C-interface), 100- μ m (C-parenchyma, micronodules).

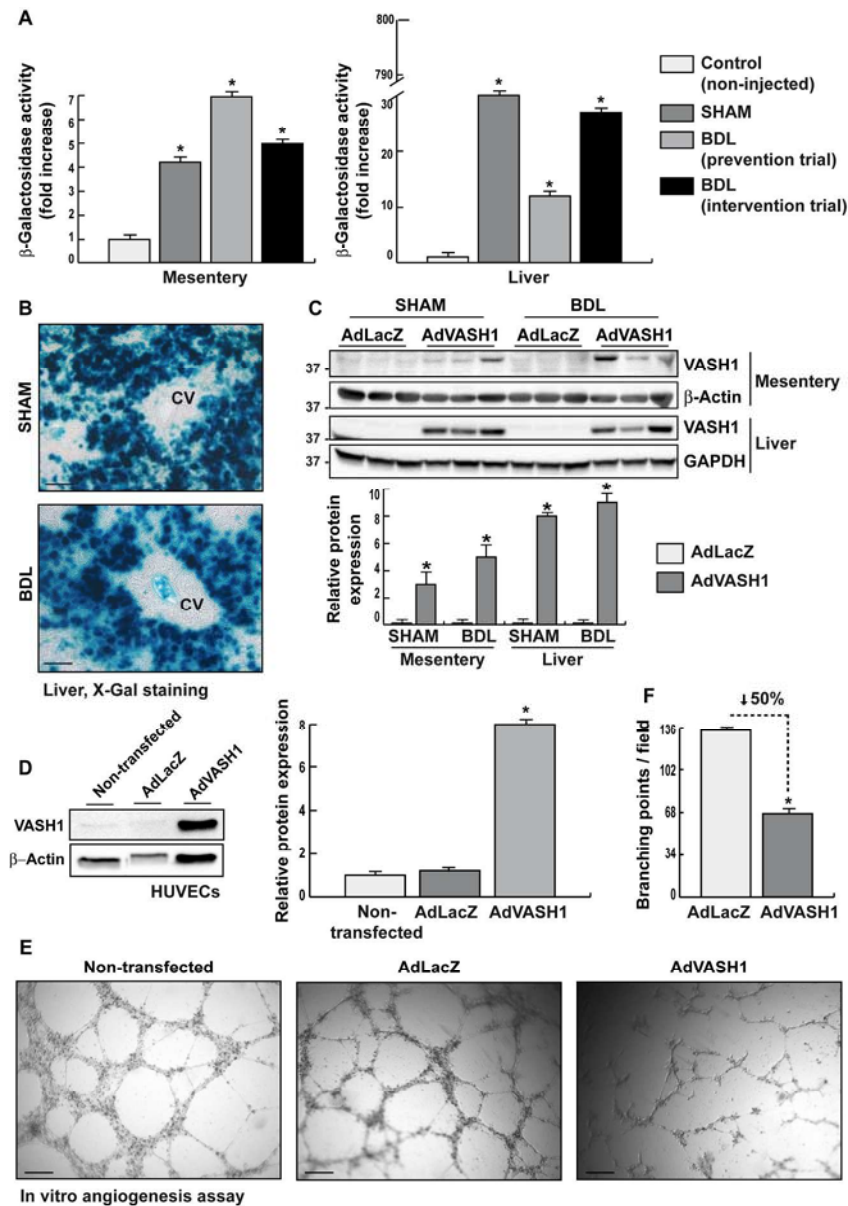


Figure 4: In vivo and in vitro adenoviral transfection efficiency. (A) β -Galactosidase activity in mesentery and liver of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats ($n=6$ /group) and untreated controls ($n=2$). (B) Representative photographs of X-Gal staining in liver of BDL and SHAM rats treated with AdLacZ from the day of surgery. CV, central vein. (C) Western blotting of VASH1 protein in the mesentery and the liver of AdVASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (prevention trial). Densitometric quantification of protein expression relative to loading controls GAPDH or β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (D) Western blotting of VASH1 in HUVECs untransfected or transfected with AdVASH1 or AdLacZ. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (E) In vitro angiogenesis assay in HUVECs untransfected or transfected with AdVASH1 or AdLacZ. Representative photographs from three independent experiments are shown. (F) Quantification of in vitro angiogenesis assay in HUVECs (number of branching points). Results are expressed as mean \pm S.E.M ($n=3$ /group). * $P<0.05$ versus AdLacZ-treated rats (C), non-transfected HUVECs (D) or AdLacZ-transfected HUVECs (F). Scale bar: 100- μ m (B).

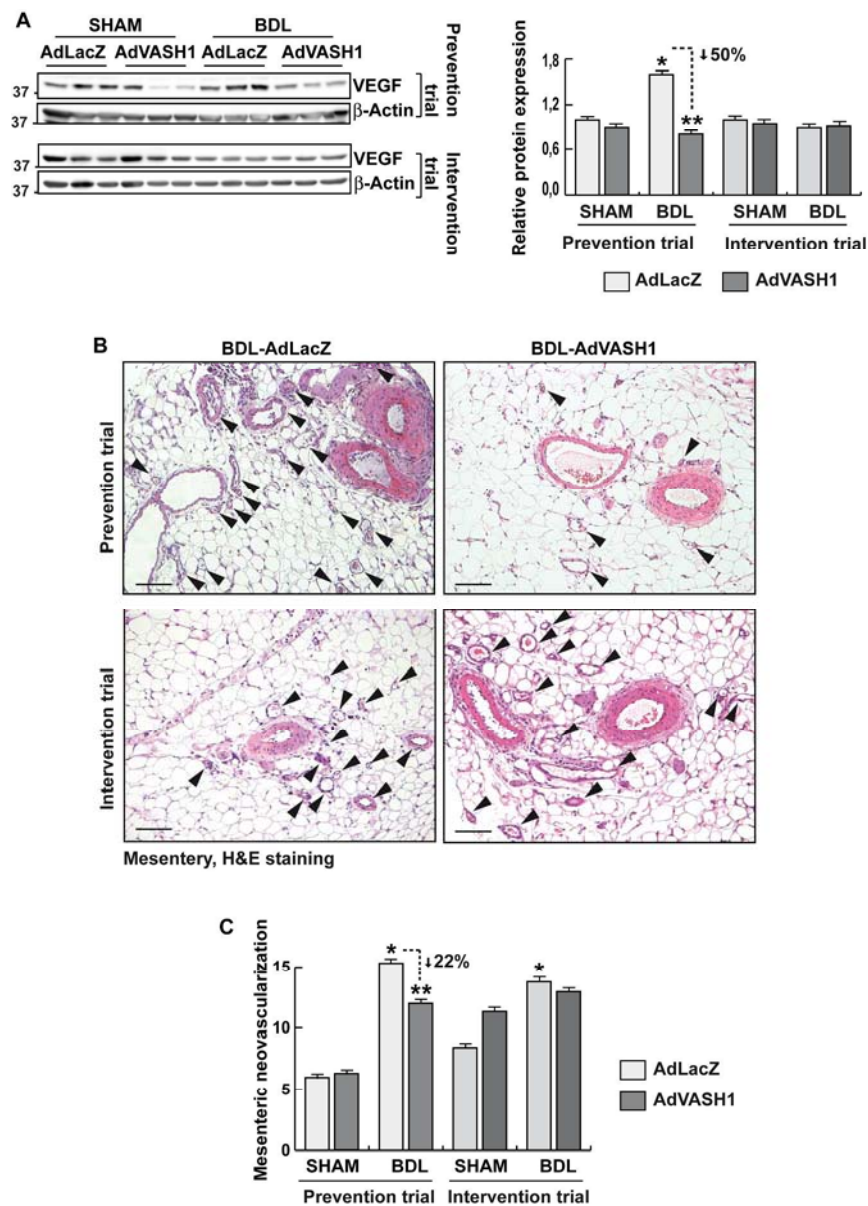


Figure 5: Effects of AdvASH1 on mesenteric angiogenesis in BDL rats. (A) Western blotting of VEGF protein in the mesentery of AdvASH1- and AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, and densitometric quantification of protein expression relative to loading control β -actin. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (B) Mesentery H&E staining in AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL rats. (C) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area) in AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean \pm S.E.M. *P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. **P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. Scale bar: 100- μ m.

199x280mm (300 x 300 DPI)

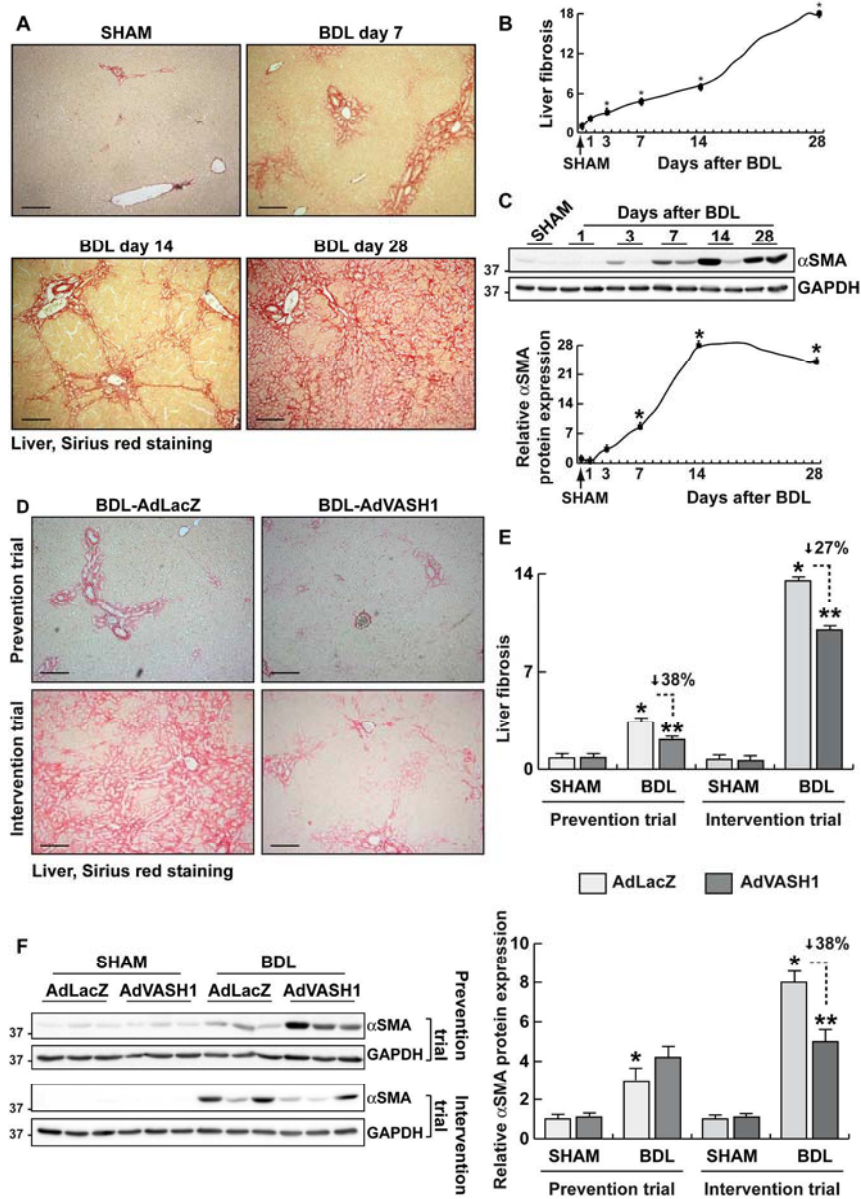


Figure 6: Effects of AdvASH1 on liver fibrosis in BDL rats. (A) Liver Sirius red staining over an observation period of 28 days after BDL. (B) Quantification of liver fibrosis (sirius red staining area/total area) in BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean±S.E.M. (C) Western blotting of αSMA protein in the rat liver over an observation of 28 days after BDL. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. (D) Sirius red staining in liver of AdvASH1- and AdLacZ-treated BDL rats. (E) Quantification of liver fibrosis (sirius red staining area/total area) in AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6-8/group). Results are expressed as mean±S.E.M. (F) Western blotting of αSMA protein in the liver of AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. *P<0.05 versus SHAM (A,C) or AdLacZ-treated SHAM rats (E,F). **P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats (E,F). Scale bars: 200-μm. 207x292mm (300 x 300 DPI)

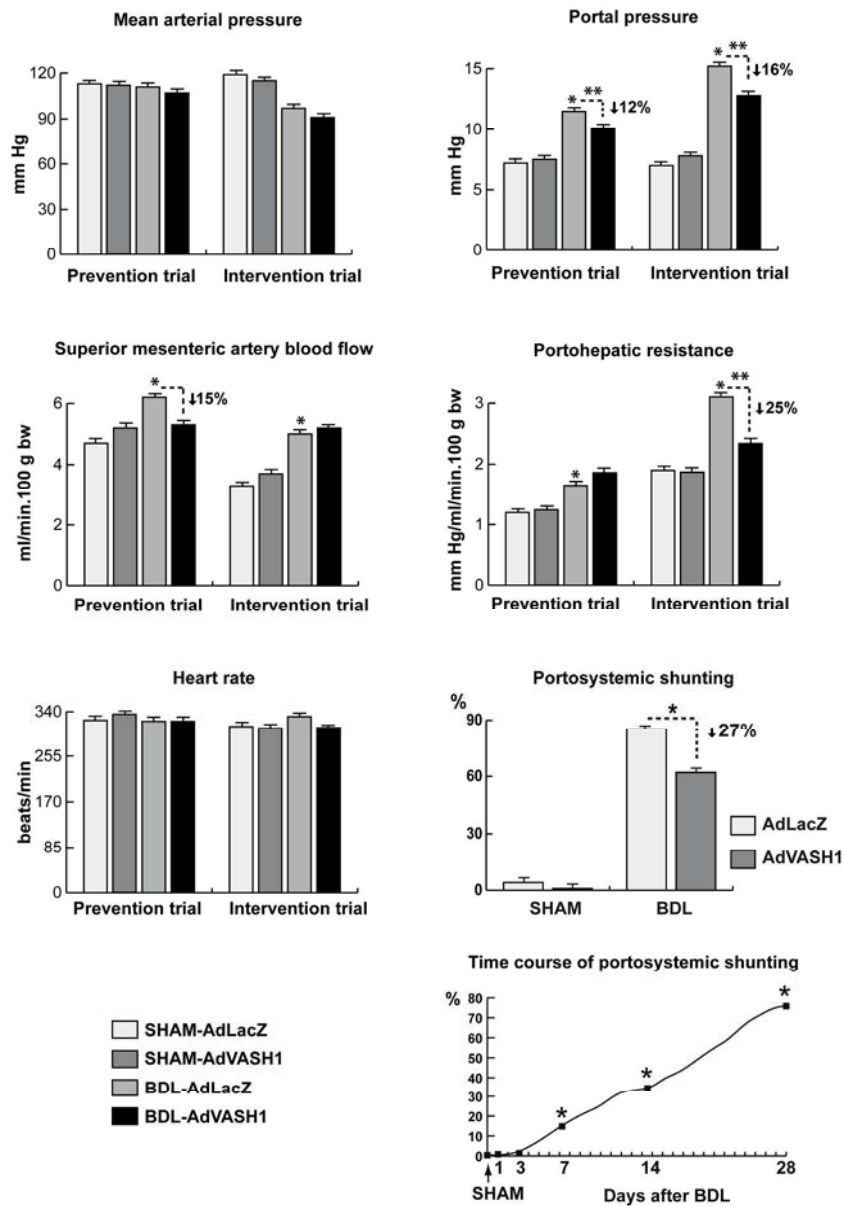
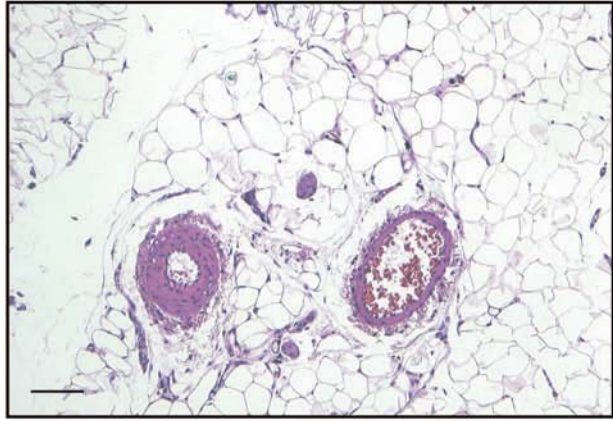
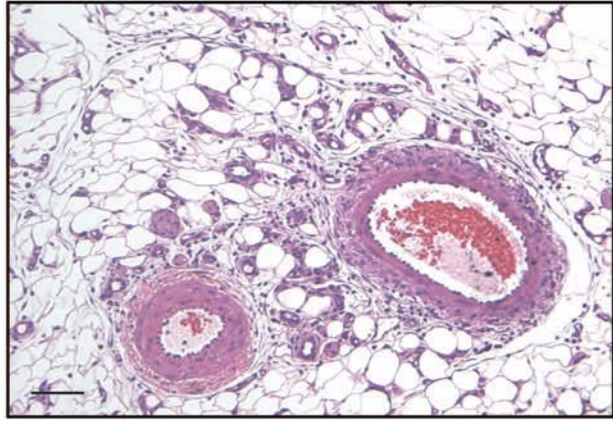


Figure 7: Hemodynamic effects of AdvVASH1. Effects of AdvVASH1 and AdLacZ on mean arterial pressure, portal pressure, superior mesenteric artery blood flow, portohepatic vascular resistance, heart rate and portosystemic shunting in BDL and SHAM rats, in prevention (SHAM-AdLacZ, n=6; SHAM-AdvVASH, n=5; BDL-AdLacZ, n=6; BDL-AdvVASH, n=7) and intervention (SHAM-AdLacZ, n=5; SHAM-AdvVASH, n=7; BDL-AdLacZ, n=6; BDL-AdvVASH, n=10) trials. *P<0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. **P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. Time course of portosystemic shunting over an observation period of 28 days after BDL is also shown (*P<0.05 versus SHAM). All results are expressed as mean±S.E.M.

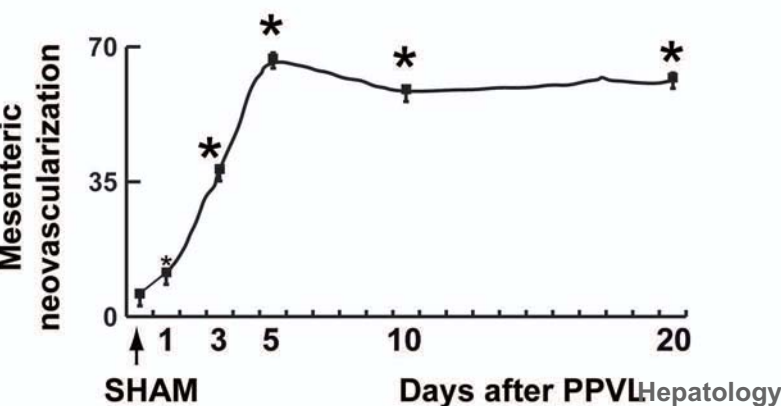
199x287mm (300 x 300 DPI)



Mesentery, H&E staining

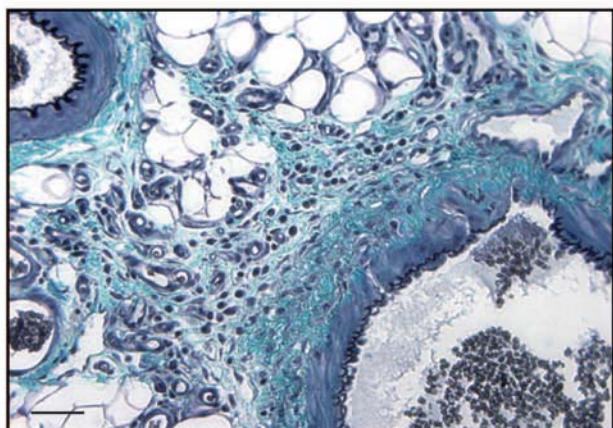


B



C

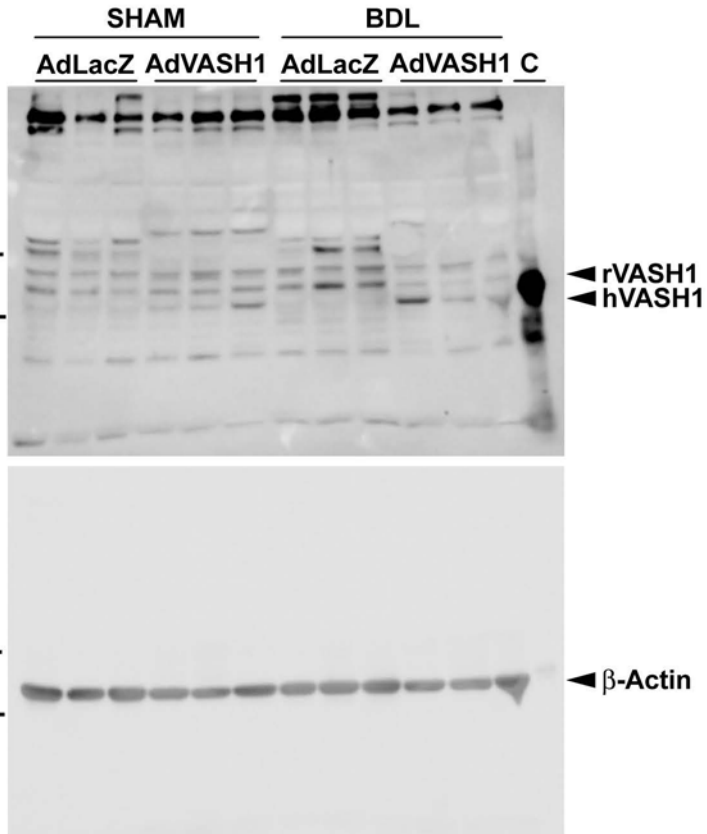
PPVL day 20



Mesentery, Masson's trichrome staining

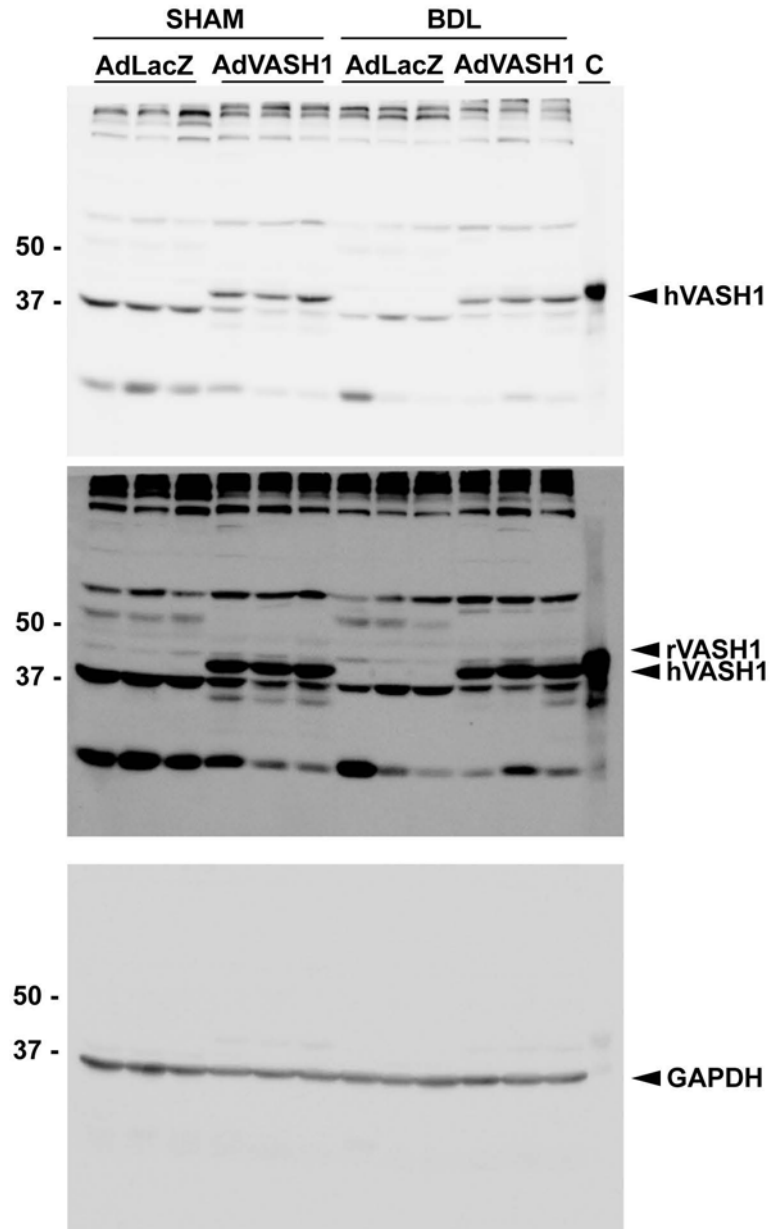
A

Mesentery
VASH1 Prevention trial



B

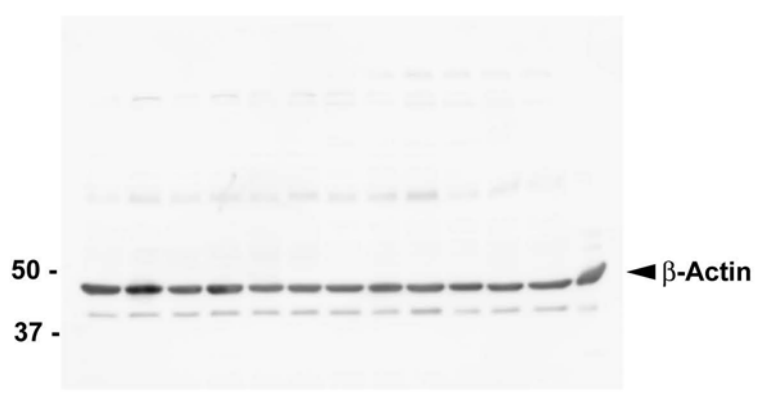
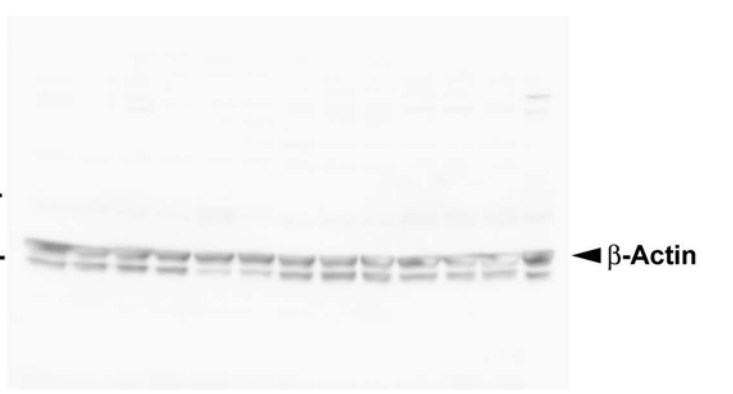
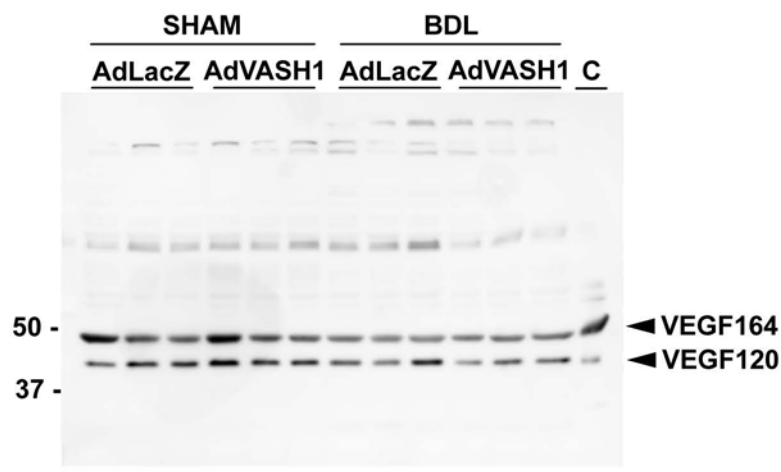
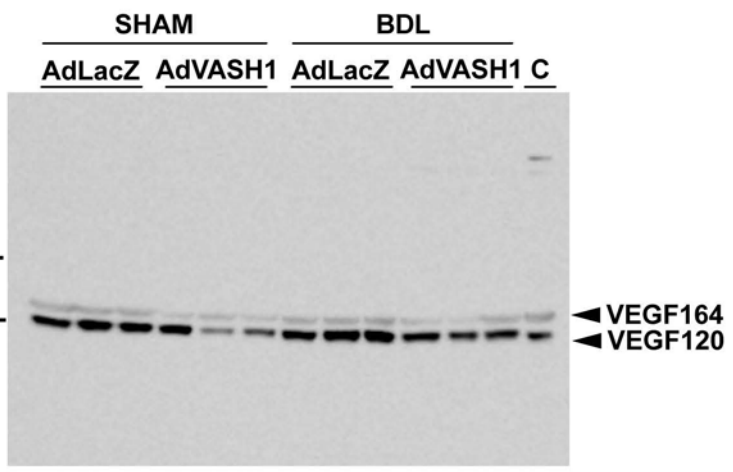
Liver
VASH1 Prevention trial



Hepatology
MESENTERY

VEGF Prevention trial

VEGF Intervention trial

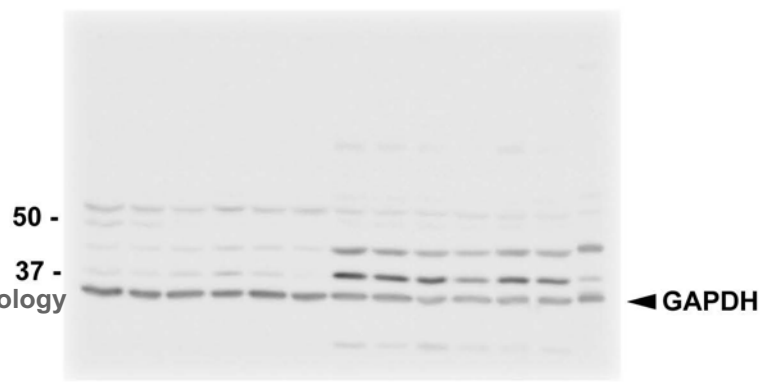
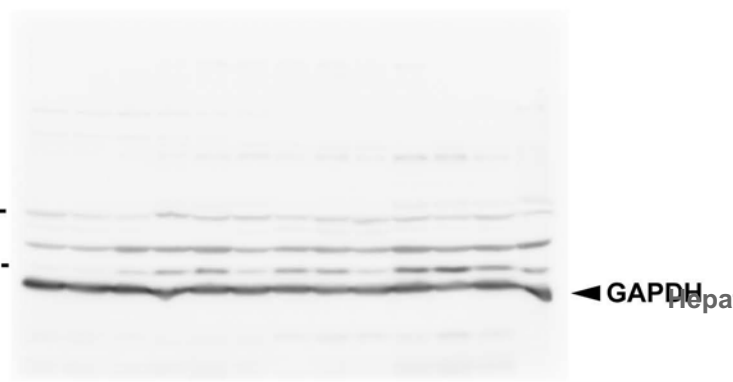
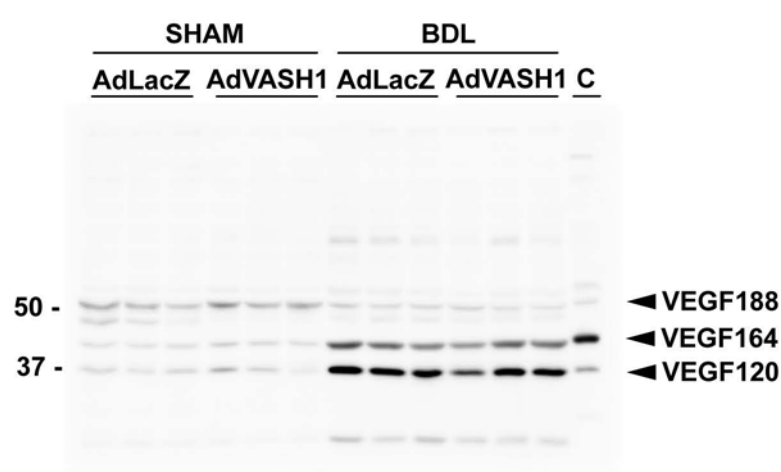
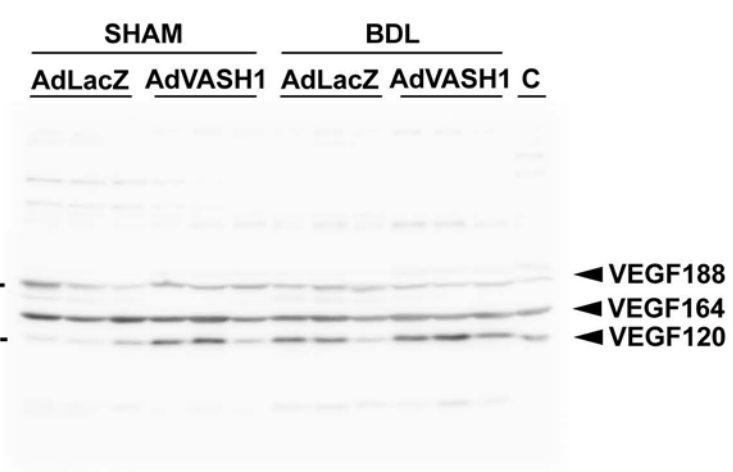


B

LIVER

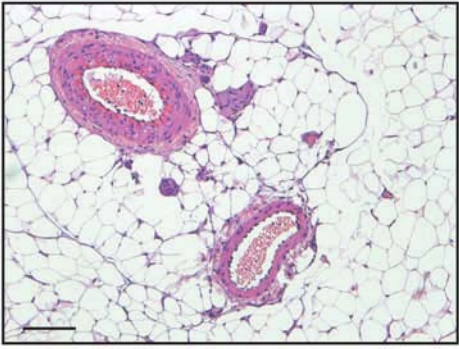
VEGF Prevention trial

VEGF Intervention trial

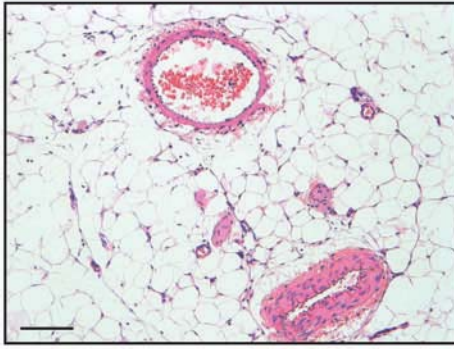


Mesentery vascularization
(H&E staining)

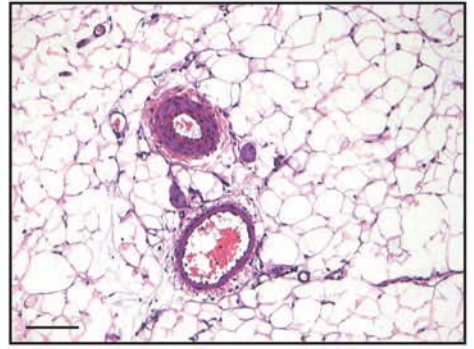
SHAM-AdLacZ



SHAM-AdvASH1

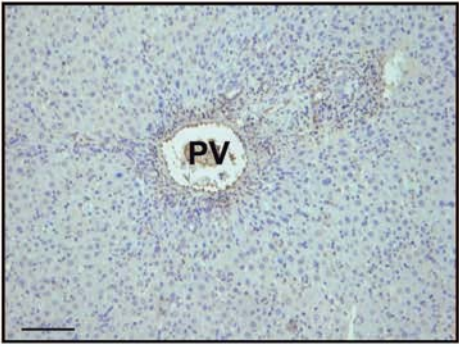


SHAM-AdLacZ

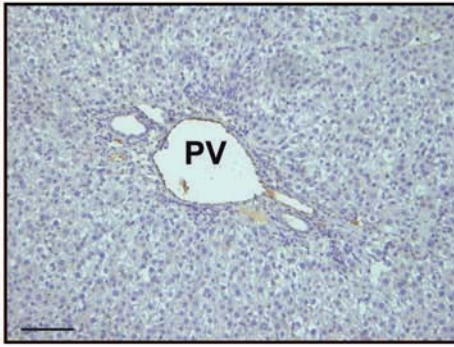


Liver vascularization
(vWF IHC)

