

Implicació de l'angiogènesi en la patofisiologia de la hipertensió portal

Marc Mejías Hernández

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) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.



Tesi Doctoral
UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Medicina

IMPLICACIÓ DE L'ANGIOGÈNESI EN LA PATOFISIOLOGIA DE LA HIPERTENSIÓ PORTAL

Tesi presentada per
Marc Mejías Hernández
Per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors: Dra. Mercedes Fernández Lobato / Prof. Jaume Bosch Genover

Tesi realitzada als laboratoris de la Unitat d'Hemodinàmica Hepàtica
Servei d'Hepatologia, Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS
Barcelona, 2010.

AGRAÏMENTS

Fer una tesi és un camí personal, però no es pot fer sol. A través d'aquestes línies voldria transmetre el meu agraïment a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han participat en que, finalment, aquesta tesi doctoral sigui una realitat.

En primer lloc, vull donar les gràcies als directors d'aquesta tesi, el Jaume i la Mercedes, per donar-me la oportunitat, tot just sortit de la Facultat de Biologia, d'entrar en el món de la investigació científica, de convertir-me en doctor i de formar part de la família hemodinàmica. En especial agraeixo a la Mercedes la seva confiança des del primer dia i el fet d'haver compartit amb mi tot aquest projecte. La meva gratitud també als altres investigadors principals del grup, Joan Carles i Juan, pel seu suport i els seus consells i suggeriments durant aquests anys.

A l'Ester i al Javi els dec gran part de la meva tesi doctoral, i no parlo només de la part que hi figura escrita. Gràcies a tots dos, tenir-vos al costat ho fa tot molt més fàcil .

A l'Héctor i el Jordi, gràcies, deixant de banda les qüestions laborals, per la vostra amistat. Tots dos formeu part de molts dels meus millors records d'aquests darrers set anys.

Gràcies a tots aquells que m'heu acompanyat durant aquest temps com a companys al laboratori. Els anys que han passat des de que vaig arribar a aquest grup m'han permès compartir laboratori i aprendre de molts companys: des de la Mireia, la Mariona i la Carole fins a l'Eugenio, la Marta, la Lucia, la Giusi i la Diana, passant per l'Aina, la Vali, la Bàrbara, el Marcos o la Montse. Hi ha una mica de cadascun de vosaltres en aquesta tesi. Gràcies també a tot el personal de la part clínica, infermeres i metges, així com al personal administratiu.

El meu agraïment al personal de Medicina Nuclear, en especial al doctor Piera i la Nieves, per les in comptables mostres quantificades i la seva permanent predisposició a col·laborar, així com al personal de l'estabulari de la Facultat de Medicina.

A nivell més personal, vull donar les gràcies a tota la meva família pel seu permanent suport incondicional, especialment als meus pares, la Marina i el Genís, per haver fet de mi la persona que sóc, per haver-me obert totes les portes, per educar-me per saber triar el meu camí i recolzar-me quan ho he fet.

Per acabar, moltes gràcies a la Berta per haver canviat la meva vida, per acompanyar-me i aguantar-me, que sé que no sempre és fàcil... Fa quatre anys tots dos ens vam embarcar en dos reptes personals alhora i junts els hem superat. Podrem amb tot allò que vingui!

SUMARI

SUMARI

- 1. INTRODUCCIÓ** **pàg. 3**
- 1.1. La resistència vascular intrahepàtica. Component estructural i component vascular.
 - 1.2. Formació de vasos col·laterals portosistèmics.
 - 1.3. Circulació hiperdinàmica esplàncnica
 - 1.4. Hiperdinàmia sistèmica
 - 1.5. Angiogènesi
 - 1.5.1. El procés angiogènic
 - 1.5.2. El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF)
 - 1.5.3. El Factor de Creixement Derivat de Plaquetes (PDGF)
 - 1.5.4. Altres factors proangiogènics relacionats amb la hipertensió portal
 - 1.5.5. L'angiogènesi en models animals d'hipertensió portal
 - 1.6. Altres conseqüències de la hipertensió portal
 - 1.7. Models animals d'hipertensió portal
- 2. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS** **pàg. 21**
- 2.1. Justificació i objectius generals
 - 2.2. Estudi 1
 - 2.3. Estudi 2
 - 2.4. Estudi 3
- 3. CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS** **pàg. 29**
- 3.1. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats.
 - 3.2. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats.

3.3. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension.

4. RESUM DE RESULTATS **pàg. 67**

4.1. Estudi 1

4.2. Estudi 2

4.3. Estudi 3

5. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS **pàg. 77**

5.1. Estudi 1

5.2. Estudi 2

5.3. Estudi 3

6. CONCLUSIONS **pàg. 87**

6.1. Estudi 1

6.2. Estudi 2

6.3. Estudi 3

7. ALTRES PUBLICACIONS **pàg. 93**

8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES **pàg. 97**

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

La síndrome de la hipertensió portal és la més greu de les complicacions de les malalties cròniques del fetge, com són la cirrosi hepàtica, l'hepatitis crònica, la malaltia hepàtica alcohòlica o el carcinoma hepatocel·lular, i és la primera causa de mort i trasplantament hepàtic entre aquests malalts. La hipertensió portal també és la causa principal d'altres complicacions greus de la cirrosi, com l'ascites, la insuficiència renal o l'encefalopatia hepàtica (1-3).

La hipertensió portal es caracteritza per un increment patològic de la pressió sanguínia a la vena porta per damunt del seu valor normal (entre 1 i 5 mmHg). Com en qualsevol sistema hidrodinàmic, la pressió portal ve determinada per la interrelació entre el flux, en aquest cas el flux sanguini portal, i la resistència que s'oposa a aquest flux. Mitjançant la Llei d'Ohm, podem calcular el gradient de pressió entre dos punts en un vas sanguini amb la següent equació:

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

On ΔP seria el gradient de pressió portal, Q , el flux sanguini de tot el territori venós portal i R , la resistència vascular exercida pel sistema portal i pel mateix fetge. Així doncs, un increment en el gradient de pressió portal es pot originar per un augment de les resistències, per un augment de l'aflux sanguini portal o per una combinació de tots dos (1-3).

1.1. La resistència vascular intrahepàtica. Component estructural i component vascular

El factor desencadenant primari de la hipertensió portal en la cirrosi és l'augment de la resistència vascular exercida pel fetge, que podem atribuir a dos components. En primer lloc, un component estructural degut a la distorsió de l'arquitectura normal del fetge, causada per la fibrosi, la cicatrització i la formació de nòduls de regeneració. Aquest component estructural es calcula responsable d'un 60-70% de l'increment de la resistència intrahepàtica. Paral·lelament, intervé un component vascular, degut a l'acció d'elements contràctils i de substàncies vasoactives al fetge, el qual es considera responsable del 30-40% de l'increment de la resistència intrahepàtica (1-3).

Els principals elements contràctils implicats en l'increment de la resistència vascular intrahepàtica són les cèl·lules de múscul llis vascular (presents en les vèdules portals) i, sobre tot, les cèl·lules estrellades hepàtiques. Aquestes cèl·lules, també conegudes com a cèl·lules d'Ito, són pericits específics del fetge i es troben a l'espai de Disse, entre les cèl·lules endotelials i els hepatòcits. Les cèl·lules estrellades presenten extensions citoplasmàtiques que envolten els sinusoides, fet que els permet, mitjançant contracció, regular el flux sinusoïdal. Davant d'un dany hepatocel·lular es produeix l'activació de les cèl·lules estrellades, la qual dóna lloc a cèl·lules amb un fenotip tipus miofibroblast, amb potencial profibrogènic i gran capacitat contràctil. En el cas que el dany hepàtic esdevingui crònic, les cèl·lules estrellades es perpetuen en l'estat activat (4,5).

S'han descrit diverses substàncies vasoactives implicades en la regulació de la resistència vascular intrahepàtica (6,7). En la cirrosi es produeix un important desequilibri entre aquests mediadors, amb elevats nivells de vasoconstrictors (endotelina, angiotensina II, vasopressina, norepinefrina o tromboxà, entre d'altres) acompanyats de nivells anormalment reduïts de vasodilatadors (principalment òxid nítric), que contribueix a l'increment de la resistència vascular intrahepàtica. Paral·lelament, el fetge cirròtic presenta hiperresposta als vasoconstrictors i hiporesposta als vasodilatadors (6,7).

En condicions normals, l'endoteli és capaç de produir un estímul vasodilatador en resposta a un increment de flux, de pressió o d'agents vasoconstrictors, però en determinades condicions patològiques, entre les quals figura la cirrosi, però també la hipertensió arterial o la diabetis, es produeix un desequilibri en aquesta vasodilatació dependent de l'endoteli. Aquesta condició, present en la vasculatura del fetge cirròtic, es coneix com a disfunció endotelial (8), i s'atribueix a la reduïda biodisponibilitat d'òxid nítric (NO) i a la producció excessiva de vasoconstrictors derivats de l'endoteli.

L'enzim NO sintasa endotelial (eNOS) és el principal productor d'òxid nítric. La reduïda producció d'òxid nítric (NO) en el fetge cirròtic té lloc tot i que els nivells d'eNOS són normals, fet que indica que la seva activitat està alterada per modificacions post-traduccionals, com l'increment en l'expressió de caveolina o defectes en el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (9,10).

1.2. Formació de vasos col·laterals portosistèmics

L'establiment de la hipertensió portal provoca el desenvolupament d'una sèrie de vasos col·laterals que deriven la sang des de la vena porta cap a la circulació sistèmica amb la finalitat de descomprimir el territori portal (2). Aquest fenomen, també conegut com a *shunting* portosistèmic, en principi beneficiós per la descompressió de la vena porta, comporta una sèrie de problemes associats, com la formació de varices gastroesofàgiques. Les hemorràgies gastrointestinals per la ruptura d'aquestes varices resulten difícils d'aturar i, en ocasions, poden ser letals (11,12).

A més a més, els vasos col·laterals portosistèmics impliquen que la sang passi directament del territori esplàncnic a la circulació sistèmica sense passar pel fetge. Això suposa que arribin a la circulació sistèmica partícules i substàncies que en condicions normals es metabolitzarien en el fetge, i pot conduir a situacions com la sèpsia i l'encefalopatia hepàtica (2). En etapes avançades de la hipertensió portal, la circulació col·lateral pot reconduir fins al 90% de la sang que entra al sistema portal.

La formació dels vasos col·laterals portosistèmics s'ha atribuït tradicionalment a un procés complex que implica la obertura, dilatació i hipertròfia de canals vasculars preexistents (13). Més recentment, estudis previs realitzats en el nostre laboratori han posat en relleu que un procés d'angiogènesi dirigit pel Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF) modula la formació de col·laterals (14).

1.3. Circulació hiperdinàmica esplàncnica

Tot i la formació dels vasos col·laterals portosistèmics, que descomprimeixen el territori portal, la pressió portal es manté elevada. El motiu és que, concomitantment, es produeix un increment en el volum de sang que arriba a la vena porta degut a l'augment del flux sanguini als òrgans esplàncnics (estómac, duodè, intestí, mesenter, pàncrees i melsa). Aquesta situació condueix a una circulació hiperdinàmica esplàncnica, i contribueix a mantenir i agreujar la síndrome de la hipertensió portal, en les seves etapes més avançades (2).

Els mecanismes implicats en l'establiment d'aquesta hiperdinàmia esplàncnica no són ben coneguts, i es considera un fenomen multifactorial, amb implicació de mecanismes neurogènics, humorals i locals. S'ha descrit una sobreproducció de vasodilatadors

paracrins circulants i una hiporesposta als vasoconstrictors (2,15,16). Aquesta situació resulta en una marcada vasodilatació arteriolar en els òrgans esplànquics, la sang dels quals concorre a la vena porta, mantenint així la pressió portal elevada.

La majoria de vasodilatadors implicats en l'establiment de la circulació hiperdinàmica esplànquica són molècules que tenen origen en el mateix territori esplànquic i, en condicions normals, són metabolitzades al fetge. Així doncs, en el context de la cirrosi, els vasodilatadors s'acumulen a la circulació sistèmica a causa de la reduïda metabolització per part del fetge malalt o del *shunting* portosistèmic.

Diverses substàncies, algunes d'elles circulants com el glucagó i els endocannabinoids, d'altres de paracrines com la prostaciclina (PGI₂) o el monòxid de carboni (CO) s'han descrit com a promotores de la marcada vasodilatació esplànquica observada en la cirrosi, però el mediador més important sembla ser l'òxid nítric (NO) (1-3).

Estudis realitzats en models experimentals han mostrat un increment de l'expressió de la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) en artèries mesentèriques durant la cirrosi (17), al contrari que la isoforma induïble (iNOS), la qual sembla no tenir una implicació en aquesta sobreproducció de NO. S'ha descrit que els pacients cirròtics i animals amb hipertensió portal experimental presenten elevats nivells plasmàtics d'òxid nítric, principalment en el territori portal, suggerint una producció mesentèrica d'aquest vasodilatador (18). A més a més, la inhibició de la síntesi de NO mitjançant inhibidors específics corregeix parcialment l'estat de circulació hiperdinàmica esplànquica (19,20).

L'excessiva producció d'òxid nítric en el territori esplànquic és degut a un increment de l'expressió d'eNOS, però també a una activitat incrementada d'aquest enzim (17). En aquest sentit, s'han descrit diversos factors que poden activar eNOS, com l'estrès per fregament (*shear stress*), el TNF- α o la presència de substàncies vasoactives circulants (endotelina, angiotensina II, vasopressina o norepinefrina), entre d'altres, però el mecanisme inicial responsable de la regulació a l'alça de l'activitat de l'eNOS en la hipertensió portal sembla ser la fosforilació de l'enzim per part d'Akt (21).

És remarcable el fet que l'increment de la síntesi de NO en el territori esplànquic es produeix al mateix temps que la síntesi reduïda d'aquest vasodilatador al fetge, la qual participa en l'increment de la resistència vascular intrahepàtica. Aquest fet constitueix

el que s'ha anomenat la "paradoxa de la hipertensió portal" (22), que descriu la situació en la que en un territori predomina la vasodilatació i en l'altre la vasoconstricció. A l'hora de planificar estratègies terapèutiques cal tenir en compte aquest fenomen, ja que un tractament beneficiós a nivell hepàtic podria resultar perjudicial a nivell esplàncnic i viceversa.

Recentment, estudis del nostre grup han demostrat que en el territori esplàncnic de models animals d'hipertensió portal té lloc un procés de neovascularització estimulat pel Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF) que contribueix a l'increment del flux sanguini als òrgans esplàncnics (23).

1.4. Hiperdinàmia sistèmica

En les fases més avançades de la cirrosi, tan pacients com models animals presenten una circulació hiperdinàmica sistèmica. Aquesta es caracteritza per una vasodilatació generalitzada acompanyada d'un descens en la pressió arterial i la resistència vascular perifèrica, juntament amb un augment de la despesa cardíaca i el volum plasmàtic (1-3).

Aquests canvis hemodinàmics a nivell sistèmic es produeixen a conseqüència de l'exagerada producció de vasodilatadors a nivell esplàncnic, acompanyada de la reduïda metabolització d'aquests per part del fetge patològic, que ja hem mencionat. L'acumulació d'aquests vasodilatadors en la circulació perifèrica comporta una vasodilatació arterial generalitzada, seguida d'una hipovolèmia relativa de la circulació arterial. En aquesta situació es produeix l'activació d'una sèrie de sistemes reguladors, com el sistema renina-angiotensina o la secreció de vasopressina, que activen la retenció d'aigua i sodi per part del ronyó, augmentant així el volum plasmàtic per tal de mantenir la pressió arterial perifèrica (1-3).

Aquesta circulació hiperdinàmica és la causant de complicacions associades a la hipertensió portal en diversos òrgans, com l'elevada retenció de sodi a nivell renal, la síndrome hepatopulmonar, la progressió d'encefalopatia hepàtica, la síndrome d'isquèmia o l'aparició d'estrès oxidatiu en diferents teixits. La severitat de la circulació hiperdinàmica es considera un índex de la prognosi i supervivència dels pacients amb hipertensió portal (1-3).

1.5. Angiogènesi

L'angiogènesi es defineix com el procés fisiològic mitjançant el qual es formen nous vasos sanguinis a partir de la vasculatura preexistent. Té una implicació important durant el desenvolupament embrionari i el creixement, mentre que, en l'edat adulta, gran part dels vasos sanguinis esdevenen quiescents i l'angiogènesi intervé únicament en funcions reproductives (durant el cicle ovàric o a la placenta, durant l'embaràs)(24,25). De tota manera, les cèl·lules endotelials mantenen la capacitat de dividir-se ràpidament en resposta a estímuls concrets, com la hipòxia i, així, l'angiogènesi s'activa en la cicatrització i la reparació de teixits danyats, però també en processos fisiopatològics, com el càncer o processos inflamatoris. El correcte funcionament d'aquest procés depèn, fonamentalment, de l'equilibri entre factors promotors i inhibidors d'angiogènesi (24,25).

Cal distingir l'angiogènesi de la vasculogènesi, que consisteix en la formació de vasos sanguinis *de novo*, a partir d'angioblasts o cèl·lules *stem* (26). Tot i que tradicionalment s'havia pensat que els processos de vasculogènesi estaven limitats a l'etapa embrionària, quan tenen lloc durant la formació de l'estructura vascular naixent, recentment s'ha demostrat que la vasculogènesi també pot tenir lloc en organismes adults. S'han identificat cèl·lules progenitores endotelials circulants que poden ser reclutades a regions isquèmiques o tumors en desenvolupament, on s'incorporen a la vasculatura promovent vasculogènesi (27).

A finals dels anys 90 es va demostrar que en el mesenteri de les rates amb hipertensió portal induïda mitjançant la lligadura parcial de la vena porta (PPVL) té lloc un procés angiogènic (28). Es va implantar una matriu de col·lagen en el mesenteri dels animals i es va observar com en els implants mesentèrics de les rates amb hipertensió portal es formaven molts més vasos que en els implants de les rates control (29). Posteriorment, estudis realitzats en els darrers anys proposen una implicació de l'angiogènesi en l'establiment i la progressió de la síndrome de la hipertensió portal, tant a nivell de la formació de vasos col·laterals portosistèmics (14), com de la neovascularització dels òrgans del territori esplàncnic i el conseqüent increment del volum de sang que arriba a la vena porta (23). En aquest sentit, els treballs realitzats per part del nostre grup van posar en relleu que el desenvolupament de la hipertensió portal està associat a una sobreexpressió de VEGF, però l'acció coordinada de diversos altres factors de creixement podrien estar implicats el control dels processos angiogènics relacionats amb aquesta síndrome.

S'ha descrit que el VEGF és el principal mediador de les respostes angiogèniques que tenen lloc al principi del procés de formació d'un nou vas sanguini a partir d'un de preexistent (26). Així doncs, el VEGF promouria la vasodilatació i permeabilitat del vas preexistent, l'expressió de proteases que dissoldrien la matriu extracel·lular que envolta el vas i la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials que donarien lloc a un túbul d'endoteli: el vas naixent (26).

A partir d'aquest punt, uns altres factors prendrien protagonisme a l'hora de permetre l'estabilització i maduració d'aquest nou vas sanguini. El Factor de Creixement Derivat de Plaquetes (PDGF) seria el principal encarregat de reclutar cèl·lules murals, pericits i cèl·lules de múscul llis vascular, que permeten l'evolució del vas naixent a un nou vas sanguini consolidat. Un altre factor que intervindria en aquesta fase és el Factor de Creixement Transformant β (TGF β), una citocina multifuncional que promou la maduració dels vasos estimulant la producció de matriu extracel·lular i induint la diferenciació de cèl·lules mesenquimals en cèl·lules murals (26).

Les Angiopoietines (Ang-1 i Ang-2) també tenen un paper important en la formació i estabilització de nous vasos sanguinis. L'Angiopoietina-1 és sintetitzada, bàsicament, per part de les cèl·lules murals i té la funció de facilitar l'estabilització dels nous vasos promovent les unions entre cèl·lules endotelials i cèl·lules murals. L'Angiopoietina-2, en canvi, és sintetitzada principalment a les cèl·lules endotelials i té diferents funcions depenent del context en el qual es troba. En presència de VEGF té una activitat proangiogènica facilitant la ramificació (sprouting) dels vasos, mentre que en absència de VEGF té la funció d'antagonitzar Ang-1, desestabilitzant i regressionant els vasos sanguinis a través de l'apoptosi de les cèl·lules endotelials (26).

1.5.1. El procés angiogènic

El procés de formació d'un nou vas sanguini a partir d'un de preexistent, de manera molt resumida, s'inicia amb un estímul proliferatiu per a les cèl·lules endotelials vasculars. El principal factor responsable d'aquest estímul, com ja s'ha mencionat, és el Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF), el qual interacciona amb els seus receptors situats a la membrana de les cèl·lules diana. El receptor VEGFR-2 és el més important a nivell de cèl·lules endotelials, i el principal mediador de la resposta proangiogènica al VEGF. És un receptor amb un domini intracel·lular tipus tirosina

kinasa, que mitjançant la unió de VEGF, dimeritza i s'autofosforil·la, activant-se. El sistema VEGF/VEGFR-2 produeix múltiples efectes proangiogènics a través de diverses vies de senyalització, com són l'increment de la permeabilitat vascular, vasodilatació, proliferació, migració i supervivència de les cèl·lules endotelials (30).

Les cèl·lules endotelials que reben l'estímul angiogènic proliferen i, alhora, comencen a produir proteases i altres enzims que degraden la matriu extracel·lular, com les metal·loproteases de matriu (MMPs), per tal de permetre la migració de les noves cèl·lules endotelials. Aquestes conformaran una estructura tubular, que serà la base del nou vas sanguini. A continuació, té lloc l'estabilització d'aquest nou vas mitjançant el recobriment amb pericits, cèl·lules de múscul llis vascular que li donen consistència. El procés consisteix, primerament, en el reclutament de cèl·lules mesenquimals per part del vas en desenvolupament. Aquest reclutament és mediat, principalment, per l'estímul del Factor de Creixement Derivat de Plaquetes (PDGF). El contacte entre les cèl·lules endotelials i les mesenquimals produeix l'activació de TGF β , el qual provocarà la diferenciació de les mesenquimals en pericits. A partir d'aquest punt, s'atura la proliferació de les cèl·lules endotelials, es produeix matriu extracel·lular de suport i es dona lloc al nou vas madur (30).

1.5.2. El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF)

El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF) forma part d'una família que també inclou el Factor de Creixement Placentari (PIGF), el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D o el VEGF-E. La nomenclatura d'aquests membres més recents ha convertit el primer VEGF en ser descobert en VEGF-A, tot i que, en general, es denomina simplement VEGF (31-35).

La isoforma predominant del VEGF, VEGF₁₆₅, és una glicoproteïna dimèrica de 45 KDa produïda per les cèl·lules endotelials, els macròfags o les cèl·lules T activades, entre d'altres, amb efectes proangiogènics específicament per les cèl·lules endotelials. L'expressió de VEGF està regulada per una gran diversitat d'estímuls, entre els quals hi ha la hipòxia, alguns factors de creixement, l'òxid nítric, algunes hormones o els promotors tumorals (31-35).

El gen del VEGF-A s'organitza en vuit exons separats per set introns i dona lloc a través de splicing a les diferents isoformes de la proteïna: VEGF₁₆₅, la isoforma

predominant, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ i les menys freqüents: VEGF₁₄₅ i VEGF₁₈₃. La isoforma VEGF₁₂₁ és àcida i no s'uneix a la heparina, resultant una proteïna completament soluble, mentre que les isoformes VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ són bàsiques i tenen alta afinitat per l'heparina, de manera que es troben quasi totalment retingudes en la matriu extracel·lular. La isoforma VEGF₁₆₅ té propietats intermitges: és secretada, però al mateix temps una fracció important es manté retinguda a la superfície cel·lular i la matriu extracel·lular (36).

Els membres de la família de VEGF s'uneixen als seus receptors: VEGFR-1, VEGFR-2, i VEGFR-3 o les neuropil·lines 1 i 2. El VEGF-A, concretament, s'uneix a dos receptors, el VEGFR-1 (Flt-1) i el VEGFR-2 (Flk-1), que s'expressen constitutivament en les cèl·lules endotelials vasculares (tot i que altres tipus cel·lulars també poden expressar-los), provocant la seva dimerització. Aquests receptors són del tipus tirosina kinasa i s'activen a través d'una transfosforilació induïda per la seva dimerització (31-35).

El receptor VEGFR-2 és el principal mediador de les respostes cel·lulars al VEGF. Un cop s'ha produït la unió lligand-receptor, el receptor s'activa per transfosforilació. Ja activat, VEGFR-2 ofereix llocs d'unió per a proteïnes adaptadores amb dominis SH2 (com Grb2 o Shb, entre d'altres), les quals iniciaran les diferents cascades de senyalització induïdes pel VEGF, o per a proteïnes tirosina fosfatasa (SHP-1 i SHP-2), moduladors negatius de la senyalització a través dels receptors tirosina kinasa. Les funcions del VEGFR-1 no són tan ben conegudes, però hi ha moltes evidències que apunten a que VEGFR-1 actua com a regulador negatiu de VEGFR-2, unint el VEGF per tal que aquest no s'uneixi al VEGFR-2. Pel que fa al receptor VEGFR-3, les seves funcions resulten importants per a les cèl·lules endotelials limfàtiques (31-35).

Les principals respostes que induïx el VEGF en les cèl·lules endotelials, a través de diversos intermediaris intracel·lulars, són la promoció de la supervivència, la inducció de la proliferació i la migració cel·lular o la regulació de la permeabilitat i l'estímul de la síntesi de vasodilatadors (31-35).

La promoció de la supervivència de les cèl·lules endotelials és fonamental en el procés de formació de nous vasos sanguinis i en la seva integritat. VEGF actua com un factor de supervivència per a les endotelials, inhibint l'apoptosi a través de l'activació de la kinasa antiapoptòtica Akt/PKB a través de PI3K. A llarg termini, els efectes de VEGF sobre la supervivència probablement són mediats a través de la regulació a l'alça de

components de la maquinaria antiapoptòtica cel·lular, concretament de les proteïnes Bcl-2 i A1, que inhibeixen l'activació de les caspases (31,33)

L'estímul proliferatiu de VEGF per a les cèl·lules endotelials té lloc, principalment, a través de l'activació de les kinases regulades per senyals extracel·lulars (ERKs), també conegudes com p42/44 MAPK. Hi ha, com a mínim, dues vies que porten a aquesta activació de les ERKs. Per una banda, la unió de la proteïna adaptadora Grb2 al receptor VEGFR-2 activat, la qual, a través de SOS activa la proteïna Ras. Posteriorment, el senyal es transporta via Raf-1 i MEK fins activar les ERKs. D'altra banda, el VEGF també activa, a través del receptor VEGFR-2, la fosforilació de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la qual produirà diacilglicerol (DAG) i inositol trifosfat (IP3) i la subseqüent activació de la proteïna kinasa C (PKC), la qual té la capacitat d'induir l'activació de la via Raf-1/MEK/ERK. L'activació de mTOR per part del VEGFR-2 a través de la via PI3K/Akt també està implicada en la senyalització proliferativa per a les cèl·lules endotelials induïda per VEGF (31,33,37).

El VEGF estimula la migració de les cèl·lules endotelials a través de la kinasa d'adhesions focals (FAK). La senyalització a través de FAK és crítica per la reorganització del citoesquelet i la migració cel·lular. VEGF provoca la fosforilació de FAK i de la proteïna adaptadora paxillin, promovent el reclutament de FAK cap a les noves adhesions focals que s'estableixen entre les cèl·lules endotelials i la matriu extracel·lular i que permeten la migració (31,33).

Pel que fa a la permeabilitat vascular, VEGF té la capacitat de modular-la a través d'induir la fenestració de l'endoteli. La producció de vasodilatadors, com l'òxid nítric i la prostaciclina, està implicada en la inducció de la permeabilitat. En el cas concret de l'òxid nítric, l'activació de l'enzim eNOS té lloc mitjançant la fosforil·lació directa per part d'Akt, la qual és activada per PI3K. A nivell de la microvasculatura mesentèrica, s'ha implicat l'activació de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la mobilització de calci i l'activació la proteïna kinasa C (PKC) com a mediadors dels efectes del VEGF sobre la permeabilitat vascular. A més a més, a través de la unió del VEGFR-2 activat amb la proteïna Src es promou la fosforil·lació de les proteïnes VE-cadherina i β -catenina, implicades en les unions cel·lulars, cosa que es tradueix en una major permeabilitat (31,33).

1.5.3. El Factor de Creixement Derivat de Plaquetes (PDGF)

El Factor de Creixement Derivat de Plaquetes (PDGF) és una glicoproteïna dimèrica d'uns 30 KDa. Està composta per dues cadenes A (PDGF-AA), dues cadenes B (PDGF-BB) o una de cada (PDGF-AB) i és el principal mitògen per als fibroblasts i les cèl·lules de múscul llis vascular. El PDGF és expressat per multitud de tipus cel·lulars, entre els quals hi ha les plaquetes, les cèl·lules endotelials, les cèl·lules de múscul llis vascular, els macròfags o els fibroblasts, i la seva síntesi s'incrementa en resposta a estímuls com la hipòxia, la trombina o diversos factors de creixement i citocines. Un cop sintetitzat, el PDGF queda retingut en la cèl·lula productora o en la seva matriu extracel·lular, però un cop madura pot esdevenir difusible (38-41).

Els efectes de les diferents isoformes del PDGF són induïts a través de l'activació de dos receptors tipus tirosina kinasa, el PDGFR- α i el PDGFR- β . El receptor α uneix tan les cadenes A com les B amb alta afinitat, mentre que el receptor β només uneix cadenes B amb alta afinitat. El fet que el PDGF sigui una proteïna dimèrica li permet, com en el cas del VEGF, unir-se a dos receptors i provocar la seva dimerització, fet que promourà la seva activació mitjançant una transfosforilació (38-41).

A més a més de diferenciar-se per la seva afinitat per les isoformes del PDGF, els dos receptors de PDGF també generen respostes cel·lulars diferents. D'aquesta manera, la resposta d'una cèl·lula concreta al PDGF dependrà de quin dels dos receptors expressa. Els fibroblasts i les cèl·lules de múscul llis vascular, principals dianes del PDGF, expressen els dos tipus de receptor, però principalment PDGFR- β (38-41).

Les principals respostes induïdes pel PDGF són de proliferació cel·lular, quimiotaxi, migració i supervivència i prevenció de l'apoptosi (38-41).

La proliferació cel·lular induïda per PDGF té lloc, principalment, a través de l'activació de la via Raf/MEK/ERK. La unió de la proteïna adaptadora Grb2 al receptor PDGFR- β activat, a través de SOS, activa la proteïna Ras, la qual s'unirà a Raf-1 per posar en marxa la citada via de senyalització. En alguns models s'ha posat en relleu una implicació de la via de PLC- γ /PKC i de la proteïna tirosina kinasa Src en la promoció de la proliferació dependent de PDGF (38).

PI3K té un paper central en la coordinació de la senyalització intracel·lular en resposta a PDGF. A través de PI3K s'activa Akt/PKB, la qual participa en la supervivència cel·lular degut a la seva capacitat de produir efectes antiapoptòtics, així com la proteïna Rac, una GTPasa de la família Rho, important per la reorganització del citoesquelet que permetrà la migració cel·lular i per la quimiotaxi (38).

1.5.4. Altres factors proangiogènics relacionats amb la hipertensió portal

A més a més del VEGF i el PDGF, la implicació de molts altres factors ha estat descrita en la hipertensió portal, com el Factor de Creixement de la Placenta (PIGF) (42), o l'Apelina (45).

El PIGF és, com hem vist anteriorment, un membre de la família del VEGF que no es troba sobreexpressat en teixits normals ni durant l'embriogènesi. Únicament exerceix funcions proangiogèniques durant l'embaràs i el cicle ovàric, de manera que en condicions de salut no té efectes sobre els vasos quiescents. S'uneix al receptor VEGFR-1, el qual s'expressa mínimament en vasos quiescents però es regula a l'alça en condicions patològiques, potenciant els efectes de VEGF, fet que fa atractiu el PIGF com a diana terapèutica, ja que la seva inhibició no afectaria la vasculatura normal (42).

A nivell de la hipertensió portal, ha estat demostrat recentment en un model de ratolins amb hipertensió portal prehepàtica que la neovascularització mesentèrica s'associa a una sobreexpressió de PIGF. En els ratolins *knockout* pel PIGF amb hipertensió portal es redueix la neovascularització esplàncnica i, conseqüentment, es produeix una millora en les alteracions hemodinàmiques provocades per la hipertensió portal (42).

L'Apelina és un pèptid identificat recentment. És el lligand del receptor tirosina kinasa APJ i la senyalització del sistema Apelina/APJ participa en el control de la pressió sanguínia (té efecte hipotensor), així com en alguns processos angiogènics, com el desenvolupament vascular embrionari, la formació postnatal de vasos a la retina, o en la vascularització d'alguns models tumorals (43). D'altra banda, un article recent ha mostrat nivells circulants elevats d'Apelina en pacients cirròtics i que l'Apelina endògena podria estar implicada en el remodelat vascular intrahepàtic en rates cirròtiques (44).