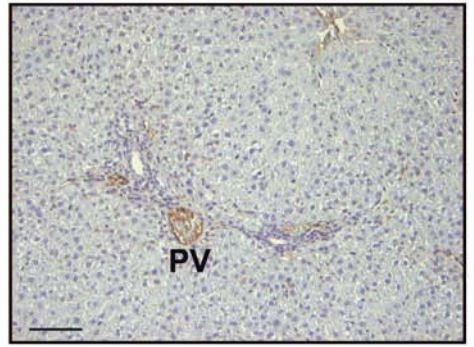
PV



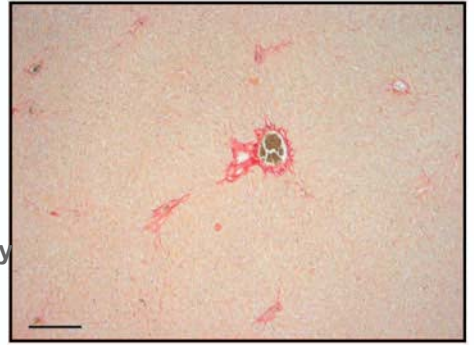
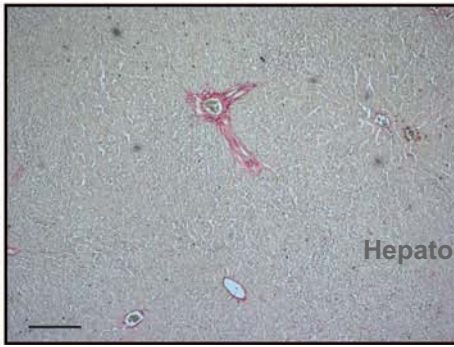
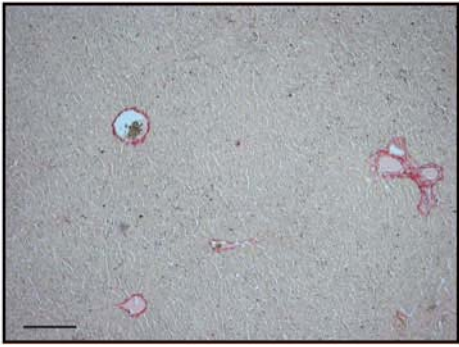
PV

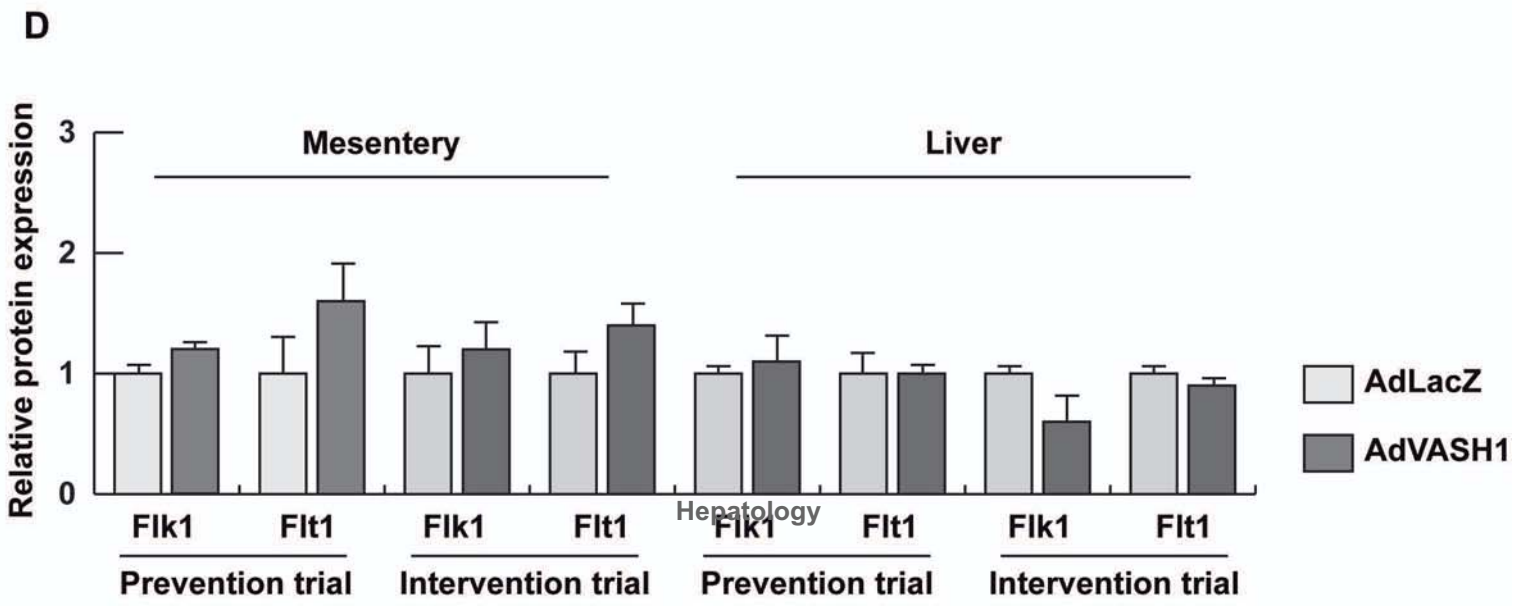
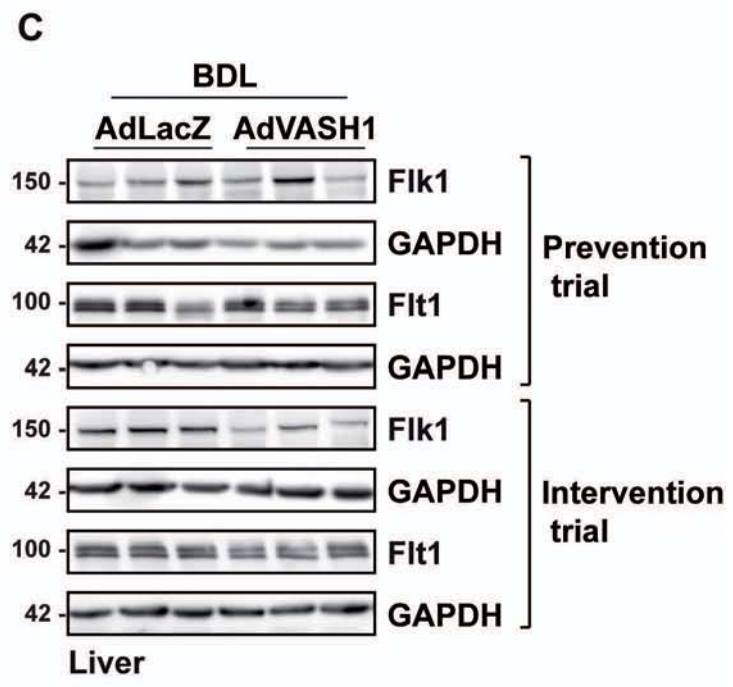
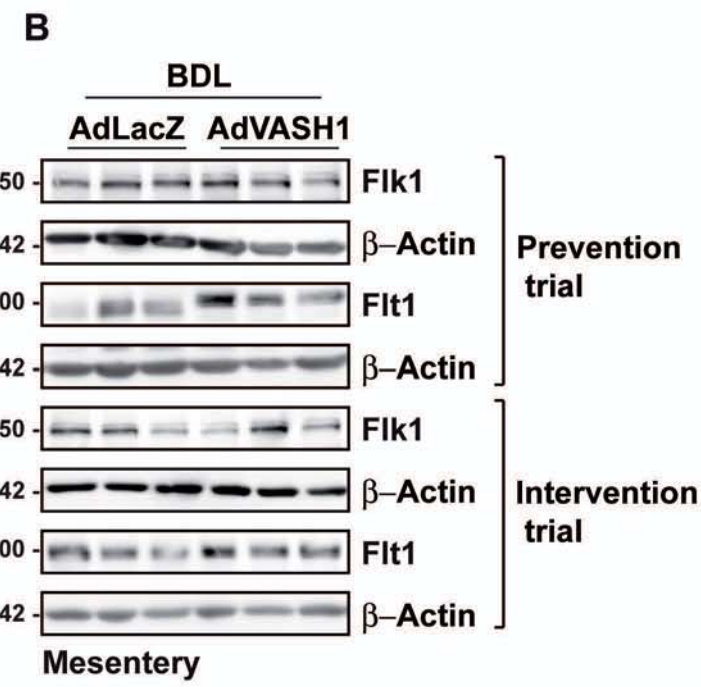
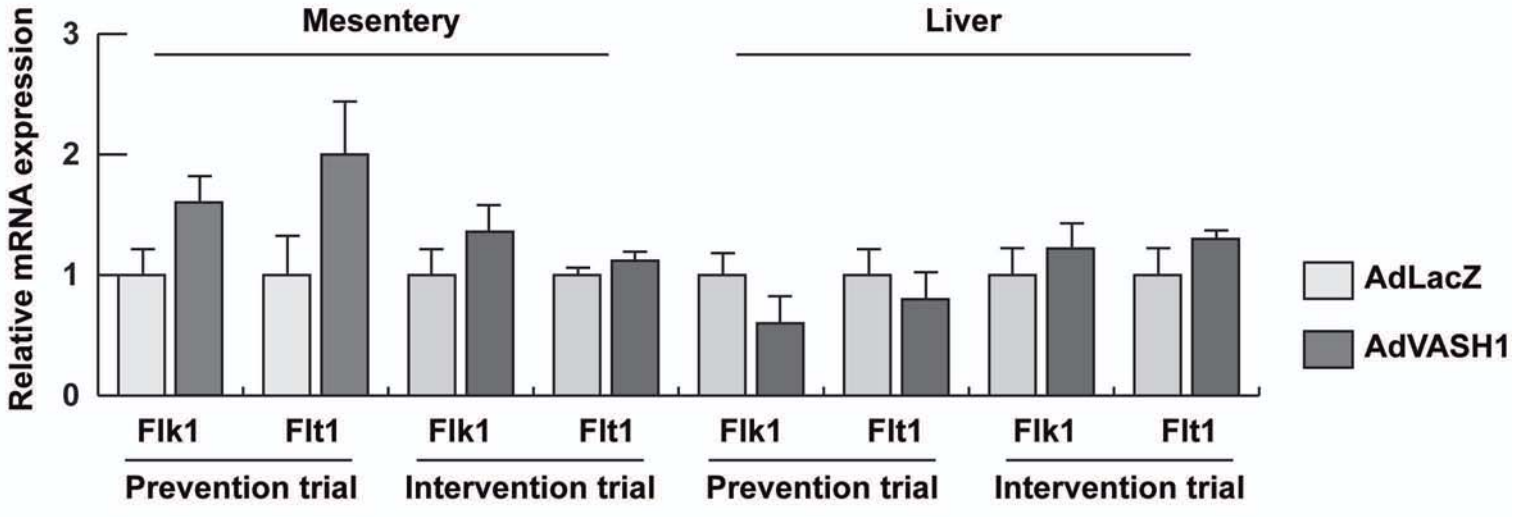


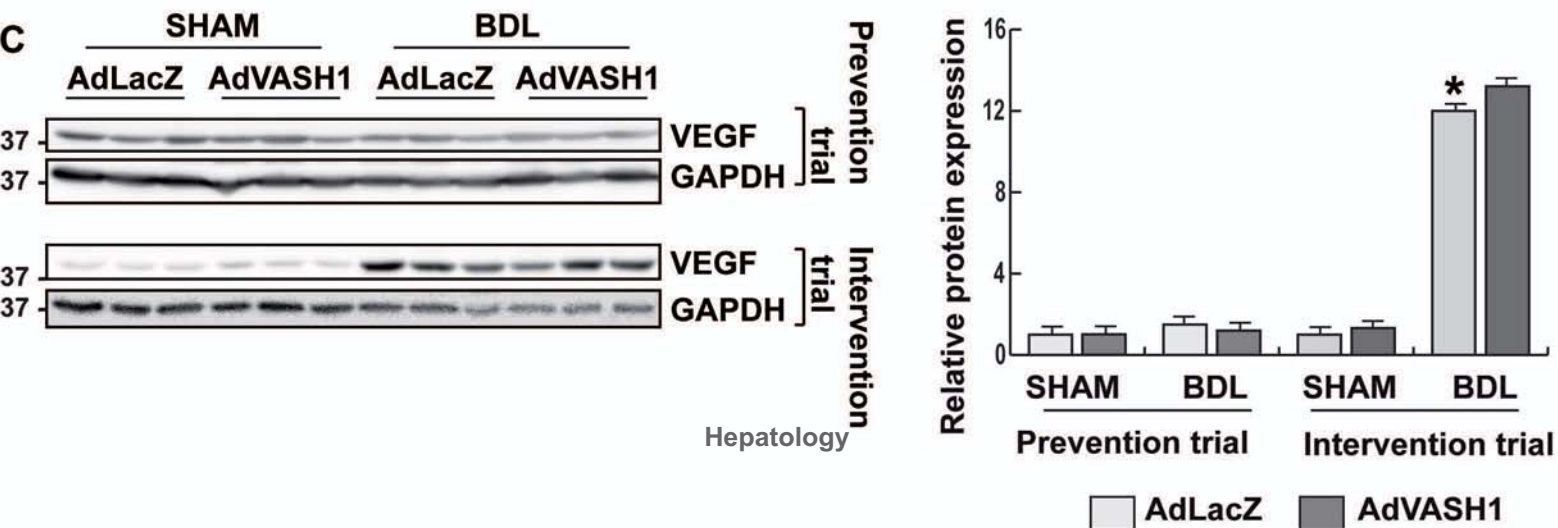
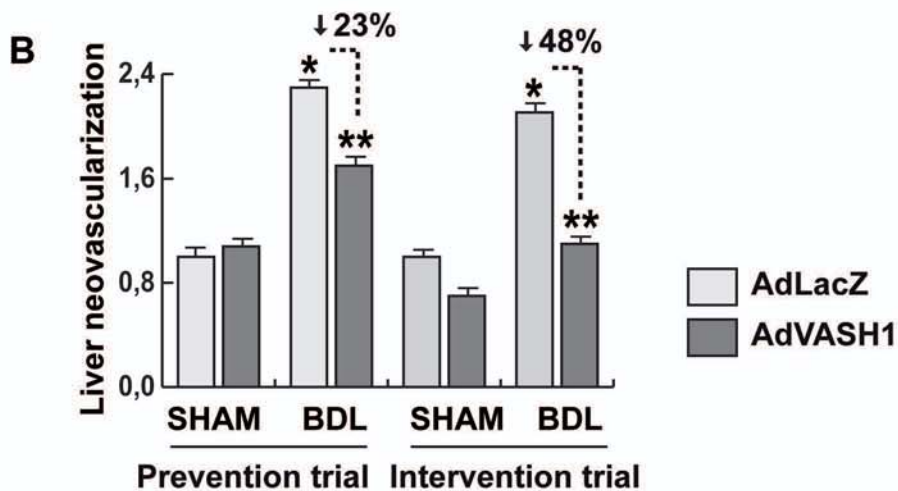
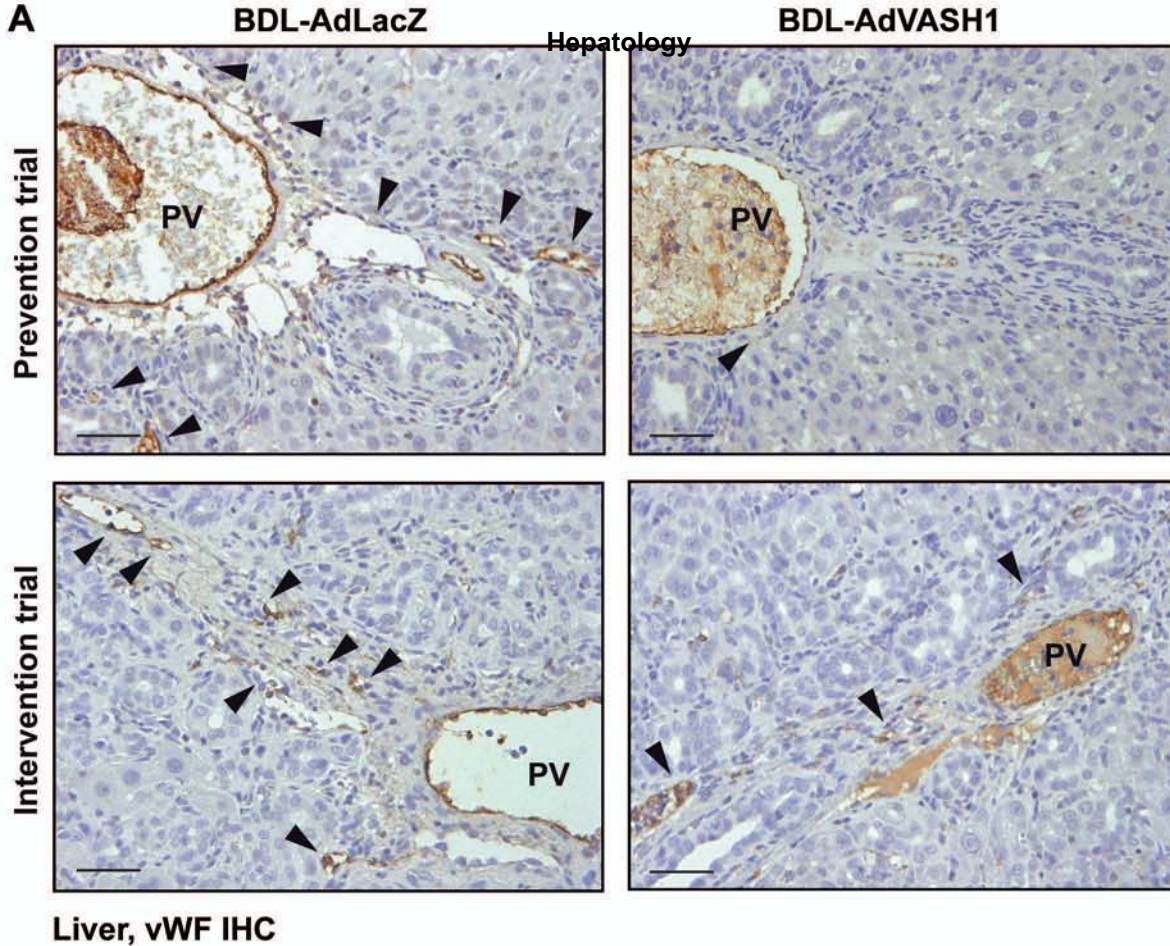
PV



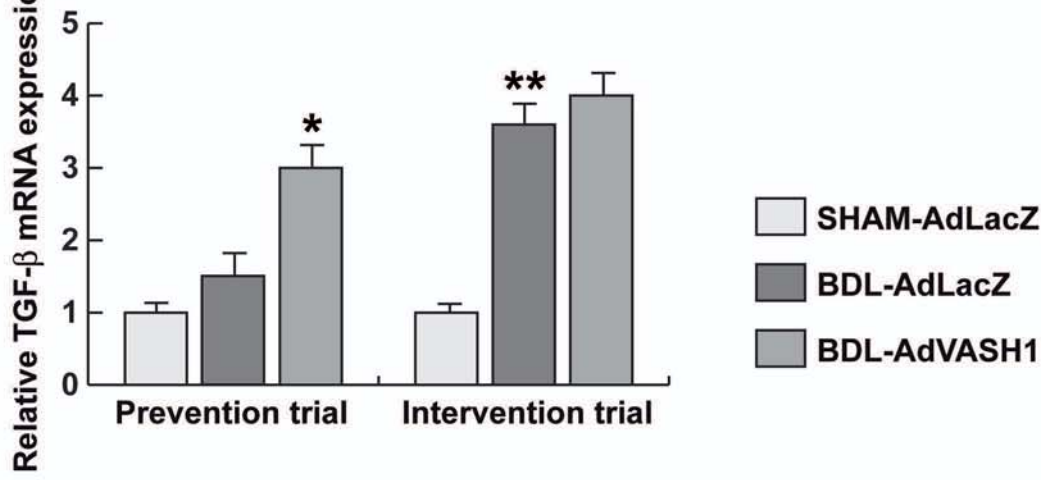
Liver fibrosis
(Sirius red staining)



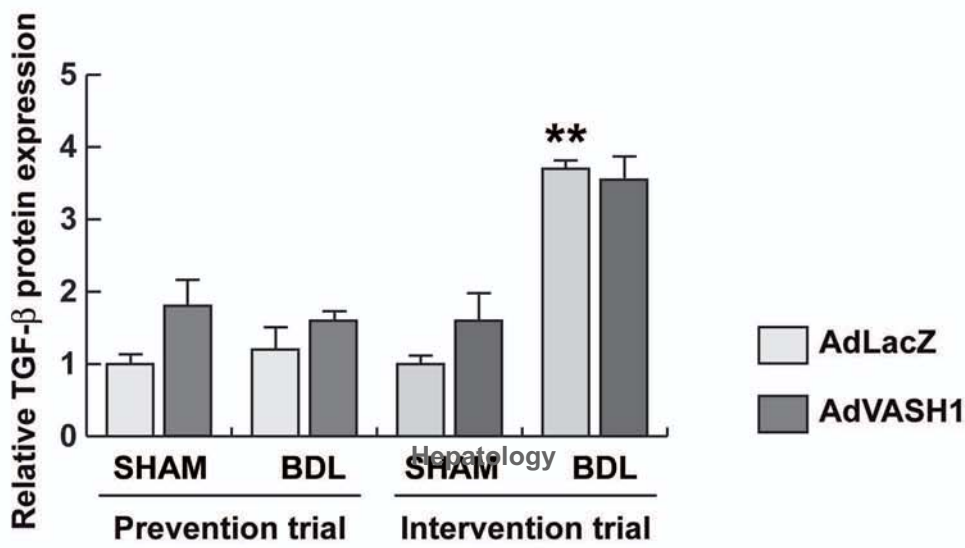
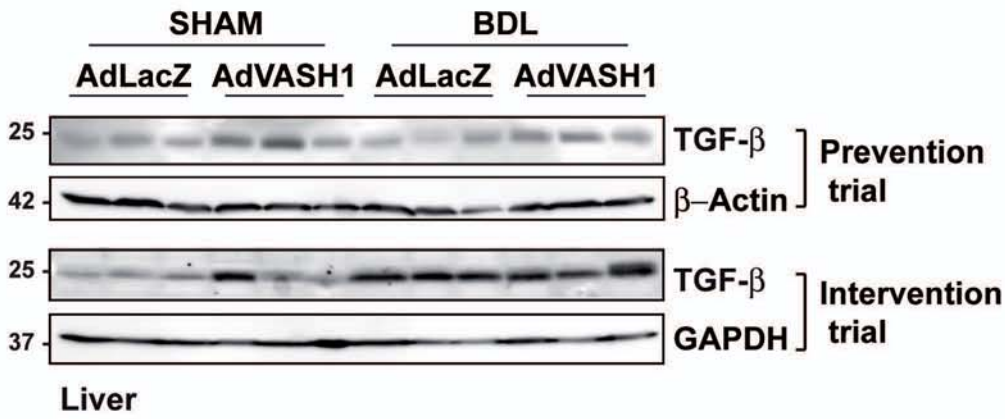




Hepatology



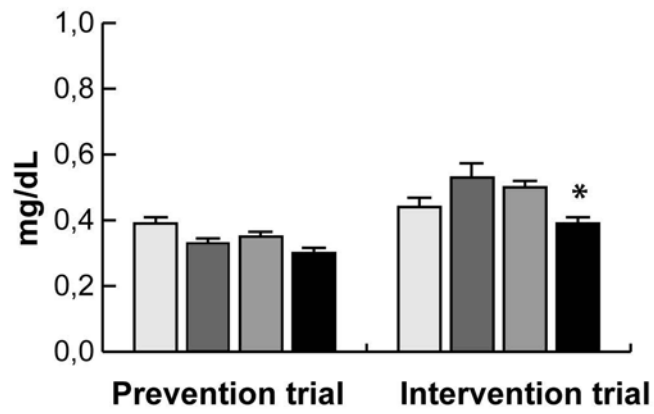
B



A

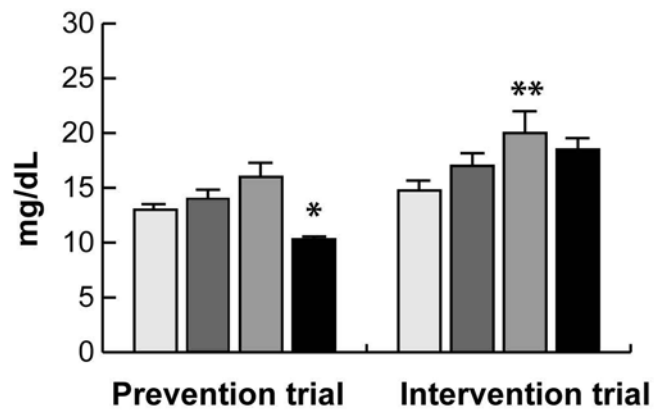
Hepatology

Creatinine



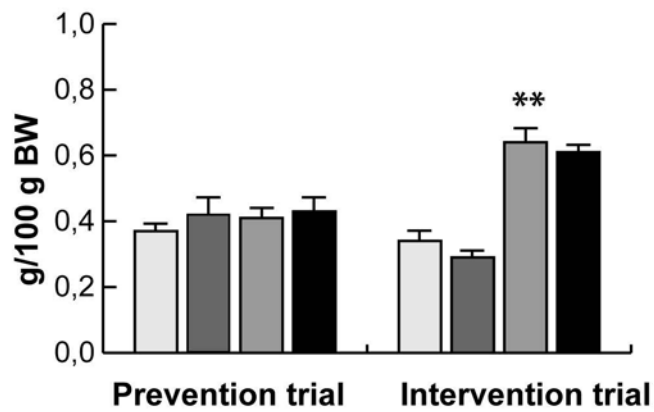
B

Blood Urea Nitrogen



C

Spleen weight (100 g BW)



SUPPLEMENTARY TABLE 1: Clinical and hemodynamic data of the patients from whom liver samples were obtained. OLT, orthotopic liver transplantation; HVP, hepatic venous pressure gradient (equivalent of portal pressure gradient in cirrhosis)¹.

Stage of the disease and Child-Pugh score	Source of liver sample	Data regarding portal hypertension
Compensated cirrhosis (n=4) Mean Child-Pugh score = 6	Transjugular liver biopsy in 3; explanted liver on OLT in one	3 without varices, 1 with small esophageal varices Mean HVP 10.5 mmHg (range 7.5-15 mmHg)
Decompensated cirrhosis (n=8) Mean Child-Pugh score = 9	Explanted liver on OLT	1 without varices, 4 with small esophageal varices, 3 with large esophageal varices Mean HVP 18 mmHg (range 12-24 mmHg)

(1) Berzigotti A, Seijo S, Reverter E, Bosch J. Assessing portal hypertension in liver diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;7:141-155.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Mesenteric angiogenic activity in portal hypertensive rats. (A) Photomicrographs of H&E-stained mesenteric sections from sham-operated control rats (SHAM, n=6), and from portal hypertensive rats at day 5 after partial portal vein ligation (PPVL, n=6), showing extensive mesenteric neovascularization after PPVL. Scale bar: 100 μ m. (B) Quantification of the magnitude of portal hypertension-associated mesenteric neovascularization (vessel number per tissue area) over an observation period of 20 days after PPVL (n=6 at each time point). * P <0.05 versus SHAM control rats. The first stage of the disease corresponded with a period of maximal angiogenic activity. In advanced portal hypertension, mesenteric angiogenesis reached a plateau involving the final stage of vessel formation. (C) Masson's trichrome staining in the mesentery from PPVL rats at day 20, showing that neovessels were surrounded by collagen extracellular matrix. These neovessels were also functional and perfused, as shown by their vascular integrity (i.e., vascular walls with endothelial cells covered by pericytes) and the presence of erythrocytes into their lumina. Scale bar: 100 μ m.

Supplementary Figure 2: Whole blots of VASH1 protein after AdvASH1 treatment. (A) Expression of VASH1 protein in the mesentery of bile duct ligated (BDL) rats and sham-operated (SHAM) control animals after AdvASH1 or AdLacZ treatments, following the prevention trial. Arrowheads indicate bands

corresponding to the endogenous rat VASH1 protein (rVASH1, 42 KDa) and the AdvVASH1-delivered human VASH1 protein (hVASH1, 40 KDa). Below, its loading control (β -Actin). (B) Expression of VASH1 protein in the liver of bile duct ligated (BDL) rats and sham-operated (SHAM) control animals after AdvVASH1 or AdLacZ treatments, following the prevention trial. Arrowhead indicates the band corresponding to the AdvVASH1-delivered human VASH1 protein (hVASH1, 40 KDa). Below, a longer exposure of the membrane showing endogenous rat VASH1 protein (rVASH1, 42 KDa) and human VASH1 (hVASH1, 40 KDa). At the bottom, the loading control (GAPDH). These whole blots correspond to those shown in Figure 4C. C lanes correspond to human VASH1 transfected 293T cell lysate used as a positive control.

Supplementary Figure 3: Whole blots of VEGF protein after AdvVASH1 treatment. (A) Expression of VEGF protein in the mesentery of bile duct ligated (BDL) rats and sham-operated (SHAM) control animals after AdvVASH1 or AdLacZ treatments, following the prevention (left) and intervention trials (right), with their respective loading controls (β -Actin). These whole blots correspond to those shown in Figure 5A. (B) Expression of VEGF protein in the liver of bile duct ligated (BDL) rats and sham-operated (SHAM) control animals after AdvVASH1 or AdLacZ treatments, following the prevention (left) and intervention trials (right), with their respective loading controls (GAPDH). These blots correspond to those shown in Supplementary Figure 6. C lanes correspond to a cell lysate of ECV304 cells, a spontaneously transformed cell line derived from a Japanese human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture, employed as control for VEGF expression.

Supplementary Figure 4: Lack of effects of AdvVASH1 and AdLacZ treatments in SHAM control rats. Photomicrographs of mesentery and liver sections from AdvVASH1- or AdLacZ-treated SHAM rats, following the prevention and intervention trials. Results show that AdvVASH1 and AdLacZ treatments did not affect mesentery vascularization (H&E staining; scale bar: 100 μ m), liver vascularization (immunohistochemistry for the endothelial cell marker von Willebrand factor, vWF; scale bar: 100 μ m), and liver fibrosis (Sirius red staining; scale bar: 200 μ m). PV, portal vein.

Supplementary Figure 5: Expression of VEGF receptors (Flk1 and Flt1) after AdvVASH1 treatments. (A) Quantification of relative Flk1 (VEGF receptor-2) and Flt1 (VEGF receptor-1) mRNA expression by RT-PCR in the mesentery and liver of BDL rats treated with AdvVASH1 or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. Results are expressed as mean \pm S.E.M of three to four independent biological replicates from each experimental group. (B) Western blotting of Flk1 and Flt1 proteins in the mesentery of BDL rats treated with AdvVASH1 or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. β -Actin was used as a loading control. (C) Western blotting of Flk1 and Flt1 proteins in the liver of BDL rats treated with AdvVASH1 or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. GAPDH was used as a loading

control. (D) Densitometric quantification of protein expression corresponding to the blots shown in panels B and C. Data are mean±S.E.M.

Supplementary Figure 6: Effects of AdvASH1 on liver neovascularization and hepatic protein expression of proangiogenic factors. (A) Photomicrographs of liver sections immunostained for the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF), from AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL rats, following the prevention and intervention trials. Arrowheads indicate vWF-positive vessels. Scale bar: 50 μ m. PV, portal vein. (B) Quantification of the liver neovascularization (vWF-positive microvessels per field). Results are expressed as mean±S.E.M from 6-8 rats per group. * P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. Scale bar: 50 μ m. (C) Immunoblotting of VEGF in the liver from AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention and intervention trials. GAPDH was used as loading control. Densitometric quantification of protein expression is also shown. Data are mean±S.E.M. * P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats.

Supplementary Figure 7: TGF- β expression in rat liver after AdvASH1 treatments. (A) Quantification of relative TGF- β mRNA expression by RT-PCR in the liver of BDL rats treated with AdvASH1 or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. Expression in AdLacZ-treated SHAM rats is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M of three to four independent biological replicates from each experimental group. * P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. (B) Western blotting of TGF- β protein in the liver of BDL and SHAM rats treated with AdvASH1 or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. GAPDH was used as a loading control. Densitometric quantification of protein expression is also shown. Data are mean±S.E.M. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats.

Supplementary Figure 8: Effects of AdvASH1 treatment in renal function and spleen weight. (A) Serum creatinine levels (mg/dl) in BDL and SHAM rats treated with AdvASH1 or AdLacZ following the prevention and intervention trials (n=4 per group). Results are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. (B) Blood urea nitrogen (BUN) levels in BDL and SHAM rats treated with AdvASH1 or AdLacZ following the prevention and intervention trials (n=4 per group). Results are expressed as mean \pm SEM. * P <0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. ** P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. (C) Spleen weight to body weight ratio (g per 100g body weight) in BDL and SHAM rats treated with AdvASH1 or AdLacZ following the prevention and intervention trials (n=6-8 per group). ** P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats.

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animal model of prehepatic portal hypertension. Portal hypertension was induced by partial portal vein ligation (PPVL), as previously described. Briefly, under anaesthesia with a combination of ketamine (100 mg/kg) (Merial, Lyon, France) plus midazolam (5 mg/kg) (Baxter, Deerfield, IL), a calibrated constriction of the portal vein was performed using a single ligature of 3-0 silk tied around the portal vein and a 20-gauge blunt-tipped needle. The needle was then removed, leaving a calibrated constriction of the portal vein. Sham-operated (SHAM) control rats were operated in the same manner as the portal hypertensive animals, except that the portal vein was not ligated.

Animal model of secondary biliary cirrhosis. Secondary biliary cirrhosis with intrahepatic portal hypertension was induced in rats by common bile duct ligation (BDL), as previously described. While each animal was under anaesthesia, the common bile duct was achieved by the isolation of common bile duct and occlusion by double ligature with 5-0 silk thread. The bile duct was then resected between the two ligatures. Two days after surgery, urine turns dark brown colour because of the presence of bilirubin in the urine. This event indicates successful ligation. In SHAM rats, the bile duct was similarly manipulated, but not ligated.

Preparation of recombinant adenovirus. Replication-defective recombinant adenoviral vectors encoding human vasohibin-1 (Ad-CMV-VASH1 or AdVASH1) or β -galactosidase reporter gene (Ad-CMV-LacZ or AdLacZ), under the transcriptional control of the cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter, were purchased from Vector Biolabs (Philadelphia, PA). After transfection of the adenovirus plasmids into human embryonic kidney HEK293A cells (Invitrogen), were seeded in supplemented DMEM medium (10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 1% non-essential amino acids and 0.1% sodium pyruvate) and allowed to grow. When culture achieved 80% of confluence, cells were infected with AdVASH1 or AdLacZ at multiplicity of infection (MOI) of 20:1 and incubated for 72 h at 37°C and 5% CO₂. Once cytopathic effects were evident, the medium containing adenovirus was collected, submitted to three freeze-thaw cycles to lyse the remaining cells, and centrifuged (405 g, 5 min). The obtained supernatant was treated with 10 U/ml benzonase (30 min, RT) to eliminate bacterial DNA. An ion exchange membrane adsorber (Sartobind Q75; Sartorius, Germany) was used to purify viral suspension. Viral suspension was prediluted in dilution buffer (20 mM bicine, 0.6 M NaCl; pH 8.4) and washing steps were performed using wash buffer (10 mM bicine, 0.4 M NaCl; pH 8.4). Finally, adenovirus were eluted with elution buffer (10 mM bicine and 0.61 M NaCl; pH 8.2) and storage buffer (10 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.2% BSA and 50% glycerol; pH 8.0) was added to preserve virus at -80°C. The tissue culture infective dose (TCID₅₀) assay was performed to determine titer of obtained adenovirus. Serial dilutions of a virus stock (10⁻⁵ to 10⁻¹²) were prepared and inoculated onto replicate HEK293A cell cultures, in 96 well plastic plates. The number of cell cultures that were infected was then determined for each virus dilution by

looking to cytopathic effects after an incubation period. TCID₅₀ titer was calculated from dilution of virus at which 50% of the cell cultures were infected and contained at least one plaque forming unit (pfu).