Un treball realitzat en el nostre grup va posar en relleu que existeix una sobreexpressió d'Apelina i el seu receptor APJ en el territori esplàncnic de les rates amb hipertensió portal prehepàtica. La inhibició específica del receptor APJ mitjançant l'administració del fàrmac F13A va reduir la neovascularització a nivell esplàncnic i la formació de vasos col·laterals portosistèmics en aquests animals, suggerint una implicació de l'Apelina en la regulació de l'angiogènesi associada a la hipertensió portal (45).

1.5.5. L'angiogènesi en models animals d'hipertensió portal

Els primers estudis realitzats en el nostre grup van posar de relleu l'existència d'un procés actiu d'angiogènesi en el territori esplàncnic de models animals d'hipertensió portal, tant rates com ratolins, evidenciat per la sobreexpressió del Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF), que com hem vist és un potent factor proangiogènic i del seu receptor 2 (VEGFR-2) (14,23). També es va detectar en aquests òrgans un increment en l'expressió de la proteïna CD31, un marcador de cèl·lules endotelials que s'utilitza com a índex de vascularització i d'angiogènesi. Aquests resultats indicaven que en els animals amb hipertensió portal té lloc, a nivell esplàncnic, una neovascularització estimulada per VEGF (14,23).

Com hem vist anteriorment, una de les conseqüències de la hipertensió portal és la formació d'una xarxa de vasos col·laterals portosistèmics. Tradicionalment, la formació d'aquests vasos s'atribuïa a l'obertura de vasos preexistents com a conseqüència mecànica de l'increment de pressió en el territori portal. Sense descartar la implicació parcial d'aquest fenomen en la formació dels vasos col·laterals, es va demostrar que el procés actiu d'angiogènesi detectat en el territori esplàncnic dels animals amb hipertensió portal era, si més no en part, responsable de la formació d'aquests vasos (14).

En un estudi posterior, es va examinar la possibilitat que el procés angiogènic actiu detectat en el territori esplàncnic dels models animals d'hipertensió portal estigués també implicat en l'establiment i el manteniment de la circulació hiperdinàmica esplàncnica, a través de l'increment de la vascularització en aquest territori. Amb aquesta finalitat es va dissenyar un estudi en el qual, mitjançant l'administració d'un fàrmac que interfereix la via de senyalització VEGF/VEGFR-2, es pretenia atenuar la circulació hiperdinàmica esplàncnica de rates amb hipertensió portal. En aquest cas, es va administrar als animals el fàrmac SU5416, el qual té la capacitat d'inhibir

l'autofosforil·lació activadora del receptor VEGFR-2, promoguda per la unió de VEGF. D'aquesta manera, queda interrompuda la senyalització de la via VEGF/VEGFR-2. Mitjançant aquest tractament, es va observar, efectivament, un efecte antiangiogènic que es va traduir en una millora de la circulació esplàncnica, representada per una reducció del volum de sang afluent a la vena porta (*portal venous inflow*, PVI) i un increment en la resistència arteriolar esplàncnica i la resistència de la vena porta (23).

Els resultats d'aquests estudis posen en relleu la importància de l'angiogènesi en la patogènesi de la hipertensió portal, tant a nivell de la formació dels vasos col·laterals portosistèmics, com de l'increment del flux esplànncic responsable de la circulació hiperdinàmica esplàncnica, i suggereixen que un tractament antiangiogènic podria ser una estratègia terapèutica prometedora per tal de prevenir la progressió de la síndrome de la hipertensió portal (14,23).

1.6. Altres conseqüències de la hipertensió portal

Acompanyant a l'augment de la pressió a la vena porta, l'establiment de la circulació hiperdinàmica al territori esplànncic i la formació dels vasos col·laterals portosistèmics, la síndrome de la hipertensió portal provoca altres alteracions que cal mencionar, com l'ascites, la síndrome hepatopulmonar, l'encefalopatia hepàtica o l'esplenomegàlia (2). Existeixen múltiples treballs que exploren en profunditat gairebé cadascuna d'aquestes alteracions, però aquest no és el cas de l'esplenomegàlia, un fenomen que roman poc estudiat (46-48).

La melsa és un òrgan que presenta una divisió en àrees estructurals i funcionals. El seu parènquima es divideix en zones de polpa blanca, l'àrea de teixit limfoide de la melsa on té lloc la formació i maduració de limfòcits, incloses en la polpa vermella, constituïda bàsicament d'una xarxa de sinusoides amb la funció de filtrar la sang i retirar les cèl·lules sanguínies velles o defectuoses de la circulació i destruir-les. A més a més, la melsa actua de reservori de cèl·lules sanguínies (49).

L'esplenomegàlia, o increment patològic de la grandària de la melsa, és una conseqüència comú de la hipertensió portal i les malalties cròniques del fetge. En general resulta asimptomàtica, i sovint s'acompanya d'hiperesplenisme. També implica un risc de ruptura, ja sigui espontània o deguda a traumatismes, amb hemoperitoni massiu (46-48). Tradicionalment, l'esplenomegàlia associada a la

hipertensió portal s'atribueix a l'efecte de la congestió de la melsa producte de l'increment de la pressió portal, però el fet que no existeixi una correlació estricta entre pressió portal i mida de la melsa suggereix que poden existir altres mecanismes implicats en aquest fenomen (47).

El tercer treball dels que conformen la present tesi doctoral es va centrar en l'estudi de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal, de cara a caracteritzar-la en major profunditat del que s'havia fet anteriorment i determinar quins altres mecanismes, a més a més de la congestió, intervenen en l'engrandiment de la melsa.

1.7. Models animals d'hipertensió portal

Els models animals permeten l'estudi detallat de les alteracions típiques de la hipertensió portal i els mecanismes moleculars que les provoquen. Existeixen models d'hipertensió portal prehepàtica, útils per a l'estudi de les alteracions en la circulació esplàncnica i la circulació sistèmica, així com models de cirrosi, que permeten també explorar la microcirculació hepàtica (50).

Per a la realització dels tres estudis que formen part d'aquesta tesi s'han fet servir dos models animals diferents, un d'hipertensió portal prehepàtica, la lligadura parcial de la vena porta (PPVL), i un de cirrosi, la lligadura del conducte biliar (CBDL), en rates.

La lligadura parcial de la vena consisteix en practicar una constricció calibrada de la vena porta amb una lligadura amb sutura de seda. El procés consisteix, primerament, en aïllar la vena del teixit circumdant i separar-la de l'artèria hepàtica. Realitzant un nus al voltant de la vena porta i d'una agulla de punta roma i de calibre determinat, quan retirem l'agulla, obtenim una constricció de la vena porta al calibre de l'agulla (50). Una setmana després de la lligadura, les rates han desenvolupat completament la síndrome de la hipertensió portal, amb vasodilatació mesentèrica, circulació hiperdinàmica, increment de la despesa cardíaca i un *shunting* portosistèmic que s'acosta al 100% (estimació del percentatge de sang que passa del territori portal a la circulació sistèmica a través dels vasos col·laterals portosistèmics) (51).

La lligadura parcial de la vena porta s'utilitza freqüentment degut a que es tracta d'un model ràpid i senzill per reproduir les alteracions circulatòries de la hipertensió portal a nivell esplànncic i sistèmic. A més a més, resulta un model excel·lent per a l'estudi de

la col·lateralització portosistèmica, ja que els animals PPVL desenvolupen gran nombre de vasos col·laterals d'una manera molt reproducible.

La lligadura del conducte biliar és un model de cirrosi biliar secundària que resulta especialment adient en rates degut a la seva manca de vesícula biliar. La intervenció consisteix en aïllar el conducte biliar o colèdoc del teixit circumdant i realitzar una doble lligadura amb sutura de seda entre el punt on s'uneixen els conductes hepàtics i el punt on s'uneixen els conductes pancreàtics. A continuació, es secciona el colèdoc entre les dues lligadures per evitar possibles repermeabilitzacions. Aquest model té una taxa alta de mortalitat, sobretot a partir de la cinquena setmana, motiu per el qual és recomanable l'ús profilàctic d'antibiòtics abans de l'operació (ampicil·lina en el nostre cas) i l'administració setmanal de vitamina K per tal de millorar la supervivència (50). Aquest model desenvolupa una fibrosi/cirrosi biliar, amb hipertensió portal molt accentuada (sovint amb un component presinusoidal) i ja a partir de les dues setmanes la pressió portal està elevada, mentre que a les quatre setmanes els animals presenten hipertensió portal severa, circulació hiperdinàmica i un valor de *shunting* portosistèmic proper al 100% (50,52).

2. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

2. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

2.1. Justificació i objectius generals

Segons les dades del Centro Nacional de Epidemiología, la cirrosi hepàtica va ser la tercera causa de mort en homes i dones d'entre 45 i 64 anys a Espanya l'any 2007, únicament per darrera del càncer de pulmó i la isquèmia cardíaca (53). La hipertensió portal i les complicacions que porta associades (trencament de varices gastroesofàgiques, ascites, síndrome hepatorenal, encefalopatia hepàtica...) són les causes de mort i trasplantament més rellevants entre els malalts de cirrosi.

La hipertensió portal, com hem vist anteriorment, pot ser provocada per un increment de la resistència vascular intrahepàtica, per un augment de l'aflux de sang a la vena porta o per una combinació d'ambdós factors, de manera que, aquelles estratègies que atenuïn la circulació hiperdinàmica esplàncnica, la resistència vascular del fetge o tots dos factors, es traduiran en un descens de la pressió portal i una conseqüent reducció del risc de patir complicacions.

Actualment, davant de la inexistència d'alternatives terapèutiques segures i efectives, el tractament de referència majoritàriament aplicat en els pacients amb cirrosi és l'ús de fàrmacs beta-bloquejants (propranolol, nadolol, o timolol). Aquest tipus de tractament té la finalitat de reduir la pressió portal, mitjançant la disminució del flux portal i col·lateral, per tal de prevenir les hemorràgies variceals. L'administració de beta-bloquejants, però, presenta limitacions, la principal, que una fracció dels pacients tractats són "no responsius" i els beta-bloquejants no assoleixen una reducció de la seva pressió portal (54).

Els treballs que conformen la present tesi estan globalment orientats a aportar coneixement sobre la implicació dels factors de creixement i de l'angiogènesi en la hipertensió portal, concretament en el manteniment de la circulació hiperdinàmica esplàncnica, la formació de vasos col·laterals portosistèmics i el conseqüent increment de la pressió portal, subratllant el potencial terapèutic de les estratègies que bloquegen les vies de senyalització proangiogèniques en el tractament de la hipertensió portal.

Els estudis realitzats anteriorment per part del nostre grup, com hem vist en la introducció, han demostrat que la formació de vasos col·laterals portosistèmics i l'augment de flux en el territori esplàncnic, factors clau en l'establiment la hipertensió portal, tenen, en part, origen en un procés angiogènic. Mitjançant la inhibició d'aquest procés des del principi del curs de la hipertensió portal, es corregeix parcialment el progrés d'aquesta síndrome (11,19).

2.2. Estudi 1: Reversió de la hipertensió portal i la circulació hiperdinàmica esplàncnica mitjançant la inhibició combinada de VEGF i PDGF en rates amb hipertensió portal experimental.

Les estratègies antiangiogèniques emprades anteriorment s'havien aplicat en models animals mentre la hipertensió portal es trobava en procés de desenvolupament. A nivell clínic, però, un hipotètic tractament antiangiogènic seria administrat a pacients que presentarien una hipertensió portal en etapes avançades, i no en el període en el qual la síndrome s'està establint, com passava en els nostres models animals. Per aquest motiu, calia confirmar els resultats obtinguts en els estudis de "prevenció" de la hipertensió portal en models "terapèutics", i d'aquesta manera, determinar si els agents antiangiogènics són capaços, no tan sols de prevenir l'establiment de les anomalies circulatòries associades a la hipertensió portal, sinó també de revertir aquestes un cop ja s'han establert.

D'altra banda, i com hem vist en la introducció, el procés de formació de vasos sanguinis a partir de la vasculatura preexistent consta de dues etapes consecutives dirigides, principalment, per dos factors de creixement diferents. Primerament, té lloc una etapa d'activació, proliferació i migració de les cèl·lules endotelials, les quals conformaran l'estructura tubular immadura que esdevindrà el nou vas sanguini. El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular, VEGF, és el principal mediador que regeix aquesta etapa del procés angiogènic. Posteriorment, i amb la finalitat de donar consistència al nou vas i permetre la seva maduració, es produeix el reclutament de cèl·lules mesenquimals, que donaran lloc a un recobriment de pericits i musculatura llisa vascular. El Factor de Creixement Derivat de Plaquetes, PDGF, és, en aquest cas, el principal responsable d'aquesta segona etapa del procés (26).

Amb aquestes premisses, en el primer dels estudis que conformen la present tesi doctoral, es va plantejar un tractament antiangiogènic que constava de dos fàrmacs,

Rapamicina i Glivec, els quals bloquegen, respectivament, les vies de senyalització de VEGF i PDGF. D'aquesta manera, s'incidia en la formació del túbul de cèl·lules endotelials i el seu posterior revestiment de cèl·lules de múscul llis vascular per establir i permetre la maduració dels nous vasos.

La Rapamicina, o Sirolimus, és un inhibidor de la Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), una proteïna serina/treonina kinasa que, com a integrador de diverses vies de senyalització, regula mecanismes com el creixement, la proliferació, la migració i la supervivència cel·lular o la transcripció proteica. La inhibició de mTOR mitjançant Rapamicina té efectes antiangiogènics a través de la capacitat de Rapamicina d'antagonitzar VEGF a dos nivells: per un costat, reduint la seva producció i per altra banda interferint en la senyalització desencadenada per VEGF a través del receptor VEGFR-2 i de les vies PI3K i Raf/MEK/ERK (55,56,37).

El Glivec, també conegut com Imatinib, té la capacitat d'inhibir l'activació de diverses proteïnes tirosina kinasa, entre les quals, el receptor β del PDGF (PDGFR- β), així com la kinasa BCR-ABL i el receptor del factor c-Kit de cèl·lules mare. Pel que fa al PDGFR- β , l'activació d'aquest receptor per part del seu lligand, en aquest cas el PDGF, implica una fosforilació. El Glivec bloqueja el lloc d'unió de l'ATP al domini tirosina kinasa del receptor, impeding així la seva fosforilació. L'efecte del Glivec sobre la kinasa BCR-ABL i el receptor de c-Kit no tindria efectes importants de cara a l'estudi de la hipertensió portal (57,58).

El tractament dels animals amb hipertensió portal amb aquests fàrmacs es va dur a terme seguint dues pautes: una de "prevenció", similar a l'emprada en els estudis anteriors, administrant Rapamicina i Glivec des del moment de la inducció de la hipertensió portal i durant 5 dies, i una altra de "reversió", en la qual els tractaments es van iniciar un cop la síndrome de la hipertensió portal ja es trobava plenament establerta, una setmana després de la seva inducció, i es van administrar durant dues setmanes.

La finalitat del treball consistia, en primer lloc, en demostrar l'associació de la hipertensió portal amb una possible sobreexpressió, no només de VEGF, com ja s'havia reportat anteriorment, sinó també de PDGF i, conseqüentment, que el bloqueig simultani de les vies de senyalització de VEGF i PDGF en les rates amb una hipertensió portal plenament establerta, incidint tan en les cèl·lules endotelials com en

els pericits, produiria una reversió dels canvis en la circulació esplàncnica més important que el bloqueig de cadascuna d'elles per separat.

2.3. Estudi 2: Efectes beneficiosos de l'inhibidor multikinasa Sorafenib sobre la circulació esplàncnica, intrahepàtica i portocol·lateral en rates amb hipertensió portal i cirròtiques.

Com a continuació natural de la feina iniciada en el primer dels treballs presentats es va plantejar un nou estudi que permetés aprofundir en el coneixement dels efectes dels agents antiangiogènics en les alteracions associades a la hipertensió portal, de cara a definir la viabilitat dels tractaments d'aquest tipus com a estratègia terapèutica en pacients.

L'objectiu del nou estudi, doncs, va ser el de determinar els efectes de Sorafenib, un fàrmac que inhibeix de manera potent les vies de senyalització de VEGF, PDGF i Raf/MEK/ERK (totes elles implicades en la modulació de l'angiogènesi) (59,60), en diverses alteracions circulatòries associades a la hipertensió portal: alteració de la circulació esplàncnica, intrahepàtica, sistèmica i col·lateral portosistèmica. En aquest cas, el tractament es va aplicar a dos models animals diferents: rates amb hipertensió portal prehepàtica, induïda per lligadura parcial de la vena porta (PPVL) i rates amb cirrosi biliar secundària induïda per lligadura del conducte biliar (CBDL) i en ambdós casos, el tractament es va administrar seguint una pauta de tipus terapèutic, és a dir, iniciant-lo quan la hipertensió portal ja estava plenament desenvolupada (50-52).