β -Galactosidase reporter gene chemiluminescent assay for transfection efficiency of adenovirus. Transfection efficiency of adenovirus was tested *in vivo* in BDL and SHAM rats by the injection of recombinant adenoviruses under the control of the cytomegalovirus promoter encoding for the β -galactosidase (LacZ) gene. Injections were performed through the tail vein, at a dose of 1×10^{10} pfu, at the moment of surgery (prevention trial) or two weeks after the initial surgery (intervention trial). Tissues were harvested one week after the administration of adenoviral vectors, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C . Then, tissues were grinded in liquid nitrogen into a powder and lysis buffer was added. Samples were centrifuged ($157,000\text{ g}$, 20 min) and protein concentration was measured in the collected supernatants by Bradford assay. The adenoviral tissue distribution was measured using the β -galactosidase reporter gene chemiluminescent assay, Galacto-Light Plus (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. In brief, $40\ \mu\text{g}$ protein samples (in triplicate for each rat) were diluted in the kit's lysis buffer plus 0.1% BSA to a final volume of $20\ \mu\text{l}$. Then, $200\ \mu\text{l}$ of reaction buffer, containing a chemiluminescent substrate for β -galactosidase, was added to each sample. After 45 min, $300\ \mu\text{l}$ of Accelerator was added to trigger light emission from the substrate, and samples were read with a Berthold Lumat LB9507 luminometer, obtaining a value of Relative Light Units (RLU). The resulting values were translated to nanograms of β -galactosidase by a standard curve performed with various known concentrations of β -galactosidase (G5635, Sigma, St Louis, MO).

X-Gal staining for transfection efficiency of adenovirus. Livers were harvested at different time points after injections, rinsed in PBS and $2\ \text{mM}\ \text{MgCl}_2$ and fixed in 0,5% glutaraldehyde/PBS for 1 h. Then, livers were transferred to 15% sucrose solution (1 h, 4°C) and 30% sucrose solution (overnight, 4°C) for cryopreservation. The next day, tissues were embedded in OCT compound and snap-frozen in a bath of methylbutane immersed in liquid nitrogen. The OCT-embedded blocks were cut on a cryotome into $10\ \mu\text{m}$ thick sections and mounted on superfrost slides. LacZ Tissue Staining Kit (InvivoGen, San Diego, CA) was used to perform X-gal staining. According to the manufacturer's instructions, the sections were fixed in 0,5% glutaraldehyde/PBS for 10 min and immersed overnight at 37°C in a staining solution containing X-gal in a PBS solution plus potassium ferrocyanide, potassium ferricyanide, MgCl_2 , Igepal and sodium deoxycholate. Finally, slides were rinsed in PBS for 30 min and mounted with a xylene-free mounting medium.

Histological analyses and immunohistochemistry. Tissues were harvested, fixed by submersion in 10% buffered formalin solution, and embedded in paraffin. Successive $2\text{-}\mu\text{m}$ sections were then obtained and prepared for histological staining (H&E staining, and modified Masson's Trichrome staining), using

standard histological protocols. For immunostaining, the 2- μm paraffin sections were deparaffinized in xylol and rehydrated in graded alcohol series. Endogenous peroxidase was inhibited using 3% H_2O_2 (10 min, RT). Sections were then washed in PBS and heated in a pressure cooker for epitope retrieval (in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, 5 min). Slides were blocked with 5% normal goat serum for 1 h, and then incubated (1 h, RT, or overnight, 4°C) with polyclonal antibodies against VEGF (1:100 dilution, ab46154, Abcam, Cambridge, UK) and VASH1 (1:100 dilution, HPA000653, Sigma), and monoclonal antibodies against vWF (1:1000 dilution, A0082, Dako, Glostrup, Denmark). Sections were then washed with PBS, and incubated with Dako Real EnVision Detection System (HRP mouse/rabbit secondary antibody; 30 min, RT). Antibody binding was revealed using H_2O_2 as a substrate, and diaminobenzidine as a chromogen. Hematoxylin was used as a counterstain. For negative control, primary antibody was omitted and then sections were incubated with corresponding secondary antibodies and detection systems. Stained sections were visualized with a Zeiss microscope. Images from several regions of the tissue sections were then acquired using an AxioCam camera (Carl Zeiss Vision, Germany). Analysis of the digitalized images was performed with computerized imaging system (AxioVision and Image J).

Immunofluorescence and confocal laser microscopy. Tissue sections (2 μm) were deparaffinized, and antigen retrieval and blocking were performed as described above for immunohistochemistry. Primary antibodies against VASH1 (1:50 dilution, sc-134454, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and VEGF (1:50 dilution; ab46154, AbCam) were used. For fluorescence visualization of antibody reactions, primary antibodies were detected using secondary antibodies labeled with the fluorochromes Alexa Fluor (Alexa anti-mouse A555 and Alexa anti-rabbit A647; Invitrogen). To detect cell nuclei, paraffin-embedded tissues were deparaffinized and mounted on Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI (H-1200; Vector). Negative controls were run omitting the primary antibody and incubating with secondary antibodies labeled with the fluorochromes Alexa Fluor. Confocal microscopy was performed at the Advanced Light Microscopy Unit (Scientific and Technological Centers) from the University of Barcelona. Confocal images were acquired using a Leica TCS SP5 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) equipped with a DMI6000 inverted microscope. DAPI, Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 647 images were acquired sequentially using 405, 561 and 633 laser lines, AOBS (Acoustic Optical Beam Splitter) as beam splitter and emission detection ranges 415-525 nm, 570-650 nm and 650-750 nm, respectively, and the confocal pinhole set at 1 Airy units. All images were acquired with an APO 63x oil (NA 1.4) immersion objective lenses, digitized into TIFF format of 1024 \times 1024 pixels and 12 bit depth (4096 fluorescence intensity levels of information). Electronic zoom (x3) was used for stronger magnification and better image resolution. Images were taken in the X-Y plane and/or the Z axis. Stacks of 1 micrometer-thick serial optical slices were taken in Z axis.

Quantification of tissue vascularization. For rat mesentery, tissue was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with H&E. Computer-based quantitative analysis of

angiogenesis was performed in mesenteric sections with the assistance of Axiovision software (Zeiss, Germany) by counting vascular structures from 4-6 digital images taken from each tissue section at 100X magnification. A value from each individual rat was obtained and the average value for each group was calculated. For rat liver, formalin-fixed paraffin-embedded liver sections were immunostained with antibody against the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF) or phosphate-buffered saline, as a negative control. Bound antibody was visualized with diaminobenzidine, as chromogen, and slides were counterstained with hematoxylin. Then, portal tracts from each slide were photographed at 100X magnification and the number of vWF-positive vessels in each field was quantified using Axiovision software. Quantifications were conducted independently by two investigators who were blinded to the samples' profiles.

Quantification of liver fibrogenesis. For semiquantitative analysis of hepatic fibrosis, formalin-fixed paraffin-embedded liver sections were pretreated 10 min with thiosemicarbazide (Sigma) and stained with a solution of 0.1% Sirius red (Direct Red 80; Sigma) in picric acid (Sigma). Slides were photographed and analyzed using Axiovision software (Zeiss, Germany). Multiple fields from each slide were randomly selected and the red stained area per total area (square pixels) was measured.

Analysis of protein expression by immunoblotting. Samples were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl (pH 7.4), 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 40 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM sodium pyrophosphate, 20 µM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and 0.1 µM okadaic acid. The resultant lysates were centrifuged at 15,700g for 30 min at 4°C. Supernatants were collected and total protein was quantified using Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Samples were heated (95°C, 5 min) in SDS- and β-mercaptoethanol-containing sample buffer and separated by 8 or 10% (depending on the protein analyzed) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immunoblot-P, Millipore, Billerica, MA) previously activated with methanol, during 2 hours at 60V at 4°C and stained with Ponceau S Solution (Sigma), to check for equal loading of protein in each lane. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) with 0,05% Tween 20 (TBS-T buffer) containing 5% (wt/vol) skim milk for 1 h, and then incubated, overnight at 4°C, with corresponding antibodies against VASH1 (1:200 dilution in TBS-T with 5% milk; sc-134454, Santa Cruz Biotechnology and HPA000653, Sigma), VEGF (1:500 dilution; ab46154, Abcam), α-SMA (1:1000 dilution; A2547, Sigma), Flk1 (1:500 dilution; sc-315; Santa Cruz), Flt1 (1:200 dilution, sc-316; Santa Cruz Biotechnology) and TGFβ (1:500 dilution; MAB 1032; Millipore). Blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgG (1:10000 dilution in TBS-T with 5% skim milk; Stressgen, Sidney, Canada) for 1 h at RT. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Western blotting detection kit; Millipore) and an ImageQuant LAS-4000 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences). Quantification of protein signals was performed using

computer-assisted densitometry. Loading accuracy was evaluated via membrane rehybridization with antibodies against β -actin (1:1000 dilution, 1h, RT; A2228, Sigma) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:1000 dilution, 1h, RT; sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). Molecular weight was calculated with prestained standards (Bio-Rad). The western blot analysis was repeated to confirm reproducibility using the samples collected from three individual rats of each experimental group.

RNA Isolation and reverse transcription. Total RNA was isolated from frozen SHAM (n=3 per treatment group) or BDL livers (n=4 per treatment group) using the Trizol method (Invitrogen). The RNA was treated with DNase (Ambion, Austin TX) to avoid DNA contamination. Obtained RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). For cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was retrotranscribed using Quantitect Reverse Transcription kit as described by the manufacturer (Qiagen).

Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction was used to amplify cDNA templates by using the fluorescent TaqMan technology (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All TaqMan probes (GAPDH, Rn 01775763_g1; 18S, Hs99999901_s1; Flk1, Rn 00564986_m1; Flt1 Rn00579815_m1; TGF β 1, Rn00572010_m1) were purchased from Applied Biosystems. Each polymerase chain reaction was carried out with 2 μ l of the hepatic or mesenteric cDNA sample (20 ng), 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), and probe in a final volume of 20 μ L, as recommended by the manufacturer. After an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, 45 cycles were performed as follows: 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. All experiments were performed in duplicate and normalized with GAPDH. The fold enrichment of target sequences in VASH or LacZ treated BDL rats compared to sham rats was calculated using the comparative Ct method according to manufacturer's instructions.

Renal function tests. Blood (1.5 ml) was drawn from animals at the end of the hemodynamic studies, and serum total creatinine and blood nitrogen urea (BUN) was determined in an ADVIA 1650 automated analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY).

4.2 Estudi 2:

Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats

Mejias M*, **Coch L***, Berzigotti A, Garcia-Pras E, Gallego J, Bosch J, Fernandez M.

* Coautors

GUT 2014 Abr 29

IF: 10.732

29-Apr-2014

Dear Dr. Fernandez,

Manuscript ID gutjnl-[2014-307138](#).R1 - Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats

Thank you for submitting your article to Gut, which I have pleasure in accepting for publication as a Original Article. Well done and many congratulations on an excellent paper!

Your paper will be now sent for editing and typesetting and you will receive a proof to check in about 10 days; please check your junk mail if you have not received your proof within this time.

If you have chosen to pay to have your article published under our Open Access option, please ensure that you pay the required fee within 48 hours so that we can process your article without delays. You can pay with a credit or debit card using our secure online system.

For more details on our Open Access option please visit:

<http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/editorial-policies#open-access>

Please note that a number of institutions have taken out Open Access Memberships with BMJ that either cover the full cost of open access publishing for authors at participating institutions, or allow authors to receive a discount on the open access fee. Please visit our open access webpage at <http://journals.bmj.com/site/authors/openaccess.xhtml> to see a full list of participating institutions, find out if you are eligible, and view instructions on how to obtain your discount code.

When will we publish your article?

Most articles are published Online First in their final form (edited and typeset) about 3 weeks after acceptance. Online First publication establishes primacy for the work; the article is deposited with PubMed and is fully citable. For further details please visit:

<http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/online-first>. Publication in a subsequent print version of the journal is determined by the Editor in Chief.

Post publication

You will be sent a link to your article by email when it is published online and you will be able to track its usage. All articles have individual usage statistics that are updated monthly; these can be accessed from the "Article Usage Statistics" link in the "Services" section to the right of the article online.

Thank you for choosing Gut.

Yours sincerely,

Dr. Matias Avila
Associate Editor, Gut

Prof. Emad El-Omar
Editor in Chief, Gut

Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats

Journal:	<i>Gut</i>
Manuscript ID:	gutjnl-2014-307138.R1
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	12-Apr-2014
Complete List of Authors:	Mejias, Marc Coch, Laura Berzigotti, Annalisa Garcia-Pras, Ester Gallego, Javier Bosch, Jaime Fernandez, Mercedes; Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Hospital Clinic, University of Barcelona, Hepatology
Keywords:	ANGIOGENESIS, CIRRHOSIS

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in**
4 **bile duct-ligated portal hypertensive rats**
5
6
7

8
9 Marc Mejias*, Laura Coch*, Annalisa Berzigotti, Ester Garcia-Pras, Javier Gallego, Jaime Bosch,
10 Mercedes Fernandez
11

12
13 Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), CIBERehd, Hospital Clinic,
14 University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
15
16

17
18 * Joint first authors. Both authors contributed equally to this work.
19
20
21
22
23
24

25 **Corresponding author:** Mercedes Fernandez, PhD; Institute of Biomedical Research IDIBAPS;
26 Rossello 153; 08036 Barcelona (Spain). E-mail address: mercefernandez@ub.edu; Phone: 34-
27 93-2275400; FAX: 34-93-2279348
28
29
30
31
32
33

34 **Electronic word count:** 3640
35
36
37

38 **Keywords:** Cirrhosis, angiogenesis, fibrogenesis, pigment epithelium-derived factor, adenovirus,
39 gene therapy, animal models.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Objective: Antiangiogenic strategies have been proposed as a promising new approach for the therapy of portal hypertension and chronic liver disease. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a powerful endogenous angiogenesis inhibitor whose role in portal hypertension remains unknown. Therefore, we aimed at determining the involvement of PEDF in cirrhotic portal hypertension and the therapeutic efficacy of its supplementation.

Design: PEDF expression profiling and its relationship with VEGF, neovascularization and fibrogenesis was determined in bile duct-ligated (BDL) rats and human cirrhotic livers. The ability of exogenous PEDF overexpression by adenovirus-mediated gene transfer (AdPEDF) to inhibit angiogenesis, fibrogenesis and portal pressure was also evaluated in BDL rats, following prevention and intervention trials.

Results: PEDF was upregulated in cirrhotic human and BDL rat livers. PEDF and VEGF protein expression and localization in mesentery and liver increased in parallel with portal hypertension progression, being closely linked in time and space with mesenteric neovascularization and liver fibrogenesis in BDL rats. Furthermore, AdPEDF increased PEDF bioavailability in BDL rats, shifting the net balance in the local abundance of positive (VEGF) and negative (PEDF) angiogenesis drivers in favor of attenuation of portal hypertension-associated pathological neovascularization. The antiangiogenic effects of AdPEDF targeted only pathological angiogenesis, without affecting normal vasculature and were observed during early stages of disease. AdPEDF also significantly decreased liver fibrogenesis (through metalloproteinase upregulation), portosystemic collateralization and portal pressure in BDL rats.

Conclusion: This study provides compelling experimental evidence indicating that PEDF could be a novel therapeutic agent worthy of assessment in portal hypertension and cirrhosis.

SUMMARY BOX

What is already known about this subject?

- Angiogenesis is a major pathological hallmark of chronic liver disease that is essential to develop and maintain portal hypertension, splanchnic hyperemia and portosystemic collateralization, and is also intimately linked to liver fibrogenesis.
- Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the strongest endogenous angiogenesis inhibitors known to date.
- PEDF gene delivery exhibits antifibrogenic effects during early stages of CCl₄- or thioacetamide-induced liver fibrosis in mice.

What are the new findings?

- PEDF is overexpressed in the liver of patients with HCV-related cirrhosis, as well as in the liver and mesenteric vascular bed in animal models of portal hypertension and cirrhosis.
- PEDF and VEGF are unidirectionally upregulated and correlate with mesenteric neovascularization and liver fibrogenesis during cirrhosis, suggesting that PEDF induction might reflect a compensatory mechanism aimed at reducing the adverse effects of VEGF.
- *In vivo* PEDF gene transfer mediated by adenoviral vectors (AdPEDF) effectively suppresses mesenteric pathological angiogenesis and intrahepatic fibrogenesis in BDL rats, leading to a significant decrease in portal pressure.
- The antiangiogenic properties of AdPEDF are specific for activated vessels engaged in the process of pathologic angiogenesis, sparing the normal organ vasculature.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- From a therapeutic perspective, our results indicate that exogenous PEDF supplementation could be a promising and plausible therapeutic modality for preventing further disease progression and consequently reducing the risk for developing overt liver cirrhosis in patients. Of note, targeting early pathogenic changes might afford an opportunity to intervene on chronic liver disease at a stage before irreversible fibrosis. This possibility is of particular significance since the management of patients with chronic liver disease continues to be a critical and prevalent clinical problem, for which few therapeutic options are available.
 - PEDF administration, by being a therapeutic strategy that specifically targets pathological angiogenesis without affecting physiological angiogenesis and vascular homeostasis, could lead to safer treatment outcomes against pathological neovascularization, without sacrificing efficacy.
 - Our present findings might also have implications for many other diseases whose pathogenicity is mediated by angiogenesis, such as chronic inflammatory disorders and cancer.

INTRODUCTION

Portal hypertension (PH) is the most important complication that develops in patients with liver cirrhosis and remains a major leading cause of mortality and liver transplantation worldwide [1,2].

PH is characterized by a pathological increase in portal pressure (PP), development of hyperdynamic splanchnic circulation, and formation of portosystemic collateral vessels responsible for life-threatening consequences like gastroesophageal variceal bleeding, portosystemic encephalopathy and sepsis [1-3]. Currently, the therapeutic armamentarium for treatment of PH and liver cirrhosis is severely limited [1-3], and new and effective therapeutic strategies to improve the prognosis of cirrhotic patients are urgently needed.

Angiogenesis, the growth of new blood vessels from preexisting vessels [4], is a pathological hallmark of chronic liver disease that is essential to develop and maintain PH, splanchnic hyperemia and portosystemic collateralization, and is also intimately linked to liver fibrogenesis [5,6]. Therefore, antiangiogenesis strategies have been proposed as a feasible and promising therapeutic approach for PH and cirrhosis treatment [7]. However, for this therapeutic strategy to be clinically applicable, it should selectively target abnormally growing neovessels and not physiologic angiogenesis, in order to minimize undesirable side effects such as collapse of normal vasculature, gastrointestinal perforation and bleeding and other adverse effects observed for example in patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis treated with multikinase inhibitors [8,9].

PEDF has recently emerged as an endogenous antiangiogenic molecule that meets these criteria as it specifically and potently suppresses pathogenic neovessel growth without harming mature vessels [10-13]. Another prominent advantage of using angioinhibitors that are endogenously present in the body, such as PEDF, is that these molecules would not be expected to activate drug resistant genes and, thus, may offer a promising breakthrough for effective antiangiogenesis therapy [12,13]. PEDF has the additional therapeutic benefit of being well

1
2
3 tolerated and unlikely to elicit an immunological response or produce the toxic side effects of
4
5 synthetic inhibitors [12,13]. PEDF is actually one of the strongest natural inhibitors of pathological
6
7 angiogenesis known to date [10-13], and this property has turned it into a promising therapeutic
8
9 tool for slowing the progression of many neovascular pathologies, including angiogenic eye
10
11 disease [12-14], diabetic complications [14,15], cardiovascular disease [16], hepatocellular
12
13 carcinoma [17], and several other cancers [18]. Notably, PEDF is constitutively expressed in
14
15 healthy liver [19,20], suggesting that its presence might be physiologically relevant for maintaining
16
17 hepatic vascular homeostasis. Further, an interesting study by Ho *et al.* demonstrated an
18
19 antifibrogenic effect of PEDF gene delivery during early stages of CCl₄- or thioacetamide-induced
20
21 liver fibrosis in mice [21]. Nonetheless, there is no study specifically addressing the potential
22
23 relationship between PEDF and pathological angiogenesis in the context of portal hypertension
24
25 and cirrhosis. In addition, we have recently demonstrated that another endogenous angiogenesis
26
27 inhibitor, vasohibin, modulates PH-associated angiogenesis in experimental cirrhosis and that its
28
29 overexpression partly corrects excessive angiogenesis and decreases portal pressure [22], thus
30
31 proving that manipulation of endogenous anti-angiogenic pathways may be a successful strategy
32
33 to treat PH in cirrhosis.

34
35
36
37
38 These considerations prompted us to provide a detailed characterization of PEDF expression
39
40 in liver specimens from patients with hepatitis C virus (HCV)-related cirrhosis, as well as in liver
41
42 and mesentery from the well established and widely used BDL animal model of PH and cirrhosis,
43
44 and to investigate the therapeutic potential of *in vivo* PEDF gene transfer using adenovirus
45
46 vectors in BDL rats.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

METHODS

Patients. Human samples of HCV-related cirrhotic liver (n=12) were obtained from transjugular liver biopsies (TJLB) or from explanted organ during liver transplantation. TJLB was performed under X-ray videofluoroscopy as previously reported [23]. Liver samples were fixed in formalin and paraffined for immunohistochemistry. Clinical data of patients at the moment of liver sampling are summarized in **Supplementary Table 1**. Paraffin-embedded human normal liver tissue blocks (n=5) were commercially obtained (AMS Biotechnology, Abingdon). All research protocols regarding human samples were approved by the Clinical Review Board and Ethics Committee at Hospital Clinic of Barcelona (protocol number: 2011/6723). All participating patients were thoroughly informed about the studies and provided written informed consent.

Animals. All animal experiments were approved by Laboratory Animal Care and Use Committees of University of Barcelona. Secondary biliary cirrhosis with intrahepatic portal hypertension was induced in male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Cambridge), weighing 275-300g, by common bile duct ligation (BDL). While each animal was under anaesthesia, the common bile duct was isolated, occluded by double ligation with 5-0 silk thread, and then resected between the two ligatures. Two days after surgery, urine turns dark brown colour because of the presence of bilirubin in the urine. This event indicates successful ligation. In SHAM rats, the bile duct was similarly manipulated, but not ligated.

Induction of cirrhosis by carbon tetrachloride (CCl₄) was performed in male Wistar rats (Charles River Laboratories, Saint Aubin les Elseuf, France) weighing 50 to 75 gr. The animals were exposed to CCl₄ vapour atmosphere three times a week, starting at 0,5 min/exposure. The duration of the exposure was then increased to 1 min after the three first sessions, and 1 more minute every three sessions until it reached 5 min, which was used until the end of the investigation. A high yield of micronodular cirrhosis was obtained after 12 weeks of CCl₄

1
2
3 inhalation. Both cirrhotic and control rats were fed ad libitum with standard chow and water
4
5 containing phenobarbital (0.3 g/L) as drinking fluid.
6
7

8
9
10 **Adenovirus-mediated PEDF gene transfer to rat mesentery and liver *in vivo*.** PEDF
11 overexpression in rats was achieved by systemic administration of a single injection of a
12 replication-defective recombinant adenoviral vector carrying the rat PEDF gene (AdPEDF; 1×10^{10}
13 plaque forming units, through the tail vein), either at the time of BDL or sham operation
14 (prevention trial) or two weeks after initial surgeries (intervention trial). Adenovirus vector
15 encoding the β -galactosidase gene (AdLacZ) was used as negative control. Subsequent
16 experiments were performed seven days after viral injection.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Hemodynamic measurements.** Under anesthesia with ketamine (100-mg/kg) and midazolam (5-
28 mg/kg), PE-50 catheters were introduced into femoral artery and portal vein to measure mean
29 arterial pressure (MAP, mmHg), heart rate (HR, beats/min) and portal pressure (PP, mmHg).
30
31 Portosystemic shunting was quantified by injection of yellow microspheres (15- μ m diameter, Dye-
32 trak, Triton Technologies, San Diego) into the spleen, as collateralization (%)=(lung
33 microspheres)/(lung microspheres+liver microspheres) $\times 100$.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Endothelial cell tube formation assay.** PEDF overexpression in human umbilical vein
44 endothelial cells (HUVECs) was achieved by AdPEDF infection at final multiplicity of infection
45 (moi) of 50 and 100. AdLacZ-treated or untreated HUVECs were used as control. After 48h,
46 infection medium was withdrawn and HUVECs were washed with PBS. To analyze tube-like
47 formation, HUVECs (2×10^4 cells/well, n=3/group) were plated on top of Matrigel (50- μ l/well; *In*
48 *vitro* angiogenesis assay kit; Chemicon, Ballerica) and incubated for 6h at 37°C. Number of
49 branching points was counted by inverted microscopy.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 **Statistical analysis.** Data are presented as mean±S.E.M. Results obtained in normally
6 distributed variables were compared with parametric statistical procedures (two-tailed Student *t*
7 test and two-way analysis of variance). For non-parametric data, we used Kruskal-Wallis one-way
8 analysis of variance and Mann-Whitney U test. *P*<0.05 was considered statistically significant.
9
10
11
12

13
14
15
16 **Additional methods are described in Supplementary Information.**
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

PEDF expression pattern in human cirrhotic liver. To investigate the pathophysiological relevance of PEDF in cirrhosis, we first determined PEDF expression, by immunohistochemistry, in livers from patients with HCV-related cirrhosis (**Supplementary-Table 1**) and healthy subjects. PEDF was overexpressed in cirrhotic liver, predominantly in regenerative micronodules and at the interface between liver parenchyma and highly neovascularized fibrous septa (**Fig.1A**). This PEDF localization correlated with regions expressing high VEGF levels (**Supplementary-Fig.1A**). PEDF protein overexpression in human cirrhotic livers was further corroborated by immunoblotting (**Fig.1B**), and was not associated with PEDF mRNA upregulation (**Fig.1C**).

Spatio-temporal PEDF expression profile in BDL rat liver. We next characterized PEDF expression kinetics in BDL rat liver, at various stages of disease progression (days 1, 3, 7, 14 and 28 after BDL), and in sham-operated (SHAM) control animals. By immunoblotting, we found that PEDF protein expression increased time-dependently after cirrhosis induction, following an expression pattern similar to that of VEGF (**Fig.1D**). By qRT-PCR, we observed that temporal changes in PEDF protein expression did not correlate with parallel changes in mRNA expression (**Fig.1E**), suggesting the presence of different still unknown regulatory mechanisms of PEDF gene expression. By immunohistochemistry, we also demonstrated that PEDF protein appeared robustly in hepatocytes of BDL rats, mainly within micronodules in areas of fibrogenesis (**Fig.1F**), with a high degree of overlap in PEDF and VEGF spatial distributions (**Supplementary-Fig.1B**).

Spatio-temporal PEDF expression profile in CCl₄-induced cirrhotic rat liver. In view of the time-dependent increase of PEDF expression found in the BDL model, apparently in contradiction with previously published data in other models of cirrhosis [21], we also explored PEDF expression along disease progression in a different model. VEGF and PEDF protein expression

1
2
3 was assessed by immunoblotting in fibrotic rats by CCl₄ inhalation (control rats, 6-week CCl₄ rats
4 and 12-week CCl₄ rats) showing progressive overexpression of PEDF (**Supplementary-Fig.2A**)
5
6 in parallel with VEGF (**Supplementary-Fig.2B**), in a time-dependent manner.
7
8

9
10
11 **Spatio-temporal PEDF expression profile in BDL rat mesentery.** We next focused our
12 attention on the mesentery because excessive neovessel growth in this vascular bed is a pivotal
13 feature of PH that promotes splanchnic hyperemia and contributes to disease aggravation [6]. We
14 studied whether and how much PEDF was expressed in mesentery in SHAM rats and at different
15 time points after BDL by immunoblotting, qRT-PCR and immunohistochemistry. Cirrhosis
16 induction led to early PEDF protein upregulation (**Fig.2A**), albeit along with unchanged PEDF
17 mRNA levels (**Fig.2B**). PEDF protein expression remained high throughout the first week
18 (**Fig.2A**), correlating with maximal angiogenic activity (**Fig.2C,D**), but subsequently returned to
19 normal levels (**Fig.2A**), when active neovessel growth declined (**Fig.2C,D**). These findings were
20 mirrored by immunolocalization data showing abundant PEDF expression in endothelial, smooth
21 muscle and adventitial cells at the vascular wall of preexisting and outgrowing vessels when
22 angiogenesis was actively developing and an overall decrease in PEDF immunoreactivity when
23 angiogenesis plateaued (**Fig.2E**). These data suggest that PEDF is involved in regulation of PH-
24 associated neovascular pathology; this was further supported by the observation that PEDF and
25 VEGF expressions increased proportionally (**Fig.2A**) and overlapped in BDL rat mesentery
26 (**Supplementary-Fig.1C**).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **AdPEDF successfully transferred PEDF gene into human umbilical vein endothelial cells**
51 **(HUVECs) and produced angioinhibitory PEDF protein *in vitro*.** Before examining the *in vivo*
52 effects of exogenous PEDF supplementation by AdPEDF in rats, we tested whether AdPEDF was
53 able to transduce cells and express PEDF protein in *in vitro* models of angiogenesis. Indeed,
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 HUVEC transfection with AdPEDF effectively overexpressed PEDF protein (**Fig.3A**) and PEDF
4 mRNA (**Fig.3B**). In contrast, PEDF protein and mRNA were barely detectable in HUVECs
5 transfected with control AdLacZ or non-transfected (**Fig.3A,3B**). Further, the ability of AdLacZ-
6 transfected HUVECs to form tube-like structures on Matrigel was strongly reduced in AdPEDF-
7 transfected HUVECs (**Fig.3C**). Quantitative analysis confirmed that PEDF protein produced after
8 AdPEDF gene transfer was functional and capable of significantly suppressing HUVEC tube and
9 branch formation (**Fig.3D**).
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 **Efficient PEDF overexpression in rat mesentery and liver after *in vivo* AdPEDF gene**
22 **delivery.** Having demonstrated that AdPEDF influences vascular growth *in vitro*, we investigated
23 whether this adenovirus would also reduce pathological angiogenesis *in vivo*. Specifically, we
24 studied the effects of systemic AdPEDF administration in BDL and SHAM rats, following a
25 prevention trial targeting early PH, and an intervention trial targeting advanced PH stages (see
26 Methods). Matching lots of rats were treated with AdLacZ, as negative controls. All animals
27 tolerated well the treatments. Quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay verified
28 that recombinant adenoviral vectors were successfully delivered *in vivo* to liver and mesentery,
29 with an optimal degree of transduction efficiency in both trials (**Supplementary-Figs.3A,4A**).
30 Immunoblotting and immunohistochemical analyses further confirmed that PEDF protein was
31 overexpressed in target organs (**Fig.3E,4A**), 7-days after AdPEDF injection, and accumulated
32 predominantly into mesenteric vessels (endothelial, smooth muscle and adventitial cells at the
33 vascular wall) and hepatocytes (**Supplementary-Fig.3B,4B**).
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Antiangiogenic effects of AdPEDF.** We determined the effects of AdPEDF on PH-associated
52 pathological angiogenic processes (i.e, mesenteric and intrahepatic neovascularization and
53 portosystemic collateral formation [6]). In the mesentery, AdPEDF exhibited a potent
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 antiangiogenic activity, significantly decreasing neovascularization (by 31%) (**Fig.3EF,G**) and
4 VEGF expression (**Fig.3H**) in BDL rats during prevention trial, but not when AdPEDF was
5 administered at advanced stages (intervention trial) (**Fig.3F-H**). Portosystemic collateralization
6 was not measured in prevention trial because it was not appreciable one week post-BDL.
7 Following intervention trial, AdPEDF-treated BDL rats showed a 16% decrease in portosystemic
8 collateralization compared to AdLacZ-treated animals ($61.5\pm 10\%$ vs. $85.5\pm 8\%$), although the
9 difference did not reach statistical significance ($P=0.3$). The liver was less responsive to the
10 angioinhibitory effects of AdPEDF, with non-significant ($P=0.3$) AdPEDF-induced decreases in
11 the number of vessels positive for the endothelial cell marker von-Willebrand factor in BDL rat
12 livers, under prevention and intervention trials, respectively (**Supplementary-Fig.5A,B**). VEGF
13 expression was not modified by AdPEDF in BDL rat liver (**Supplementary-Fig.5C**). In SHAM rats
14 (**Supplementary-Fig.6**), AdPEDF had not significant antiangiogenic effects.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30 It is believed that laminin receptor (LR) is the main PEDF receptor driving PEDF
31 antiangiogenic signals [24]. Therefore, we determined LR expression in liver and mesentery of
32 BDL and SHAM rats, throughout different stages of PH and after treatments, but found no
33 differences (**Supplementary-Fig.7A,B**), suggesting that the mild antiangiogenic effects of
34 AdPEDF in BDL rat liver could not be ascribed to a deficiency or downregulation of LR.

35
36
37
38
39
40
41
42
43 **Antifibrogenic effects of AdPEDF.** We further conducted studies to determine whether liver
44 fibrosis was affected by AdPEDF. BDL resulted in extensive intrahepatic deposition of collagen-I
45 fibers (Sirius red staining; **Fig.4B,C**), which was substantially diminished (by 35%) by AdPEDF
46 under prevention trial (**Fig.4B,C**). This antifibrotic effect occurred independently of hepatic stellate
47 cell (HSC) activation suppression since AdPEDF did not attenuate expression of the HSC
48 activation marker α SMA (**Fig.4D**). Instead, HSCs were even activated by AdPEDF, leading to
49 increased mRNA and protein production of collagen-I α -chains (**Fig.4D,E**). Since collagen-I fibers
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

are composed by α -chains wrapped around each other, we reasoned that AdPEDF could upregulate α -chains production by activated HSC, but concurrently stimulate collagen-I fibers breakdown through activation of fibrotic matrix degradatory proteases such as matrix metalloproteinase-2 and -13 (MMP-2 and MMP-13) [25], resulting in significant net reduction of fibrillar collagen-I accumulation. We examined this possibility and found that, indeed, AdPEDF increased mRNA expression of MMP-2 in BDL rat liver (**Fig.4F**), indicating that increased collagen degradation is involved in the AdPEDF antifibrotic activity. AdPEDF also upregulated MMP-13 mRNA expression (**Fig.4F**), but this effect was not associated with a parallel increase in the expression of MMP-13 protein (**Fig.4G**). In the intervention trial, AdPEDF was unable to significantly reduce liver fibrosis (**Fig.4B,C**) or change either the activation status of HSCs (**Fig.4D**), collagen production (**Fig.4D,E**) or collagen degradation (**Fig.4F,G**).

Hemodynamic effects. The combined antiangiogenic and antifibrogenic activities of AdPEDF translated into significant decrease in PP in AdPEDF-treated BDL rats both in prevention (12% decrease; $P=0.03$) and intervention trials (10% decrease; $P=0.045$) (**Table 1, Supplementary-Table 2**). MAP and HR were unchanged and similar among groups (**Table 1, Supplementary-Table 2**).

Table 1: Hemodynamic AdPEDF effects during prevention trial. * $P<0.05$ vs SHAM-AdLacZ; ** $P<0.05$ vs BDL-AdLacZ.

	SHAM-AdLacZ	SHAM-AdPEDF	BDL-AdLacZ	BDL-AdPEDF
n	6	6	6	9
PP	7.3 \pm 0.2	7.5 \pm 0.3	11.7 \pm 0.3*	10.3 \pm 0.4**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MAP	114±6	118±6	109±4	103±2
HR	310±23	337±8	308±14	324±11

Confidential: For Review Only

DISCUSSION

The present study demonstrates that *in vivo* gene transfer of the endogenous angiogenesis inhibitor PEDF mediated by adenoviral vectors (AdPEDF) exerts pleiotropic beneficial effects in BDL rats, albeit with stage specificity. Thus, systemic administration of AdPEDF in BDL rats during early stages of liver disease (prevention trial) was effective in suppressing mesenteric pathological angiogenesis (by 31%) and intrahepatic fibrogenesis (by 35%), leading to a significant 12% decrease in PP. Besides confirming with a different experimental model the previous data reported by Ho and colleagues regarding the antifibrotic effect of PEDF in early liver fibrosis [21], our data points out that PEDF gene delivery shows antiangiogenic effects in early phases of chronic liver disease. These antiangiogenic and antifibrogenic protective actions of AdPEDF were only modest when the adenovirus was given during advanced stages of disease progression (intervention trial). This apparent discrepancy does not preclude, however, the clinical relevance and potential therapeutic value of this novel approach since, even a mild reduction in angiogenesis, fibrogenesis and PP in the context of early disease stages may have important implications by preventing further disease progression and consequently reducing the risk for developing overt liver cirrhosis.