En el moment de dissenyar l'estudi, el fàrmac ja era administrat a pacients humans, concretament en casos de càncer de cèl·lules clares de ronyó (61) i càncer hepatocel·lular, aquest darrers, en molts casos, amb hipertensió portal (62). Aquests fets donarien peu, en cas d'obtenir bons resultats en els estudis en models animals, a plantejar-se l'aplicació d'una teràpia antiangiogènica amb Sorafenib en els malalts amb hipertensió portal

El Sorafenib (BAY 43-9006) basa la seva capacitat antiangiogènica en el bloqueig dels dominis tirosina kinasa dels receptors VEGFR-2 i PDGFR- β , així com en la inhibició de l'activació de la proteïna serina-treonina kinasa Raf-1, la qual transmet l'estímul de proliferació cel·lular a través de la via Raf/MEK/ERK (59,60).

Com ja hem dit, mitjançant aquest treball es perseguia aconseguir un coneixement sistemàtic i exhaustiu dels efectes d'un tractament antiangiogènic sobre les diferents alteracions circulatòries derivades de la hipertensió portal, de cara a definir el potencial d'aquesta estratègia terapèutica en pacients humans. D'aquesta manera es pretenia descartar que un tractament que pogués resultar beneficiós a nivell de la circulació esplàncnica tingués un efecte negatiu sobre la circulació intrahepàtica o la circulació sistèmica.

2.4. Estudi 3: Importància de la senyalització per mTOR en la patofisiologia de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal.

L'esplenomegàlia, l'increment patològic de la mida de la melsa, és una conseqüència comú de la hipertensió portal i les malalties cròniques del fetge. Les rates dels models animals d'hipertensió portal, entre ells la lligadura parcial de la vena porta i la lligadura del conducte biliar, presenten esplenomegàlia.

Degut a que, en general, l'esplenomegàlia resulta asimptomàtica en els pacients cirròtics, és un fenomen relativament poc estudiat (46,48). L'observació de l'esplenomegàlia en aquests pacients s'associa amb un major risc de patir complicacions relacionades amb la hipertensió portal (63). La majoria dels pacients amb malalties hepàtiques que desenvolupen esplenomegàlia no presenten símptomes relacionats amb la mida de la melsa, sinó amb la seva activitat. La melsa, entre d'altres funcions, s'ocupa de retenir i destruir les cèl·lules sanguínies velles o defectuoses de la circulació. L'increment d'aquesta activitat de la melsa s'anomena hiperesplenisme, i a través de la destrucció ràpida i prematura de cèl·lules circulants pot comportar l'aparició de citopènies. La trombocitopènia especialment pot alterar i limitar les opcions de tractament dels pacients cirròtics. En termes generals, la major manifestació d'una melsa molt engrandida és el dolor, però també implica un risc de ruptura, espontània o deguda a petits traumatismes. A més a més, poden produir-se episodis d'isquèmia o infarts esplènics (46-48).

Com s'ha mencionat anteriorment, l'establiment de l'esplenomegàlia s'atribueix, principalment, a la congestió venosa passiva que té lloc a la melsa com a conseqüència de l'increment de pressió al territori portal, però no existeix una correlació clara entre la pressió portal i la mida de la melsa (47), fet que indicaria que

hi hauria altres mecanismes implicats en l'establiment de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal (48).

L'objectiu de l'estudi, per tant, era el d'estudiar l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal, de cara a caracteritzar-la en major profunditat del que s'havia fet anteriorment i determinar quins altres mecanismes, a més a més de la congestió, intervenen en l'engrandiment de la melsa.

Arran d'aquesta caracterització de l'esplenomegàlia es van identificar una sèrie de processos angiogènics, fibrogènics i de proliferació del compartiment limfoide, en la melsa dels animals amb hipertensió portal, fets que van suggerir que la inhibició de mTOR podria ser una estratègia terapèutica prometedora per tal de contrarestar les alteracions que condueixen a l'esplenomegàlia. El motiu és que mTOR, com ja hem mencionat anteriorment, és una proteïna serina/treonina kinasa que s'expressa de manera ubiqua i està implicada en la regulació del creixement i la proliferació cel·lular, jugant un paper clau en processos immunològics, angiogènics i fibrogènics (55,56).

3. CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS

3. CÒPIES DELS ARTICLES ORIGINALS

- 3.1. 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;46:1208-17.
- 3.2. **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;49:1245-56.
- 3.3. **Mejias M**, Garcia-Pras E, Gallego J, Mendez R, Bosch J, Fernandez M. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. **J Hepatol** 2010;52:529-39.

Reversal of Portal Hypertension and Hyperdynamic Splanchnic Circulation by Combined Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor Blockade in Rats

Mercedes Fernandez,¹ Marc Mejias,¹ Ester Garcia-Pras,¹ Raul Mendez,² Juan Carlos Garcia-Pagan,¹ and Jaime Bosch¹

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) pathways are crucial to angiogenesis, a process that contributes significantly to the pathogenesis of portal hypertension. This study determined the effects of inhibition of VEGF and/or PDGF signaling on hyperdynamic splanchnic circulation and portosystemic collateralization in rats with completely established portal hypertension, thus mimicking the situation in patients. Portal vein-ligated rats were treated with rapamycin (VEGF signaling inhibitor), Gleevec (PDGF signaling inhibitor), or both simultaneously when portal hypertension was already fully developed. Hemodynamic studies were performed by transit-time flowmetry. The extent of portosystemic collaterals was measured by radioactive microspheres. The expression of angiogenesis mediators was determined by Western blotting and immunohistochemistry. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling significantly reduced splanchnic neovascularization (i.e., CD31 and VEGFR-2 expression) and pericyte coverage of neovessels (that is, α -smooth muscle actin and PDGFR- β expression) and translated into hemodynamic effects as marked as a 40% decrease in portal pressure, a 30% decrease in superior mesenteric artery blood flow, and a 63% increase in superior mesenteric artery resistance, yielding a significant reversal of the hemodynamic changes provoked by portal hypertension in rats. Portosystemic collateralization was reduced as well. **Conclusions:** Our results provide new insights into how angiogenesis regulates portal hypertension by demonstrating that the maintenance of increased portal pressure, hyperkinetic circulation, splanchnic neovascularization, and portosystemic collateralization is regulated by VEGF and PDGF in portal hypertensive rats. Importantly, these findings also suggest that an extended antiangiogenic strategy (that is, targeting VEGF/endothelium and PDGF/pericytes) may be a novel approach to the treatment of portal hypertension. (HEPATOLOGY 2007;46:1208-1217.)

Abbreviations: MAP, mean arterial pressure; PDGF, platelet-derived growth factor; PDGFR- β , PDGF receptor- β ; PH, portal hypertension; PP, portal pressure; PPVL, partial portal vein ligation; RAPA, rapamycin; α -SMA, α -smooth muscle actin; SMAR, superior mesenteric artery resistance; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; SO, sham operated; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, VEGF receptor-2.

From the ¹Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic, Ciberehd, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and ²Centre de Regulacio Genomica (CRG), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

Received December 5, 2006; accepted April 18, 2007.

Supported by the Ministerio de Educacion y Ciencia (grant SAF2005-05825) and Instituto de Salud Carlos III (grants PI02739, PI040655, and CO3/02).

Address reprint requests to: Mercedes Fernandez, Ph.D., Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mercefernandez@ub.edu; fax: (34) 93-2279348.

Copyright © 2007 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21785

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Portal hypertension (PH) is the most important complication of chronic liver diseases and is a leading cause of mortality and liver transplantation worldwide.¹ A characteristic feature of the PH syndrome is development of hyperdynamic splanchnic circulation, with an increase in blood flow in splanchnic organs draining into the portal vein and a subsequent increase in portal venous inflow.² Such increased portal venous inflow is a significant factor in maintaining and worsening portal pressure elevation. We have recently demonstrated that an increase in the splanchnic vascular bed size mediated by a vascular endothelial growth factor (VEGF)-dependent angiogenic process significantly contributes to increased overall blood flow in splanchnic tissues of PH animals.³⁻⁶ In addition, this VEGF-dependent angiogenesis also plays a crucial role in the formation of portal-systemic collateral vessels, which include the gastro-

esophageal varices.³⁻⁶ Collectively, these prior studies highlighted the importance of angiogenesis in the pathogenesis of PH and suggested that antiangiogenic treatment might be a promising therapeutic strategy to prevent the progression of the PH syndrome.

In clinical practice, however, an antiangiogenic drug would have to be given to patients presenting with PH at rather advanced stages.⁷ Thus, it was imperative to confirm our previous prophylactic studies by therapeutic models that most closely mirror advanced human PH and to determine whether antiangiogenic agents could not only prevent but also get the circulatory abnormalities associated with PH to revert once they are fully developed. Therefore, we evaluated long-term antiangiogenic treatment in an animal model of established portal hypertension induced by partial portal vein ligation.

Recent studies indicate that in the process of neovascularization, VEGF plays the predominant role in the formation of new blood vessels by activating proliferation of endothelial cells and the subsequent formation of an endothelial tubule, whereas maturation of newly formed vessels is mainly modulated by proangiogenic platelet-derived growth factor (PDGF), which regulates the investiture of the endothelial tubule with mural cell and pericyte populations, thereby stabilizing the vascular architecture of the nascent vessel.⁸⁻¹² Thus, it can be hypothesized that established PH could be associated with overexpression of PDGF in splanchnic tissues and that reversal of splanchnic circulatory changes associated with PH might be greater after the combined blockade of VEGF and PDGF (i.e., after simultaneous targeting of endothelial cells and pericytes) than after either alone.

The purpose of the study was to test this hypothesis. We used rapamycin and Gleevec as strategies to inhibit the VEGF and PDGF signaling pathways, respectively.¹³⁻¹⁸ We chose these drugs because, in addition to being well-known inhibitors of the VEGF and PDGF pathways, they are already broadly used in the treatment of several human malignancies and have been proven to be well tolerated in these indications.¹³⁻¹⁸

Our study is the first to our knowledge to describe the successful therapeutic use of the combination of rapamycin and Gleevec in an animal model of PH. We demonstrate that treatment with rapamycin plus Gleevec reversed the hemodynamic and vascular changes provoked by PH in the partial portal vein ligated rat model. Taking into account the limitations of experimental studies, we believe our findings will stimulate consideration of this novel therapeutic approach in patients suffering from advanced PH, in which VEGF and PDGF signaling pathways may be up-regulated, as suggested by the findings in the currently investigated PH animals.

Materials and Methods

Materials. Rapamycin (RAPA) was purchased from Wyeth Europe (Berkshire, UK). Gleevec was from Novartis (West Sussex, UK). Polyclonal antibodies against rat CD31 (sc-8306 and sc-1506), VEGF (sc-507), VEGF receptor-2 (VEGFR-2; sc-315), PDGF-BB (sc-7878), PDGF receptor- β (PDGFR- β sc-1627), and GAPDH (sc-32233) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Monoclonal anti- α -smooth muscle actin (α -SMA; A-2547) and anti- α -tubulin (T-9026) were from Sigma (St. Louis, MO). Peroxidase-conjugated secondary antibody was from Stressgen (Sidney, British Columbia, Canada). ⁵¹Cr-labeled microspheres were from Perkin-Elmer (Boston, MA). A protein assay kit and nitrocellulose membranes were from Bio-Rad (Hercules, CA). All other reagents and chemicals were from Sigma.

Animals and Treatments. Portal hypertension (PH) was induced in male Sprague-Dawley rats (300–350 g body weight) by partial portal vein ligation (PPVL) as previously described.¹⁹ Briefly, under anesthesia (80 mg/kg ketamine plus 12 mg/kg xylacin, intramuscularly), 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. In sham-operated (SO) rats, the portal vein was isolated and similarly manipulated but not ligated.

In a first experimental protocol, rats were treated with the VEGF signaling inhibitor RAPA (2 mg kg⁻¹ day⁻¹ intraperitoneally; PPVL: n = 12, SO: n = 4),^{13,14} the PDGF signaling inhibitor Gleevec (20 mg kg⁻¹ day⁻¹ intraperitoneally; PPVL: n = 6, SO: n = 5),¹⁵⁻¹⁸ a combination of RAPA plus Gleevec (PPVL: n = 4, SO: n = 4), or vehicle (700 μ L of NaCl 0.9%; PPVL: n = 13, SO: n = 6) for 5 days starting immediately after PPVL or SO.

In a second protocol, rats were treated with RAPA (PPVL: n = 9, SO: n = 5), Gleevec (PPVL: n = 9, SO: n = 5), RAPA plus Gleevec (PPVL: n = 8, SO: n = 5), or vehicle (PPVL: n = 12, SO: n = 4) over a 2-week period, commencing 1 week after PPVL (or SO in controls), when portal hypertension was fully established.^{3,4}

Doses of RAPA and Gleevec were selected on the basis of earlier work showing that these doses efficiently inhibit VEGF and PDGF signaling, respectively.¹³⁻¹⁸ All procedures were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication 86-23, revised 1985).

Hemodynamic Studies. Under anesthesia, PE-50 catheters were introduced into a femoral artery and the

portal vein and connected to highly sensitive pressure transducers to measure arterial pressure (MAP, mm Hg) and portal pressure (PP, mm Hg), respectively. Then, a nonconstrictive perivascular transit-time ultrasonic flow probe (Transonic Systems, New York, NY) was placed around the superior mesenteric artery and connected to a flowmeter to measure superior mesenteric artery blood flow (SMABF, mL min⁻¹ 100 g⁻¹). Superior mesenteric artery resistance (SMAR, mmHg mL⁻¹ min⁻¹ 100 g⁻¹) was calculated as: (MAP - PP)/SMABF.²⁰

Determination of Extent of Portal-Systemic Collateral Vessel Formation. The extent of portal-systemic collateralization was quantified by injection of ⁵¹Cr-labeled microspheres (diameter 15 ± 3 μm; specific activity 52.68 mCi/g) into the spleen.³⁻⁶ Rats were then sacrificed, and radioactivity in liver and lungs was determined in a γ-scintillation counter. This enabled quantification of the degree of collateral formation on a scale from 0% to 100% by this equation: collateralization (%) = (lung radioactivity/[lung radioactivity + liver radioactivity]) × 100.

Western Blot Analysis. Tissue samples were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 2 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Nonidet P40, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 0.1% deoxycholate. Samples were then centrifuged for 30 minutes at 10,000g. The supernatant was collected, and the protein concentration was measured using a colorimetric assay. Proteins (100 and 200 μg) were separated by SDS-PAGE electrophoresis and subsequently transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in incubation buffer and incubated with antibodies against rat CD31, VEGF, VEGFR-2, PDGF, PDGFR-β, and α-SMA (1:500 dilution). Bound antibody was detected with peroxidase-linked secondary antibody and a chemiluminescence detection system. Loading accuracy was evaluated by membrane rehybridization with monoclonal antibodies against α-tubulin or GAPDH.³⁻⁶

Immunohistochemistry. Immunohistochemical detection of CD31 and α-SMA was carried out on sections from paraffin-embedded mesenteric tissues fixed in 10% neutral-buffered formalin solution. Endogenous peroxidase activity was blocked using methanol containing 0.3% H₂O₂. Antigen retrieval for CD31 detection was performed using citrate buffer. Nonspecific antibody binding was prevented by incubation with 10% normal horse serum. Sections were incubated with primary antibodies against CD31 (diluted 1:200), and α-SMA (diluted 1:500), and then the bound antibodies were visualized using diaminobenzidine (DAB) as the chromo-

gen. For the negative control, phosphate-buffered saline was used instead of the primary antibody.

Measurement of Vascular Areas. Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin. Tissues were sectioned (thickness of 2 μm), and slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immunostained for CD31 and α-SMA. Quantitative analysis of angiogenesis was performed with the assistance of ImageJ version 1.37 software (NIH, Bethesda, MD) by scanning the entire tissue section and counting the areas occupied by vascular structures. We obtained a value from each tissue section (1 section per rat) and then averaged the results from individual sections in each experimental group (3-5 sections per group). Group values reflect the average readings from all sections in the group. The results of neovascularization measurements are expressed as the mean area (± SEM; expressed in square micrometers) occupied by vascular structures in a tissue field measuring 1 mm².

Determination of Rapamycin Concentration in Whole Blood. Blood rapamycin was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem ultraviolet detection (HPLC-UV) as previously described.²¹ In brief, to each whole-blood sample was added sodium acetate buffer (0.1M, pH 4.7), demethoxyrapamycin (2.5 μg/mL), and 1-chlorobutane. After sample centrifugation, the organic extract was evaporated at 45°C under nitrogen gas. The dried extracts were reconstituted with methanol/H₂O, and the supernatants were analyzed with a reverse-phase C18 column at 50°C under a flow rate of 1.1 mL/min for 30 minutes in the HPLC system. Rapamycin was detected by ultraviolet absorption at 278 nm. The calibration range was 2.5-100 ng/mL.

Statistical Analysis. Values are expressed as means ± SEMs and compared using the unpaired Student *t* test and ANOVA analysis. Statistical significance was established at *P* < 0.05.

Results

Increased VEGF and PDGF Expression in PH Rats. Given the importance of growth factors VEGF and PDGF in vascular formation and maturation, we hypothesized that their expression could be up-regulated in PH and that simultaneous inhibition of both the VEGF and the PDGF pathways might be expected to show greater antiangiogenic activity than inhibition of only 1 of these signaling pathways. To demonstrate this, we first measured VEGF and PDGF protein expression in intestines from SO rats and also 1, 5, 10 and 20 days after induction of PH. PDGF expression was minimal in SO rats (Fig. 1).

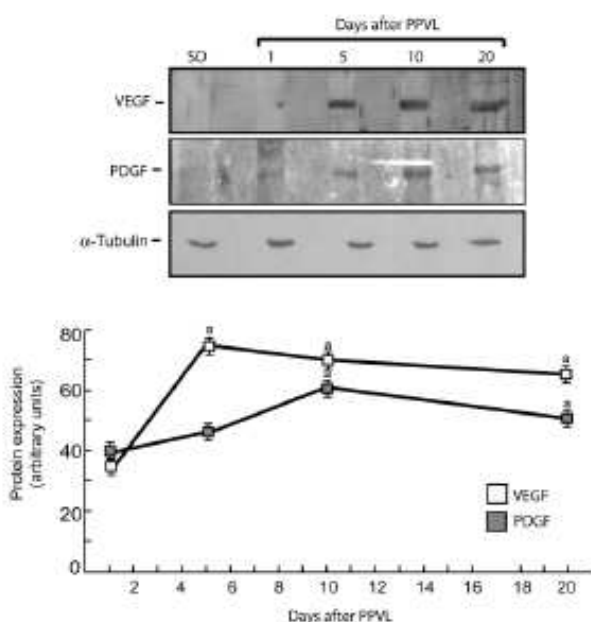


Fig. 1. Expression of VEGF and PDGF on days 1, 5, 10, and 20 after PPVL and also in SO rats. Representative blots are shown on top, and quantification of expression normalized to α -tubulin and expressed as arbitrary units is shown on bottom: (a) $P < 0.05$ versus SO rats.

After PPVL, however, expression of PDGF increased progressively, with the highest expression observed on day 10 (Fig. 1). VEGF expression also increased as the PH syndrome progressed, but peak VEGF expression (on day 5) preceded the appearance of the PDGF peak (Fig. 1).

Effects of Angiogenesis Blockade When PH Was Actively Developing. Next, we determined the effects of VEGF and/or PDGF inhibition when PH was actively developing in rats. For that purpose, treatment with RAPA, Gleevec, a combination of RAPA plus Gleevec, or vehicle was started immediately after PPVL or SO and terminated 5 days later.

RAPA effectively prevented increased VEGF expression (Fig. 2A) and the formation of new blood vessels in the splanchnic territory of PPVL rats, as reflected by significant inhibition in the intestinal expression of vascular endothelial cell markers CD31 and VEGFR-2 (Fig. 2A).¹¹ These findings were further identified on mesenteric sections stained with H&E and immunostained for CD31 (Fig. 2B). Quantitative analysis confirmed a significantly ($P < 0.05$) greater vascular area in PPVL-vehicle rats than in SO-vehicle rats and a significant decrease in vascular area after RAPA treatment in PPVL rats but not in SO rats (Fig. 2C). We also found that expression of the vascular smooth muscle cell marker α -SMA was not significantly modified by the RAPA treatment in the mesentery from PPVL or SO rats (Fig. 2D), indicating that, at

least in the experimental settings used in this study, RAPA had no significant antiproliferative effects on smooth muscle. These Western blot results show that the amount of α -SMA per cell was not modified by RAPA, although the net amount of α -SMA in the mesentery tissue was decreased by RAPA as a consequence of the overall reduction in vascularization caused by this treatment, as we demonstrated by immunohistochemistry (Fig. 2B).

The RAPA-induced inhibition of splanchnic neovascularization was paralleled by significant prevention of the hyperdynamic splanchnic circulation of PPVL rats, as indicated by a significant 24% decrease in SMABF and a 66% increase in SMAR compared with that in vehicle-treated PPVL rats (Fig. 3), reaching values not significantly different from those observed in RAPA-treated SO rats (Fig. 3). Despite the decrease in SMABF, PP was not reduced by RAPA in PPVL animals. Instead, it increased compared with that in vehicle-treated PPVL rats ($P = 0.19$; Fig. 3). That was most likely a result of the marked, 67% reduction in portal-systemic collateral vessel formation observed in PPVL rats after VEGF signaling inhibition (Fig. 3). Notably, the extent of portal-systemic collaterals in PPVL rats after RAPA treatment was not statistically different from that in RAPA-treated SO rats ($P = 0.12$; Fig. 3). In addition, RAPA increased MAP, both in PPVL rats (108.68 ± 3.70 mm Hg in vehicle vs. 131.18 ± 3.33 mm Hg in RAPA; $P < 0.001$) and in SO animals (111.02 ± 4.53 mm Hg in vehicle vs. 140.73 ± 2.97 mm Hg in RAPA; $P < 0.01$), whereas it did not significantly change heart rate compared with the vehicle (PPVL rats: 348.58 ± 9.77 vs. 356.77 ± 10.73 beats/min, respectively; $P = 0.6$; SO rats: 326.00 ± 15.11 vs. 324.17 ± 14.18 beats/min, respectively; $P = 0.9$). Values of PP, SMABF, and SMAR and the extent of collateralization were similar when comparing SO rats treated with RAPA or with vehicle (Fig. 3). Whole-blood RAPA concentration in RAPA-treated rats was 46.63 ± 3.5 ng/mL.

In addition, Gleevec had no significant effects on any of the hemodynamic parameters studied (Table 1). Moreover, the combination of RAPA+Gleevec had hemodynamic effects that were not significantly different from those observed after treatment with RAPA alone (Table 1). In PPVL rats, the decrease in the extent of portal-systemic collaterals observed after RAPA+Gleevec (78% decrease) was more pronounced than that observed after RAPA alone (67% decrease), but the difference was not statistically significant ($14.77 \pm 6.48\%$ vs. $21.64 \pm 7.30\%$, respectively; $P = 0.6$).

Collectively taken, these data indicate that blockade of VEGF signaling by RAPA markedly prevents the development of hyperdynamic splanchnic circulation, splanchnic neovascularization, and portal-systemic collat-

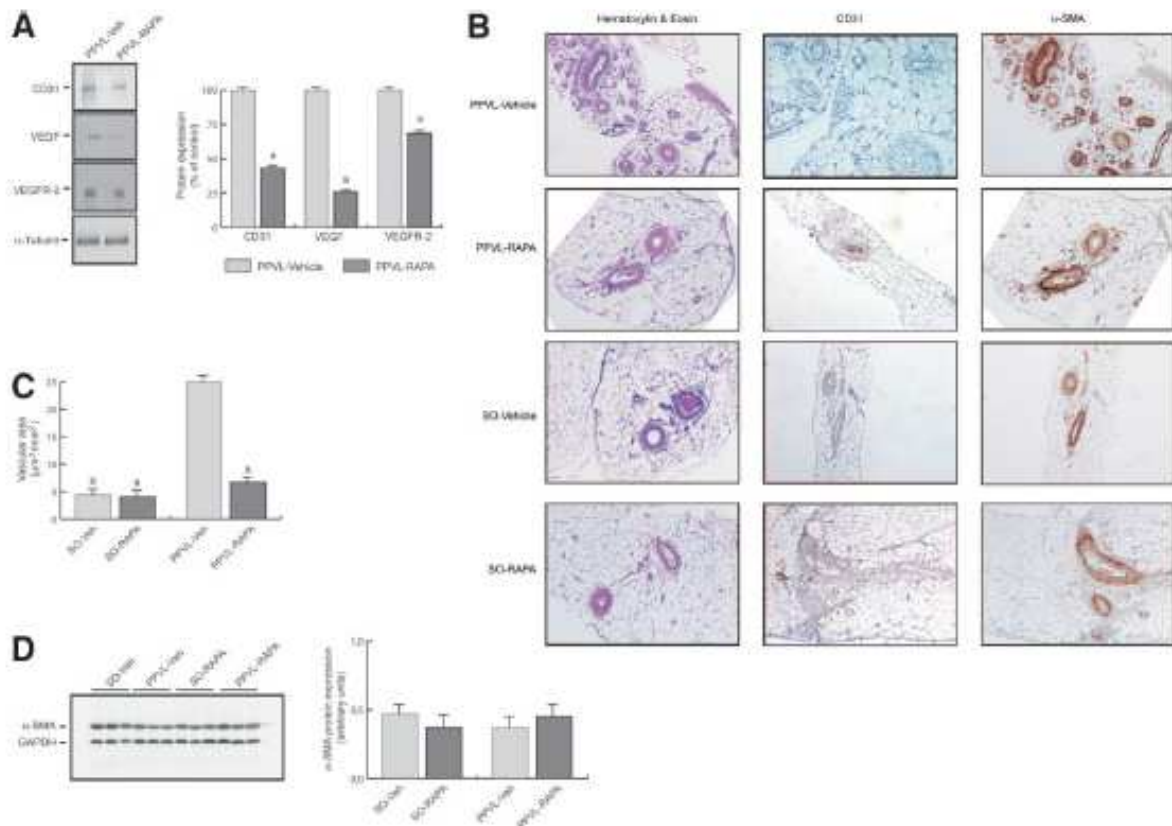


Fig. 2. Effects of RAPA on angiogenesis mediators when PH was actively developing. (A) Expression of CD31, VEGF, and VEGFR-2 in the intestines of PPVL rats treated with RAPA or vehicle. Representative Western blots are shown on the left, and quantification of protein expression normalized to α -tubulin and expressed as percentages of controls (PPVL-vehicle) is shown on the right. (B) Representative histological images of mesentery tissues stained with H&E or immunostained for CD31 and α -SMA from PPVL and SO rats treated with RAPA or vehicle. (Original magnification $\times 40$ [$\times 100$ magnification in CD31 staining of PPVL-vehicle].) (C) Quantitative analysis of neovascularization in the mesentery from RAPA- or vehicle-treated PPVL and SO rats. (a) $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle. (D) Expression of α -SMA in the mesentery of PPVL and SO rats treated with RAPA or vehicle. Representative Western blot is shown on the left, and quantification of protein expression normalized to GAPDH and expressed as arbitrary units is shown on the right.

eral formation when administered at the time of portal hypertension initiation.

Effects of Angiogenesis Blockade When PH Was Completely Established. We then addressed the effects of inhibiting VEGF signaling, PDGF signaling, or signaling by both pathways simultaneously on rats that had an already established PH syndrome. For this purpose, 7 days after induction of PH (or after SO), rats were given RAPA, Gleevec, a combination of RAPA and Gleevec, or vehicle over a 2-week period.

Therapy with RAPA alone in PPVL rats was effective in reducing the intestinal expression of VEGF and translated into substantial inhibition of splanchnic neovascularization, as indicated by significant down-regulation of intestinal CD31 and VEGFR-2 expression compared with that in vehicle-treated PPVL rats (Fig. 4A). RAPA did not significantly affect expression of PDGF,

PDGFR- β , and α -SMA in PPVL rats (Fig. 4A). To examine this further, we identified vascular structures in mesentery sections by H&E staining and by immunohistochemical staining for CD31 and α -SMA (Fig. 4B). Quantitative analysis of neovascularization revealed that vehicle-treated PPVL mesenteries were more angiogenic than were those of SO-vehicle and that RAPA treatment markedly and significantly reduced this neovascularization (Fig. 4C).

In PPVL rats, hyperdynamic splanchnic circulation was also significantly reduced after RAPA treatment, with a 17% decrease in SMABF and a 38% increase in SMAR (Fig. 5). Of note, PP was significantly decreased by RAPA (by 17%, $P < 0.01$; Fig. 5), whereas MAP increased compared with vehicle (117.93 ± 2.32 vs. 104.12 ± 3.62 mm Hg, respectively; $P < 0.05$). RAPA did not significantly modify heart rate ($351.83 \pm$

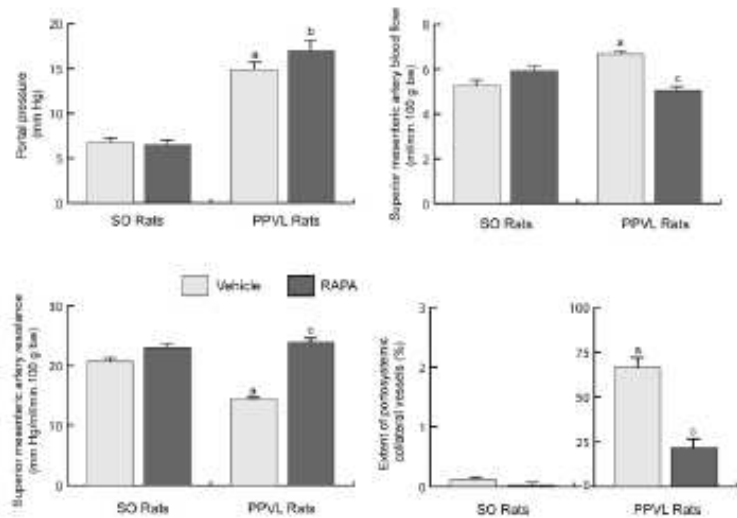


Fig. 3. Effects of RAPA on splanchnic hemodynamic parameters and extent of portal-systemic collateral vessels when FH was actively developing. (a) $P < 0.05$ versus SO-vehicle; (b) $P < 0.05$ versus SO-RAPA; (c) $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle.

24.14 beats/min in vehicle vs. 316.67 ± 17.43 beats/min in RAPA; $P = 0.3$). In contrast to the inhibitory effect of RAPA on splanchnic neovascularization, PP, and mesenteric blood flow, the degree of portal-systemic collateralization was not significantly different when comparing RAPA-treated and vehicle-treated rats (Fig. 5). In SO rats, RAPA did not significantly affect any of the hemodynamic parameters studied (Fig. 5). Whole-blood RAPA concentration (steady-state) in RAPA-treated rats was 16.3 ± 1.5 ng/mL, which was in the 10–60 ng/mL range required to get maximum effectiveness with limited toxicity.²¹

Treatment with Gleevec alone significantly diminished the intestinal expression of PDGF as well as that of pericyte-specific markers α -SMA and PDGFR- β in PPVL rats compared with vehicle but did not significantly modify splanchnic neovascularity (i.e., CD31 and VEGFR-2 expression), SMABF, SMAR, PP, and the extent of portal-systemic collaterals (Figs. 4A and 5). MAP was significantly higher in Gleevec-treated PPVL rats than in those receiving vehicle (118.57 ± 4.96 vs. 104.12 ± 3.62 mm Hg, respectively; $P < 0.05$), whereas heart rate was similar in both groups (359.57 ± 8.16 vs. 351.83 ± 24.14 beats/min, re-

spectively; $P = 0.8$). In SO rats, Gleevec had no significant hemodynamic effects (Fig. 5).

Interestingly, treatment of PPVL rats with a combination of RAPA plus Gleevec effectively inhibited expression of VEGF and PDGF protein and also caused a marked and significant reduction in the extent of splanchnic neovascularization (i.e., in expression of endothelial cell markers CD31 and VEGFR-2) and in the perivascular cell coverage of neovessels (i.e., in expression of pericyte markers α -SMA and PDGFR- β), shown in Fig. 4A. In addition, this therapy translated into hemodynamic effects as marked as a 40% decrease in PP, a 30% decrease in SMABF, and a 63% increase in SMAR (Fig. 5), whereas MAP increased compared with vehicle (127.05 ± 3.37 vs. 104.12 ± 3.62 mm Hg, respectively; $P < 0.01$), and heart rate was unchanged (366.00 ± 6.66 vs. 351.83 ± 24.14 beats/min, respectively; not significant). Importantly, RAPA+Gleevec yielded significantly greater effects than the addition of the effects of either drug alone. Of note, the RAPA+Gleevec treatment was also accompanied by a modest but significant decrease in the degree of portal-systemic collateral vessels (9% decrease, $P < 0.05$; Fig. 5). In SO rats, treatment with

Table 1. Hemodynamic Effects of Treatment with Gleevec or Combination of RAPA+Gleevec for 5 Days Starting Immediately after Induction of Portal Hypertension or Sham Operation

	PP (mm Hg)	SMAR (mm Hg mL ⁻¹ min ⁻¹ 100 g ⁻¹)	MAP (mm Hg)	HR (beats/min)
PPVL-Vehicle (n = 13)	14.9 ± 1.0	14.4 ± 0.8	108.7 ± 3.7	356.8 ± 10.7
PPVL-Gleevec (n = 6)	14.0 ± 1.3	14.2 ± 1.1	116.7 ± 7.5	378.0 ± 13.5
PPVL-RAPA+Gleevec (n = 4)	13.0 ± 0.7	19.5 ± 1.8*	144.2 ± 4.8*	363.0 ± 9.2
SO-vehicle (n = 6)	6.8 ± 0.5*	20.7 ± 1.7*	111.0 ± 4.5	324.2 ± 14.2
SO-Gleevec (n = 5)	5.3 ± 0.3†	18.3 ± 2.7†	97.4 ± 6.4	344.0 ± 15.4
SO-RAPA+Gleevec (n = 4)	7.2 ± 0.5‡	25.0 ± 4.5	123.0 ± 12.2	320.5 ± 21.1

* $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle. † $P < 0.05$ versus PPVL-Gleevec. ‡ $P < 0.05$ versus PPVL-RAPA+Gleevec.