These results also uncovered some novel aspects of AdPEDF antiangiogenic properties. Thus, the finding that AdPEDF treatment was effective in inhibiting the BDL-induced mesenteric neovascular response during the initial angiogenic switching and maximal angiogenic activity (during prevention trial), but not when this process declined (during intervention trial) suggests that AdPEDF selectively targeted vessels that were participating in pathological neovascularization, without harming preexisting and maturing vessels. In support of this idea, AdPEDF had no angioinhibitory activity in absence of pathogenic angiogenesis, that is in SHAM rat mesentery. More important, in none of the AdPEDF-treated rats, we observed any wound healing problem after abdominal surgery for BDL or sham-operation (data not shown), supporting

1
2
3 that AdPEDF did not interfere with physiological angiogenesis. Accordingly, a low mesenteric
4
5 antiangiogenic effect of AdPEDF in intervention trial may not be contradictory to a high effect in
6
7 prevention trial, but instead reflect that PEDF may not necessarily always act as an
8
9 antiangiogenic agent on all blood vessels, specifically targeting the vasculature engaged in the
10
11 process of pathological angiogenesis. Of note, during the first week after BDL, VEGF levels were
12
13 high in mesentery, creating a more stimulatory environment for neovessel growth, and implicating
14
15 also a scenario more susceptible to be manipulated by antiangiogenic strategies like AdPEDF.
16
17 Consistently, AdPEDF treatment during early PH stages, which we show here promotes PEDF
18
19 upregulation concomitantly accompanied by VEGF downregulation, causes a shift away from
20
21 pathological angiogenic signalling, while leaving vascular homeostasis of normal vessels
22
23 unperturbed. It is therefore likely that the ability of AdPEDF to reduce pathological mesenteric
24
25 neovascularization in PH could be at least in part attributable to the effect of AdPEDF
26
27 counteracting VEGF proangiogenic activities, in agreement with previous studies [26,27].
28
29
30

31
32 The data presented here also exemplify the complexity of PEDF, a multifaceted protein with
33
34 different context-dependent functions [10-13]. In particular, our results illustrate that in the BDL rat
35
36 mesentery, PEDF function could be mostly restricted to inhibition of pathological angiogenesis,
37
38 whereas in the BDL rat liver, PEDF might function more as an antifibrogenic factor rather than an
39
40 antiangiogenic agent. AdPEDF rendered protection against liver fibrosis by upregulating the
41
42 fibrotic matrix degrading protease MMP-2 in BDL rat liver. This additional antifibrotic activity of
43
44 PEDF strengthens the rationale for its use in chronic liver diseases.
45
46

47
48 Taken together, these results suggest that the use of an endogenous antiangiogenic protein
49
50 like PEDF could lead to safer treatment outcomes against pathological angiogenesis than
51
52 pharmacological antagonists. It should be noted in this regard that previous attempts at targeting
53
54 angiogenesis in cirrhosis by using multikinase inhibitors, such as sorafenib or imatinib, were
55
56 successful in rats [5,6], but have little translational potential due to the many adverse effects that
57
58
59
60

1
2
3 these agents may have by interfering with physiological angiogenesis [8,9]. In fact, it has been
4
5 previously reported that sorafenib at doses of 60-mg/kg induced biochemical and histological
6
7 signs of liver injury, especially in cirrhotic rats [28]. Our studies, therefore, provide *in vivo*
8
9 evidence suggesting that exogenous PEDF supplementation may be a promising and plausible
10
11 therapeutic modality for treatment and prevention of PH and chronic liver disease, at least in an
12
13 early clinical setting. Of note, safety in humans will be soon confirmed as the first clinical trial with
14
15 virally delivered PEDF in patients with choroidal neovascularization is ongoing [29] and a phase I,
16
17 open-label trial has been recently completed in patients with macular degeneration (Clinical
18
19 Trials: NCT00109499). Furthermore, the potential therapeutic application for endogenous
20
21 inhibitors of angiogenesis in PH and cirrhosis has been also highlighted in a recent study from our
22
23 group using vasohibin-1 [22].
24
25
26

27 Another salient finding of the present study was that PEDF and VEGF proteins followed a
28
29 parallel expression pattern over PH progression in mesentery and liver of BDL rats, being closely
30
31 linked in time and space with mesenteric neovascularization and liver fibrogenesis. PEDF
32
33 overexpression in the liver was found in two rat models of overt cirrhosis (namely induced by CCl₄
34
35 and by BDL). The apparent discrepancy between our results and those obtained by Ho *et al.* [21]
36
37 regarding expression of PEDF in cirrhosis might be due to several factors, including different
38
39 models (mice vs. rat in experimental models; etiology of liver disease in cirrhotic patients), and
40
41 different time frames when PEDF levels have been determined (early vs. more advanced). From
42
43 a translational point of view, it is relevant to observe that, alongside increased PEDF expression,
44
45 VEGF was also upregulated in human cirrhotic liver tissue. These results raise the possibility that
46
47 endogenous PEDF could increase in response to PH-associated VEGF upregulation presumably
48
49 as a counterbalancing inhibitory circuit serving as a natural barrier to limit the adverse effects of
50
51 VEGF. Our findings are consistent with previously published reports showing that both the
52
53 angiogenesis inducer VEGF and the negative regulator of angiogenesis PEDF were
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 unidirectionally upregulated and significantly correlated with angiogenesis in different pathological
4 conditions [30-33], with VEGF acting as a stimulator of PEDF expression [34,35]. In agreement
5
6
7 with our study, PEDF has also been found to be elevated in other pathological settings as a
8
9
10 compensation mechanism to avoid excessive pathological angiogenesis [32-40].

11
12 In conclusion, expression of the anti-angiogenic protein PEDF is increased in cirrhotic liver,
13
14 both in murine models of PH and cirrhosis (CCl₄-treated and BDL rats) and in patients with HCV-
15
16 related cirrhosis. PEDF expression increased in parallel with the increase in pro-angiogenic
17
18 VEGF, suggesting that PEDF upregulation might reflect a compensatory mechanism aimed at
19
20 reducing pathological VEGF-mediated angiogenesis. This is reinforced by the finding that in BDL
21
22 rats, in early stages of chronic liver disease, the systemic administration of PEDF through
23
24 adenoviral vectors (AdPEDF) exerted a safe and selective anti-angiogenic effect on newly formed
25
26 mesenteric vessels, and concomitantly acted as an anti-fibrotic agent in the liver leading to a
27
28 significant reduction in portal pressure. Due to these characteristics, PEDF seems a promising
29
30 novel therapeutic agent to be tested in human chronic liver diseases.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **ACKNOWLEDGMENTS:** We thank the IDIBAPS Biobank for sample and data procurement, Dr.
4 Garcia-Pagan and Garcia-Caldero for human liver samples, and Dr. Hernandez-Gea for helpful
5 discussions.
6
7

8
9
10
11 **COMPETING INTEREST:** The authors declare no competing financial interests
12

13
14
15 **FUNDING:** This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad
16 (SAF2008-02461 and SAF2011-29491 to M.F. and PS09/01261 and PI13/00341 to J.B.) and
17 AGAUR (SGR1108 to J.B.). The CIBERehd is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- 1
2
3
4
5 [1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;**371**:838-851.
6
7 [2] Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, et al. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*
8
9 2008;**134**:1715-1728.
10
11 [3] Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl*
12
13 *J Med* 2010;**362**:823-832.
14
15 [4] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*
16
17 2011;**473**:298-307.
18
19 [5] Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic,
20
21 intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*
22
23 2009;**49**:1245-1256.
24
25 [6] Fernandez M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;**50**:604-
26
27 620.
28
29 [7] Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology*
30
31 2009;**49**:1066-1068.
32
33 [8] Llovet JM, Bruix J. Testing molecular therapies in hepatocellular carcinoma: the need for
34
35 randomized phase II trials. *J Clin Oncol* 2009;**27**:833-835.
36
37 [9] Pinter M, Sieghart W, Reiberger T, et al. The effects of sorafenib on the portal hypertensive
38
39 syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. A pilot study. *Aliment*
40
41 *Pharmacol Ther* 2012;**35**:83-91.
42
43 [10] Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor
44
45 of angiogenesis. *Science* 1999;**285**:245-248.
46
47 [11] Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin PEDF: new insights
48
49 into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci* 2005;**10**:2131-2149.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [12] Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Therapeutic prospects for PEDF: More than a promising
4 angiogenesis inhibitor. *Trends Mol Med* 2003;**9**:244-250.
5
6
7 [13] Amaral J, Becerra S. Pigment epithelium-derived factor and angiogenesis: Therapeutic
8 implications. Springer; Dordrecht, The Netherlands 2008:311-337.
9
10 [14] Wang B, Atherton P, Patel R, et al. Antiangiogenic effects and transcriptional regulation of
11 pigment epithelium-derived factor in diabetic retinopathy. *Microvasc Res* 2010;**80**:31-36.
12
13 [15] Wang JJ, Zhang SX, Mott R, et al. Salutary effect of pigment epithelium-derived factor in
14 diabetic nephropathy. Evidence for antifibrogenic activities. *Diabetes* 2006;**55**:1678-1685.
15
16 [16] Rychli K, Huber K, Wojta J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a therapeutic target
17 in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* 2009;**13**:1295-1302.
18
19 [17] Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, et al. Antiangiogenic property of pigment epithelium-
20 derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;**40**:252-259.
21
22 [18] Ek ETH, Dass CR, Choong PFM. PEDF: a potential molecular therapeutic target with
23 multiple anticancer activities. *Trends Mol Med* 2006;**12**:497-502.
24
25 [19] Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci*
26 2003;**4**:628-636.
27
28 [20] Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, et al. Organization, evolutionary conservation,
29 expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a
30 unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 1996;**2**:11.
31
32 [21] Ho TC, Chen SL, Shih SC, et al. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis
33 factor targeting hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2010;**177**:1798-1811.
34
35 [22] Coch L, Mejias M, Berzigotti A, et al. Disruption of negative feedback loop between
36 vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor decreases portal pressure, angiogenesis, and
37 fibrosis in cirrhotic rats. *Hepatology* 2014 (*in press*).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [23] Berzigotti A, Abraldes JG, Tandon P, et al. Ultrasonographic evaluation of liver surface and
4 transient elastography in clinically doubtful cirrhosis. *J Hepatol* 2010;**52**:846-853.
5
6
7 [24] Bernard A, Gao-Li J, Franco CA, et al. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic
8 activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2009;**284**:10480-10490.
9
10 [25] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;**134**:1655-1669.
11
12 [26] Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, et al. Pigment epithelium-derived factor
13 (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression
14 in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* 2005;**77**:3231-3241.
15
16 [27] Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular
17 endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in
18 diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006;**37**:1-12.
19
20 [28] Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, et al. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in
21 rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2011;**91**:241-251.
22
23 [29] Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, et al. Adenoviral vector-delivered pigment
24 epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: Results of a phase I
25 clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;**17**:167-176.
26
27 [30] Duh EJ, Yang HS, Haller JA, et al. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and
28 vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol*
29 2004;**137**:668-674.
30
31 [31] Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and
32 vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related
33 macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006;**82**:99-110.
34
35 [32] Ogata N, Matsuoka M, Matsuyama K, et al. Plasma concentration of pigment epithelium-
36 derived factor in patients with diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:1176-1179.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 [33] Matsuoka M, Ogata N, Minamino K, et al. High levels of pigment epithelium-derived factor in
4 the retina of a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res* 2006;**82**:172-178.

5
6
7 [34] Miyagishi D, Ohno-Matsui K, Amagasa T, et al. Regulation of the expression of pigment
8 epithelium-derived factor, an anti-angiogenic factor in human oral squamous cell carcinoma cell
9 lines. *Cancer Lett* 2003;**196**:77-85.

10
11
12 [35] Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, et al. Vascular endothelial growth factor upregulates
13 pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial
14 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**303**:962-967.

15
16
17 [36] Yamagishi S, Adachi H, Abe A, et al: Elevated serum levels of pigment epithelium-derived
18 factor in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:2447-2450.

19
20
21 [37] Kuncel RW, Bilak MM, Bilak SR, et al. Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of
22 patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2002;**81**:178-184.

23
24
25 [38] Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in
26 neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci*
27 2001;**114**:4421-4428.

28
29
30 [39] Crawford SE. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the
31 prostate and pancreas. *Nat Med* 2003;**9**:774-780.

32
33
34 [40] Kawaguchi T, Yamagishi S, Itou M, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits
35 lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells. *Am J Pathol* 2010;**176**:168-176.

FIGURE LEGENDS

Figure-1: PEDF expression in human cirrhotic and BDL rat liver. (A) Human liver PEDF immunohistochemistry. Arrowheads point to interface between parenchyma and fibrous septa, and micronodules. **(B)** Human liver PEDF immunoblotting and protein expression quantification. **(C)** Human liver PEDF mRNA expression. **(D)** Rat liver PEDF and VEGF immunoblotting and protein expression quantification. Ctrl, positive control. **(E)** Rat liver PEDF mRNA expression. **(F)** PEDF immunohistochemistry and liver fibrosis (sirius red staining). Arrowheads point to micronodules. Scale bars: 200- μm (D: PEDF), 100- μm (A: parenchyma, interface; D: fibrosis), 50- μm (A: micronodules). * $P < 0.05$ versus human healthy (B,C) and versus SHAM (D).

Figure-2: PEDF expression in BDL rat mesentery. (A) PEDF and VEGF immunoblotting, and protein expression quantification. Ctrl, positive control. **(B)** PEDF mRNA expression. **(C)** Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area; $n=6/\text{group}$). **(D)** H&E staining. Arrowheads point to neovessels. **(E)** PEDF immunohistochemistry. Arrowheads point to PEDF immunoreactivity in endothelial, smooth muscle and adventitial cells at the vascular wall of preexisting mesenteric vessels, and at endothelium and pericytes in mesenteric neovessels. * $P < 0.05$ versus SHAM. Scale bars: 100- μm (D), 50- μm (E), 25- μm (E-insets).

Figure-3: Antiangiogenic effects of AdPEDF. (A) PEDF immunoblotting in HUVECs. Ctrl, positive control. **(B)** PEDF mRNA expression in HUVECs. **(C)** *In vitro* angiogenesis assay in HUVECs. **(D)** Quantification of branching points ($n=3/\text{group}$). **(E)** Rat mesentery PEDF immunoblotting. **(F)** H&E staining. Arrowheads point to neovessels. **(G)** Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area; $n=6-8/\text{group}$). **(H)** VEGF immunoblotting and protein expression quantification. Ctrl, positive control. Scale bars: 100- μm .

1
2
3 * $P < 0.05$ versus AdLacZ-transfected HUVECs (B,C), AdLacZ-treated SHAM rats (G) or AdLacZ-
4
5 treated BDL rats (H). ** $P < 0.05$ versus AdLacZ-treated BDL rats.
6
7

8
9
10 **Figure-4: Antifibrogenic effects of AdPEDF.** (A) Rat liver PEDF immunoblotting. (B) Sirius red
11 staining. (C) Liver fibrosis quantification (stained area/total area; n=6-8/group). (D) α SMA and
12 alpha-1 collagen-I immunoblottings and protein expression quantification. (E) Collagen-I mRNA
13 expression. (F) MMP-2 and MMP-13 mRNA expression. (G) MMP-2 and MMP-13
14 immunoblottings and protein expression quantification. Scale bars: 200- μ m. * $P < 0.05$ versus
15 AdLacZ-treated SHAM rats. ** $P < 0.05$ versus AdLacZ-treated BDL rats.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

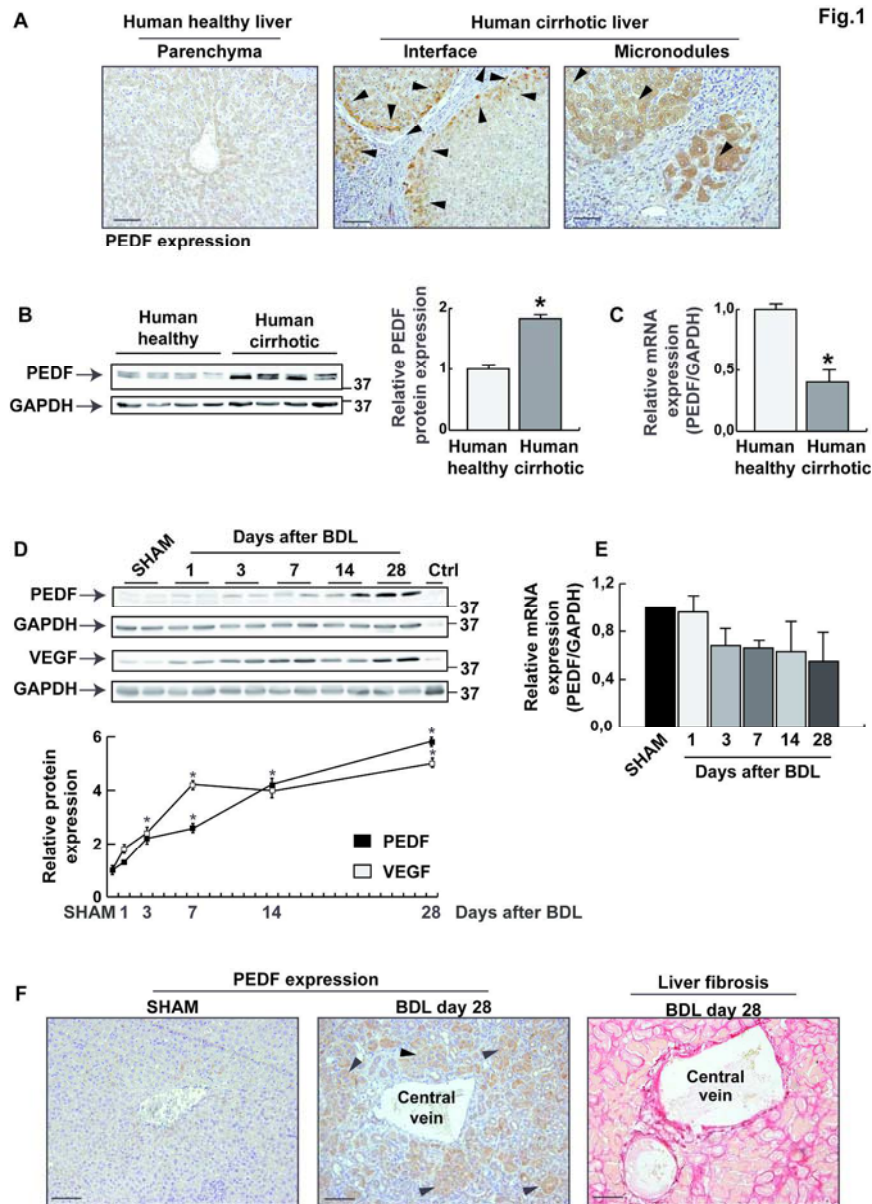


Figure-1: PEDF expression in human cirrhotic and BDL rat liver. (A) Human liver PEDF immunohistochemistry. Arrowheads point to interface between parenchyma and fibrous septa, and micronodules. (B) Human liver PEDF immunoblotting and protein expression quantification. (C) Human liver PEDF mRNA expression. (D) Rat liver PEDF and VEGF immunoblotting and protein expression quantification. Ctrl, positive control. (E) Rat liver PEDF mRNA expression. (F) PEDF immunohistochemistry and liver fibrosis (sirius red staining). Arrowheads point to micronodules. Scale bars: 200- μ m (D: PEDF), 100- μ m (A: parenchyma, interface; D: fibrosis), 50- μ m (A: micronodules). * P <0.05 versus human healthy (B,C) and versus SHAM (D).

205x286mm (300 x 300 DPI)

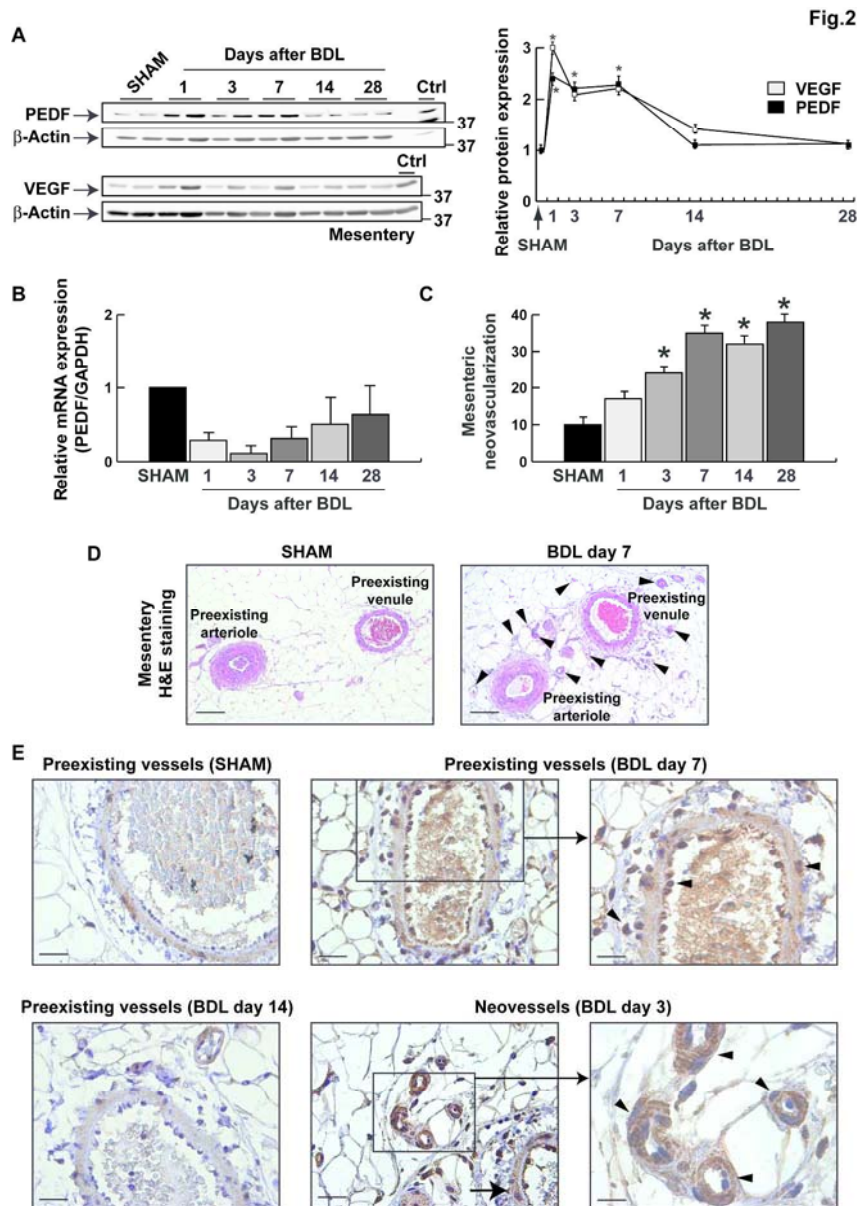


Figure-2: PEDF expression in BDL rat mesentery. (A) PEDF and VEGF immunoblotting, and protein expression quantification. Ctrl, positive control. (B) PEDF mRNA expression. (C) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area; n=6/group). (D) H&E staining. Arrowheads point to neovessels. (E) PEDF immunohistochemistry. Arrowheads point to PEDF immunoreactivity in endothelial, smooth muscle and adventitial cells at the vascular wall of preexisting mesenteric vessels, and at endothelium and pericytes in mesenteric neovessels. *P<0.05 versus SHAM. Scale bars: 100- μ m (D), 50- μ m (E), 25- μ m (E-insets). 205x292mm (300 x 300 DPI)

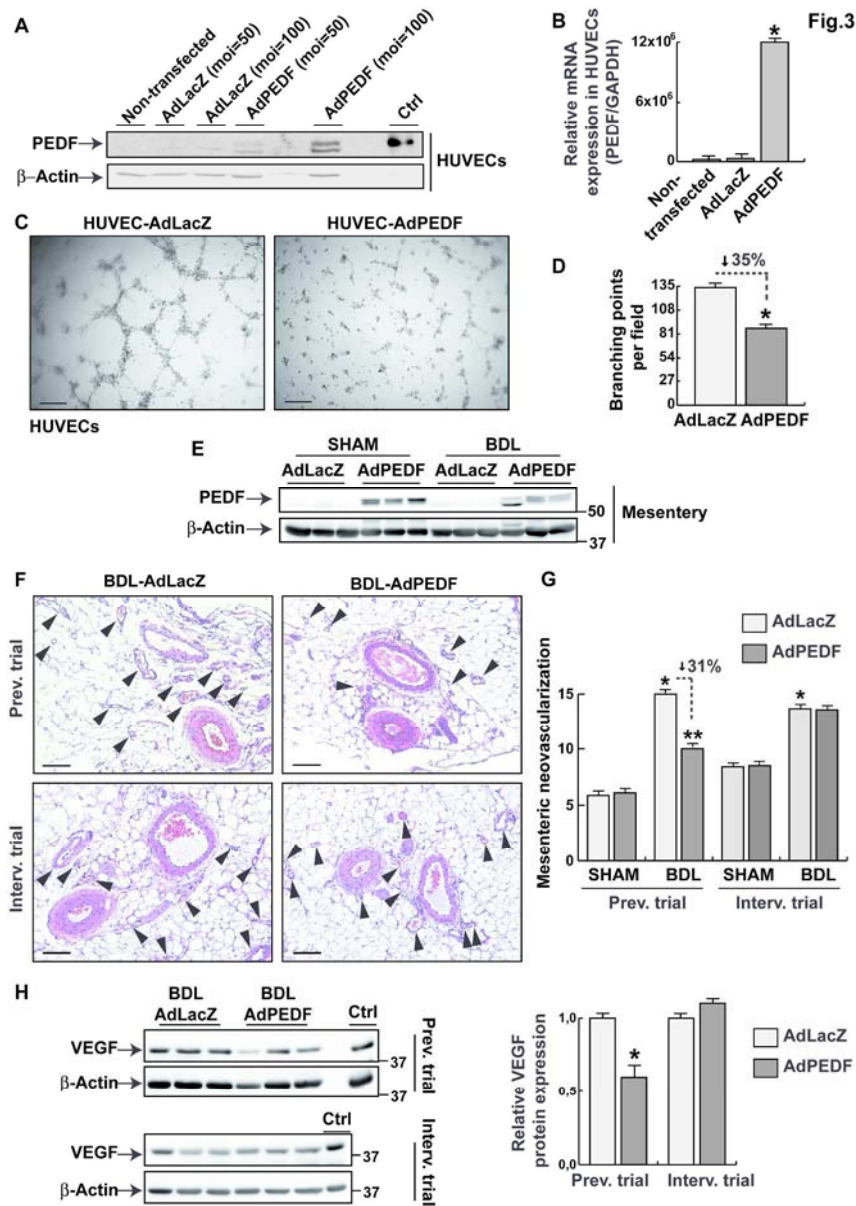


Figure-3: Antiangiogenic effects of AdPEDF. (A) PEDF immunoblotting in HUVECs. Ctrl, positive control. (B) PEDF mRNA expression in HUVECs. (C) In vitro angiogenesis assay in HUVECs. (D) Quantification of branching points (n=3/group). (E) Rat mesentery PEDF immunoblotting. (F) H&E staining. Arrowheads point to neovessels. (G) Quantification of mesenteric neovascularization (vessel number/tissue area; n=6-8/group). (H) VEGF immunoblotting and protein expression quantification. Ctrl, positive control. Scale bars: 100- μ m. *P<0.05 versus AdLacZ-transfected HUVECs (B,C), AdLacZ-treated SHAM rats (G) or AdLacZ-treated BDL rats (H). **P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats.

206x292mm (300 x 300 DPI)

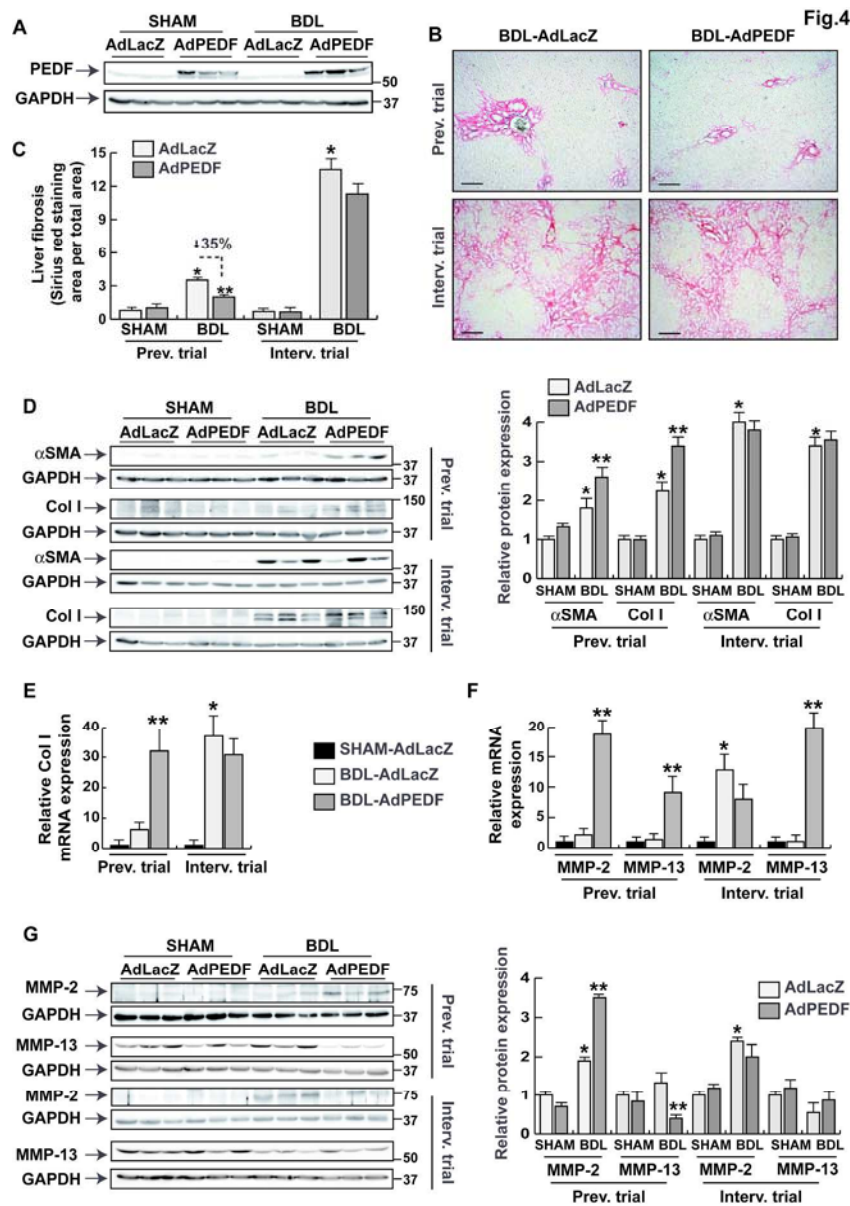


Figure-4: Antifibrogenic effects of AdPEDF. (A) Rat liver PEDF immunoblotting. (B) Sirius red staining. (C) Liver fibrosis quantification (stained area/total area; n=6-8/group). (D) α SMA and alpha-1 collagen-I immunoblottings and protein expression quantification. (E) Collagen-I mRNA expression. (F) MMP-2 and MMP-13 mRNA expression. (G) MMP-2 and MMP-13 immunoblottings and protein expression quantification. Scale bars: 200- μ m. *P<0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. **P<0.05 versus AdLacZ-treated BDL rats. 206x294mm (300 x 300 DPI)

SUPPLEMENTARY TABLE 1: Main characteristics of patients from whom liver tissue samples were obtained. CTP, Child-Turcotte-Pugh score; HVPG, hepatic venous pressure gradient (equivalent of portal pressure gradient in cirrhosis)[1]; OLT, orthotopic liver transplantation

Number of patients	Stage of the disease [2]	Median Age (years)	Median CTP score	Presence and grade of esophageal varices	Median HVPG	Liver tissue sampling method
4	Compensated	61	6	No varices in 3; small varices in 1	10.5 mmHg	Liver biopsy (transjugular route) in 3; explanted liver on OLT in 1
8	Decompensated	56	9	No varices in 1; small varices in 4; large varices in 3	18 mmHg	Explanted liver on OLT in all cases

[1] Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:573-582.

[2] D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.

SUPPLEMENTARY TABLE 2: Hemodynamic effects of adenoviral PEDF gene transfer in BDL and SHAM rats, following the intervention trial. MAP, mmHg; HR, beats/min; PP, mmHg. Data are shown as mean±S.E.M. * $P < 0.05$ vs SHAM-AdLacZ; ** $P < 0.05$ vs BDL-AdLacZ.

	SHAM-AdLacZ	SHAM-AdPEDF	BDL-AdLacZ	BDL-AdPEDF
n	5	7	5	9
PP	7.4±0.3	6.9±0.4	14.1±0.5*	12.7±0.4**
MAP	116±9	125±3	90±5	94±3
HR	308±12	320±9	308±19	294±7

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Expression of VEGF protein in human cirrhotic liver and BDL rat liver and mesentery. (A) Representative photomicrographs of VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from healthy controls and hepatitis C-related cirrhotic humans. Asterisc point to hepatocytes within cirrhotic regenerative micronodule in which VEGF was overexpressed. Arrowheads point to cells with intense immunoreaction for VEGF located at the interface between fibrous septa and liver parenchyma. Scale bars: 100- μ m. (B) Representative photomicrographs of liver sections immunostained for VEGF from sham-operated control rats and BDL rats at day 28 after bile duct obstruction. Scale bars: 200- μ m. (C) Representative VEGF immunohistochemistry in the mesentery from sham-operated control rats and BDL rats at day 7 after bile duct obstruction. Arrowheads indicate mesenteric neovessels positively stained for VEGF at the periphery of preexisting mesenteric venules. Scale bars: 25- μ m.

Supplementary Figure 2: PEDF, VEGF and laminin receptor expression in CCl₄ rat liver. (A) Immunoblotting of PEDF in the liver of control, 6-week CCl₄ rats and 12-week CCl₄ rats (n=4 per group). Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. *P<0.05 versus controls. (B) Immunoblotting of VEGF in the liver of control, 6-week CCl₄ rats and 12-week CCl₄ rats (n=4 per group). Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. *P<0.05 versus controls.

Supplementary Figure 3: Efficient PEDF overexpression in rat mesentery after *in vivo* AdPEDF gene delivery. (A) Quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay indicates that recombinant adenoviral vectors were successfully delivered *in vivo* to the mesentery, with an optimal degree of transduction efficiency in both trials. β -Galactosidase activity in mesentery of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats (n=6/group) and untreated controls (n=2) is expressed as mean \pm S.E.M. *P<0.05 versus non-injected controls. (B) Representative photomicrographs of PEDF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from BDL and SHAM rats treated with AdPEDF or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. PEDF protein was overexpressed in endothelial cells, smooth muscle cells and adventitial cells at the vascular wall of mesenteric vessels from AdPEDF-treated rats (arrowheads), compared with AdLacZ-treated animals. Scale bars: 100- μ m (AdLacZ and AdPEDF) and 25- μ m (AdPEDF-insets).