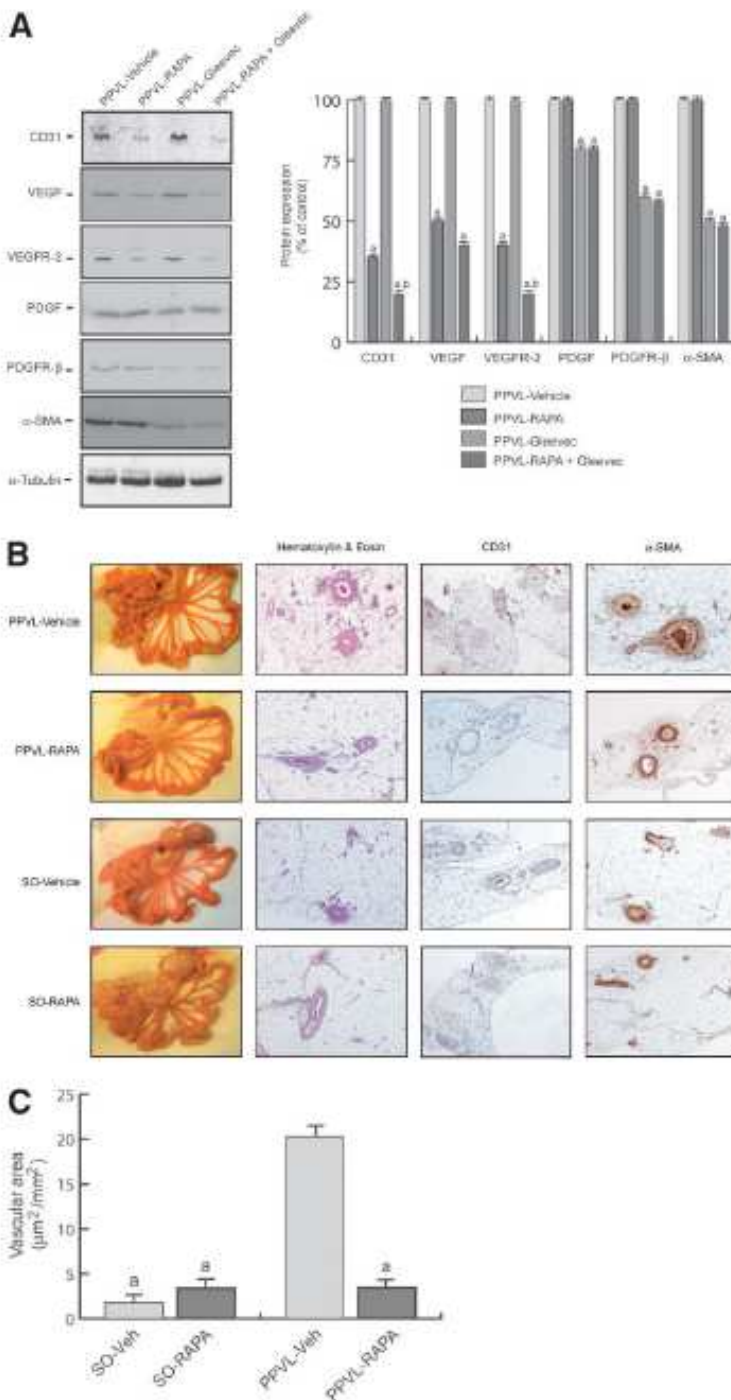


Fig. 4. Effects of RAPA, Gleevec, or RAPA+Gleevec on angiogenesis mediators when PH was completely established. (A) Expression of CD31, VEGF, VEGFR-2, PDGF, PDGFR- β , and α -SMA in the intestines of PPVL rats after treatment with RAPA, Gleevec, RAPA+Gleevec, or vehicle. Representative blots are shown on the left, and quantification of expression normalized to α -tubulin and expressed as percentages of controls (PPVL vehicle) is shown on the right: (a) $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle; (b) $P < 0.05$ versus PPVL-RAPA. (B) Representative mesentery photographs and representative histological images of mesentery sections stained with H&E or immunostained for CD31 and α -SMA from PPVL and SO rats treated with RAPA or vehicle. Original magnification, $\times 40$. (C) Quantitative analysis of neovascularization in the mesentery from PPVL and SO rats treated with RAPA or vehicle. (a) $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle.

RAPA+Gleevec had no significant hemodynamic effects (Fig. 5).

Discussion

The present study demonstrates that the development of hyperdynamic splanchnic circulation and splanchnic

neovasculature and the formation of portal-systemic collateral vessels in PH rats are in part VEGF-dependent angiogenic processes that can be significantly prevented by administration of the VEGF pathway inhibitor RAPA starting at the time of PH initiation. This is very much in line with our recent findings in which other angiogenesis

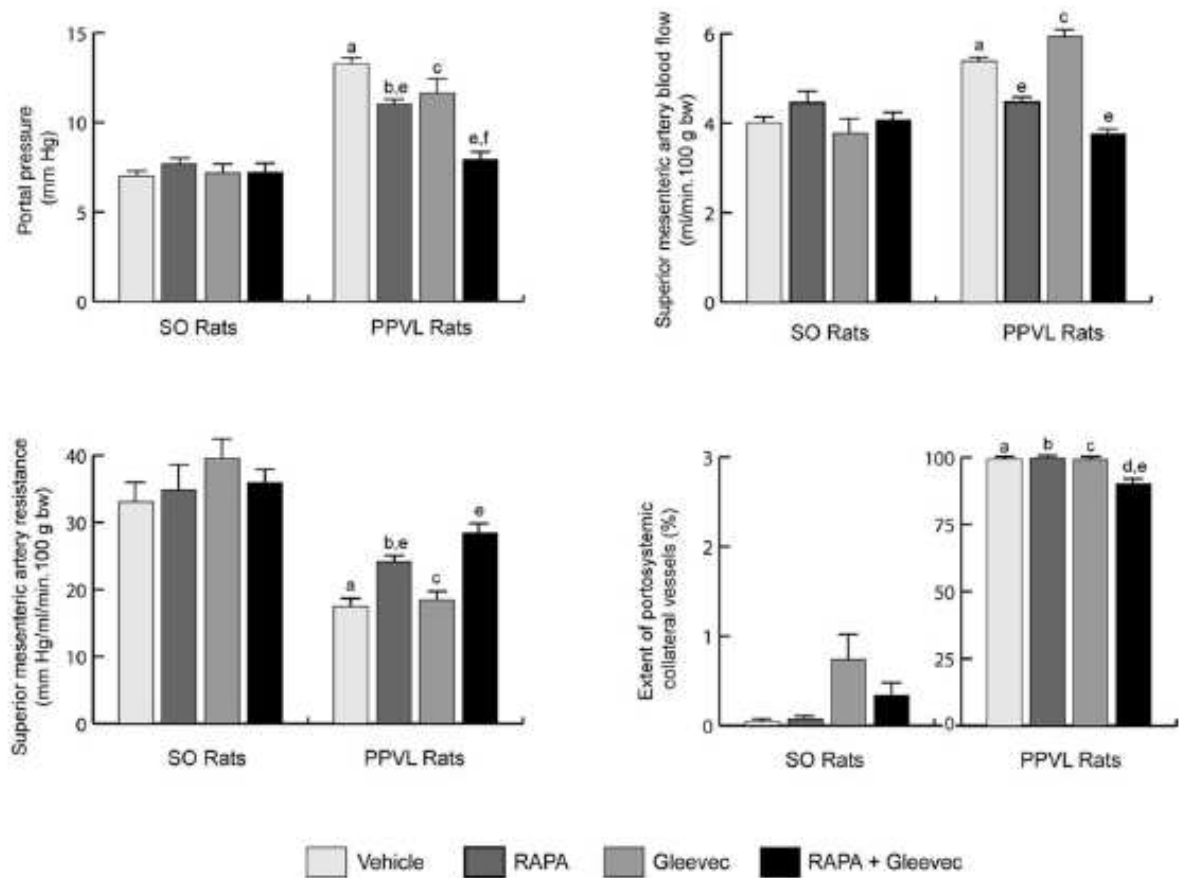


Fig. 5. Effects of RAPA, Gleevec, or RAPA+Gleevec on splanchnic hemodynamic parameters and the extent of portal-systemic collaterals when PH was completely established. (a) $P < 0.05$ versus SO-vehicle; (b) $P < 0.05$ versus SO-RAPA; (c) $P < 0.05$ versus SO-Gleevec; (d) $P < 0.05$ versus SO-RAPA+Gleevec; (e) $P < 0.05$ versus PPVL-vehicle; (f) $P < 0.01$ versus PPVL-RAPA.

inhibitors with different modes of action were used in experimental models of PH to interfere with the VEGF signaling pathway.³⁻⁶ Altogether, these results provide additional support for the idea that angiogenesis plays a key role in the pathogenesis of PH.

However, the principal novel findings of this study were derived from experiments in which antiangiogenesis treatments were begun when PH was already fully developed. The idea was to determine whether antiangiogenic agents could not only prevent the circulatory abnormalities associated with PH but also get them to revert once these were completely established. This is closer to the clinical situation of the PH patient, who is usually diagnosed and eventually treated when PH is already advanced and has caused clinical manifestations. Because VEGF and PDGF are both crucial to the angiogenic process, contributing to the formation, stabilization, and maturation of newly formed vessels,⁸⁻¹² it seems reasonable to hypothesize that established PH should be associated with overexpression of not only VEGF but also

PDGF and that greater benefit in reducing circulatory disorders associated with PH could be obtained by simultaneous targeting of the VEGF and PDGF pathways rather than by targeting either alone. Indeed, this study has demonstrated for the first time that in addition to VEGF, PH development is associated with progressive overexpression of PDGF, which reached its peak later in the course of PH than did VEGF overexpression. In addition, in rats with fully established PH, a 2-week course of treatment with RAPA induced a significant decrease in VEGF expression, which was associated with substantial attenuation of the increased splanchnic neovascularity (i.e., attenuation of overexpression of endothelial cell markers CD31 and VEGFR-2 and decrease in vascular area) and a marked reduction in PP and splanchnic hyperemia. These effects were specific for the neovasculature of PH rats because they were not observed in SO control animals. We therefore concluded that VEGF signaling is required not only for development but also for maintenance of the PH syndrome and that inhibition of the

VEGF pathway results in significant attenuation of increased PP and of hyperdynamic splanchnic circulation in rats with advanced PH. However, despite the significant decreases in PP, SMABF, and splanchnic neovascularization, the extent of collateralization was unchanged. This finding is discussed later.

Treatment with the PDGF inhibitor Gleevec alone had no major effects other than reduced PDGF expression and decreased perivascular cell coverage of splanchnic neovessels, as indicated by the significantly decreased expression of pericyte-specific markers α -SMA and PDGFR- β . However, combined treatment with RAPA and Gleevec resulted in, on top of the expected significantly decreased expression of VEGF, VEGFR-2, CD31, PDGF, PDGFR- β , and α -SMA, virtually complete reversal of the increases in PP and SMABF, which were reduced by 40% and 30%, respectively. Notably, the magnitude of the effects of the combination treatment was greater than the addition of the effects of either drug alone, suggesting a synergistic regulatory interaction between the VEGF and the PDGF signaling pathways in mediating maintenance of the vascular and circulatory abnormalities observed in PH rats. These findings also have important clinical implications; in the absence of perivascular cells (i.e., after PDGF signaling inhibition), the endothelium is more vulnerable to antiangiogenic therapies targeting endothelial cells, such as a VEGF signaling blockade.²²

As already noted, although VEGF inhibition suppressed the development of new portal-systemic collateral vessels, selective VEGF signaling blockade did not have a significant effect on the extent of already established collateral vessels. The simultaneous inhibition of VEGF plus PDGF signaling, despite much greater effects on PP and SMABF, caused a significant but mild reduction in the extent of portal-systemic collaterals. Why did the antiangiogenic therapy prevent the formation of collaterals when these vessels began to develop but not when collateralization was extensive? A possible explanation is that a measurable decrease in collateralization may take longer than the 2-week course of treatment evaluated in this study. It should be noted in this regard that patients with cirrhosis receiving an orthotopic liver transplant maintain increased portocollateral blood flow for months.²³ Actually, the extent of portal-systemic collaterals decreased slightly (9% decrease) but significantly ($P < 0.05$) after the combined inhibition of VEGF plus PDGF signaling. On the other hand, it is also possible that there are intrinsic differences in the sensitivity of vessels to the lack of growth factors or differences in the extent of vessel maturation.^{8-10,24,25} In this regard, it is important to note that collaterals are frequently large-size vessels, suggesting a

high degree of vessel maturation.²⁶ Therefore, it could be that the dependence on VEGF and PDGF for collateral vessel growth and maintenance changes over time and that on their maturation, portal-systemic collaterals dependence from VEGF and PDGF is less accentuated. Nevertheless, the marked decrease in PP and splanchnic hyperemia in response to the combined VEGF and PDGF signaling inhibition suggests that even if collaterals remain, the possible risk that they could cause clinical complications could be substantially reduced by this treatment.²⁶⁻²⁸ Importantly, the use of RAPA and Gleevec as inhibitors of the VEGF and PDGF signaling pathways, respectively, has the additional advantages of being safe and effective in the treatment of several human malignancies, which has already been broadly documented.¹⁵⁻¹⁸

In conclusion, the results of this study provide new and important biological insights into the role of growth factors and angiogenesis in PH by suggesting the existence of a regulatory interaction between the VEGF and PDGF pathways to maintain hyperdynamic splanchnic circulation, splanchnic neovascularization, and increased portal pressure in PH rats and further underline their potential importance in therapeutic strategies for patient treatment based on the combined blockade of the VEGF and PDGF signaling pathways.

References

1. Bosch J, Picuseta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-13.
2. Bosch J, Garcia-Pagan JC. The splanchnic circulation in cirrhosis. In: Gines P, Arroyo V, Rodes J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2005:125-136.
3. Fernandez M, Vizcusi 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.
4. 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. *J Hepatol* 2005;43:98-103.
5. 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. *J Hepatol* 2006;44:1033-1039.
6. 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 hyperemia in portal hypertensive rats. *Gut* 2007;56:560-564.
7. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:2254-2261.
8. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-1155.
9. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
10. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-693.

11. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
12. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283-1316.
13. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128-135.
14. Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit* 1995;17:666-671.
15. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:935-942.
16. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811-2821.
17. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:493-502.
18. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 2003;3:439-443.
19. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piera C, Whitde BJ, et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:1487-1495.
20. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Mourelle MI, Pique JM, Bosch J, Rodes J. Acute and chronic cyclooxygenase blockade in portal hypertensive rats: Influence on nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996;110:1529-1535.
21. Jimenez O, Campistol JM, Vidal E, Faura A, Oppenheimer F, Corbella J, Brunet M. Defining the initial doses of sirolimus and tacrolimus in the period immediately after renal transplantation. *Transplant Proc* 2003;35:1686-1688.
22. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287-1295.
23. Navasa M, Forns X, Sanchez V, Andreu H, Marcos V, Borrás JM, Rimola A, et al. Quality of life, major medical complications and hospital service utilization in patients with primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *J Hepatol* 1996;25:129-134.
24. 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;60:1388-1393.
25. Gee MS, Procopio WN, Makonnen S, Feldman MD, Yeilding NM, Lee WM. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am J Pathol* 2003;162:183-193.
26. Escorsell A, Bosch J. Pathophysiology of variceal bleeding. In: Groszmann RJ, Bosch J, eds. *Portal Hypertension in the 21st Century*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2004:155-166.
27. Abrakdes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2003;37:902-908.
28. D'Amico G, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 2006;131:1611-1624.