Supplementary Figure 4: Efficient PEDF overexpression in rat liver after *in vivo* AdPEDF gene delivery. (A) Quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay indicates that recombinant adenoviral vectors were successfully delivered *in vivo* to the liver, with an optimal degree of transduction

1
2
3 efficiency in both trials. β -Galactosidase activity in liver of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats
4 (n=6/group) and untreated controls (n=2) is expressed as mean \pm S.E.M. * P <0.05 versus non-injected
5 controls. **(B)** Representative photomicrographs of liver sections immunostained for PEDF from BDL and
6 SHAM rats treated with AdPEDF or AdLacZ, following the prevention and intervention trials, showing
7 intrahepatic PEDF overexpression in AdPEDF-treated rats compared with AdLacZ-treated animals. Scale
8 bars: 25- μ m.
9
10

11
12
13 **Supplementary Figure 5: Effects of AdPEDF treatment on liver neovascularization and hepatic**
14 **protein expression of proangiogenic VEGF.**

15 **(A)** Representative photomicrographs from
16 immunohistochemical analyses in liver sections from AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL rats, following the
17 prevention and intervention trials, showing expression of the endothelial cell marker von Willebrand factor
18 (vWF) in the vascular wall of intrahepatic blood neovessels (arrowheads). Scale bar: 50- μ m. **(B)**
19 Quantification of liver neovascularization (vWF-positive microvessels per field). Results are expressed as
20 mean \pm S.E.M from 6-8 rats per group. * P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. **(C)** Immunoblotting of
21 VEGF in the liver from AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention and
22 intervention trials. GAPDH was used as loading control. Ctrl, positive control (human transformed
23 endothelial ECV304 cell lysate). Densitometric quantification of protein expression is also shown. Results
24 are expressed as mean \pm S.E.M.
25
26
27
28
29
30
31

32 **Supplementary Figure 6: Lack of effects of AdPEDF and AdLacZ treatments in SHAM control rats.**

33 Photomicrographs of mesentery and liver sections from AdPEDF- or AdLacZ-treated SHAM rats, following
34 the prevention and intervention trials. Results show that AdPEDF and AdLacZ treatments did not affect
35 mesentery vascularization (H&E staining; scale bar: 100 μ m), liver vascularization (immunohistochemistry
36 for the endothelial cell marker von Willebrand factor, vWF; scale bar: 100 μ m), and liver fibrosis (Sirius red
37 staining; scale bar: 200 μ m).
38
39
40
41
42

43 **Supplementary Figure 7: Expression of laminin receptor following AdPEDF treatment.**

44 **(A)** Immunoblotting of laminin receptor in the mesentery of AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats,
45 following the prevention and intervention trials. Densitometric quantification of protein expression relative
46 to loading control β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. **(B)** Immunoblotting of
47 laminin receptor in the liver of AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention
48 and intervention trials. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control
49 GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M.
50
51
52
53
54

55 **SUPPLEMENTARY METHODS**
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Preparation of recombinant adenovirus. Replication-defective recombinant adenoviral vectors encoding rat PEDF (Ad-CMV-PEDF or AdPEDF) or β -galactosidase reporter gene (Ad-CMV-LacZ or AdLacZ), under the transcriptional control of the cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter, were purchased from Vector Biolabs (Philadelphia, PA). After transfection of the adenovirus plasmids into human embryonic kidney HEK293A cells (Invitrogen), were seeded in supplemented DMEM medium (10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 1% non-essential amino acids and 0.1% sodium pyruvate) and allowed to grow. When culture achieved 80% of confluence, cells were infected with AdPEDF or AdLacZ at multiplicity of infection (MOI) of 20:1 and incubated for 72 h at 37°C and 5% CO₂. Once cytopathic effects were evident, the medium containing adenovirus was collected, submitted to three freeze-thaw cycles to lyse the remaining cells, and centrifuged (405 g, 5 min). The obtained supernatant was treated with 10 U/ml benzonase (30 min, RT) to eliminate bacterial DNA. An ion exchange membrane adsorber (Sartobind Q75; Sartorius, Germany) was used to purify viral suspension. Viral suspension was prediluted in dilution buffer (20 mM bicine, 0.6 M NaCl; pH 8.4) and washing steps were performed using wash buffer (10 mM bicine, 0.4 M NaCl; pH 8.4). Finally, adenovirus were eluted with elution buffer (10 mM bicine and 0.61 M NaCl; pH 8.2) and storage buffer (10 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.2% BSA and 50% glycerol; pH 8.0) was added to preserve virus at -80°C. The tissue culture infective dose (TCID₅₀) assay was performed to determine titer of obtained adenovirus. Serial dilutions of a virus stock (10⁻⁵ to 10⁻¹²) were prepared and inoculated onto replicate HEK293A cell cultures, in 96 well plastic plates. The number of cell cultures that were infected was then determined for each virus dilution by looking to cytopathic effects after an incubation period. TCID₅₀ titer was calculated from dilution of virus at which 50% of the cell cultures were infected and contained at least one plaque forming unit (pfu).

β -Galactosidase reporter gene chemiluminescent assay for transfection efficiency of adenovirus.

Transfection efficiency of adenovirus was tested *in vivo* in BDL and SHAM rats by the injection of recombinant adenoviruses under the control of the cytomegalovirus promoter encoding for the β -galactosidase (LacZ) gene. Injections were performed through the tail vein, at a dose of 1x10¹⁰ pfu, at the moment of surgery (prevention trial) or two weeks after the initial surgery (intervention trial). Tissues were harvested one week after the administration of adenoviral vectors, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Then, tissues were grinded in liquid nitrogen into a powder and lysis buffer was added. Samples were centrifuged (157,000 g, 20 min) and protein concentration was measured in the collected supernatants by Bradford assay. The adenoviral tissue distribution was measured using the β -galactosidase reporter gene chemiluminescent assay, Galacto-Light Plus (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. In brief, 40 μ g protein samples (in triplicate for each rat) were diluted in the kit's lysis buffer plus 0.1% BSA to a final volume of 20 μ l. Then, 200 μ l of reaction buffer, containing a chemiluminescent substrate for β -galactosidase, was added to each sample. After 45 min, 300 μ l of Accelerator was added to trigger light emission from the substrate, and samples were read with a Berthold

1
2
3 Lumat LB9507 luminometer, obtaining a value of Relative Light Units (RLU). The resulting values were
4 translated to nanograms of β -galactosidase by a standard curve performed with various known
5 concentrations of β -galactosidase (G5635, Sigma, St Louis, MO).
6
7

8
9 **Histological analyses and immunohistochemistry.** Tissues were harvested, fixed by submersion in
10 10% buffered formalin solution, and embedded in paraffin. Successive 2- μ m sections were then obtained
11 and prepared for H&E staining, using standard histological protocols. For immunostaining, the 2- μ m
12 paraffin sections were deparaffinized in xylol and rehydrated in graded alcohol series. Endogenous
13 peroxidase was inhibited using 3% H₂O₂ (10 min, RT). Sections were then washed in PBS and heated in a
14 pressure cooker for epitope retrieval (in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, 5 min). Slides were blocked with 5%
15 normal goat serum for 1 h, and then incubated (1 h, RT, or overnight, 4°C) with polyclonal antibodies
16 against VEGF (1:100 dilution, ab46154, Abcam, Cambridge, UK) and PEDF (1:75 dilution, HPA005825,
17 Sigma), and monoclonal antibody against vWF (1:1000 dilution, A0082, Dako, Glostrup, Denmark).
18 Sections were then washed with PBS, and incubated with Dako Real EnVision Detection System (HRP
19 mouse/rabbit secondary antibody; 30 min, RT). Antibody binding was revealed using H₂O₂ as a substrate,
20 and diaminobenzidine as a chromogen. Hematoxylin was used as a counterstain. For negative control,
21 primary antibody was omitted and then sections were incubated with corresponding secondary antibodies
22 and detection systems. Stained sections were visualized with a Zeiss microscope. Images from several
23 regions of the tissue sections were then acquired using an AxioCam camera (Carl Zeiss Vision, Germany).
24 Analysis of the digitalized images was performed with computerized imaging system (AxioVision and
25 Image J).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Quantification of tissue vascularization.** For rat mesentery, tissue was fixed in 10% formalin,
37 embedded in paraffin, sectioned and stained with H&E. Computer-based quantitative analysis of
38 angiogenesis was performed in mesenteric sections with the assistance of Axiovision software (Zeiss,
39 Germany) by counting vascular structures from 4-6 digital images taken from each tissue section at 100X
40 magnification. A value from each individual rat was obtained and the average value for each group was
41 calculated. For rat liver, formalin-fixed paraffin-embedded liver sections were immunostained with antibody
42 against the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF) or phosphate-buffered saline, as a
43 negative control. Bound antibody was visualized with diaminobenzidine, as chromogen, and slides were
44 counterstained with hematoxylin. Then, portal tracts from each slide were photographed at 100X
45 magnification and the number of vWF-positive vessels in each field was quantified using Axiovision
46 software. Quantifications were conducted independently by two investigators who were blinded to the
47 samples' profiles.
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **Quantification of liver fibrosis.** For visualization of collagen I fibers and semiquantitative analysis of
57 hepatic fibrosis, formalin-fixed paraffin-embedded liver sections were pretreated 10 min with
58
59
60

thiosemicarbazide (Sigma) and stained with a solution of 0.1% Sirius red (Direct Red 80; Sigma) in picric acid (Sigma). Slides were photographed and analyzed using Axiovision software (Zeiss, Germany). Multiple fields from each slide were randomly selected and the red stained area per total area (square pixels) was measured.

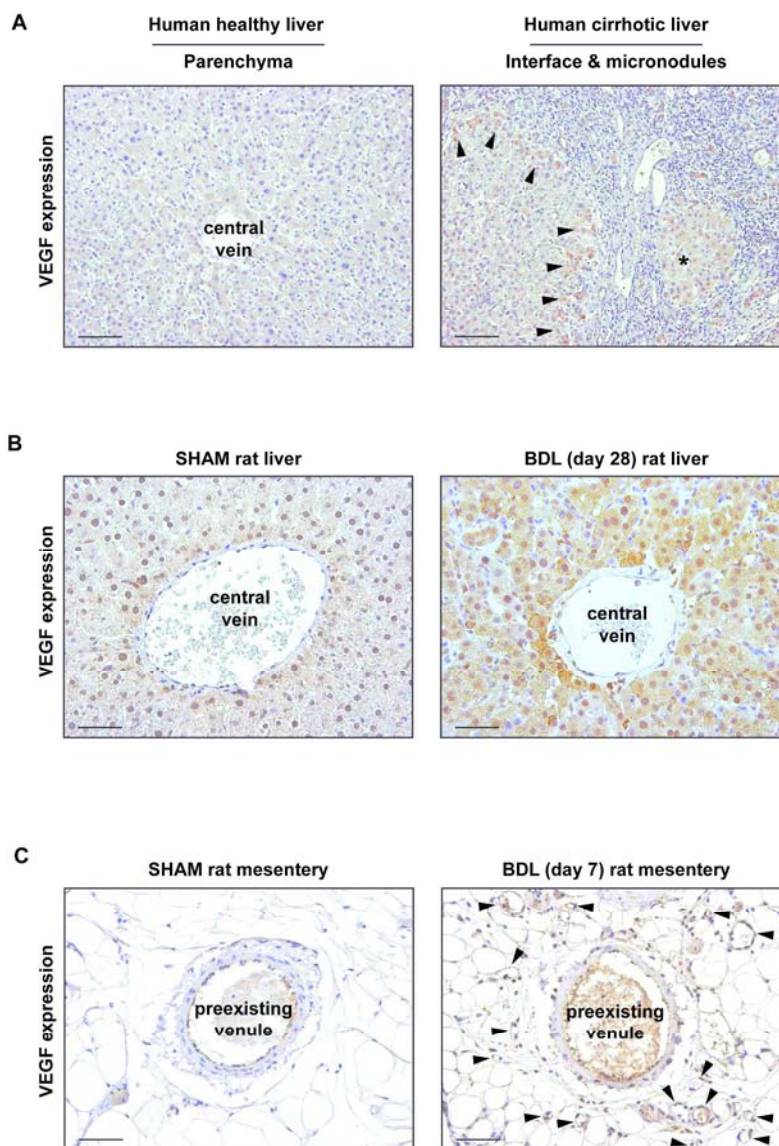
Analysis of protein expression by immunoblotting. Samples were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl (pH 7.4), 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 40 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM sodium pyrophosphate, 20 µM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and 0.1 µM okadaic acid. The resultant lysates were centrifuged at 15,700g for 30 min at 4°C. Supernatants were collected and total protein was quantified using Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Samples were heated (95°C, 5 min) in SDS- and β-mercaptoethanol-containing sample buffer and separated by 8 or 10% (depending on the protein analyzed) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immunoblot-P, Millipore, Billerica, MA) previously activated with methanol, during 2 hours at 60V at 4°C and stained with Ponceau S Solution (Sigma), to check for equal loading of protein in each lane. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) with 0,05% Tween 20 (TBS-T buffer) containing 5% (wt/vol) skim milk for 1 h, and then incubated, overnight at 4°C, with corresponding antibodies against PEDF (1:250 dilution in TBS-T with 5% milk; HPA005825, Sigma and 1:500 dilution, sc-25594, Santa Cruz Biotechnology), VEGF (1:500 dilution; ab46154, Abcam), α-SMA (1:1000 dilution; A2547, Sigma), PDFGR-β (1:500 dilution, sc-1627-R, Santa Cruz Biotechnology), laminin receptor (1:200 dilution; sc-20979, Santa Cruz Biotechnology), MMP2 (dilution 1:500; ab37150, Abcam) and MMP13 (1:5000; ab39012), collagen type I (1:1000 dilution; ABT123, Millipore). Blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgG (1:10000 dilution in TBS-T with 5% skim milk; Stressgen, Sidney, Canada) for 1 h at RT. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Western blotting detection kit; Millipore) and an ImageQuant LAS-4000 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences). Quantification of protein signals was performed using computer-assisted densitometry. Loading accuracy was evaluated via membrane rehybridization with antibodies against β-actin (1:1000 dilution, 1h, RT; A2228, Sigma) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:1000 dilution, 1h, RT; sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). Molecular weight was calculated with prestained standards (Bio-Rad). As western blotting positive controls, we used a lysate of 293T cells transfected with a human PEDF expression vector (sc-158841; Santa Cruz Biotechnology) for PEDF antibody, and a human transformed endothelial ECV304 cell lysate (sc-2269; Santa Cruz Biotechnology) for VEGF antibody. The western blot analysis was repeated to confirm reproducibility using the samples collected from three individual rats of each experimental group.

RNA isolation and reverse transcription. Total RNA was isolated from frozen SHAM (n=3 per treatment group), BDL livers (n=4 per treatment group) or human liver samples (n=11) using the Trizol method

1
2
3 (Invitrogen), or using RNeasy Mini Kit (Qiagen) for HUVEC RNA's extraction, as described by the
4 manufacturer. The RNA was treated with DNase (Ambion, Austin TX) to avoid DNA contamination.
5
6 Obtained RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). For cDNA
7 synthesis, 1 µg of total RNA was retrotranscribed using Quantitect Reverse Transcription kit as described
8 by the manufacturer (Qiagen).
9

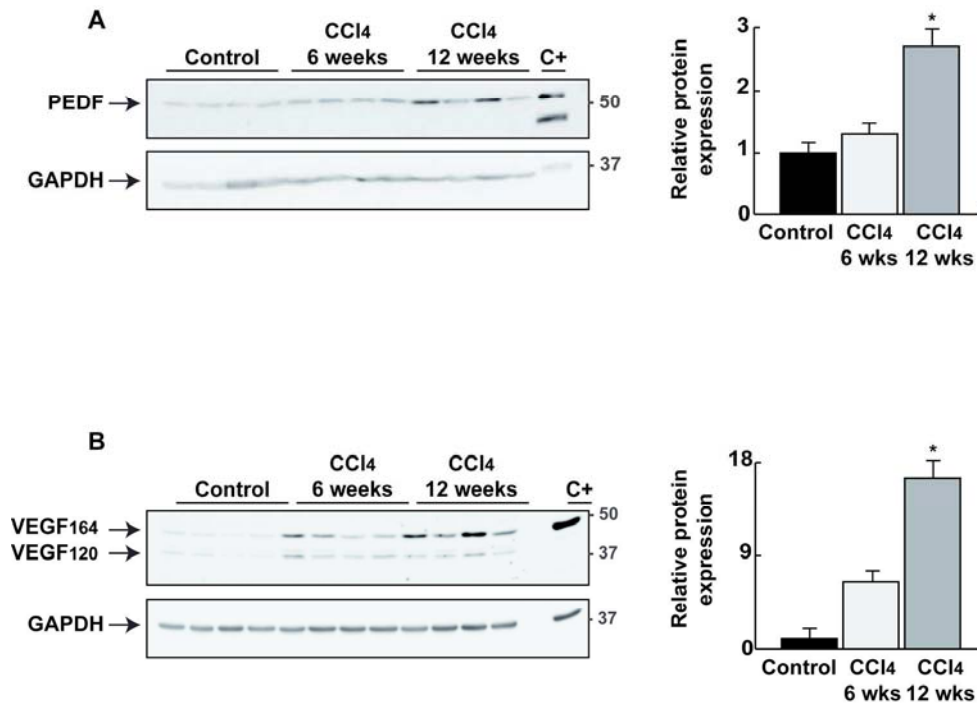
10
11 **Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR).** Reverse
12 transcriptase-polymerase chain reaction was used to amplify cDNA templates by using the fluorescent
13 TaqMan technology (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System
14 (Applied Biosystems). All TaqMan probes (GAPDH, Rn01775763_g1; 18S, Hs99999901_s1; MMP2,
15 Rn02532334_s1; MMP13, Rn01448194_m1; PEDF, Rn00709999_m1 and Hs01106934_m1 were
16 purchased from Applied Biosystems. Each polymerase chain reaction was carried out with 2 µl of the
17 hepatic or mesenteric cDNA sample (20 ng), 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems),
18 and probe in a final volume of 20 µL, as recommended by the manufacturer. After an initial denaturation
19 step at 95°C for 10 minutes, 45 cycles were performed as follows: 95°C for 15 seconds and 60°C for 1
20 minute. All experiments were performed in duplicate and normalized with GAPDH. The fold enrichment of
21 target sequences in PEDF or LacZ treated BDL rats compared to sham rats was calculated using the
22 comparative Ct method according to manufacturer's instructions.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sup.Fig.1

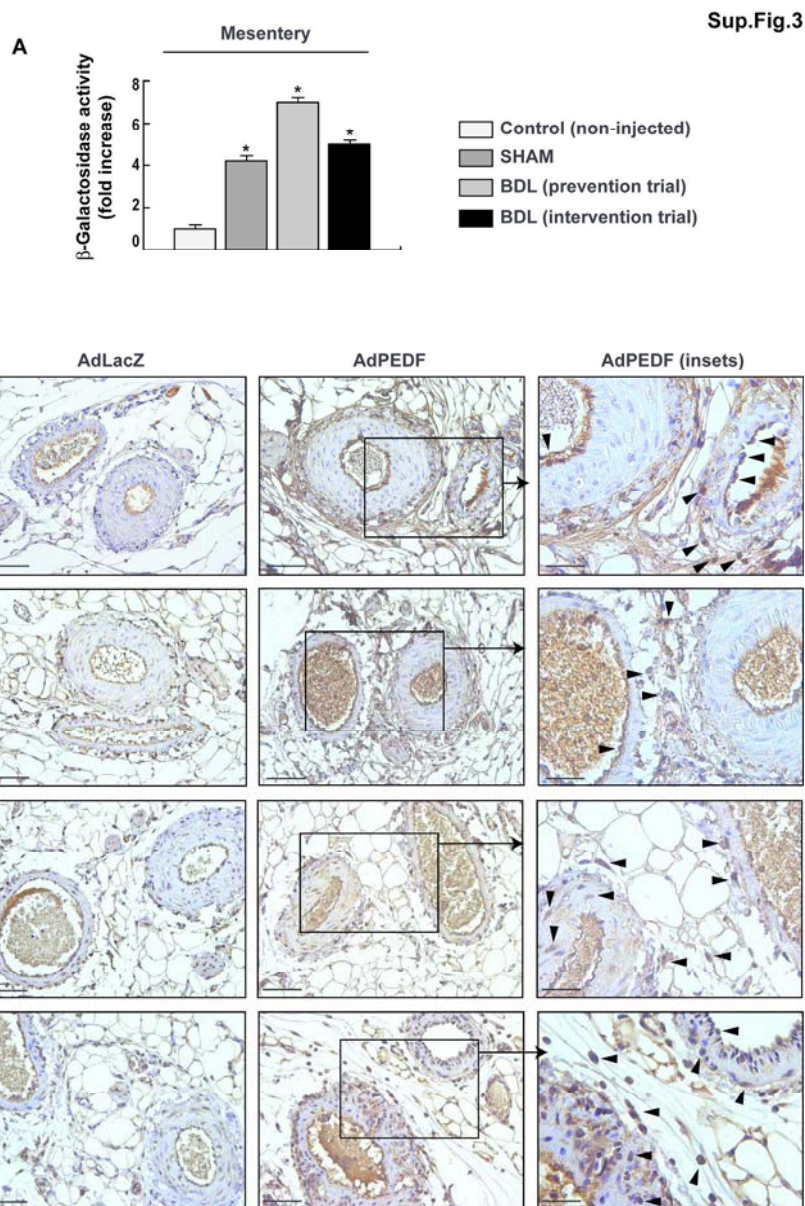


Supplementary Figure 1: Expression of VEGF protein in human cirrhotic liver and BDL rat liver and mesentery. (A) Representative photomicrographs of VEGF immunostainings in paraffin-embedded liver sections from healthy controls and hepatitis C-related cirrhotic humans. Asterisk point to hepatocytes within cirrhotic regenerative micronodule in which VEGF was overexpressed. Arrowheads point to cells with intense immunoreaction for VEGF located at the interface between fibrous septa and liver parenchyma. Scale bars: 100- μ m. (B) Representative photomicrographs of liver sections immunostained for VEGF from sham-operated control rats and BDL rats at day 28 after bile duct obstruction. Scale bars: 200- μ m. (C) Representative VEGF immunohistochemistry in the mesentery from sham-operated control rats and BDL rats at day 7 after bile duct obstruction. Arrowheads indicate mesenteric neovessels positively stained for VEGF at the periphery of preexisting mesenteric venules. Scale bars: 25- μ m.
196x275mm (300 x 300 DPI)

Sup.Fig.2



Supplementary Figure 2: PEDF, VEGF and laminin receptor expression in CCI4 rat liver. (A) Immunoblotting of PEDF in the liver of control, 6-week CCI4 rats and 12-week CCI4 rats (n=4 per group). Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. *P<0.05 versus controls. (B) Immunoblotting of VEGF in the liver of control, 6-week CCI4 rats and 12-week CCI4 rats (n=4 per group). Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean±S.E.M. *P<0.05 versus controls. 200x183mm (300 x 300 DPI)



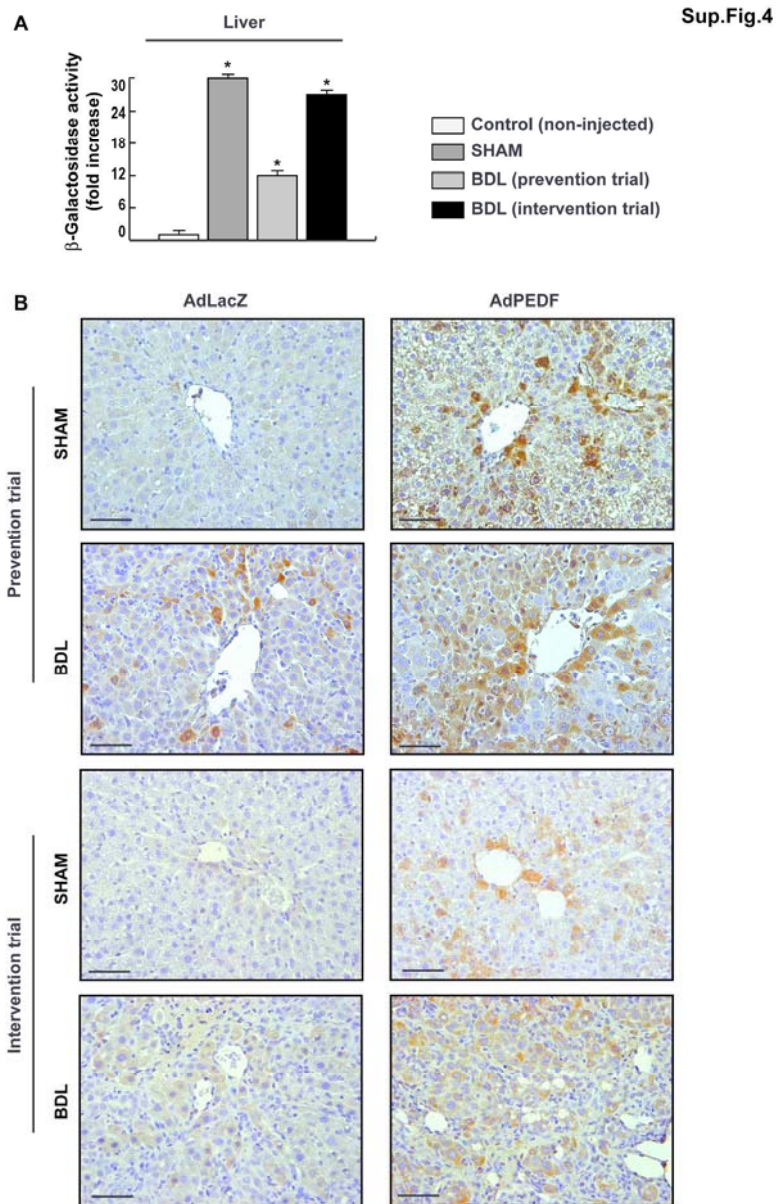
Supplementary Figure 3: Efficient PEDF overexpression in rat mesentery after in vivo AdPEDF gene delivery.

(A) Quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay indicates that recombinant adenoviral vectors were successfully delivered in vivo to the mesentery, with an optimal degree of transduction efficiency in both trials. β -Galactosidase activity in mesentery of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats ($n=6/\text{group}$) and untreated controls ($n=2$) is expressed as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$ versus non-injected controls. (B)

Representative photomicrographs of PEDF immunostainings in paraffin-embedded mesenteric sections from BDL and SHAM rats treated with AdPEDF or AdLacZ, following the prevention and intervention trials. PEDF protein was overexpressed in endothelial cells, smooth muscle cells and adventitial cells at the vascular wall of mesenteric vessels from AdPEDF-treated rats (arrowheads), compared with AdLacZ-treated animals.

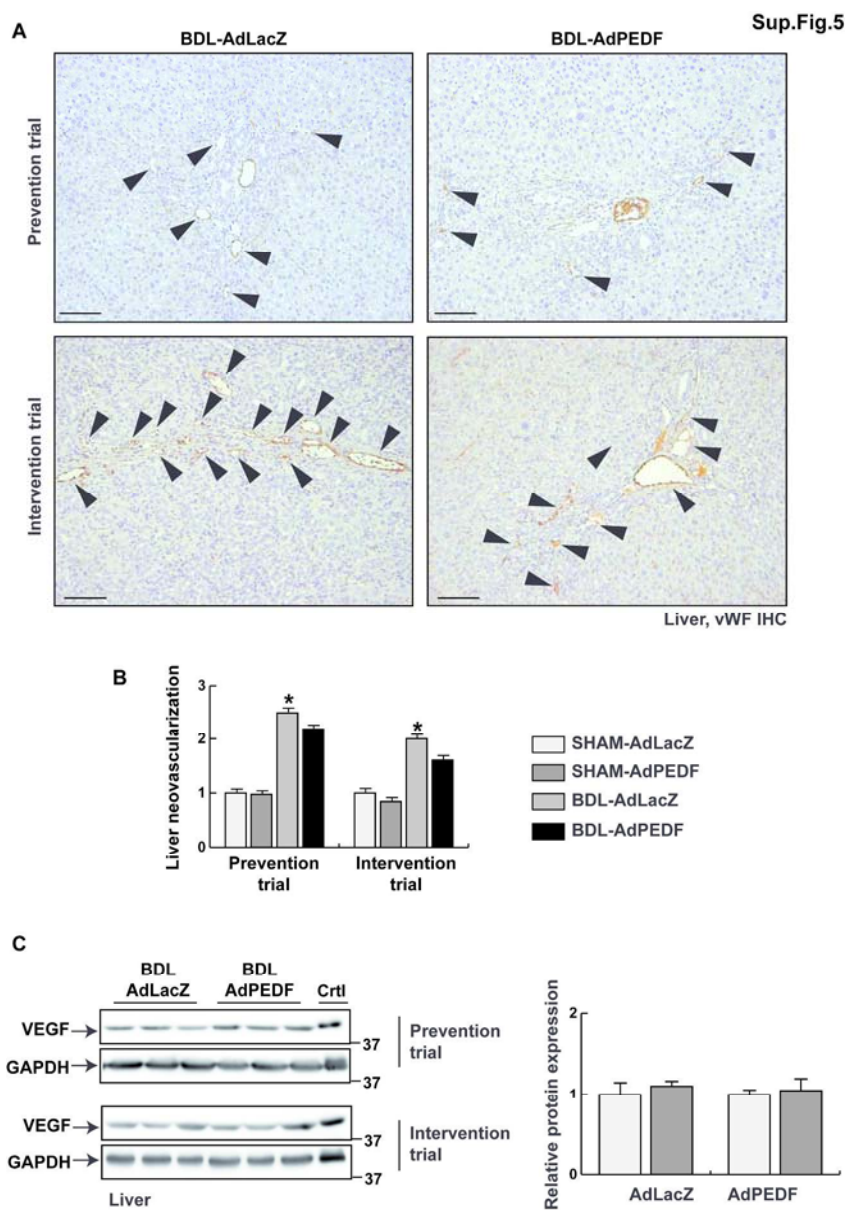
Scale bars: 100- μm (AdLacZ and AdPEDF) and 25- μm (AdPEDF-insets).

204x278mm (300 x 300 DPI)



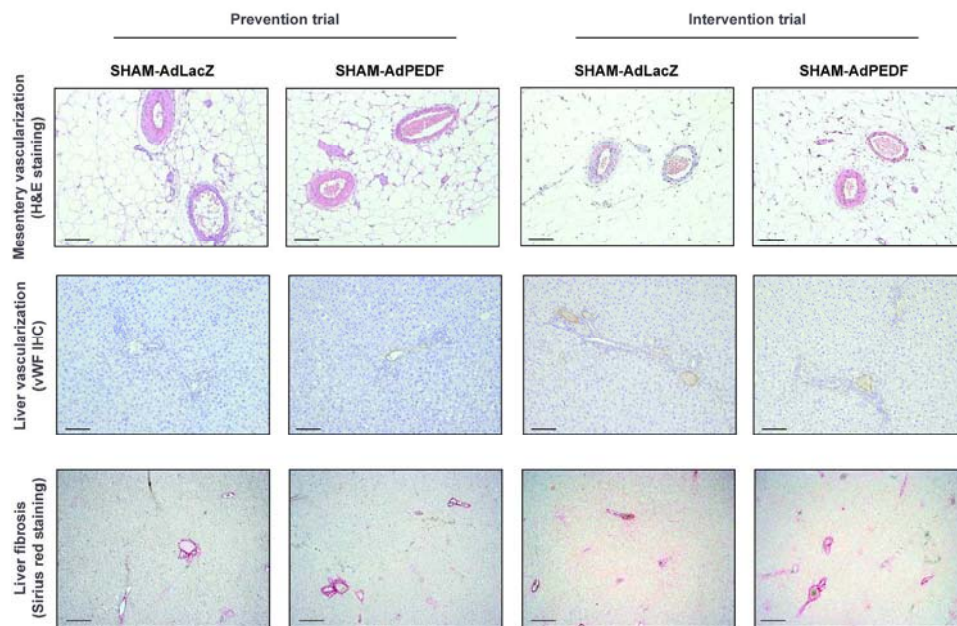
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Figure 4: Efficient PEDF overexpression in rat liver after in vivo AdPEDF gene delivery. (A) Quantitative β -galactosidase chemiluminescence assay indicates that recombinant adenoviral vectors were successfully delivered in vivo to the liver, with an optimal degree of transduction efficiency in both trials. β -Galactosidase activity in liver of AdLacZ-treated BDL and SHAM rats ($n=6$ /group) and untreated controls ($n=2$) is expressed as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$ versus non-injected controls. (B) Representative photomicrographs of liver sections immunostained for PEDF from BDL and SHAM rats treated with AdPEDF or AdLacZ, following the prevention and intervention trials, showing intrahepatic PEDF overexpression in AdPEDF-treated rats compared with AdLacZ-treated animals. Scale bars: 25- μ m. 185x290mm (300 x 300 DPI)



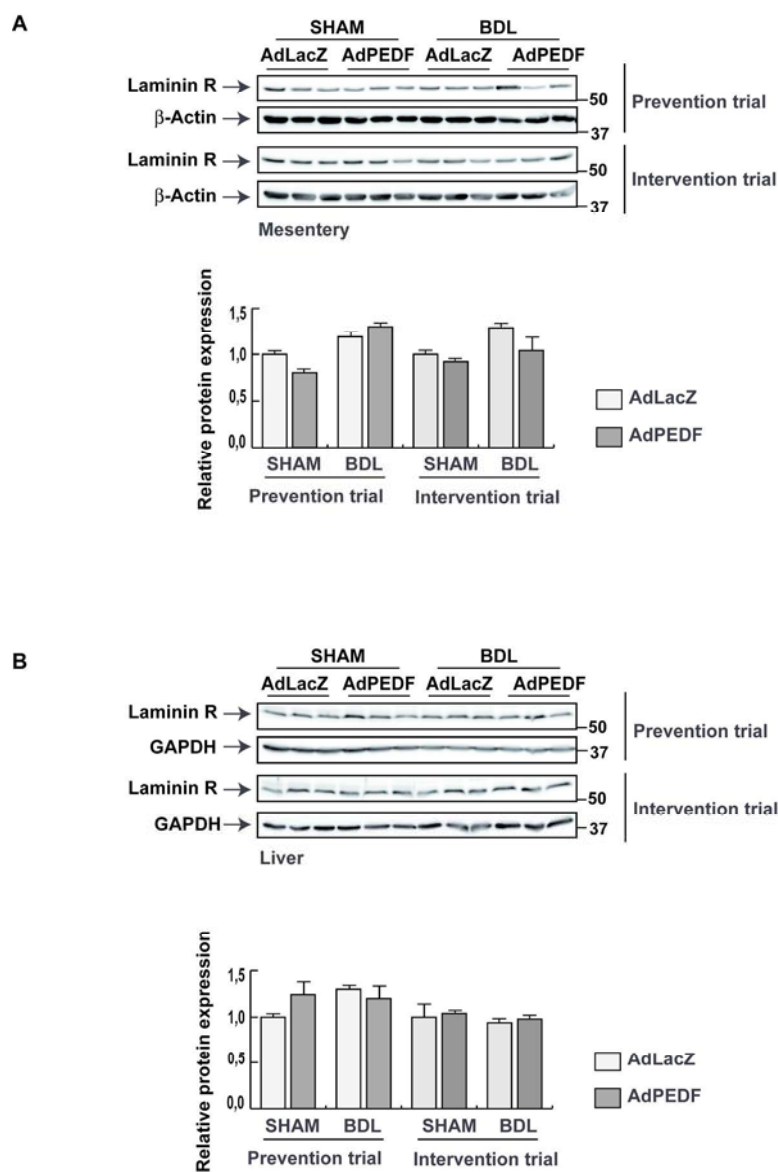
Supplementary Figure 5: Effects of AdPEDF treatment on liver neovascularization and hepatic protein expression of proangiogenic VEGF. (A) Representative photomicrographs from immunohistochemical analyses in liver sections from AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL rats, following the prevention and intervention trials, showing expression of the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF) in the vascular wall of intrahepatic blood neovessels (arrowheads). Scale bar: 50- μ m. (B) Quantification of liver neovascularization (vWF-positive microvessels per field). Results are expressed as mean \pm S.E.M from 6-8 rats per group. * P <0.05 versus AdLacZ-treated SHAM rats. (C) Immunoblotting of VEGF in the liver from AdvASH1- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention and intervention trials. GAPDH was used as loading control. Ctrl, positive control (human transformed endothelial ECV304 cell lysate). Densitometric quantification of protein expression is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. 201x287mm (300 x 300 DPI)

Sup.Fig.6



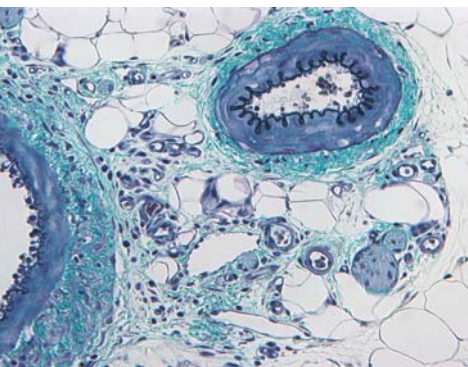
Supplementary Figure 6: Lack of effects of AdPEDF and AdLacZ treatments in SHAM control rats. Photomicrographs of mesentery and liver sections from AdPEDF- or AdLacZ-treated SHAM rats, following the prevention and intervention trials. Results show that AdPEDF and AdLacZ treatments did not affect mesentery vascularization (H&E staining; scale bar: 100 μ m), liver vascularization (immunohistochemistry for the endothelial cell marker von Willebrand factor, vWF; scale bar: 100 μ m), and liver fibrosis (Sirius red staining; scale bar: 200 μ m).
282x191mm (300 x 300 DPI)

Sup.Fig.7



Supplementary Figure 7: Expression of laminin receptor following AdPEDF treatment. (A) Immunoblotting of laminin receptor in the mesentery of AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention and intervention trials. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control β -actin is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (B) Immunoblotting of laminin receptor in the liver of AdPEDF- or AdLacZ-treated BDL and SHAM rats, following the prevention and intervention trials. Densitometric quantification of protein expression relative to loading control GAPDH is also shown. Results are expressed as mean \pm S.E.M.

194x274mm (300 x 300 DPI)



Resum de resultats

5. Resum de resultats

5.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques

La caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogèn VASH1 en relació al proangiogèn VEGF en mesenteri de rata durant la hipertensió portal cirròtica i precirròtica, van produir els següents resultats:

- Les expressions basals de VASH1 i VEGF eren baixes en les rates SHAM (control) i un cop induïda la cirrosi, ambdues proteïnes augmentaven tan en la paret vascular dels vasos preexistents com en la dels vasos formats de nou, en el model d'hipertensió portal prehepàtica per lligadura parcial de la vena porta (PPVL) i en el model de cirrosi biliar secundària per lligadura del colèdoc (BDL).
- No obstant, les expressions en el temps d'ambdós proteïnes mostraven patrons diferents. Tan en el model de BDL com en el de PPVL, primer se sobreexpressava VEGF, indicant que el factor promotor de l'angiogènesi VEGF és predominant en les primeres fases de la malaltia, coincidint amb la màxima activitat angiogènica, mentre que, el factor inhibidor de l'angiogènesi VASH1 era secundari en aquest punt. En canvi, en estadis avançats de la malaltia, el factor promotor de l'angiogènesi VEGF adoptava un paper secundari i el factor inhibidor de l'angiogènesi VASH1 prenia dominància corresponent a un període on l'angiogènesi arribava a una fase de *plateau*.
- Aquests resultats també donen suport a que VEGF i VASH1 estan connectats formant un control per retroalimentació negativa (*feedback* negatiu) on l'activador de l'angiogènesi VEGF induïx l'expressió del inhibidor de l'angiogènesi VASH1, i que VASH1, un cop produït disminueix VEGF.
- D'acord amb el concepte anterior, es va observar que la inhibició de l'augment de VEGF en el mesenteri de rates PPVL a través de l'ús del fàrmac rapamicina reduïa la sobreexpressió de VASH1 i evitava l'augment de l'angiogènesi patològica induïda per la malaltia.

La caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogènic VASH1 en relació al proangiogènic VEGF en fetge de rata i en humans durant la hipertensió portal cirròtica i precirròtica, van produir els següents resultats:

- Després de la inducció de la cirrosi en rates BDL, es va observar una marcada sobreexpressió de VASH1 de forma predominant en els micronòduls de regeneració i en la neovasculatura fruit de l'angiogènesi patològica en el fetge cirròtic, seguint un patró de localització semblant al de VEGF.
- L'anàlisi del patró d'expressió temporal de VASH1/VEGF va revelar que l'augment de VEGF en el fetge de rata també era un esdeveniment que es donava de manera primerenca abans del augment de VASH1, recolzant la idea que l'augment de VEGF que es dona després de la inducció de la hipertensió portal i cirrosi pot ser un factor important que causi la inducció de la sobreexpressió de VASH1.
- En fetges humans sans, VASH1 i VEGF s'expressaven de manera uniforme a nivells molt baixos per pràcticament totes les cèl·lules del parènquima. En fetges cirròtics, en canvi, VASH1 i VEGF se sobreexpressaven intensament, especialment en els hepatòcits dels micronòduls de regeneració i en la paret vascular dels nombrosos neovasos observats dins els septes fibrosos gruixuts, els quals transformen el parènquima del fetge en nòduls.
- Tot i que l'expressió de VASH1 era homogènia en tot el parènquima del fetge cirròtic humà, en el cas del VEGF s'observaven algunes cèl·lules amb marcatge més intens concentrades en la primera línia d'hepatòcits, adjacents als fibroblasts (negatius per VASH1) de les bandes fibroses, en la interfase entre els septes fibrosos i el parènquima del fetge. Aquesta regulació espacial de VEGF probablement també existeix en els fetges de les rates BDL, però en aquest cas els micronòduls estan composts per poques cèl·lules, i per tant són massa petits per detectar un gradient potencial en l'expressió de VASH1-VEGF.
- Un altra vegada, i sent ambdós VEGF i VASH1 factors secretats, aquest patró de localització reflecteix un retràs en el sistema de retroalimentació dels dos components aquest cop modulats espacialment (a més a més d'una regulació temporal) a la interfase entre dos tipus diferents de cèl·lules generant dos nivells diferents de VEGF.
- Aquests resultats suggereixen que l'augment de VEGF i la subseqüent angiogènesi dependent de VEGF induïx la sobreexpressió de VASH1 en un intent de regular l'angiogènesi patològica durant la hipertensió cirròtica i precirròtica.

L'ús de vectors adenovirals que expressaven la proteïna exògena de VASH1 va resultar en:

- Una sobreexpressió eficient i robusta de la proteïna de VASH1 en cèl·lules endotelials humanes (HUVEC) *in vitro*, mostrant una reducció substancial en la capacitat de formació de xarxes tubulars de les HUVEC en Matrigel amb una disminució significativa del 50% dels punts de ramificació, en comparació amb les HUVEC no-transfectades o transfectades amb AdLacZ (control).
- Una sobreexpressió eficient i robusta *in vivo* de la proteïna de VASH1 exògena en fetge i mesenteri de rates SHAM i BDL en ambdós protocols (prevenció i intervenció).

L'efecte de la sobreexpressió de VASH1 mitjançant transferència gènica adenoviral en mesenteri de rates BDL va resultar en:

- Una disminució de VEGF induïda per AdvASH1, que només es va observar durant el protocol de prevenció (en un 50%), corresponent al començament de la malaltia, el qual està caracteritzat per una màxima activitat angiogènica i un augment de l'expressió de VEGF, però no durant el protocol d'intervenció, coincidint amb les etapes de progressió de la malaltia on disminueix el creixement actiu de nous vasos i els nivells de VEGF. En conseqüència, el tractament amb AdvASH1 causava una inhibició significativa del 22% de l'angiogènesi patològica durant el protocol de prevenció però no en el protocol d'intervenció, suggerint que l'AdvASH1 només actua en els nous vasos en creixement però no sobre els vasos preexistents ja madurs.
- L'angiogènesi fisiològica associada amb la cicatrització de les cirurgies practicades en l'abdomen de les rates durant la lligació del ducte biliar o de les operacions fictícies no estava afectada per AdvASH1. Aquests resultats donen suport a que els nivells intermedis de VEGF generats després de la disrupció del sistema de retroalimentació negativa de VEGF-VASH1 utilitzant AdvASH1 exogen és suficient per mantenir la homeòstasi de la vasculatura dels vasos sans i l'angiogènesi fisiològica.
- En les rates SHAM amb operacions fictícies, l'AdvASH1 o l'AdLacZ, no van tenir efecte antiangiogènic en l'absència d'angiogènesi patològica. Tampoc no es va observar una reducció significativa de VEGF o un efecte antiangiogènic en la vasculatura normal de les rates, indicant per tant que els efectes inhibitoris de VASH1 es restringien als vasos en proliferació, sense danyar els vasos madurs preexistents.
- L'AdvASH1 no presentava efecte en l'expressió a nivell de mRNA i proteïna dels receptors de VEGF Flk1 i Flt1 en mesenteri de rates BDL i SHAM.

L'efecte de la sobreexpressió de VASH1 mitjançant transferència gènica adenoviral en fetge de rates BDL va resultar en:

- Una neovascularització reduïda en els septes fibrosos (d'un 23% i un 48% en els protocols de prevenció i intervenció, respectivament), comparat amb les rates BDL tractades amb AdLacZ.
- No obstant, l'expressió total de VEGF no estava significativament modificada per AdVASH1. L'existència d'una regulació per retroalimentació negativa entre els nivells patològics de VEGF i VASH1 restringida als hepatòcits localitzats a la interfase entre els septes fibrosos altament neovascularitzats i el parènquima del fetge, aporta una possible explicació per la reducció de l'angiogènesi patològica intrahepàtica tot i la manca de canvi d'expressió de VEGF entre les rates BDL AdVASH1 i AdLacZ. A causa de que aquesta població cel·lular només representa una fracció molt petita del total de cèl·lules en el fetge, el *Western blot* del teixit del fetge sencer no pot detectar cap disminució local de l'expressió de VEGF induïda per AdVASH1. La reducció observada de l'angiogènesi patològica en els fetges BDL suggereix que una disminució estratègica i localitzada de VEGF es pot donar en resposta a l'AdVASH1.
- L'AdVASH1 no presentava efecte en l'expressió a nivell de mRNA i proteïna dels receptors de VEGF Flk1 i Flt1 en el fetge de rates BDL i SHAM.
- De la mateixa manera com s'havia observat en el cas del mesenter, els efectes antiangiogènics d'AdVASH1 no eren detectats en rates SHAM indicant que el VASH1 exogen interfereix en l'angiogènesi patològica però no la fisiològica.
- L'AdVASH1 disminuïa de forma marcada l'àrea fibròtica en els fetges de rates BDL (en un 38% i un 27% en els protocols de prevenció i intervenció, respectivament), comparat amb les rates BDL tractades amb AdLacZ.
- L'expressió de l' α SMA en els fetges de rates BDL era clarament disminuïda per l'AdVASH1 en el protocol d'intervenció (en un 38%), però no es veia afectada en el protocol de prevenció, consistent amb el perfil temporal de l'expressió de l' α SMA després de la BDL (activació baixa en els estadis primerencs després de la BDL i activació alta en estadis tardans), suggerint que la supressió de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades pot ser com a mínim part del mecanisme que dona l'efecte antifibròtic de l'AdVASH1. Aquest efecte també pot ser indirectament recolzat a través de la inhibició de l'angiogènesi intrahepàtica, la qual pot explicar la fibrosi reduïda que s'observa en el protocol de prevenció.

- L'AdvASH1 no modificava significativament l'expressió del factor profibròtic TGF- β (factor de creixement transformant β), suggerint que l'efecte antifibròtic d'AdvASH1 era independent de la via de TGF- β .

Els efectes antiangiogènics i antifibròtics d'AdvASH1 es van traduir en una millora de les anomalies hemodinàmiques que es donen en les rates BDL:

- Les rates BDL tractades amb AdLacZ presentaven un increment de la pressió portal (PP), del flux sanguini de l'artèria mesentèrica superior (SMABF) i de la resistència portohepàtica, en comparació amb les rates SHAM.
- El tractament amb l'AdvASH1 en les rates BDL reduïa de forma significativa la PP (en un 12% i en un 16% en els protocols de prevenció i d'intervenció, respectivament), sense afectar la pressió arterial mitjana i la freqüència cardíaca.
- L'atenuació de la hipertensió portal en les rates BDL tractades amb AdvASH1 es va donar majoritàriament a través de la reducció de la neovascularització esplàncnica i del SMABF (en un 15%) en el protocol de prevenció, i una disminució de la fibrosi hepàtica i de la resistència portohepàtica (en un 25%) en el protocol d'intervenció.
- La millora en la hipertensió portal també es va associar a una disminució del 27% del *shunting* portosistèmic (protocol d'intervenció). La col·lateralització portosistèmica no es va mesurar en el protocol de prevenció ja que aquest fenomen no es veu alertat d'una manera apreciable fins a una setmana post-BDL.
- El tractament amb AdvASH1 no va tenir efectes importants a nivell sistèmic, com evidència la falta de canvis en la pressió arterial mitjana i de freqüència cardíaca, en la funció renal i en el pes de la melsa.

4.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)

La caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogènic PEDF en relació al proangiogènic VEGF en fetges cirròtics humans amb cirrosi derivada d'hepatitis per virus C i en fetges d'individus sans va resultar en:

- Una sobreexpressió de PEDF en els fetges cirròtics en comparació amb fetges d'individus sans, de forma predominant en els micronòduls de regeneració i en l'interfase entre el parènquima del fetge i els septes fibrosos altament neovascularitzats. Aquesta

localització del PEDF correlacionava amb les zones on hi havia uns nivells alts d'expressió de VEGF.

La caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogènic PEDF en relació al proangiogènic VEGF en fetge de rata durant la hipertensió portal i cirrosi per BDL, va produir els següents resultats:

- L'expressió de PEDF a nivell de proteïna augmentava al llarg del temps després de la inducció de la hipertensió portal i la cirrosi seguint un patró d'expressió similar al de VEGF, tot i la manca de canvis d'expressió a nivell de mRNA.
- En el cas del fetge de rata, també es va demostrar que la proteïna de PEDF se sobreexpressava de manera robusta en els hepatòcits de rates BDL, principalment en els micronòduls en les àrees on s'està donant la fibrogènesi, amb un elevat grau de superposició en la distribució espacial de PEDF i VEGF.
- L'observació de l'expressió de VEGF i PEDF a nivell de proteïna en rates fibròtiques/cirròtiques per inhalació de CCl₄ (rates control, rates de 6 setmanes amb CCl₄ i rates de 12 setmanes amb CCl₄) va resultar en una progressiva sobreexpressió de PEDF en paral·lel amb VEGF al llarg del temps.

La caracterització temporal i espacial de l'expressió de l'antiangiogènic PEDF en relació al proangiogènic VEGF en mesenteris de rata durant la hipertensió portal i cirrosi per BDL, va produir els següents resultats:

- La inducció de la cirrosi mitjançant lligadura del colèdoc va conduir a un augment primerenc de l'expressió a nivell de proteïna de PEDF, tot i la manca de canvis en els nivells de mRNA. L'expressió de PEDF es va mantenir alta durant la primera setmana, correlacionant amb la màxima activitat angiogènica en el mesenteri però a continuació retornava als nivells normals, quan el creixement actiu dels neovasos frenava.
- Aquests efectes es reflectien en l'anàlisi de l'expressió de PEDF mitjançant immunohistoquímica on s'observava una expressió de PEDF abundant en la paret vascular dels vasos preexistents i en vasos en creixement quan l'angiogènesi es desenvolupava de manera activa i una disminució global de la immunoreactivitat del PEDF quan l'angiogènesi arribava a una fase de *plateau*. Aquests resultats suggereixen que PEDF està involucrat en la regulació de la formació de neovasos associats a la hipertensió portal. Recolzat a més a més pel fet que les expressions de PEDF i VEGF

augmentaven proporcionalment i se solapaven, marcant els mateixos compartiments de la paret vascular en el mesenterí de rates BDL.

L'ús de vectors adenovirals que expressaven la proteïna exògena de PEDF va resultar en:

- Una sobreexpressió eficient i robusta del mRNA i la proteïna de PEDF en cèl·lules endotelials humanes (HUVEC) *in vitro*, mostrant una reducció substancial en la capacitat de formació de xarxes tubulars de les HUVEC en Matrigel amb una disminució significativa del 35% dels punts de ramificació, en comparació amb les HUVEC no-transfectades o transfectades amb AdLacZ (control).
- Una sobreexpressió eficient i robusta *in vivo* de la proteïna de PEDF exògena en fetge i mesenterí de rates SHAM i BDL en ambdós protocols (prevenció i intervenció).

Els efectes antiangiogènics de la sobreexpressió de PEDF mitjançant transferència gènica adenoviral en rates BDL va resultar en:

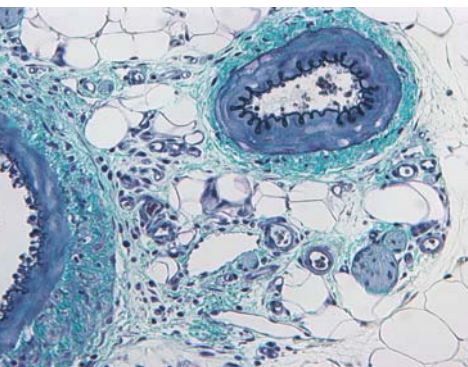
- En el mesenterí, l'AdPEDF exhibia una activitat antiangiogènica important, amb una disminució de la neovascularització mesentèrica significativa d'un 31% i de l'expressió de VEGF en rates BDL durant el protocol de prevenció, però no quan l'adenovirus s'administrava en estadis més avançats (protocol d'intervenció).
- La formació de vasos portocol·laterals seguint el protocol d'intervenció en rates tractades amb l'AdPEDF mostraven una disminució del 16% en la formació de vasos portocol·laterals si es compara amb els animals tractats amb AdLacZ ($61.5 \pm 10\%$ vs. $85.5 \pm 8\%$), tot i que la diferència no va arribar a ser significativa.
- En el cas del fetge, es va observar una resposta menor a l'efecte angiointhibitori d'AdPEDF amb una disminució no significativa sobre els número de vasos positius pel marcador de cèl·lula endotelial factor *von-Willebrand* en fetge de rates BDL, en els protocols de prevenció i d'intervenció. L'expressió de VEGF no es veia modificada per l'AdPEDF en fetges de rates BDL.
- En rates SHAM, AdPEDF no produïa efectes antiangiogènics significatius.
- No es van observar diferències d'expressió del receptor de laminina en el fetge i mesenterí de rates SHAM i BDL, en diferents estadis de la hipertensió portal i després dels tractaments amb AdPEDF, suggerint que el lleu efecte antiangiogènic de l'AdPEDF en els fetges de rates BDL no es pot adscriure a una deficiència o una disminució del LR.

Els efectes antifibròtics de la sobreexpressió de PEDF mitjançant transferència gènica adenoviral en el fetge de rates BDL va resultar en:

- Una reducció de fibra en un 35% amb el tractament mitjançant AdPEDF en el protocol de prevenció. Aquest efecte antifibrogènic es donava de manera independent de la supressió de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC) ja que l'AdPEDF no atenuava l'expressió del marcador indicador d'activació d'HSC α SMA i donava un augment a nivell de proteïna i mRNA del col·lagen.
- L'AdPEDF augmentava l'expressió a nivell de mRNA i proteïna de MMP-2 en el fetge de rates cirròtiques BDL, indicant que l'augment de la degradació del col·lagen pot estar involucrat en l'activitat antifibròtica del PEDF. L'AdPEDF també va augmentar l'expressió a nivell de mRNA de la MMP13 però aquest efecte no estava associat a un augment en paral·lel en la proteïna de MMP13.
- En el protocol d'intervenció, l'AdPEDF no va ser capaç de reduir de manera significativa la fibrosi hepàtica. En aquests estadis finals de la fibrosi biliar, l'AdPEDF no era capaç de canviar l'estat d'activació de les HSCs, la producció de col·lagen o la degradació del col·lagen.

Els efectes antiangiogènics i antifibròtics d'AdPEDF es van traduir en una millora de les anomalies hemodinàmiques que es donen en les rates BDL:

- La combinació de les activitats antiangiogèniques i antifibròtiques de PEDF es van traduir en una disminució significativa de la pressió portal (PP) en les rates tractades amb AdPEDF en comparació amb les rates tractades amb AdLacZ en ambdós protocols, prevenció en un 12% i en el protocol d'intervenció d'un 10%. Els valors de pressió arterial mitjana (MAP) i índex cardíac (HR) no es van veure alterats i eren similars en ambdós grups.



Discussió

6. Discussió

En els darrers anys s'ha demostrat que l'angiogènesi patològica és un procés clau en el desenvolupament de malalties cròniques del fetge i les seves complicacions associades, com és el cas de la cirrosi i la síndrome de la hipertensió portal (17, 19-21, 55). Entendre els mecanismes que la regulen és essencial per poder desenvolupar noves estratègies terapèutiques que actuïn de manera específica i efectiva sobre aquesta angiogènesi patològica sense afectar l'angiogènesi fisiològica, la qual és necessària per una correcta homeòstasi en l'organisme. La majoria de teràpies antiangiogèniques han estat dirigides a la inhibició del factor proangiogènic VEGF donant múltiples beneficis en models animals de cirrosi i hipertensió portal (17, 19, 21, 55), fet que indica el seu fort potencial per una aplicació clínica. No obstant, s'ha de tenir en compte que una inhibició excessiva de VEGF pot afectar al seu paper fisiològic essencial per la homeòstasi vascular, el manteniment i reparació d'òrgans i teixits, i molts altres processos fisiològics on l'angiogènesi té un paper important (23, 43). De fet, l'ús de teràpies amb una inhibició excessiva de VEGF pot ser un dels possibles motius de les complicacions, com el sagnat de varius, que presenten malalts cirròtics quan són tractats amb inhibidors multiquinases (88, 212).

Arrel de la importància d'ampliar el coneixement sobre la regulació dels processos angiogènics que es donen durant el desenvolupament de la cirrosi hepàtica i la hipertensió portal, el nostre grup de recerca ha volgut enfocar la seva investigació en els altres protagonistes reguladors d'aquest procés, com són els inhibidors endògens de l'angiogènesi. Concretament el nostre estudi s'ha centrat en dos d'aquests factors antiangiogènics endògens, un d'ells àmpliament estudiat, el factor derivat de l'epiteli pigmentari (PEDF), i un altre descrit aquests darrers anys, vasohibin-1 (VASH1).

6.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques

6.1.1 Relació de l'expressió de VASH1 i VEGF en mesenteris i en fetge durant la hipertensió portal cirròtica i precirròtica

Vasohibin-1 és un factor antiangiogènic recentment identificat (90) el qual es caracteritza per ser un factor induït selectivament per proangiogènics, especialment VEGF, com a conseqüència d'un mecanisme de retroalimentació negativa (90, 106, 207).

En el present estudi, es va realitzar una caracterització completa del perfil d'expressió espaciotemporal de VASH1, i la seva relació amb VEGF, durant el procés de neovascularització i fibrogènesi en la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica a través de l'anàlisi de fetges de pacients amb cirrosi pel virus de l'hepatitis C, en dos models animals (PPVL i CBDL), en dos llits vasculars amb característiques diferents (fetge i mesenteris), en diferents punts de la progressió de la malaltia (etapes inicials i avançades de la malaltia), així com en assaigs d'angiogènesi *in vitro* amb cèl·lules endotelials humanes, HUVECs.

Els resultats obtinguts d'aquest anàlisi en el mesenteris de rates amb hipertensió portal mostren, per *western blot*, immunohistoquímica i immunofluorescència, tal i com ja s'havia obtingut anteriorment (55, 206), que VEGF se sobreexpressa en les fases inicials del desenvolupament de la hipertensió portal i cirrosi després de la inducció de la malaltia per tal de donar un fenotip angiogènic, tan en el model BDL com PPVL. Es va observar que aquest augment de VEGF i la subseqüent angiogènesi associada precedien en el temps, en ambdós models (CBDL i PPVL), a la sobreexpressió de l'inhibidor angiogènic VASH1 en un intent de frenar aquesta angiogènesi. D'aquesta manera els resultats obtinguts indicaven que VEGF indueix l'expressió de VASH1, i aquest al seu torn actuaria inhibint l'angiogènesi, per un sistema de retroalimentació negativa, com s'havia descrit anteriorment en altres contextos (90), també en el marc de la síndrome de la hipertensió portal i cirrosi.

Per acabar de confirmar que VEGF efectivament era un factor inductor de l'expressió de VASH1 es va analitzar per *western blot* en mesenteris de rates PPVL si l'ús del fàrmac rapamicina, el qual inhibeix l'expressió de VEGF, reduïa la sobreexpressió de VASH1. Efectivament en mesenteris de rates PPVL tractades amb rapamicina es reduïa l'expressió de VASH1 i VEGF de forma significativa a nivells semblants.

En el cas del fetge, els resultats obtinguts d'aquest anàlisi mostraven per immunohistoquímica que després de la inducció de la cirrosi hi havia una marcada sobreexpressió de VASH1 sobretot en els micronòduls de regeneració i en els neovasos seguint un patró de colocalització semblant al observat per VEGF. També es va realitzar un estudi complementari per *western blot* per determinar la cinètica d'expressió d'ambdues proteïnes, i s'observava que també en el cas del fetge, l'expressió de VEGF precedia lleugerament en el temps a l'expressió de VASH1 confirmant de nou el patró d'inducció de VASH1 per VEGF. Per altra banda, també es va analitzar l'expressió d'aquests dos factors en mostres humanes de fetges d'individus sans i de pacients cirròtics per virus de l'hepatitis C. De la mateixa manera que s'observava en fetges de rates CBDL, tan VEGF com VASH1 se sobreexpressaven en fetges cirròtics respecte fetges d'individus sans. En aquest cas també s'observava aquest augment en els hepatòcits dels micronòduls de regeneració i neovascularització dins el septes fibrosos gruixuts, sobretot concentrat en la primera línia d'hepatòcits en l'interfase entre els septes fibrosos i el parènquima del fetge (206).

6.1.2 Sobreexpressió de VASH1 usant transferència gènica adenoviral

A partir de l'anàlisi realitzat sobre l'expressió de VASH1 i VEGF en diferents models animals (tant en fetge com en mesenter) i en fetges cirròtics humans, s'ha determinat que VASH1 endogen es troba sobreexpressat en la inducció de la cirrosi i la hipertensió portal formant un sistema de retroalimentació negatiu retardat amb VEGF, i que per tant, es tracta d'un component important en el procés angiogènic en aquestes patologies.

Estudis anteriors han demostrat que VASH1 endogen s'expressa dèbilment a la zona de més activitat angiogènica (zona d'*sprouting*) i en canvi hi ha una sobreexpressió d'aquest factor en la zona terminal de l'angiogènesi (zona de terminació) (112). Aquests estudis coincidirien amb el que s'ha observat en els nostres models experimentals on en els punts de màxima activitat angiogènica hi ha un pic d'expressió de VEGF però en canvi l'expressió de VASH1 encara és força menor, i a continuació, l'expressió de VASH1 augmenta coincidint amb la fase de *plateau* de l'angiogènesi. No obstant, en aquest estudi (112), van demostrar que la sobreexpressió exògena de VASH1 mitjançant transferència gènica adenoviral era capaç d'inhibir l'angiogènesi en la zona de màxima activitat (zona d'*sprouting*) on el VASH1 endogen és escàs, suggerint d'aquesta manera que el VASH1 endogen actua en la finalització de l'angiogènesi però no és capaç de inhibir-la en la zona d'inici. No obstant, la sobreexpressió de VASH1 de manera

exògena sí que és capaç d'evitar aquesta angiogènesi patològica sense afectar la vasculatura preexistent (112).

Aquest estudi i altres (90, 121-123, 125, 132, 134) han demostrat doncs que la transferència gènica mitjançant vectors adenovirals permet augmentar els nivells de VASH1 de forma independent de l'expressió de VEGF, i d'aquesta manera es pot interrompre el sistema VEGF/VASH1 permetent així que es doni una inhibició clara de la neovascularització ja en els seus inicis.

Arrel dels resultats obtinguts i d'una extensa cerca en la literatura es va voler demostrar si la sobreexpressió exògena de l'antiangiogènic VASH1 podria afavorir el desplaçament de l'equilibri entre factors proangiogènics i antiangiogènics a favor d'aquests últims, resultant en una inhibició efectiva de l'angiogènesi patològica, també en la patologia de la cirrosi i hipertensió portal. Això podria causar múltiples efectes beneficiosos, tant esplànncics com intrahepàtics, en animals amb hipertensió portal i cirrosi, sense efectes secundaris aparents, suggerint que la suplementació de VASH1 podria ser una estratègia terapèutica prometedora per frenar la progressió d'aquestes malalties.

La sobreexpressió d'aquest factor es va assolir mitjançant dos protocols dissenyats per avaluar els efectes de l'antiangiogènic tant en les fases primerenques de la progressió de la malaltia (protocol de prevenció) com en les etapes més avançades de la malaltia (protocol d'intervenció).

Primer de tot, es va realitzar una posada a punt de la tècnica a partir de l'anàlisi d'expressió del gen Lac Z, establint a partir d'un grup de rates pilot la dosi d'adenovirus òptima per la infecció tant del fetge com del territori esplànncic així com el número de dosis necessàries a injectar al llarg del temps per obtenir una bona expressió sense toxicitat pel animal. D'aquesta manera es va verificar que els vectors adenovirals eren alliberats correctament *in vivo* en el fetge i mesenteri després de la injecció intravenosa, tal i com s'observa en l'assaig de quimioluminiscència quantitatiu de la β -galactosidasa i en la tinció de X-gal. Per altra banda, l'anàlisi d'expressió de proteïna per *western blot* va confirmar que el tractament amb AdVASH1 induïa la sobreexpressió de VASH1 en ambdós teixits de rates BDL i control.

A més a més, també es van portar a terme estudis *in vitro* en Matrigel en cèl·lules HUVEC per demostrar que l'AdVASH1 era capaç d'infectar de manera eficient les cèl·lules endotelials. No només es va observar una sobreexpressió clara de la proteïna VASH1 en les cèl·lules HUVEC infectades amb l'AdVASH1, sinó que a més a més, es confirmava la seva funcionalitat i capacitat antiangiogènica observant una disminució clara i significativa de la formació de xarxes tubulars amb una reducció del 50% dels punts de ramificació en comparació

amb el control amb sobreexpressió de l'AdLacZ. Aquest efecte antiangiogènic de VASH1 en les HUVEC s'havia observat anteriorment quan s'addicionava directament la proteïna (90). En el nostre cas, demostrem que l'ús de transferència gènica adenoviral és igual d'efectiva que l'adició directa de la proteïna, i que per tant resulta una bona estratègia de sobreexpressió de VASH1.

6.1.3 Efecte de la sobreexpressió de VASH1 mitjançant transferència gènica adenoviral en la hemodinàmica de rates BDL derivats de l'efecte en l'angiogènesi i la fibrogènesi en fetge i mesenter

A partir dels estudis realitzats s'ha observat que la sobreexpressió de la proteïna de VASH1 *in vivo* amb un vector adenoviral que codifica el gen de la VASH1 (AdVASH1) suprimeix de manera eficient la neovascularització patològica mesentèrica i intrahepàtica i redueix la formació de vasos col·laterals portosistèmics en rates BDL. L'acció protectora de VASH1 no es limita però a la inhibició de l'angiogènesi sinó que també actua com atenuant de la fibrogènesi intrahepàtica en part a través de la supressió de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades. Aquests resultats concorden amb observacions prèvies on VASH1 està sobreexpressat, com en tumors, en neovascularització de la retina, engruïment de la capa íntima de les artèries, i que quan s'aplica de manera exògena, inhibeix l'angiogènesi *in vivo* en models animals d'aquests desordres vasculars (120-125). No obstant, no es coneix exactament el mecanisme d'acció associat a VASH1 ja que no s'ha identificat encara el receptor funcional (106, 207).

Els resultats obtinguts aquí defineixen que l'efecte inhibitori d'AdVASH1 en l'angiogènesi es podria explicar en part per la disrupció del sistema de retroalimentació negativa de VEGF-VASH1 amb la disminució local de l'expressió excessiva del factor de creixement proangiogènic VEGF. Paradoxalment, la sobreexpressió del factor VASH1 que ja estava prèviament sobreexpressat en els fetges cirròtics millora la malaltia hepàtica. La clau d'aquesta aparent contradicció és que el VASH1 endogen està regulat per VEGF seguint un sistema de retroalimentació negativa. En aquest sistema, la sobreexpressió de VEGF (induïda per diferents estímuls presents en la patologia) produeix la inducció de l'expressió de VASH1, però no de manera immediata sinó amb un decalatge en el temps i/o una restricció espacial. Aquest decalatge permet doncs que es produeixi un pic d'expressió de VEGF (Figura 14,A) que promourà l'angiogènesi patològica, i que el VASH1 endogen expressat actui posteriorment en les fases de terminació angiogènica. No obstant, quan se sobreexpressa el VASH1 de manera exògena utilitzant AdVASH1 (Figura 14, B), de forma independent de VEGF, aquest sistema es

troba interromput, inhibint aquest pic abrupte de sobreexpressió patològica de VEGF, requerit per a l'angiogènesi patològica. D'aquesta manera s'inhibeix l'angiogènesi patològica en les fases d'*sprouting* ja als inicis, tot i que mantenint uns nivells basals de VEGF necessaris per a l'homeòstasi vascular.

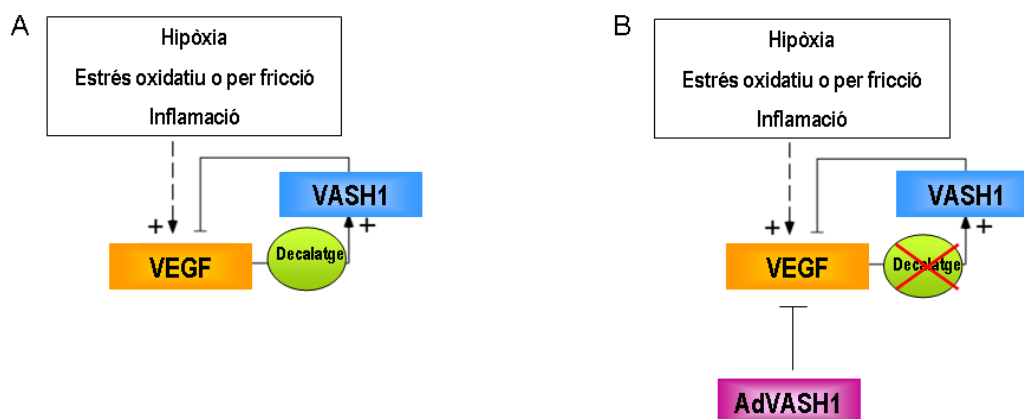


Figura 14: Sistema de retroalimentació negatiu VEGF/VASH1. A) Funcionament del sistema en l'expressió endògena de VASH1. B) Funcionament del sistema quan se sobreexpressa de manera exògena VASH1 mitjançant vectors adenovirals.

És interessant destacar, que els efectes protectors pleiotròpics d'AdVASH1 es van traduir en una disminució significativa de la pressió portal en rates BDL (en un 12% en el protocol de prevenció i en un 16% en el protocol d'intervenció), apuntant el potencial valor terapèutic de VASH1 en la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica. La baixada de la pressió portal causada per l'AdVASH1 en el protocol de prevenció es va donar en part per una disminució significativa del 15% del flux sanguini esplàncnic, com a resultat de la reducció de la neovascularització mesentèrica. Aquesta reducció de la neovascularització mesentèrica en el protocol de prevenció era d'un 22%, lligada a una disminució de l'expressió a nivell de proteïna de VEGF del 50%. En el cas del protocol d'intervenció no hi havia disminució de l'expressió de la proteïna VEGF, ni tampoc disminució de la neovascularització mesentèrica. Això és degut a que l'efecte del VASH1 exogen actua a l'inici de la malaltia on es dona la màxima activitat angiogènica i hi ha un augment patològic de VEGF, però no durant el protocol d'intervenció, etapa de la progressió de la malaltia on disminueix el creixement actiu de neovasos i els nivells patològics de VEGF. Aquests efectes suggereixen que l'AdVASH1 actua només en els nous vasos en creixement però no sobre els vasos preexistents ja madurs.

En canvi, la reducció de la pressió portal observada en el protocol d'intervenció era parcialment regulada mitjançant una disminució significativa del 25% de la resistència

portohepàtica, com a conseqüència de la reducció de la fibrogènesi intrahepàtica induïda per AdVASH1. Aquesta reducció de la fibrogènesi per part de l'AdVASH1 es va determinar a partir de la tinció histològica de fetges de rates BDL amb *Sirius red*, on es va observar una disminució marcada de l'àrea fibròtica comparat amb les rates BDL tractades amb AdLacZ, en un 38% en el protocol de prevenció, i en un 27% en el protocol de intervenció. Si s'observa la cinètica de producció de fibra en el model BDL, és en la fase que correspon el protocol d'intervenció (dels 14 als 28 dies) on aquesta disposició de fibra és més important i per tant comporta conseqüències més greus.

Per tal d'explicar aquesta baixada de la fibrogènesi en ambdós protocols, es va estudiar l'efecte de l'AdVASH1 en l'expressió d' α SMA, marcador d'activació de cèl·lula hepàtica estrellada el paper de la qual és clau en la fibrogènesi del fetge (6). Com a resultat, es va observar per *western blot* que AdVASH1 disminuïa en un 38% l'expressió de α SMA en el protocol d'intervenció però no produïa una baixada en el protocol de prevenció. Aquest fenomen es pot explicar si s'observa el perfil d'activació de l' α SMA en la cinètica BDL on la major activació de la cèl·lules hepàtiques estrellades, i per tant, amb més expressió de α SMA, es dona en estadis tardans de la inducció de BDL (corresponent al protocol d'intervenció) i en canvi és menor en les primeres fases de la malaltia (corresponent al protocol de prevenció). Per altra banda, no es va observar una modificació significativa de l'expressió del factor profibròtic TGF- β per part de l'AdVASH1 suggerint que l'efecte antifibrogènic d'AdVASH1 és independent de la via de senyalització de TGF- β . En el cas del protocol de prevenció, la inhibició de la fibrogènesi pot estar indirectament relacionada amb la inhibició de l'angiogènesi intrahepàtica ja que s'ha demostrat anteriorment l'estreta relació entre processos angiogènics i fibrogènics (21, 58, 73-75). De fet, en ambdós protocols es va obtenir una disminució significativa de l'angiogènesi intrahepàtica amb el tractament amb l'AdVASH1 en comparació amb les BDL tractades amb el gen control AdLacZ corresponent a una baixada de la neovascularització en els septes fibrosos del 23% en el cas del protocol de prevenció, i un baixada del 48% en el protocol d'intervenció, tot i que no s'observava una disminució de l'expressió de VEGF en cap cas.