Beneficial Effects of Sorafenib on Splanchnic, Intrahepatic, and Portocollateral Circulations in Portal Hypertensive and Cirrhotic Rats

Marc Mejias,¹ Ester Garcia-Pras,¹ Carolina Tiani,¹ Rosa Miquel,² Jaime Bosch,¹ and Mercedes Fernandez¹

Portal hypertension, the most important complication in patients with cirrhosis of the liver, is a serious and life-threatening disease for which there are few therapeutic options. Because angiogenesis is a pathological hallmark of portal hypertension, the goal of this study was to determine the effects of sorafenib—a potent inhibitor of proangiogenic vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β), and Raf kinases—on splanchnic, intrahepatic, systemic, and portosystemic collateral circulations in two different experimental models of portal hypertension: rats with prehepatic portal hypertension induced by partial portal vein ligation and rats with intrahepatic portal hypertension and secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. Such a comprehensive approach is necessary for any translational research directed toward defining the efficacy and potential clinical application of new therapeutic agents. Sorafenib administered orally once a day for 2 weeks in experimental models of portal hypertension and cirrhosis effectively inhibited VEGF, PDGF, and Raf signaling pathways, and produced several protective effects by inducing an approximately 80% decrease in splanchnic neovascularization and a marked attenuation of hyperdynamic splanchnic and systemic circulations, as well as a significant 18% decrease in the extent of portosystemic collaterals. In cirrhotic rats, sorafenib treatment also resulted in a 25% reduction in portal pressure, as well as a remarkable improvement in liver damage and intrahepatic fibrosis, inflammation, and angiogenesis. Notably, beneficial effects of sorafenib against tissue damage and inflammation were also observed in splanchnic organs. **Conclusion:** Taking into account the limitations of translating animal study results into humans, we believe that our findings will stimulate consideration of sorafenib as an effective therapeutic agent in patients suffering from advanced portal hypertension. (HEPATOLOGY 2009;49:1245-1256.)

See Editorial on Page 1066

Abbreviations: CBDL, common bile duct ligation; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; H&E, hematoxylin-eosin; HO-1, heme oxygenase-1; IL-1 β , interleukin-1 β ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LBP, lipopolysaccharide-binding protein; MAP, mean arterial pressure; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; PDGF, platelet-derived growth factor; PDGFR- β , PDGF receptor- β ; PP, portal pressure; PPVL, partial portal vein ligation; SHAM, sham-operated; α -SMA, α -smooth muscle actin; SMABF, superior mesenteric artery blood flow; SMAR, superior mesenteric artery resistance; TNF- α , tumor necrosis factor α ; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, VEGF receptor-2; vWF, von Willebrand factor.

From the ¹Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, and the ²Department of Pathology, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer, Hospital Clinic, Ciberehd, Barcelona, Spain.

Received July 2, 2008; accepted November 19, 2008.

Supported in part by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2005-05825) and from La Fundació Marató de TV3. CiBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Marc Mejias is a recipient of a Fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

Address reprint requests to: Mercedes Fernandez, Ph.D., Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mercefernandez@ub.edu; fax: (34)-93-2279348.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22758

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Portal hypertension is the most important complication that develops in patients with cirrhosis of the liver and remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide.¹ The portal hypertensive syndrome is characterized by a pathological increase in portal pressure and by the development of hyperdynamic splanchnic circulation, with an increase in blood flow in splanchnic organs draining into the portal vein and a subsequent elevation in portal venous inflow. Such increased portal venous inflow is a significant factor maintaining and worsening portal pressure elevation and determining the formation of ascites. Another characteristic feature of portal hypertension is the formation of an extensive network of portosystemic collateral vessels; these include gastroesophageal varices, which are prone to rupture that can cause massive, life-threatening gastroesophageal bleeding. In addition, collateral vessels result in shunting of portal blood into the systemic circulation and play an important role in other major complications of chronic liver disease, including portosystemic encephalopathy and sepsis.¹

Unfortunately, the management of patients with portal hypertension still is a relevant clinical problem, and

1245

current therapy with nonselective β -adrenergic blockers has significant limitations due to adverse events and unpredictable response.² Therefore, it is clear that new treatment strategies are needed to improve the prognosis of patients with advanced portal hypertension. Understanding the vascular and molecular alterations occurring in portal hypertension could contribute to this aim.

Recent studies from our laboratory have highlighted that angiogenesis, the growth of new blood vessels from a preexisting vascular bed,³ is a pathological hallmark of portal hypertension. Thus, increased splanchnic neovascularization regulated through the coordinated action of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) has been found in experimental models of portal hypertension and has been shown to be a crucial mechanism by which portal hypertension, hyperdynamic splanchnic circulation, and portosystemic collateralization are initiated and stabilized.⁴⁻⁹ Importantly, these prior studies have made the control of new blood vessel formation a promising therapeutic target for patients suffering from portal hypertension and chronic liver disease.

Until now, however, investigation of antiangiogenesis agents focusing simultaneously on several circulatory disturbances associated with the pathophysiology of portal hypertension (disturbances in splanchnic, intrahepatic, systemic, and portosystemic collateral circulations) has not been conducted. Such a comprehensive and systematic approach is required for any careful translational research directed toward defining the effectiveness of new agents with potential therapeutic application in human patients. For example, a treatment could have clinical benefit on the intrahepatic circulation but be detrimental to the splanchnic circulation, and vice versa. In the present study, we determined the effects of sorafenib, an orally active multikinase inhibitor, on the splanchnic, intrahepatic, and systemic circulations and on portosystemic collateral vessels in two different experimental models of portal hypertension: rats with prehepatic portal hypertension induced by partial portal vein ligation, and rats with intrahepatic portal hypertension and secondary biliary cirrhosis induced by common bile duct ligation. Sorafenib potently blocks the tyrosine kinases of VEGF receptor 2 (VEGFR-2) and PDGF receptor β (PDGFR- β), as well as the Raf serine/threonine kinases along the Raf/mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway.¹⁰ Integration of the signals decoded by these different transduction pathways orchestrates the cellular events acting at different stages during angiogenesis.³ Sorafenib is farthest along in clinical development and has been approved in several countries worldwide for treatment of renal cell carcinoma and hepato-

cellular carcinoma.^{11,12} The latter is a common complication of advanced cirrhosis, which means that sorafenib is currently being used in patients with portal hypertension. Hence, evaluation of the effects of sorafenib in animal models of portal hypertension seems timely and pertinent.

Materials and Methods

Materials. Sorafenib was purchased from Bayer Pharmaceuticals (West Haven, CT). Antibodies against CD31, VEGF, VEGFR-2, PDGF, PDGFR- β , lipopolysaccharide-binding protein (LBP), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS) antibody was obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Antibodies against heme oxygenase-1 (HO-1) and peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Stressgen (Sidney, Canada). Antibodies against ERK1/2, phospho-ERK1/2, phospho-eNOS, and inducible NOS (iNOS) were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibody against von Willebrand factor (vWF) was obtained from Dako (Carpinteria, CA), and antibody against CD43 was obtained from Serotec (Raleigh, NC). ⁵¹Cr-labeled microspheres were obtained from Perkin-Elmer (Boston, MA). All other reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Animals. Studies were performed in male Sprague-Dawley rats (300 to 350 g). All procedures were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985).

Prehepatic portal hypertension was induced by partial portal vein ligation (PPVL) as described.¹³ Briefly, under anesthesia 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.

Secondary biliary cirrhosis with intrahepatic portal hypertension was induced by common bile duct ligation (CBDL) as described.¹⁴ While each animal was under anesthesia, the common bile duct was occluded by double ligature with 5-0 silk thread. The bile duct was then resected between the two ligatures. Two days after surgery, the presence of bilirubin in the urine turned it a dark brown color, indicating successful ligation. In sham-op-

erated (SHAM) animals, portal vein and common bile duct were similarly manipulated but not ligated.

Treatments. Sorafenib (PPVL, $n = 7$; CBDL, $n = 12$; SHAM, $n = 8$) or vehicle (0.9% sodium chloride; PPVL, $n = 8$; CBDL, $n = 8$; SHAM, $n = 7$) was administered orally by gavage, once a day, for 2 weeks at dose levels of 2 mg/kg/day in PPVL and SHAM rats and 1 mg/kg/day in CBDL animals. Treatments began when portal hypertension was already developed (1 week after PPVL or 2 weeks after CBDL).^{5,15} This is closer to the clinical situation of the portal hypertensive patient, who is usually diagnosed, and eventually treated, when portal hypertension is already quite advanced and has caused clinical manifestations. Doses and schedule of administration of sorafenib were selected on the basis of earlier work showing that these were efficacious in inhibiting angiogenesis, that sorafenib has a long half-life (24 to 48 hours), and that steady-state concentrations are reached after 7 days.¹⁰

Hemodynamic Studies. Under anesthesia, PE-50 catheters were introduced into the femoral artery and portal vein to measure mean arterial pressure (MAP) (mm Hg), heart rate (beats/minute), and portal pressure (PP) (mm Hg). A perivascular ultrasonic flowprobe (Transonic Systems, NY) was placed around the superior mesenteric artery to measure superior mesenteric artery blood flow (SMABF) ($\text{mL} \cdot \text{minute}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Superior mesenteric artery resistance (SMAR) ($\text{mm Hg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) was calculated as $(\text{MAP} - \text{PP})/\text{SMABF}$.⁸ Cardiac output (mL/minute) was measured using the thermolysis technique. Briefly, a thermocouple probe was placed in the aortic arch via the carotid artery and connected to a Cardiac Output System (ADInstruments, Colorado Springs, CO). The thermal indicator (0.1 mL of room temperature 0.9% saline) was injected into the right atrium through a PE-50 catheter placed in the jugular vein.

Determination of the Extent of Portosystemic Collateral Vessels. The extent of portosystemic collateralization was quantified by injection of ⁵¹Cr-labeled microspheres (diameter, $15 \pm 3 \mu\text{m}$; specific activity, 52.68 mCi/g) into the spleen⁸ as collateralization (%) = $[\text{lungs radioactivity}/(\text{lungs radioactivity} + \text{liver radioactivity})] \times 100$.

Western Blot Analysis. Lysate proteins were separated via sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, and western blotting was performed using the corresponding primary antibodies and a chemiluminescence detection system. Loading accuracy was evaluated via membrane rehybridization with antibodies against β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.⁸

Histological Analysis. Tissues (mesentery, jejunum,

or liver) were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin (H&E).⁸ Computer-based quantitating analysis of angiogenesis was performed in mesenteric sections with the assistance of Axiovision software (Zeiss, Germany) by scanning of the entire section and counting areas occupied by vascular structures. We obtained a value from each tissue section (one section per rat) and then averaged the results from individual sections in each group (six to eight animals per group). Group values reflect the average readings from all sections in the group.⁸

For semiquantitative analysis of hepatic fibrosis, liver sections were stained with 0.1% Sirius red,¹⁶ photographed, and analyzed using a microscope equipped with a digital camera. Six fields from each slide were randomly selected, and the red-stained area per total area was measured using AxioVision software. Values are expressed as the mean of 18 to 24 fields taken from three to four animals per group.

Immunohistochemistry. Immunostaining of paraffin-embedded liver sections was performed with anti-CD43 and anti-vWF antibodies diluted 1:500 or, as a negative control, with phosphate-buffered saline. Bound antibodies were visualized using diaminobenzidine as chromogen, and slides were then counterstained with hematoxylin. The number of CD43- and vWF-positive cells and vessels was quantified using AxioVision software.

Statistical Analysis. Values are expressed as the mean \pm standard error of the mean and compared via an unpaired Student *t* test and analysis of variance. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

In all the animals studied, the 2-week course of treatment with sorafenib was well tolerated without any sign of toxicity, adverse effects (reduced body weight gain, diarrhea, or hemorrhage), or drug-induced mortality.

Effects on Splanchnic Neovascularization. Consistent with our recent observations,⁴⁻⁹ overexpression of the proangiogenic factors VEGF and PDGF, the endothelial cell markers VEGFR-2 and CD31, and the perivascular cell markers PDGFR- β and α -smooth muscle actin (α -SMA) was observed in mesenteries from rats with prehepatic portal hypertension induced by PPVL when compared with SHAM control animals ($P < 0.05$) (Fig. 1A). Of note, these findings were also reproduced in the CBDL model of intrahepatic portal hypertension and cirrhosis (Fig. 2A). Interestingly, in both experimental models, therapy with sorafenib was highly effective in reducing VEGF and PDGF expressions, which translated into substantial inhibition of splanchnic neovascularization (down-regulation of CD31 and VEGFR-2 expressions)

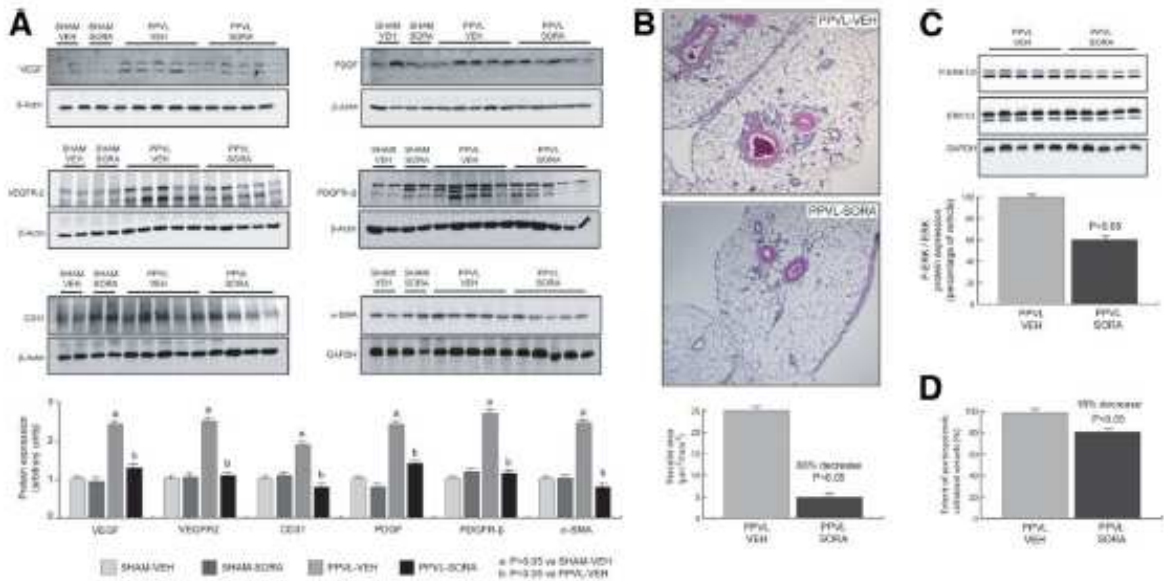


Fig. 1. Effects of sorafenib on splanchnic neovascularization and portosystemic collateralization in PPVL rats. (A) Expression of the proangiogenic factors VEGF and PDGF, the endothelial cell markers VEGFR-2 and CD31, and the perivascular cell markers PDGFR-β and α-SMA in mesenteries of sorafenib- or vehicle-treated PPVL and SHAM rats. (B) Histological images of mesenteries from PPVL rats (H&E stain; original magnification ×40) and neovascularization quantification. (C) Western blot analysis of phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 in intestines of PPVL rats. (D) Effects of sorafenib on portosystemic collateralization in PPVL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

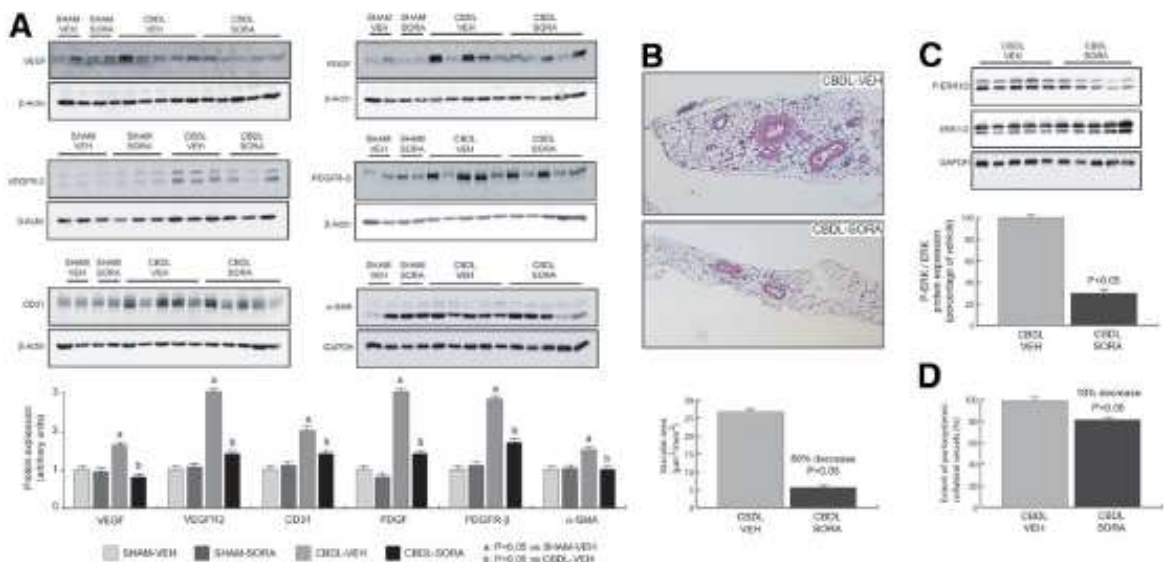


Fig. 2. Effects of sorafenib on splanchnic neovascularization and portosystemic collateralization in CBDL rats. (A) Expression of the proangiogenic factors VEGF and PDGF, the endothelial cell markers VEGFR-2 and CD31, and the perivascular cell markers PDGFR-β and α-SMA in mesenteries of sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats. (B) Histological images of mesenteries from CBDL rats (H&E stain; original magnification ×40) and neovascularization quantification. (C) Western blot analysis of phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 in intestines of CBDL rats. (D) Effects of sorafenib on portosystemic collateralization in CBDL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