Una possible explicació a la disminució de l'angiogènesi patològica intrahepàtica en els fetges BDL tractats amb AdVASH1 *versus* AdLacZ, tot i la manca de canvis en l'expressió de VEGF en l'anàlisi del fetge total, podria ser a causa de l'existència d'una regulació espacial per retroalimentació negativa entre VEGF i VASH1 restringida als hepatòcits localitzats a l'interfase entre els septes fibrosos altament neovascularitzats i el parènquima del fetge. Com que aquesta població cel·lular només representa una fracció molt petita del total de cèl·lules en el fetge, no es

podria detectar, en fetge total, aquesta disminució local de l'expressió de VEGF induïda per AdVASH1 efectiva en la baixada de neovascularització en els septes fibrosos. Per tant, la reducció observada de l'angiogènesi patològica en els fetges BDL suggereix que una disminució estratègica i localitzada de VEGF es pot donar en resposta a l'AdVASH1.

A més a més dels efectes antiangiogènics observats tan en mesenteri com en fetge de les rates BDL tractades amb AdVASH1, també és important destacar la contribució a la millora de la hipertensió portal relacionada amb la baixada significativa del 27% observada en el *shunting* portosistèmic en el protocol d'intervenció. El *shunting* portosistèmic no es va mesurar en el protocol de prevenció ja que en fases tan primerenques les alteracions no són apreciables, però sí que ho estan a partir d'una setmana postBDL com és l'etapa d'estudi corresponent al protocol d'intervenció.

La importància d'aquestes troballes és que els efectes de l'AdVASH1 es reflecteixen en el patró dels canvis patològics observats en mesenteri i fetge en la progressió de la malaltia. Per aquest motiu l'AdVASH1 redueix de manera efectiva la neovascularització mesentèrica, i al seu torn, el flux sanguini esplàncnic només quan s'administra durant el creixement actiu de nous vasos (la primera setmana després de la BDL/ protocol de prevenció). En canvi, l'AdVASH1 disminueix la resistència portohepàtica quan es dona en el període de màxima fibrogènesi (a partir de dues setmanes postBDL/ protocol d'intervenció).

Un altre resultat important a destacar és que l'AdVASH1 no presentava activitat antiangiogènica en absència d'angiogènesi patològica, ja que no es va observar cap efecte en les rates SHAM injectades amb l'AdVASH1 respecte les rates SHAM injectades amb l'AdLacZ ni en fetge ni en territori esplàncnic. Tampoc es va observar un efecte antifibròtic mitjançant la tinció de *Sirius Red* en fetges SHAM tractats amb l'antiangiogènec *versus* les rates SHAM control.

Aquest fet indica que les propietats antiangiogèniques de l'AdVASH1 eren específiques pels vasos actius involucrats en el procés d'angiogènesi patològica, sense afectar la vasculatura normal dels òrgans. L'observació que l'AdVASH1 només inhibeixi la neovascularització mesentèrica quan aquest procés es troba en la seva màxima activitat també suggereix que l'AdVASH1 actua selectivament sobre els neovasos en proliferació però no en els vasos preexistents o aquells vasos ja madurs. A més a més, el creixement normal dels vasos sans associat a la cicatrització de les cirurgies no es va veure impedida en cap cas en els animals tractats amb AdVASH1, donant suport a que AdVASH1 només interfereix en l'angiogènesi patològica però no la fisiològica, la qual és necessària en múltiples processos que inclouen no només la cicatrització sinó també com creixement i desenvolupament d'òrgans, manteniment de teixits, i reproducció (23).

Aquest fet es va confirmar mostrant que l'AdVASH1 no presentava cap efecte en l'expressió de VEGF de les rates SHAM ni en fetge ni en mesenteri d'ambdós protocols. A més, la disminució dels nivells de VEGF en les rates BDL tractades amb AdVASH1 arribaven als nivells basals de les SHAM però no per sota d'aquests nivells, indicant que la reducció de l'AdVASH1 redueix la producció excessiva de VEGF però no la normal necessària per a la homeòstasi vascular. Tampoc es va observar cap efecte significatiu en l'expressió a nivell de mRNA ni proteïna de l'expressió dels receptors de VEGF Flk1 i Flt1 ni en mesenteri ni en fetge de rates tractades amb AdVASH respecte AdLacZ. També és important destacar, que el tractament amb AdVASH1 no va tenir efectes importants a nivell sistèmic, com evidencia la falta de canvis en la pressió arterial mitjana i de freqüència cardíaca, en la funció renal (a partir de la mesura dels nivells de creatinina i de nitrogen urea en sang) ni en el pes de la melsa.

A partir dels estudis realitzats s'ha demostrat que l'augment exogen de l'expressió de VASH1 resulta en múltiples efectes beneficiosos en el model hipertensió portal experimental usat sense efectes adversos aparents.

Tenint sempre presents les limitacions a l'hora de traslladar les dades obtingudes en models animals als humans, els resultats obtinguts en aquest estudi reforçarien la idea de considerar la suplementació de VASH1 com una nova i atractiva estratègia terapèutica per frenar la progressió de malalties cròniques del fetge com la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica. Per tant, es proposa VASH1 com un "factor dual" per inhibir l'angiogènesi i la fibrogènesi simultàniament amb dosis relativament baixes de VASH1 (213).

6.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènic i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)

6.2.1 Patró d'expressió de PEDF en fetges cirròtics humans i en fetge i mesenteri de rates BDL

De la mateixa manera que s'havia realitzat en l'estudi de l'antiangiogènic VASH1, es va portar a terme una caracterització completa del perfil d'expressió de PEDF, i la seva relació amb VEGF, durant el procés de neovascularització i fibrogènesi en la hipertensió portal i la cirrosi. Aquest estudi es va realitzar a través de l'anàlisi de fetges de pacients amb cirrosi pel virus de l'hepatitis C, així com el perfil d'expressió espaciotemporal, en diferents punts de la progressió de

la malaltia, en fetge i mesenteri de rates on se'ls havia induït hipertensió portal i cirrosi mitjançant lligadura del colèdoc i en fetge de rates fibròtiques i cirròtiques induït per inhalació de CCl₄.

Per tal de definir la rellevància de PEDF en cirrosi, es va analitzar l'expressió d'aquest factor en mostres humanes de fetges d'individus sans i pacients cirròtics per virus de l'hepatitis C, on es va observar una sobreexpressió de PEDF en fetges cirròtics respecte els fetges d'individus sans. En aquest cas també s'observava aquest augment de manera més marcada en els hepatòcits dels micronòduls de regeneració i en la neovasculatura dins el septes fibrosos, colocalitzant amb les zones de més expressió de VEGF.

Els resultats obtinguts de l'anàlisi en el fetge de rates cirròtiques amb hipertensió portal mostraven, per *Western blot* i immunohistoquímica, que l'expressió de PEDF augmenta temporalment després de la inducció de la malaltia, tan en el model de BDL com en d'inducció per CCl₄, seguint un patró d'expressió tan espacial com temporal similar a VEGF. L'anàlisi de la localització mitjançant immunohistoquímica demostrava que aquesta expressió era més important en els micronòduls de les àrees amb fibrogènesi, com passava en els fetges cirròtics humans, tot i la manca d'augment del mRNA. L'aparent contradicció entre els nostres resultats i aquells obtinguts per Ho *et al* (214) en quan a l'expressió de PEDF durant la cirrosi pot ser deguda a diferents factors, incloent diferents models (models experimentals ratolí *versus* rata; etiologia de la malaltia del fetge en pacients cirròtics), i diferents temps d'anàlisi on es van determinar els nivells de PEDF (primerenques *versus* més avançats).

En el cas del mesenteri, els resultats obtinguts tan per immunohistoquímica com per *Western blot* d'aquest anàlisi mostraven que la inducció de la cirrosi conduïa a una sobreexpressió de PEDF, tot i la manca de canvis a nivell de mRNA. Aquesta sobreexpressió de PEDF era similar tant en temps com en localització al patró d'expressió de VEGF, suggerint un intent de PEDF de contrarestar els efectes angiogènics de VEGF com s'ha observat també en altres malalties (190, 191, 215)

6.2.2 Sobreexpressió de PEDF usant transferència gènica adenoviral

Tot i l'augment endogen observat de PEDF, tant en fetge com en mesenteri, durant la progressió de la malaltia després de la inducció del model, aquest no era capaç de contrarestar l'efecte angiogènic de VEGF. Per aquest motiu, a continuació es va voler determinar si una sobreexpressió de PEDF de manera exògena mitjançant un vector adenoviral que expressés la proteïna, seria capaç de frenar la neovascularització patològica que es dona durant el desenvolupament de la cirrosi i la hipertensió portal en el model de BDL seguint dues

estratègies. Una estratègia de prevenció (en les etapes inicials de la malaltia), i una estratègia d'intervenció (en etapes més avançades de la malaltia).

Abans d'examinar els efectes de PEDF *in vivo* es va determinar mitjançant estudis *in vitro* en cèl·lules HUVEC l'eficiència d'infecció i posterior expressió de l'AdPEDF així com la seva capacitat antiangiogènica. Aquest anàlisi va demostrar una sobreexpressió clara del mRNA i de la proteïna de PEDF en les HUVEC infectades amb l'AdPEDF respecte aquelles infectades amb el control AdLacZ, així com el seu efecte antiangiogènic traduït en una reducció del 35% dels punts de ramificació en la formació de xarxes tubulars en Matrigel.

Aquesta correcta infecció i sobreexpressió de l'AdPEDF també es va observar *in vivo* mitjançant les tècniques de *Western blot* i immunohistoquímica en ambdós òrgans d'estudi, fetge i mesenteri, 7 dies després de la injecció de l'adenovirus en les rates SHAM i BDL en ambdós protocols (prevenció i intervenció).

6.2.3 Efectes en l'angiogènesi, la fibrogènesi i l'hemodinàmica per la sobreexpressió de PEDF mitjançant transferència gènica adenoviral en rates BDL

A més a més de confirmar amb un model experimental diferent l'efecte antifibròtic de PEDF reportat anteriorment per Ho *et al* (214) en les fases primerenques de la malaltia, els resultats presentats en aquest segon estudi també confirmaven un efecte antiangiogènic de l'expressió de PEDF exògena en fases primerenques en malalties cròniques del fetge. Aquests efectes antiangiogènics i antifibrogènics de l'AdPEDF, no obstant, eren modestos quan l'adenovirus s'administrava en etapes més avançades de la malaltia (protocol d'intervenció).

Pel que fa als efectes antiangiogènics de PEDF, en el cas del mesenteri, es va donar una potent reducció significativa de la neovascularització mesentèrica d'un 31% en el protocol de prevenció, correlacionada amb una reducció també de l'expressió de VEGF. Aquest efecte no es va donar però durant el protocol d'intervenció. Així doncs el fet que el tractament amb AdPEDF fos efectiu inhibint la neovascularització induïda mitjançant BDL durant l'angiogènesi inicial corresponent a la màxima activitat angiogènica (protocol de prevenció), però no quan el procés de neovascularització disminueix (durant el protocol d'intervenció), suggereix que l'AdPEDF actua selectivament sobre els vasos que estan participant activament en la neovascularització patològica, sense afectar els vasos preexistents i madurs, com s'observava també usant l'AdVASH1. Recolzant aquesta idea, l'AdPEDF no presentava efecte angiointhibitori en absència d'angiogènesi patològica, com s'observa en els mesenteris de les rates amb operacions fictícies (SHAM). A més a més, en cap de les rates tractades amb AdPEDF, es va

observar cap problema de cicatrització després de la cirurgia abdominal tan per BDL com per operacions fictícies, remarcant que l'AdPEDF no interfereix amb l'angiogènesi fisiològica. D'aquesta manera podem dir que el baix efecte antiangiogènic en el mesenteri de rates injectades amb AdPEDF en el protocol d'intervenció no es contradiu amb l'alt efecte observat en el protocol de prevenció, i que de fet reflecteix que PEDF no ha d'actuar necessàriament sempre com un agent antiangiogènic en tots els vasos, sinó que actua específicament sobre la vasculatura involucrada en processos d'angiogènesi patològica. És interessant destacar, que durant la primera setmana després de la lligadura del colèdoc, els nivells de VEGF eren alts en el mesenteri, creant un ambient més estimulador del creixement neovascular, i implicant també un escenari més susceptible a ser manipulat per estratègies antiangiogèniques com la sobreexpressió de PEDF. Consistent amb aquest fet, el tractament durant les fases inicials de la hipertensió portal (protocol de prevenció), on hem demostrat que es promou un augment de l'expressió de PEDF exogen acompanyat d'una disminució concomitant de l'expressió de VEGF, causa una frenada de la senyalització de l'angiogènesi patològica, sense afectar l'homeòstasi dels vasos normals. Per tant, és probable que l'habilitat de l'AdPEDF de reduir la neovascularització patològica mesentèrica en la hipertensió portal es pugui donar, com a mínim en part, contraactuant sobre les activitats angiogèniques de VEGF, de la mateixa manera que s'ha observat en altres estudis (159, 211).

En el cas del fetge, l'efecte antiangiogènic era menor que en el mesenteri en ambdós protocols donant unes reduccions en la neovascularització intrahepàtica no significatives, correlacionat amb una manca de reducció del factor proangiogènic VEGF. En canvi, si que es van observar efectes antifibròtics importants. Aquests resultats doncs exemplifiquen la complexitat de PEDF a causa de les múltiples funcions que pot dur a terme depenent del context en el que es trobi (91, 97, 98). Els nostres resultats il·lustren que, en fetges de rates BDL, l'AdPEDF funciona més com un factor antifibròtic que no pas com un agent antiangiogènic. Aquest efecte antifibròtic es pot observar amb una baixada significativa del 35% del dipòsit de les fibres de col·lagen en el fetge fibròtic tractat amb l'AdPEDF en comparació amb les rates control durant el protocol de prevenció. Aquesta reducció de la fibra podria ser mitjançada per una sobreexpressió de les metal·loproteinases degradadores de fibra MMP2 i MMP-13, com s'havia observat en estudis anteriors, com és el cas de l'activitat antifibròtica de PEDF en la nefropatia diabètica, la qual està associada a la sobreexpressió de MMPs (167). Aquest efecte antifibròtic de PEDF però es donava de manera independent a la supressió de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades, ja que no es detectava una disminució del marcador d'activació α SMA. Per tant, semblava ser que tot i l'augment de col·lagen tan a nivell de mRNA i proteïna a causa

de l'activació de les HSC, la disminució del dipòsit de col·lagen estaria relacionat amb una disminució de l'acumulació de col·lagen neta a causa de la degradació per part de la MMP-2, ja que tot i que s'observava un augment de la MMP13 a nivell de mRNA amb l'AdPEDF, aquest augment no anava en paral·lel amb un augment a nivell de proteïna. En el cas del protocol d'intervenció l'AdPEDF va ser incapaç de reduir de manera significativa la fibrosi hepàtica, canviar l'estat de les HSC, la producció de col·lagen, i en aquest cas tampoc en la degradació de col·lagen. D'aquesta manera l'activitat antifibròtica de PEDF representa una característica més per recolzar el seu ús en malalties cròniques del fetge.

Es va voler estudiar si els efectes de PEDF en la neovascularització tan en fetge com en mesenterí eren donats per canvis en l'expressió del receptor de laminina, ja que s'ha definit com un dels principals receptors de PEDF relacionat amb els seus efectes antiangiogènics. No obstant, no es van observar diferències en la seva expressió ni en els diferents estadis de la malaltia (prevenció o intervenció) ni després del tractament amb AdPEDF, suggerint que el lleu efecte antiangiogènic en fetge no es pot atribuir a una deficiència o disminució de l'expressió del receptor de laminina.

Per tant, si s'analitzen en conjunt els resultats obtinguts es pot dir que aquest segon estudi demostra que la transferència gènica *in vivo* de l'inhibidor antiangiogènic PEDF mitjançant vectors adenovirals (AdPEDF) resulta en múltiples efectes beneficiosos en rates BDL, tot i que de manera específica segons l'etapa en que s'administra l'AdPEDF. És a dir, l'administració sistèmica de l'AdPEDF en rates BDL durant estadis inicials de la malaltia (protocol de prevenció) era efectiva en la supressió de l'angiogènesi patològica en el mesenterí (en un 31%) i en la fibrogènesi intrahepàtica (en un 35%) donant una reducció significativa de la pressió portal (12%), però que en canvi, aquestes activitats antiangiogèniques i antifibròtiques de la sobreexpressió exògena de PEDF eren menors quan els adenovirus s'administraven en fases més avançades de la malaltia (protocol d'intervenció). No obstant, no s'ha de menystenir la rellevància clínica i el potencial terapèutic d'aquesta estratègia, ja que una reducció en l'angiogènesi, fibrogènesi i pressió portal en el context d'estadis inicials de la malaltia poden tenir implicacions importants prevenint la progressió de la malaltia, i consegüentment reduint el risc de desenvolupar una cirrosi hepàtica completa.

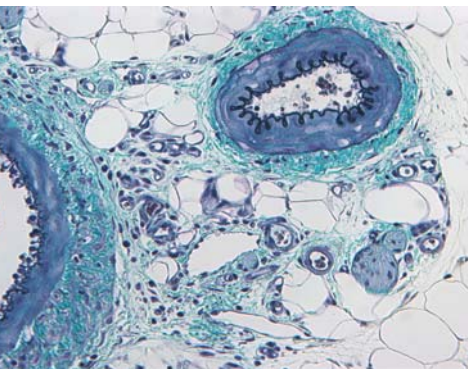
Un altre resultat a destacar d'aquest segon estudi és que les proteïnes de PEDF i VEGF segueixen un patró d'expressió en paral·lel durant la progressió de la hipertensió portal en el mesenterí i el fetge de les rates BDL i CCl₄, de manera estretament vinculada en el temps i l'espai amb la neovascularització en el mesenterí i la fibrogènesi en el fetge. Des d'un punt de vista aplicatiu, és rellevant observar que, en paral·lel a l'increment de l'expressió de PEDF, el

VEGF també estava augmentat en fetges cirròtics humans. Aquests resultats indiquen la possibilitat que el PEDF endogen podria veure's incrementat en resposta a l'augment de VEGF associat a la hipertensió portal presumiblement com un efecte compensatori inhibitori, servint com una barrera natural per limitar els efectes adversos de VEGF. Els nostres resultats són consistents amb altres estudis publicats anteriorment on mostren que ambdós, l'inductor de l'angiogènesi VEGF i el regulador negatiu de l'angiogènesi PEDF, es trobaven unidireccionalment augmentats i que correlacionaven de manera significativa amb el procés angiogènic en diferents condicions patològiques (187, 190, 215, 216). D'acord amb el nostre estudi, PEDF també es troba elevat en altres situacions patològiques, com retinopatia diabètica (190, 215), síndrome metabòlic (217), esclerosi lateral amiotròfica (218), i en diferents tipus de càncer (200, 219), incloent el carcinoma hepatocel·lular (220), el qual és un típic tumor hipervascularitzat. La sobreexpressió de PEDF en aquests contextos de malaltia s'ha proposat com un mecanisme compensatori per evitar l'excessiva angiogènesi patològica.

En conclusió, l'expressió de la proteïna antiangiogènica PEDF es veu incrementada en el fetge cirròtic, tan en el model murí d'hipertensió portal i cirrosi (rates BDL i tractades amb CCl₄), com en pacients amb cirrosi derivada d'hepatitis per virus C. A més a més, l'expressió de PEDF augmentava en paral·lel amb l'increment del proangiogènic VEGF, suggerint que l'augment de PEDF podria reflectir un mecanisme compensatori dirigit a reduir l'angiogènesi patològica mitjançada per VEGF. Aquest fet està reforçat pel resultat obtingut en rates BDL, en les fases més primerenques de la progressió de la malaltia crònica del fetge, on l'administració sistèmica de PEDF mitjançant vectors adenovirals (AdPEDF) exerceix un efecte antiangiogènic segur i selectiu en els neovasos mesentèrics, i que de manera concomitant actua com a factor antifibròtic en el fetge donant una reducció significativa de la pressió portal. A causa d'aquestes característiques, PEDF sembla ser un nou agent terapèutic prometedori per ser testat en malalties cròniques del fetge en humans.

En conjunt, els resultats dels nostres estudis suggereixen que l'ús de proteïnes antiangiogèniques endògenes com VASH1 i PEDF, presents de forma natural a l'organisme (97, 207), poden conduir a tractaments més segurs contra l'angiogènesi patològica que els actuals antagonistes farmacològics, sense sacrificar l'eficiència. Caldria destacar en aquest sentit, que intents anteriors on es pretenia actuar sobre l'angiogènesi en la cirrosi utilitzant inhibidors multiquinases, com ara el sorafenib o l'imatinib, donaven resultats positius en rates (21, 55), però en canvi tenien poc potencial translacional ja que presentaven múltiples efectes adversos a causa de la seva actuació sobre l'angiogènesi fisiològica (88, 212). De fet, s'ha publicat anteriorment que el sorafenib a dosis de 60 mg/kg indueixen signes bioquímics i histològics de

dany en el fetge, especialment en rates cirròtiques (156). Els nostres estudis, per tant, proporcionen una evidència *in vivo* que suggereix que la suplementació exògena d'antiangiogènics com VASH1 o PEDF poden ser una modalitat terapèutica plausible i prometedora pel tractament i prevenció de la hipertensió portal i malalties cròniques del fetge. Cal destacar, que la seva aplicabilitat en humans es confirmarà aviat ja que ja està en marxa un primer protocol clínic mitjançant transferència viral de PEDF en pacients amb neovascularització coroïdal (156) i que un assaig en fase I ha estat recentment completat en pacients amb degeneració macular (Assaig clínic: NCT00109499).



Conclusions

7. Conclusions

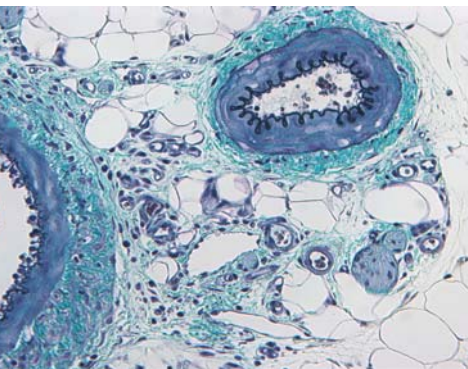
7.1 Estudi 1: La disrupció de la regulació per retroalimentació negativa entre VASH1 i VEGF disminueix la pressió portal, l'angiogènesi i fibrosi en rates cirròtiques

- VEGF se sobreexpressa en el fetge de pacients amb cirrosi per virus de l'hepatitis C, així com en el fetge i el llit vascular mesentèric de models animals d'hipertensió portal i cirrosi, i aquesta sobreexpressió, amb la consegüent augment de la angiogènesi patològica, resulta en la inducció de la sobreexpressió de VASH1.
- VASH1 i VEGF formen un sistema per retroalimentació negativa on la sobreexpressió d'un induïx a la expressió de l'altra fent que aquest últim inhibeixi l'expressió del primer.
- La transferència gènica *in vitro* de cèl·lules endotelials HUVEC mitjançant vectors adenovirals de VASH1 és capaç de disminuir la formació d'estructures vasculares en Matrigel .
- La transferència gènica de VASH1 *in vivo* mitjançant vectors adenovirals que sobreexpressen de manera exògena VASH1 permet suprimir de manera efectiva l'angiogènesi patològica que es dona en el mesenteri i fetge de rates BDL així com la fibrogènesi intrahepàtica durant el protocol de prevenció, donant una disminució significativa de la pressió portal així com del flux sanguini esplàncnic, indicant VASH1 com a bona estratègia preventiva de l'empitjorament de la hipertensió portal i cirrosi.
- De la mateixa manera, la suplementació de VASH1 exogen és capaç de disminuir la pressió portal, resistència portohepàtica així com la formació de vasos col·laterals portosistèmic un cop iniciada la hipertensió portal i cirrosi (protocol d'intervenció), indicant VASH1 també com a bona diana terapèutica.
- Les propietats antiangiogèniques de la suplementació de VASH1 exogen són específiques dels vasos actius involucrats amb l'angiogènesi patològica, sense actuar sobre la vasculatura normal.

7.2 Estudi 2: Efecte antiangiogènec i antifibròtic del factor derivat d'epiteli pigmentari (PEDF) en rates amb hipertensió portal i cirrosi per lligadura del colèdoc (BDL)

- PEDF està sobreexpressat en el fetge de pacients amb cirrosi per virus de l'hepatitis C, així com en el fetge i en el llit vascular mesentèric de models animals d'hipertensió portal i cirrosi.
- PEDF i VEGF se sobreexpressen de manera unidireccional i correlacionant amb la neovascularització mesentèrica i la fibrogènesi hepàtica durant la cirrosi, suggerint que la inducció de PEDF pot reflectir un mecanisme compensatori dirigit a reduir els efectes patològics de VEGF.
- La transferència gènica *in vitro* de cèl·lules endotelials HUVEC mitjançant vectors adenovirals de PEDF disminueix la formació d'estructures vasculares en Matrigel .
- La transferència gènica *in vivo* mitjançant vectors adenovirals de PEDF suprimeix de manera efectiva l'angiogènesi patològica que es dona en el mesenteri i fibrogènesi intrahepàtica de rates BDL, donant una disminució significativa de la pressió portal, durant el protocol de prevenció, tot i que amb menys efectes durant el protocol d'intervenció.
- Les propietats antiangiogèniques de la suplementació de PEDF exogen són específiques dels vasos actius involucrats amb l'angiogènesi patològica, sense actuar sobre la vasculatura normal.

Des d'un punt de vista terapèutic, els nostres resultats indiquen que la suplementació exògena de PEDF o VASH1 pot ser una modalitat plausible i prometedora per prevenir la progressió de la hipertensió portal i cirrosi, i conseqüentment reduir el risc de desenvolupar una cirrosi avançada observable en pacients. Cal destacar, que actuar sobre els canvis patològics primerencs podria permetre la possibilitat d'intervenir en les malalties cròniques del fetge en una etapa abans de una fibrosi irreversible. Es tracta d'un fet important, ja que el tractament de pacients amb malalties cròniques del fetge continua sent un punt crític i prevalent en la clínica, amb poques opcions terapèutiques. El present estudi doncs, obra la porta a l'ús d'aquests factors, no només en la hipertensió portal i la cirrosi, sinó en diverses malalties la patogènia de les quals està caracteritzada per una angiogènesi patològica.



Bibliografia

8. Bibliografía

1. Bosch J. Vascular deterioration in cirrhosis: the big picture. *J Clin Gastroenterol* 2007 Nov;41 Suppl 3:S247-53.:S247-S253.
2. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:S68-S92.
3. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):141-156.
4. Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2004 May;20(3):254-263.
5. Garcia-Pagan JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol* 2012 Aug;57(2):458-461.
6. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008 Mar 8;371(9615):838-851.
7. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004 Apr;36(4):231-242.
8. Hytiroglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. *Am J Clin Pathol* 2012 Jan;137(1):5-9.
9. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004 Apr;126(4):955-963.
10. Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008 May;134(6):1715-1728.
11. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):522-531.
12. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002 Feb;35(2):478-491.
13. Villanueva C, Balanzo J. Variceal bleeding : pharmacological treatment and prophylactic strategies. *Drugs* 2008;68(16):2303-2324.
14. Escorsell A, Bosch J. Pathogenesis of bleeding in portal hypertension. *Digestion* 1998 Jul;59 Suppl 2:2-5.:2-5.
15. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992 Mar;21(1):1-14.
16. Colle I, Geerts AM, Van SC, Van VH. Hemodynamic changes in splanchnic blood vessels in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 2008 Jun;291(6):699-713.

17. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004 Mar;126(3):886-894.
18. Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology* 2005 Jul;43(1):98-103.
19. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007 Oct;46(4):1208-1217.
20. Van SC, Geerts A, Vanheule E, Van VH, De VF, Olievier K, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009 Dec;137(6):2112-2124.
21. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009 Apr;49(4):1245-1256.
22. Reiberger T, Angermayr B, Schwabl P, Rohr-Udilova N, Mitterhauser M, Gangl A, et al. Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol* 2009 Nov;51(5):865-873.
23. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011 May;473(7347):298-307.
24. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011 Sep 16;146(6):873-887.
25. Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2012 Apr;24(2):188-193.
26. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992 Jun 5;267(16):10931-10934.
27. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):653-660.
28. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010 Nov;53(5):976-980.
29. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005 Dec 15;438(7070):932-936.
30. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992 Oct 29;359(6398):843-845.

31. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 1994 Feb 11;269(6):4355-4359.
32. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996 Jan 12;271(2):736-741.
33. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997 May;11(6):457-465.
34. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med (Berl)* 2013 Mar;91(3):323-328.
35. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, et al. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002 Feb 1;277(5):3101-3108.
36. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004 Sep;264(1-2):85-97.
37. Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. *Microcirculation* 2014 Jan 28;10.
38. Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R, et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. *Nitric Oxide* 2010 May 15;22(4):304-315.
39. Siemann DW, Horsman MR. Vascular targeted therapies in oncology. *Cell Tissue Res* 2009 Jan;335(1):241-248.
40. Claesson-Welsh L. Blood vessels as targets in tumor therapy. *Ups J Med Sci* 2012 May;117(2):178-186.
41. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005 Feb;15(1):102-111.
42. Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van VH, Mortier S, Cheung KJ, et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006 Sep;26(7):889-898.
43. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):669-676.
44. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007 May;38(3):258-268.
45. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011 Jul 15;437(2):169-183.

46. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999 Jan;13(1):9-22.
47. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006 May 22;580(12):2879-2887.
48. Carmeliet P, De SF, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 2009 Jun;6(6):315-326.
49. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007 Aug 24;130(4):691-703.
50. De FS. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med* 2012 Jan 31;44(1):1-9.
51. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008 Dec;8(12):942-956.
52. Vanheule E, Geerts AM, Van HJ, Schelfhout D, Praet M, Van VH, et al. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2008 Dec;89(6):419-432.
53. Sumanovski LT, Battegay E, Stumm M, van der KM, Sieber CC. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 1999 Apr;29(4):1044-1049.
54. Sieber CC, Sumanovski LT, Stumm M, van der KM, Battegay E. In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J Hepatol* 2001 May;34(5):644-650.
55. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009 Mar;50(3):604-620.
56. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010 Sep;53(3):558-567.
57. Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-Del-Arbol L, et al. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999 Apr;29(4):1057-1063.
58. Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, et al. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 1999 Oct;155(4):1065-1073.
59. Van SC, Ribera J, Geerts A, Pauta M, Tugues S, Casteleyn C, et al. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* 2011 May;53(5):1629-1640.

60. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002 May;35(5):1010-1021.
61. Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodes J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007 Dec;46(6):1919-1926.
62. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998 Jun;27(6):1554-1562.
63. Abdelmoaty MA, Bogdady AM, Attia MM, Zaky NA. Circulating vascular endothelial growth factor and nitric oxide in patients with liver cirrhosis: A possible association with liver function impairment. *Indian J Clin Biochem* 2009 Oct;24(4):398-403.
64. Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004 May;39(5):1185-1195.
65. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Jan 27;254(3):587-593.
66. Angermayr B, Fernandez M, Mejias M, Gracia-Sancho J, Garcia-Pagan JC, Bosch J. NAD(P)H oxidase modulates angiogenesis and the development of portosystemic collaterals and splanchnic hyperaemia in portal hypertensive rats. *Gut* 2007 Apr;56(4):560-564.
67. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003 Sep;52(9):1347-1354.
68. Abralde JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq O, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G980-G987.
69. Angermayr B, Mejias M, Gracia-Sancho J, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Fernandez M. Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology* 2006 Jun;44(6):1033-1039.
70. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 27;98(5):2604-2609.
71. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997 Jun 1;99(11):2625-2634.

72. Geerts AM, Vanheule E, Van VH, Leybaert L, Van SC, De VM, et al. Rapamycin prevents mesenteric neo-angiogenesis and reduces splanchnic blood flow in portal hypertensive mice. *Hepatology* 2008;38(11):1130-1139.
73. Kalluri R, Sukhatme VP. Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000 Jul;9(4):413-418.
74. Hoofring A, Boitnott J, Torbenson M. Three-dimensional reconstruction of hepatic bridging fibrosis in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2003 Nov;39(5):738-741.
75. Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol* 2000 Oct;33(4):555-563.
76. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van SC, Colle I, Van VH. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011 Feb;31(2):146-162.
77. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001 Aug;21(3):397-416.
78. Novo E, Cannito S, Zamara E, Valfre di BL, Caligiuri A, Cravanzola C, et al. Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2007 Jun;170(6):1942-1953.
79. nkoma-Sey V, Matti M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, et al. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998 Jul 9;17(1):115-121.
80. Thabut D, Routray C, Lomberk G, Shergill U, Glaser K, Huebert R, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 2011 Aug;54(2):573-585.
81. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003 May;83(5):655-663.
82. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 2010 Jul;90(3):1165-1194.
83. Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, et al. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000 Nov;32(5):980-989.
84. Zhu J, Wu J, Frizell E, Liu SL, Bashey R, Rubin R, et al. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999 Nov;117(5):1198-1204.
85. Biecker E, De GA, Neef M, Unternahrer M, Schneider V, Ledermann M, et al. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Jun;313(3):952-961.

86. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009 Apr;49(4):1066-1068.
87. Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer* 2010 Jan;1(1):12-25.
88. Llovet JM, Bruix J. Testing molecular therapies in hepatocellular carcinoma: the need for randomized phase II trials. *J Clin Oncol* 2009 Feb;27(6):833-835.
89. Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008 Jun;26(18):2992-2998.
90. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004 Oct;114(7):898-907.
91. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Therapeutic prospects for PEDF: more than a promising angiogenesis inhibitor. *Trends Mol Med* 2003 Jun;9(6):244-250.
92. Sato Y. Delta-like 4 and vasohibin 1: two endothelium-produced negative regulators of angiogenesis with distinctive roles. *Eur Cytokine Netw* 2009 Dec;20(4):220-224.
93. Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res* 2009 May;33(5):638-644.
94. Sato Y. Update on endogenous inhibitors of angiogenesis. *Endothelium* 2006 Mar;13(2):147-155.
95. Albini A, Indraccolo S, Noonan DM, Pfeffer U. Functional genomics of endothelial cells treated with anti-angiogenic or angiopreventive drugs. *Clin Exp Metastasis* 2010 Aug;27(6):419-439.
96. Vogten JM, Drixler TA, te Velde EA, Schipper ME, van Vroonhoven TJ, Voest EE, et al. Angiostatin inhibits experimental liver fibrosis in mice. *Int J Colorectal Dis* 2004 Jul;19(4):387-394.
97. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999 Jul 9;285(5425):245-248.
98. Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci* 2005 Sep 1;10:2131-49.2131-2149.
99. Ren JG, Jie C, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* 2005;64(1):74-78.
100. Jan R, Huang M, Lewis-Wambi J. Loss of pigment epithelium-derived factor: a novel mechanism for the development of endocrine resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012 Nov 14;14(6):R146.

101. Miyashita H, Watanabe T, Hayashi H, Suzuki Y, Nakamura T, Ito S, et al. Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. *PLoS One* 2012;7(10):e46459.
102. Ueda S, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, Imaizumi T. Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 2011 Feb;178(2):591-598.
103. Matsui T, Higashimoto Y, Taira J, Yamagishi S. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to caveolin-1 and inhibits the pro-inflammatory effects of caveolin-1 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Nov 15;441(2):405-410.
104. Yamazaki H, Oda M, Takahashi Y, Iguchi H, Yoshimura K, Okada N, et al. Relation between ultrastructural localization, changes in caveolin-1, and capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in human hepatitis C-related cirrhotic liver. *J Histochem Cytochem* 2013 Feb;61(2):169-176.
105. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Takeuchi M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) ameliorates advanced glycation end product (AGE)-induced hepatic insulin resistance in vitro by suppressing Rac-1 activation. *Horm Metab Res* 2008 Sep;40(9):620-625.
106. Kerbel RS. Vasohibin: the feedback on a new inhibitor of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004 Oct;114(7):884-886.
107. Shimizu K, Watanabe K, Yamashita H, Abe M, Yoshimatsu H, Ohta H, et al. Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Feb 18;327(3):700-706.
108. Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H, Shimizu K, Miyashita H, Abe M, et al. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 May;26(5):1051-1057.
109. Kern J, Bauer M, Rychli K, Wojta J, Ritsch A, Gastl G, et al. Alternative splicing of vasohibin-1 generates an inhibitor of endothelial cell proliferation, migration, and capillary tube formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Mar;28(3):478-484.
110. Sonoda H, Ohta H, Watanabe K, Yamashita H, Kimura H, Sato Y. Multiple processing forms and their biological activities of a novel angiogenesis inhibitor vasohibin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Apr 7;342(2):640-646.
111. Sato Y. The vasohibin family: Novel regulators of angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2012 May;56(5-6):262-266.
112. Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y, Kobayashi M, Watanabe K, Sonoda H, et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 2009 May 7;113(19):4810-4818.
113. Naito H, Kidoya H, Sato Y, Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J Biochem* 2009 May;145(5):653-659.

114. Kishlyansky M, Vojnovic J, Roudier E, Gineste C, Decary S, Forn P, et al. Striated muscle angio-adaptation requires changes in Vasohibin-1 expression pattern. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Aug 27;399(3):359-364.
115. Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, Ware JA. Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1997 Mar 14;272(11):7390-7397.
116. Takahashi T, Shibuya M. The overexpression of PKCdelta is involved in vascular endothelial growth factor-resistant apoptosis in cultured primary sinusoidal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Jan 12;280(1):415-420.
117. Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, Ohta H, Sonoda H, Sato Y. Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. *J Cell Sci* 2010 Sep 15;123(Pt 18):3094-3101.
118. Kozako T, Matsumoto N, Kuramoto Y, Sakata A, Motonagare R, Aikawa A, et al. Vasohibin induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 2012 Apr 5;586(7):1067-1072.
119. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, et al. Expression of vasohibin as a novel endothelium-derived angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Sci* 2008 May;99(5):914-919.
120. Tamaki K, Moriya T, Sato Y, Ishida T, Maruo Y, Yoshinaga K, et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis. *Cancer Sci* 2009 Jan;100(1):88-94.
121. Hosaka T, Kimura H, Heishi T, Suzuki Y, Miyashita H, Ohta H, et al. Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol* 2009 Jul;175(1):430-439.
122. Li D, Zhou K, Wang S, Shi Z, Yang Z. Recombinant adenovirus encoding vasohibin prevents tumor angiogenesis and inhibits tumor growth. *Cancer Sci* 2010 Feb;101(2):448-452.
123. Yamashita H, Abe M, Watanabe K, Shimizu K, Moriya T, Sato A, et al. Vasohibin prevents arterial neointimal formation through angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Jul 7;345(3):919-925.
124. Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta H, et al. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2009 Feb;52(2):359-361.
125. Shen J, Yang X, Xiao WH, Hackett SF, Sato Y, Campochiaro PA. Vasohibin is up-regulated by VEGF in the retina and suppresses VEGF receptor 2 and retinal neovascularization. *FASEB J* 2006 Apr;20(6):723-725.

126. Tamaki K, Sasano H, Maruo Y, Takahashi Y, Miyashita M, Moriya T, et al. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Sci* 2010 Apr;101(4):1051-1058.
127. Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, et al. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. *Cancer Sci* 2011 Feb;102(2):446-451.
128. Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012 Aug 1;18(15):4145-4153.
129. Wang Q, Tian X, Zhang C, Wang Q. Upregulation of vasohibin-1 expression with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative surgery. *Med Oncol* 2012 Dec;29(4):2727-2736.
130. Zhao G, Yang Y, Tang Y, Han R, Sun Y. Reduced expression of vasohibin-1 is associated with clinicopathological features in renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2012 Dec;29(5):3325-3334.
131. Kern J, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Untergasser G. Vasohibin inhibits angiogenic sprouting in vitro and supports vascular maturation processes in vivo. *BMC Cancer* 2009 Aug 17;9:284. doi: 10.1186/1471-2407-9-284.:284-289.
132. Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, Miyashita H, Oike Y, Takahashi T, et al. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. *Am J Pathol* 2010 Apr;176(4):1950-1958.
133. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000 Mar 1;60(5):1388-1393.
134. Zhou SY, Xie ZL, Xiao O, Yang XR, Heng BC, Sato Y. Inhibition of mouse alkali burn induced-corneal neovascularization by recombinant adenovirus encoding human vasohibin-1. *Mol Vis* 2010 Jul 26;16:1389-98.:1389-1398.
135. Wang X, Zhu H, Yang X, Bi Y, Cui S. Vasohibin attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis in mice. *Pathology* 2010;42(5):457-462.
136. Nasu T, Maeshima Y, Kinomura M, Hirokoshi-Kawahara K, Tanabe K, Sugiyama H, et al. Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009 Oct;58(10):2365-2375.
137. Saito D, Maeshima Y, Nasu T, Yamasaki H, Tanabe K, Sugiyama H, et al. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011 Apr;300(4):F873-F886.
138. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 1991 Sep;53(3):411-414.

139. Tombran-Tink J, Li A, Johnson MA, Johnson LV, Chader GJ. Neurotrophic activity of interphotoreceptor matrix on human Y79 retinoblastoma cells. *J Comp Neurol* 1992 Mar 8;317(2):175-186.
140. Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra SP, Chader GJ, Diloreto DA, Jr., del CC, et al. Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors* 1994;10(4):289-297.
141. Sawant S, Aparicio S, Tink AR, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Dec 10;325(2):408-413.
142. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* 1996 Nov 4;2:11.:11.
143. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 2003 Aug 15;374(Pt 1):199-206.
144. Pollina EA, Legesse-Miller A, Haley EM, Goodpaster T, Randolph-Habecker J, Collier HA. Regulating the angiogenic balance in tissues. *Cell Cycle* 2008 Jul 1;7(13):2056-2070.
145. Tombran-Tink J, Aparicio S, Xu X, Tink AR, Lara N, Sawant S, et al. PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J Struct Biol* 2005 Aug;151(2):130-150.
146. Filleur S, Nelius T, de RW, Kennedy RC. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* 2009 Apr 1;106(5):769-775.
147. Shao H, Schwartz I, Shaltiel S. Secretion of pigment epithelium-derived factor. Mutagenic study. *Eur J Biochem* 2003 Mar;270(5):822-831.
148. Pignolo RJ, Francis MK, Rotenberg MO, Cristofalo VJ. Putative role for EPC-1/PEDF in the G0 growth arrest of human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* 2003 Apr;195(1):12-20.
149. Hosomichi J, Yasui N, Koide T, Soma K, Morita I. Involvement of the collagen I-binding motif in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Sep 30;335(3):756-761.
150. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 2002 Nov 22;277(47):45400-45407.
151. Sekiya A, Okano-Kosugi H, Yamazaki CM, Koide T. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) shares binding sites in collagen with heparin/heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2011 Jul 29;286(30):26364-26374.

152. Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4992-5003.
153. Valnickova Z, Petersen SV, Nielsen SB, Otzen DE, Enghild JJ. Heparin binding induces a conformational change in pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2007 Mar 2;282(9):6661-6667.
154. Alberdi EM, Weldon JE, Becerra SP. Glycosaminoglycans in human retinoblastoma cells: heparan sulfate, a modulator of the pigment epithelium-derived factor-receptor interactions. *BMC Biochem* 2003 Feb;4:1. Epub;2003 Feb;4:1.
155. Ek ET, Dass CR, Choong PF. PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* 2006 Oct;12(10):497-502.
156. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006 Aug;37(1):1-12.
157. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 27;98(5):2593-2597.
158. Chen L, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. PEDF induces apoptosis in human endothelial cells by activating p38 MAP kinase dependent cleavage of multiple caspases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Oct 6;348(4):1288-1295.
159. Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* 2005 Nov 4;77(25):3231-3241.
160. Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. PEDF Expression Regulates the Pro-angiogenic and Pro-inflammatory Phenotype of the Lung Endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013 Dec 6.
161. Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 2006 Feb 10;281(6):3604-3613.
162. Cai J, Wu L, Qi X, Li CS, Caballero S, Shaw L, et al. PEDF regulates vascular permeability by a gamma-secretase-mediated pathway. *PLoS One* 2011;6(6):e21164.
163. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002 Apr;8(4):349-357.
164. Barreiro R, Schadlu R, Herndon J, Kaplan HJ, Ferguson TA. The role of Fas-FasL in the development and treatment of ischemic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Mar;44(3):1282-1286.

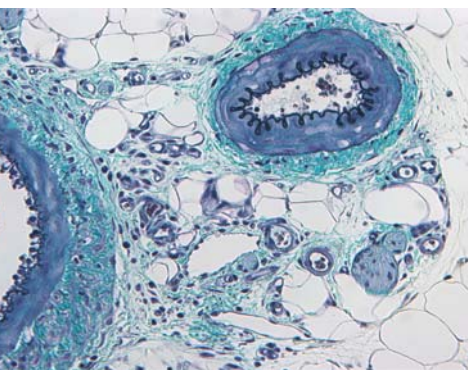
165. Kawaguchi T, Yamagishi S, Itou M, Okuda K, Sumie S, Kuromatsu R, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells. *Am J Pathol* 2010 Jan;176(1):168-176.
166. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):774-780.
167. Wang JJ, Zhang SX, Mott R, Knapp RR, Cao W, Lau K, et al. Salutary effect of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy: evidence for antifibrogenic activities. *Diabetes* 2006 Jun;55(6):1678-1685.
168. Chung C, Shugrue C, Nagar A, Doll JA, Cornwell M, Gattu A, et al. Ethanol exposure depletes hepatic pigment epithelium-derived factor, a novel lipid regulator. *Gastroenterology* 2009 Jan;136(1):331-340.
169. Ho TC, Chen SL, Shih SC, Wu JY, Han WH, Cheng HC, et al. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2010 Oct;177(4):1798-1811.
170. Schmitz JC, Protiva P, Gattu AK, Utsumi T, Iwakiri Y, Neto AG, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates early pancreatic fibrotic responses and suppresses the profibrotic cytokine thrombospondin-1. *Am J Pathol* 2011 Dec;179(6):2990-2999.
171. Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, et al. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Aug 1;170(3):242-251.
172. Cina DP, Xu H, Liu L, Farkas L, Farkas D, Kolb M, et al. Renal tubular angiogenic dysregulation in anti-Thy1.1 glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011 Feb;300(2):F488-F498.
173. Bernard A, Gao-Li J, Franco CA, Bouceba T, Huet A, Li Z. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2009 Apr 17;284(16):10480-10490.
174. Notari L, Baladron V, roca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 2006 Dec 8;281(49):38022-38037.
175. Park K, Lee K, Zhang B, Zhou T, He X, Gao G, et al. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway. *Mol Cell Biol* 2011 Jul;31(14):3038-3051.
176. Dai Z, Zhou T, Li C, Qi W, Mao Y, Lu J, et al. Intracellular pigment epithelium-derived factor contributes to triglyceride degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 2013 Sep;45(9):2076-2086.
177. Yamagishi SI, Matsui T, Kawaguchi T, Sata M. Pathophysiological role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in hepatic disorders. *Curr Med Chem* 2010;17(19):1995-2000.

178. Chung C, Doll JA, Gattu AK, Shugrue C, Cornwell M, Fitchev P, et al. Anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor regulates hepatocyte triglyceride content through adipose triglyceride lipase (ATGL). *J Hepatol* 2008 Mar;48(3):471-478.
179. Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K. Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004 Jul;40(1):252-259.
180. Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C. Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol Ther* 2003 Jul;8(1):72-79.
181. Lai LJ, Ho TC. Pigment epithelial-derived factor inhibits c-FLIP expression and assists ciglitazone-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2011 Apr;31(4):1173-1180.
182. Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001 Dec;189(3):323-333.
183. King GL, Suzuma K. Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N Engl J Med* 2000 Feb 3;342(5):349-351.
184. Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2001 Aug;188(2):253-263.
185. Wang B, Atherton P, Patel R, Manning G, Donnelly R. Antiangiogenic effects and transcriptional regulation of pigment epithelium-derived factor in diabetic retinopathy. *Microvasc Res* 2010 Jul;80(1):31-36.
186. Gao G, Li Y, Zhang D, Gee S, Crosson C, Ma J. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001 Feb 2;489(2-3):270-276.
187. Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006 Feb;17(2):167-176.
188. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M, Ristow M, Francis MK, et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 2001 Dec;50(12):2641-2645.
189. Matsuoka M, Ogata N, Minamino K, Higuchi A, Matsumura M. High levels of pigment epithelium-derived factor in the retina of a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res* 2006 Jan;82(1):172-178.
190. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006 Jan;82(1):99-110.

191. Ogata N, Matsuoka M, Matsuyama K, Shima C, Tajika A, Nishiyama T, et al. Plasma concentration of pigment epithelium-derived factor in patients with diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Mar;92(3):1176-1179.
192. Ek ET, Dass CR, Choong PF. Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1641-1646.
193. Halin S, Wikstrom P, Rudolfsson SH, Stattin P, Doll JA, Crawford SE, et al. Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* 2004 Aug 15;64(16):5664-5671.
194. Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2004 May 15;64(10):3533-3537.
195. Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW, et al. Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* 2003 Apr;56(4):277-282.
196. Cheung LW, Au SC, Cheung AN, Ngan HY, Tombran-Tink J, Auersperg N, et al. Pigment epithelium-derived factor is estrogen sensitive and inhibits the growth of human ovarian cancer and ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology* 2006 Sep;147(9):4179-4191.
197. Guan M, Jiang H, Xu C, Xu R, Chen Z, Lu Y. Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2. *Cancer Biol Ther* 2007 Mar;6(3):419-425.
198. Rychli K, Huber K, Wojta J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* 2009 Nov;13(11):1295-1302.
199. Baba H, Yonemitsu Y, Nakano T, Onimaru M, Miyazaki M, Ikeda Y, et al. Cytoplasmic expression and extracellular deposition of an antiangiogenic factor, pigment epithelium-derived factor, in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Sep;25(9):1938-1944.
200. Yamagishi S, Adachi H, Abe A, Yashiro T, Enomoto M, Furuki K, et al. Elevated serum levels of pigment epithelium-derived factor in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Jun;91(6):2447-2450.
201. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piera C, Whittle BJ, et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995 May;108(5):1487-1495.
202. Abralde JG, Pasarin M, Garcia-Pagan JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006 Nov 7;12(41):6577-6584.
203. Fernandez M, Pizcueta P, Garcia-Pagan JC, Feu F, Cirera I, Bosch J, et al. Effects of ritanserin, a selective and specific 5₂-serotonergic antagonist, on portal pressure and splanchnic hemodynamics in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology* 1993 Aug;18(2):389-393.

204. Groszmann RJ, Vorobioff J, Riley E. Splanchnic hemodynamics in portal-hypertensive rats: measurement with gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1982 Feb;242(2):G156-G160.
205. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981 May;240(5):G371-G375.
206. Tanaka A, Tsuneyama K, Mikami M, Uegaki S, Aiso M, Takikawa H. Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats: VEGF-A expression is up-regulated in hepatocytes adjacent to the portal tracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 Nov;22(11):1993-2000.
207. Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation. *J Biochem* 2013 Jan;153(1):5-11.
208. Pomerening JR, Sontag ED, Ferrell JE, Jr. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol* 2003 Apr;5(4):346-351.
209. Ferrell JE, Jr. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr Opin Cell Biol* 2002 Apr;14(2):140-148.
210. Berzigotti A, Seijo S, Reverter E, Bosch J. Assessing portal hypertension in liver diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013 Feb;7(2):141-155.
211. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008 May;134(6):1655-1669.
212. Pinter M, Sieghart W, Reiberger T, Rohr-Udilova N, Ferlitsch A, Peck-Radosavljevic M. The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma--a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012 Jan;35(1):83-91.
213. Chatterjee S. Reversal of vasohibin driven negative feedback loop of VEGF-angiogenesis axis promises a novel anti-fibrotic therapeutic strategy for liver diseases. *Hepatology* 2014 Feb 7;10.
214. Ho TC, Chen SL, Shih SC, Wu JY, Han WH, Cheng HC, et al. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2010 Oct;177(4):1798-1811.
215. Duh EJ, Yang HS, Haller JA, De JE, Humayun MS, Gehlbach P, et al. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol* 2004 Apr;137(4):668-674.
216. Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani Z, Stark C, Nischalke HD, Kramer B, et al. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2011 Feb;91(2):241-251.
217. Miyagishi D, Ohno-Matsui K, Amagasa T, Morita I. Regulation of the expression of pigment epithelium-derived factor, an anti-angiogenic factor in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2003 Jun 30;196(1):77-85.

-
218. Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita I. Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Apr 11;303(3):962-967.
 219. Kuncl RW, Bilak MM, Bilak SR, Corse AM, Royal W, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2002 Apr;81(1):178-184.
 220. Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* 2001 Dec;114(Pt 24):4421-4428.



Annex

Article editorial sobre l'estudi 1: *Disruption of negative feedback loop between Vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats.*

Reversal of vasohibin driven negative feedback loop of VEGF-angiogenesis axis promises a novel anti-fibrotic therapeutic strategy for liver diseases

Suvro Chatterjee

Hepatology doi:10.1002/hep.27061

IF: 12.003.

Reversal of vasohibin driven negative feedback loop of VEGF-angiogenesis axis
promises a novel anti-fibrotic therapeutic strategy for liver diseases

Suvro Chatterjee

Vascular Biology Laboratory, AU-KBC Research Centre, Chennai, India.

Centre for Biotechnology, Anna University, Chennai, India.

Corresponding Author

Suvro Chatterjee Ph.D,
AU-KBC Research Centre,
MIT Campus of Anna University,
Chromepet,
Chennai-600044, India.

Tel.: +91 44 2223 4885×48/+91 44 2223 2711×48;

Fax: +91 44 2223 1034

E-mail address: soovro@yahoo.ca

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/hep.27061

Pubmed search with key words “vasohibin (VASH) and liver” extracted only 8 publications since 2004 when vasohibin reported for the first time. Among them only two works [1, 2] dealt with Hepatocellular Carcinoma (HCC), while another work explored the VASH implications in liver regeneration [3]. At this point of time, the work of Coch et al (2014) has significantly extended and strengthened the understanding of VASH1 implications in re-modeling of hepatic angiogenesis pertaining to the development of liver diseases [4]. Discovery of VASH and its selective induction in endothelial cells (EC) by VEGF by Saito group in 2004 is an important addition to the list of anti-angiogenic proteins [5]. VASH appears to operate as an intrinsic and highly specific feedback inhibitor of activated EC engaged in the process of angiogenesis. This virtue of VASH could be exploited in developing a therapeutic strategy to curb liver fibrosis as the fibrotic scar formation is associated with elevated pro-angiogenic activity in the sensitized liver [4]. Based on this proposition the work of Coch et al. (2014) elaborated the anti-angiogenic effects of VASH1 that contained liver fibrosis and cirrhosis. This is a significant step forward in formulating a therapeutic strategy for liver pathologies associated with fibrosis. Although the work convincingly demonstrated anti-angiogenic effects of VASH1 on the VEGF-dominating liver fibrosis, it could not offer the mechanistic insight of the VASH1 associated inhibition of fibrosis by studying primary fibrogenic pathways. In this connection, a previous work by Saito *et al.* [2011] offered a hint that overexpression of VSH1 in diabetic animals suppressed the renal levels of TGF- β 1 [6].

The dynamic process of fibrosis forges the liver matrix becoming heterogeneous with respect to various types of collagen, combinations within different tissue regions, and age associated alterations [7]. This progressive condition leads ultimately to portal hypertension at the end stage of the disease, and makes clinical management of liver fibrosis and cirrhosis difficult. Coch and co-workers (2014) demonstrated that overexpression of VASH1 by adenoviral gene transfer exerts multifold beneficial effects in portal hypertension and significantly decreases portohepatic resistance and portal pressure [4]. Therefore, VASH1 mediated beneficial effects in

portal hypertension strongly suggests that supplementation with VASH1 might be a novel and promising therapeutic strategy for halting chronic liver disease progression.

Hepatic stellate cells (HSC) play critical role in defining fibrosis in liver [7]. During resolution of liver fibrosis, activated HSC undergo either apoptosis or inactivation of sensitized HSC [7].

Many pathways associated with fibrosis such as TGF- β 1 [7], and lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) [8] have been targeted to develop anti-fibrosis drugs, however with limited success [9]. Although there is evidence of reversibility of liver fibrosis in animal models no specific antifibrotic drug has been developed so far for the treatments of liver fibrosis. Pathological angiogenesis in liver emerged as a target module for anti-fibrotic drug development since "vascular remodeling," is a core contributing factor in the progression of the fibrosis [9]. DNA array analysis of human cirrhotic livers showed overexpression of key angiogenesis genes such as VEGF, FGF-8, FGF receptor-1, PDGF and their corresponding receptors, cell-cell and cell-matrix adhesion molecules, and matrix re-modeling molecules [10]. However, the anti-angiogenesis therapy for tumors as a whole could not achieve much because of lack of understanding of mechanistic insight of the neovascularization process. At one point bevacizumab was approved for breast cancer by the FDA, but the approval was revoked on 18 November 2011 [11] because of collateral interference with vascular functions and less effectiveness in increasing life span of the patients.

Recent studies suggest that anti-angiogenic therapies can prevent liver fibrosis [12]. In relation to the use of anti-angiogenesis drugs in liver fibrosis the world is in search for a drug which would ideally attenuate pathological neo-angiogenesis, dampening collagen synthesis and restricting transformation of liver from fibrotic to tumorigenic. Discovering VASH1 as an anti-fibrotic and an anti-angiogenic natural protein holds promise for developing an effective anti-fibrotic and liver-protective drug. The scope of such propositions appeared optimistic particularly after observing anti-fibrosis functions of kinase and multi kinase inhibitors such as bevacizumab, sorafenib and sunitinib, and their increasing uses in liver pathologies [13]. Sunitinib, a PDGF

and VEGF RTKs' inhibitor could potentially block both activated HSC and angiogenesis and thus prevents the progression of cirrhotic liver to HCC. Tugues *et al.* [2007] demonstrated that sunitinib decreased hepatic vascular density, collagen expression and portal pressure in a rodent model of cirrhosis [14]. Sorafenib, a Raf kinase and VEGF receptor type 2 kinase inhibitor, was the first drug of this kind to prolongate the survival of patients with HCC [15]. A recent work by Huang *et al.* [2013] [16] revealed that bevacizumab was also found to downregulate the expression α -SMA and TGF- β 1, which have been reported to be pro-fibrogenic genes *in vivo*. In a similar fashion, VASH1 can be proposed as "dual effector" to inhibit angiogenesis and fibrosis simultaneously with relatively lower doses of the VASH1. The first ever effort by Coch *et al.* (2014) in overexpressing VASH1 protein *in vivo* could efficiently suppress pathological neovascularization and reduced the formation of portosystemic collateral vessels in cirrhotic rats. The encouraging results of the study confirms that over-expression of VASH1 in BDL liver has dual actions; 1) Inhibition of angiogenesis and 2) Attenuation of intrahepatic fibrogenesis through suppression of HSC activation. A recent work by Xue *et al.* [2013] demonstrated that the activation of VASH2 in HCC milieu promotes angiogenesis [1]. Therefore, it would be very relevant and significant to study if the differential expression of VASH1 and VASH2 define the transition of fibrotic liver to HCC. The challenges lying ahead is formulating a strategy of keeping precise balance between anti-angiogenic and other vascular functions in liver particularly when the anti-angiogenic drugs perturb critical signalling networks in both the pathological angiogenesis and vascular functions. The main side effects of bevacizumab are hypertension and heightened risk of bleeding [18]. Sunitinib showed some effects against HCC in phase II studies, but a large phase III study was interrupted due to unfavorable safety profile associated with vascular health and shorter survival in comparison to sorafenib. Therefore, the therapeutic use of VASH1 in curbing liver fibrosis should be studied in parallel with bevacizumab, sunitinib and sorafenib in *in vitro* and *in vivo* models to understand the relative effectiveness of the approach in reversing liver fibrosis.

Factually the observation by Coch et al (2014) is convincing that disruption of the VEGF-VASH1 negative-feedback loop induced local downregulation of the excessive expression of the proangiogenic growth factor VEGF [4]. However the paradox is that overexpression or ectopic delivery of VASH1, which was already overexpressed in cirrhotic livers could reverse the liver pathology in part (figure 1). Like VASH, similar observations were made previously with sFRP4, a natural anti-angiogenesis protein [17]. Ectopic delivery of sFRP4 could effectively inhibit tumor neo-vascularization and ultimately restricted tumor size in BALB/C nude mice while endogenous expression of sFRP4 always remained high in solid tumors [17]. In the present work the authors put forward the proposition that ectopically, and non VEGF-regulated, VASH1 overexpression disrupts the circuit but keeping a constant and lower levels of VEGF synthesis, which is sufficient to maintain vascular homeostasis but not pathological angiogenesis [4]. This proposition only could be verified by thorough study of crosstalk between VASH1 and VEGF signaling that would enable to explain the paradox. A comprehensive study of receptor biology of VEGF under ectopic application of VASH1 would be able to explain the “paradox”. This study would also elaborate the VEGF-VASH1 negative-feedback loop because interplay between VEGF receptor types and VEGF splice variances is key to the final vasculature architecture of the liver. Studying VASH1 signaling under low oxygen environment in sensitized liver is also critical since hypoxia and hypoxia inducible factor (HIF) play decisive role in fibrotic processes in the liver [18]. A recent work by Kozako *et al.* [2012] described that VASH1 induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of HIF-1 α in human umbilical vein EC under oxidative stress [19].

The heterogeneous nature of liver fibrosis and its consequences throw challenges at different levels. Therefore, the research might be directed to understand the following layers of events in future 1) VASH1 acts only through VEGF axis? Does it have transcriptional or post-translational regulation of other signaling pathways pertaining to liver fibrosis? 2) VASH1 implications in the activation and apoptosis of HSC 3) Profiling transcriptional regulation, post-translational events,

and protein expression of VASH1 under routine therapeutic regime of liver diseases. 4) Synthesizing cell permeable and targeted “VASH1-mimicking” small peptide to have better delivery and control over VASH functions.

The work of Coch et al [4] holds a promise for developing a novel anti-fibrotic therapeutic strategy for liver pathologies since the study hinted a reversal of vasohibin driven negative feedback loop of VEGF-angiogenesis axis in fibrotic liver (Figure 1).

Acknowledgement: This work was partially supported by a grant from University Grant Commission Faculty Recharge Programme, Government of India to SC. The author acknowledges Dr. Syamantak Majumder, Aab Cardiovascular Research Institute, University of Rochester, Rochester, New York for helping in writing the manuscript.

References

- [1] Xue X, Gao W, Sun B, Xu Y, Han B, Wang F, et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2013; 28;32(13):1724-34.
- [2] Wang Q, Tian X, Zhang C, Wang Q. Upregulation of vasohibin-1 expression with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curativesurgery. *Med Oncol.* 2012; 29(4):2727-36.
- [3] Nygard IE, Mortensen KE, Hedegaard J, Conley LN, Kalstad T, Bendixen C, Revhaug A. The genetic regulation of the terminating phase of liver regeneration. *Comp Hepatol.* 2012 Nov 20;11(1):3.
- [4] Coch L, Mejias M, Berzigotti A, Garcia-Pras E, Gallego J, Bosch J, Mendez R, Fernandez M. Disruption of negative feedback loop between vasohibin-1 and VEGF decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats. *Hepatology* 2014. doi: 10.1002/hep.26995.

[5] Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004; 114(7):898-907.

[6] Saito D, Maeshima Y, Nasu T, Yamasaki H, Tanabe K, Sugiyama H, Sonoda H, Sato Y, Makino H. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(4):F873-86.

[7] Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;53(5):976-80.

[8] El-Assal On, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998;27:1554–1562.

[9] Dufour JF, Pierre-Alain, Clavien, Fabio Mara et al. Signaling Pathways in Liver Diseases. 2010; Page 41-68.

[10] Shackel NA, McGuinness P, Abbott C, Gorrell M, McCaughan G. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 2001;49:567–576.

[11] US Food and Drug Administration, 2011. FDA Commissioner announces Avastin decision – drug not shown to be safe and effective in breast cancer patients. <<http://www.fda.gov/downloads/NewsEvents/Newsroom/UCM280546.pdf>>.

[12] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011; 31: 146–162.

[13] Piguet AC, Majumder S, Balaguru UM, Manjunathan R, Saran U, Chatterjee S, Dufour JF. Everolimus is a potent inhibitor of activated hepatic stellate cell functions in vitro and in vivo, while demonstrating anti-angiogenic activities. *Clin Sci (Lond)*. 2013.

- [14] Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz- Luque J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007; 46: 1919–26.
- [15] Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48(4):1312-27.
- [16] Huang Y, Feng H, Kan T, Huang B, Zhang M, Li Y, et al. Bevacizumab attenuates hepatic fibrosis in rats by inhibiting activation of hepatic stellate cells. *PLoS One* 2013; 30;8(8):e73492
- [17] Muley A, Majumder S, Kolluru GK, Parkinson S, Viola H, Hool L, Arfuso F, Ganss R, Dharmarajan A, Chatterjee S. Secreted frizzled-related protein 4: an angiogenesis inhibitor. *Am J Pathol* 2010;176(3):1505-16.
- [18] Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology*. 2012 Feb;55(2):622-33.
- [19] Kozako T, Matsumoto N, Kuramoto Y, Sakata A, Motonagare R, Aikawa A, et al. Vasohibin induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in human umbilical vein endothelial cells 2012; 586(7):1067-72.

Legends:

Figure 1: Reversal of vasohibin induced negative feedback loop of VEGF-angiogenesis axis in fibrotic liver.

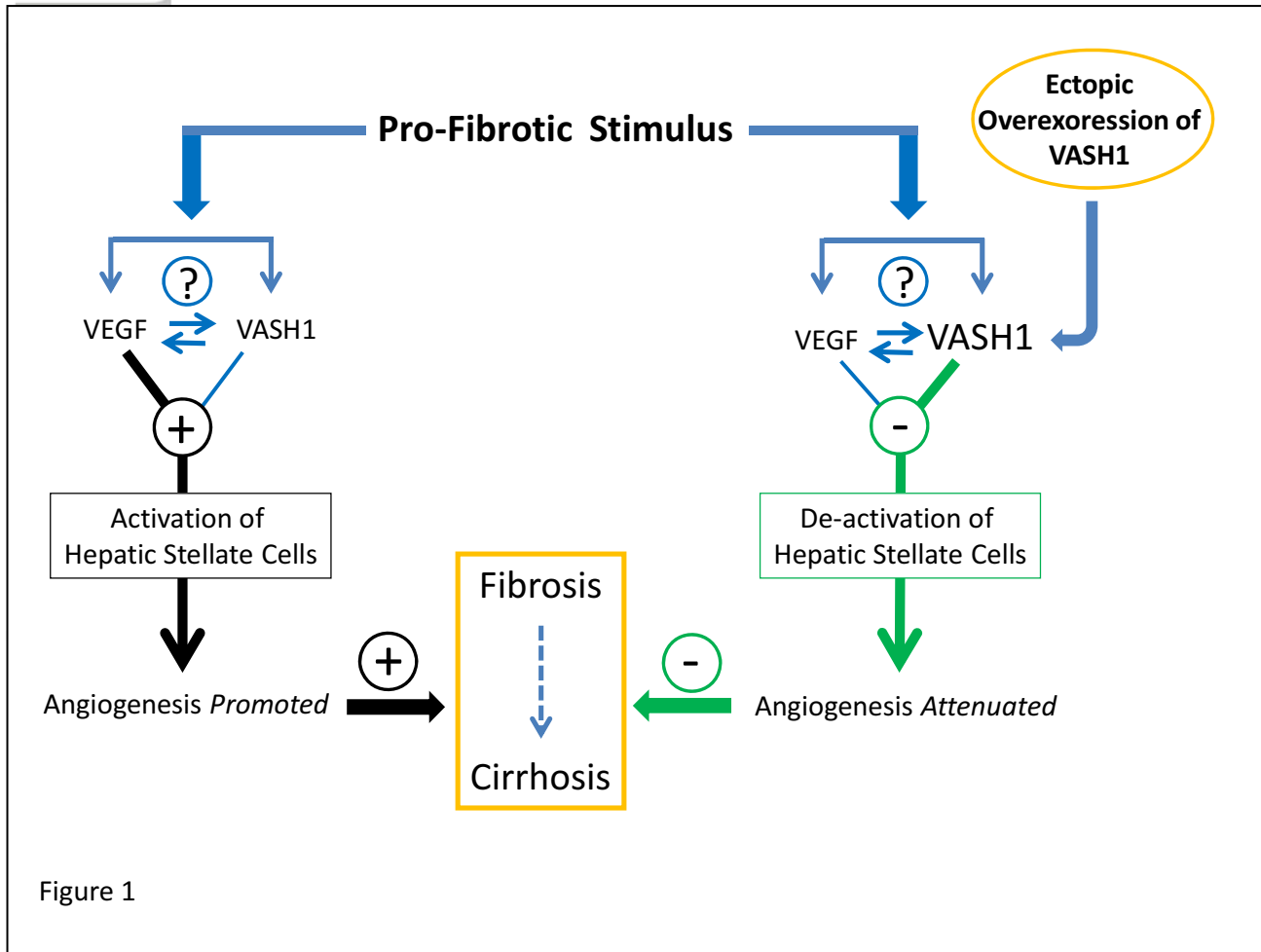
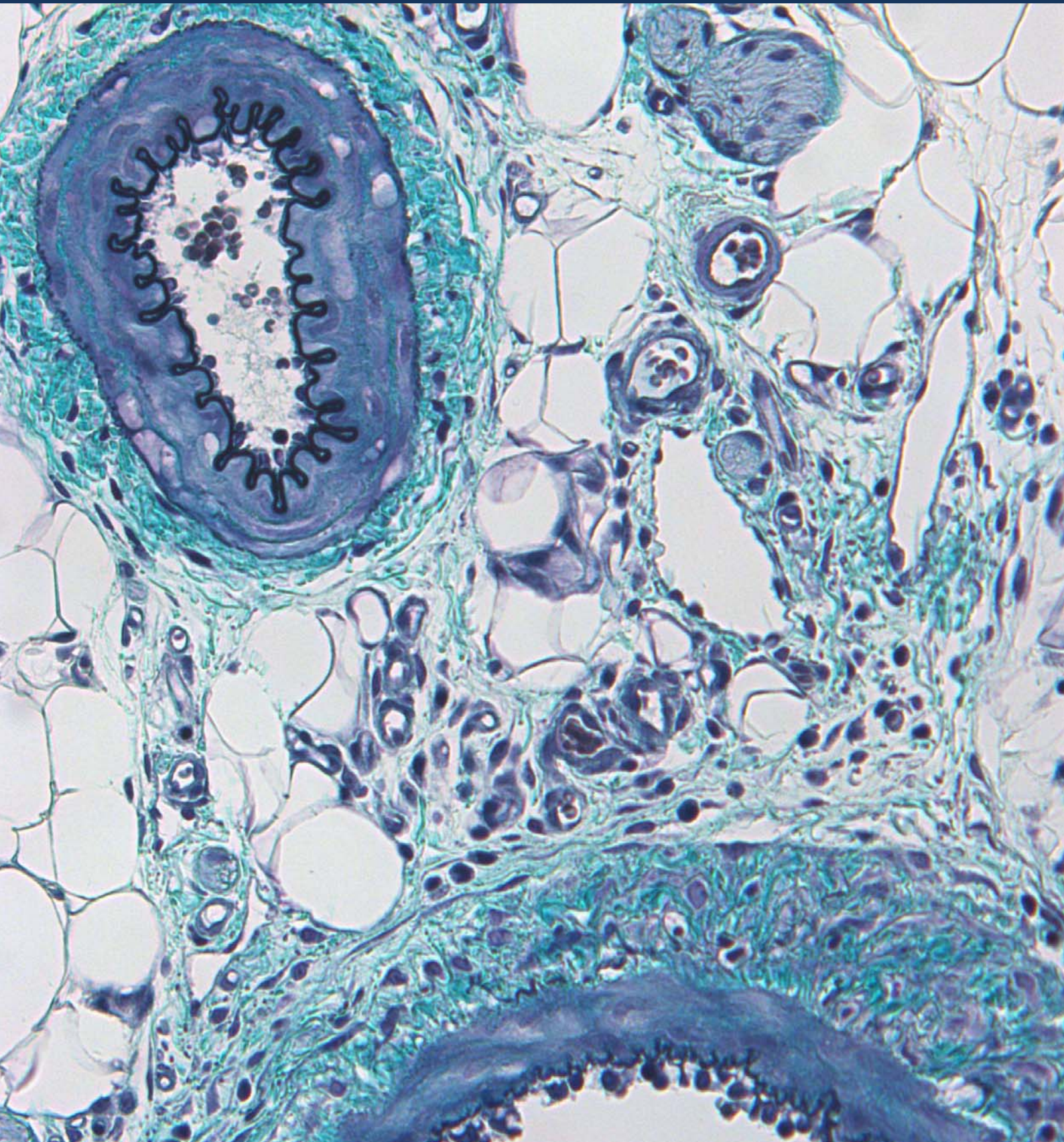


Figure 1

Accep



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Barcelona, 2014