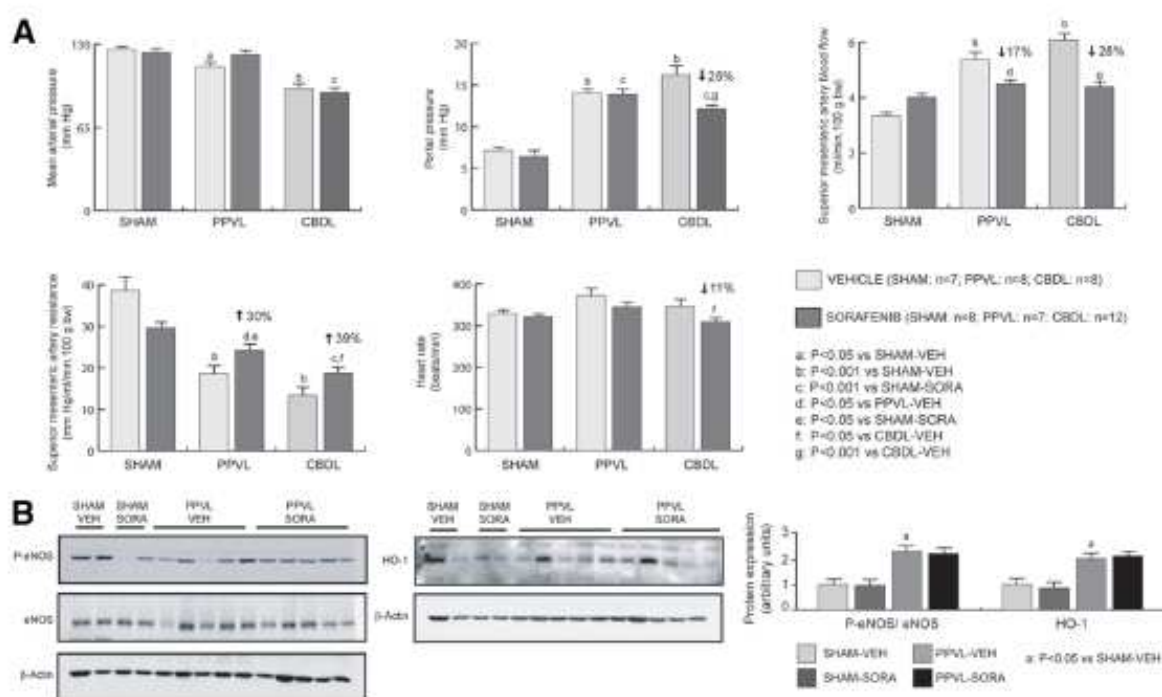


Fig. 3. Effects of sorafenib on hemodynamics and splanchnic protein expression of eNOS and HO-1 in PPVL and CBDL rats. (A) Effects of sorafenib on mean arterial pressure, heart rate, portal pressure, and superior mesenteric artery blood flow and resistance in PPVL, CBDL, and SHAM rats. (B) Western blot analysis of phospho-eNOS, total eNOS, and HO-1 in mesenteries of PPVL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

and perivascular cell coverage of neovessels (down-regulation of α -SMA and PDGFR- β expressions), compared with the corresponding vehicle-treated groups (Figs. 1A, 2A). In agreement with these western blot results, computer-based quantitative analysis of neovascularization in tissue sections also demonstrated that the vascular area was markedly reduced by approximately 80% in mesenteries from drug-treated relative to vehicle-treated PPVL and CBDL rats (Figs. 1B, 2B). These anti-angiogenic effects of sorafenib were not observed in SHAM rats (Figs. 1A, 2A).

The anti-angiogenic effects of sorafenib can be mediated not only by inhibition of receptor tyrosine kinases such as VEGFR-2 and PDGFR- β , but also by blockade of the ubiquitous Raf/MEK/ERK signaling pathway, which plays a major role in the regulation of endothelial cell proliferation and neoangiogenesis.¹⁰ Therefore, we determined the effectiveness of sorafenib in inhibiting the Raf/MEK/ERK signaling cascade in portal hypertensive rats by immunoblotting with antibodies specific for phosphorylated ERK-1 and ERK-2 kinases and total ERK1/2. Indeed, sorafenib markedly inhibited signaling through the Raf kinase pathway, as evidenced by a decrease in ERK1/2 phosphorylation in the intestines of sorafenib-treated PPVL and CBDL rats, compared with those receiving vehicle (Figs. 1C, 2C).

Effects on Portosystemic Collateral Circulation. An extremely high degree of portosystemic collateral vessels developed 2 weeks after PPVL ($98.69 \pm 0.87\%$) and 4 weeks after CBDL ($98.87 \pm 0.37\%$) in animals receiving vehicle. Sorafenib significantly reduced this portosystemic collateralization both in PPVL rats (18% reduction; $P < 0.05$) (Fig. 1D) and CBDL rats (18% decrease; $P < 0.05$) (Fig. 2D) compared with their corresponding vehicle-treated groups.

Hemodynamic Effects. Both vehicle-treated PPVL and CBDL rats exhibited portal hypertension, increased SMABF, and decreased SMAR and MAP compared with vehicle-treated SHAM animals (Fig. 3A), thus demonstrating the hyperkinetic splanchnic circulation characteristic of portal hypertension.¹ Values of heart rate were similar among groups (Fig. 3A).

In PPVL rats, sorafenib administered as a daily oral treatment for 2 weeks markedly attenuated the hyperdynamic splanchnic circulation, as indicated by a 17% decrease in SMABF ($P = 0.012$) and a 30% increase in SMAR ($P = 0.004$) compared with vehicle-treated PPVL rats (Fig. 3A). Despite the decrease in splanchnic blood flow, PP was not reduced by sorafenib in PPVL animals. This was most likely due to the reduction of portosystemic collateralization observed in PPVL rats following administration of sorafenib (Fig. 1D). In addition, sor-

afenib did not modify MAP ($P = 0.2$) or heart rate ($P = 0.8$) in PPVL rats compared with vehicle (Fig. 3A), but it caused a marked and significant 24% decrease in cardiac output (143.4 ± 5.9 mL/minute in vehicle-treated PPVL rats and 108.7 ± 7.9 mL/minute in sorafenib-treated PPVL rats [$P = 0.040$]).

In CBDL rats, the hyperdynamic splanchnic circulation was also reduced after sorafenib treatment with a 28% decrease in SMABF ($P = 0.0002$) and a 39% increase in SMAR ($P = 0.022$) (Fig. 3A). Unlike what was observed in the prehepatic portal hypertensive model, the attenuation of splanchnic hyperemia translated in cirrhotic rats into a marked (25%) decrease in PP ($P = 0.0002$) (Fig. 3A), despite the degree of portosystemic collateral vessels being similarly reduced in both experimental models (Fig. 2D). These findings suggest that the intrahepatic vascular resistance of CBDL rats could have been reduced by sorafenib treatment (see Effects on Intrahepatic Fibrosis section and Discussion below). Sorafenib did not modify MAP in CBDL rats ($P = 0.7$) but induced a significant 11% reduction in heart rate ($P = 0.02$) (Fig. 3A) and a marked 31% decrease in cardiac output that did not reach statistical significance (156.6 ± 14.8 mL/minute in vehicle-treated CBDL rats; 107.7 ± 18.5 mL/minute in sorafenib-treated CBDL rats [$P = 0.16$]). In SHAM rats, sorafenib had no significant hemodynamic effects (Fig. 3A).

The sorafenib-induced attenuation of hyperdynamic splanchnic circulation observed in PPVL and CBDL rats was most likely due to inhibition of splanchnic neovascularization rather than inhibition of vasodilatation, because no effects were seen after sorafenib on the expression of eNOS and HO-1, which catalyze the production of the vasodilators nitric oxide and carbon monoxide, respectively (Fig. 3B).^{17,18}

Effects on Intrahepatic Fibrosis. To evaluate the possibility that sorafenib decreased hepatic vascular resistance, we determined the intrahepatic effects of sorafenib in CBDL rats through a series of complementary experimental approaches. CBDL resulted in distortion of the normal liver architecture, with a marked proliferation of bile ductules and an extensive deposition of fibrillar collagen in portal tracts and central veins of the liver, as identified by staining of liver sections with H&E and Sirius red (Fig. 4A). Impressively, these histological and structural changes were substantially decreased in response to administration of sorafenib, with a 49% reduction in fibrosis (Sirius red staining area) in the liver from sorafenib-treated CBDL rats compared with vehicle-treated CBDL animals (Fig. 4A,B).

Because activated hepatic stellate cells are a major contributor to hepatic fibrogenesis,^{16,19} we measured the pro-

tein expression of α -SMA, which is expressed by hepatic stellate cells when they gain a myofibroblast-like phenotype in response to liver injury. α -SMA expression was remarkably high in livers from vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM animals, consistent with stellate cell activation in fibrotic livers (Fig. 4C). Interestingly, sorafenib caused a profound decrease in α -SMA expression in CBDL rats (Fig. 4C), suggesting that this treatment inhibited activation of stellate cells. These results were further supported by our findings of an increased expression of PDGF, which is the most potent mitogen for hepatic stellate cells,^{16,19} and its receptor PDGFR- β in livers from vehicle-treated CBDL rats (Fig. 4C), together with a marked reduction of these overexpressions by sorafenib ($P < 0.05$) (Fig. 4C).

Effects on Intrahepatic Inflammation. Current evidence suggests that the process of hepatic fibrosis is driven primarily by the development of inflammation in response to liver injury.¹⁶ Therefore, we determined whether the sorafenib-stimulated attenuation of fibrosis was also associated with a reduction in inflammatory activity. Indeed, using histological analyses (H&E) as well as immunohistochemistry with staining for CD43, we found an increased inflammatory cell infiltrate in livers from CBDL rats, compared with SHAM control animals, and attenuation of this inflammatory infiltration (24% decrease) after sorafenib treatment (Fig. 5A,B).

These immunohistochemical studies were supported and confirmed via western blot analyses showing an increased protein expression of the proinflammatory mediators TNF- α , LBP, and iNOS in livers from vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM animals (Fig. 5C), and a marked reduction of this overexpression by sorafenib treatment over a period of 2 weeks (Fig. 5C).

Effects on Intrahepatic Neovascularization. Because liver fibrogenesis and inflammation are frequently associated with hepatic angiogenesis,²⁰ we also conducted studies to determine hepatic neovascularization and the expression of angiogenic factors in livers of sorafenib-treated and vehicle-treated CBDL rats and in corresponding SHAM-operated control animals. Western blot analysis revealed a marked 200% increase in VEGFR-2 expression in vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM rats ($P < 0.05$) (Fig. 6A). VEGFR-2 is predominantly expressed on endothelial cells, and its expression is up-regulated during angiogenesis.³ Therefore, VEGFR-2 overexpression most likely reflects an increase in intrahepatic neovascularization in livers from CBDL rats. Notably, sorafenib decreased the expression of VEGFR-2 in CBDL rats by 45% ($P < 0.05$) (Fig. 6A). These results fit well with the immunohistochemical studies of vWF protein expression, a marker of endothelial cells,³ which con-

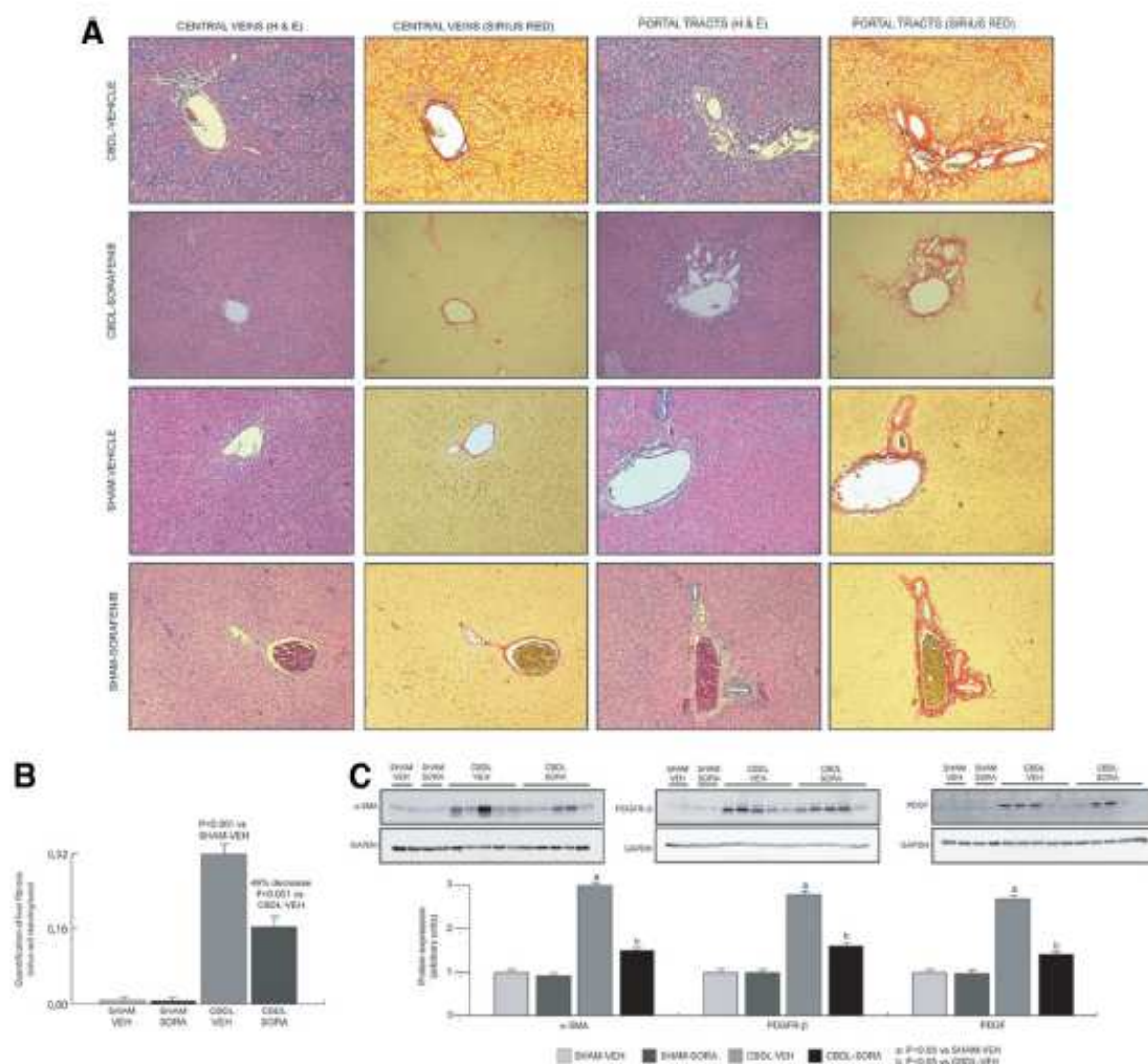


Fig. 4. Effects of sorafenib on intrahepatic fibrosis in CBDL rats. (A) Histological images of livers (central vein and portal tract areas) stained with H&E or Sirius red from sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats (original magnification $\times 50$). (B) Quantification of liver fibrosis (Sirius red staining area per total area) in sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats. (C) Western blot analysis of α -SMA, PDGFR- β , and PDGF in livers of CBDL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

firming an increased number of vWF-positive vessels in livers from vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM animals (322% increase), and a marked 59% reduction of this neovascularization following sorafenib treatment (Fig. 6B). Intriguingly, increased intrahepatic angiogenesis in CBDL rats was not associated with VEGF overexpression. Rather, the expression of VEGF was lower in CBDL rats than in SHAM animals, and it was not modified by sorafenib (Fig. 6A).

Effects on Intrahepatic eNOS and HO-1 Expression. To determine whether the decrease of intrahepatic vascular resistance in livers from CBDL rats could also be

assigned to sorafenib-induced vasodilatation, we measured the protein expression of the vasodilatory enzymatic systems eNOS and HO-1. As expected,^{17,18} a robust decrease in phosphorylated eNOS expression, as well as overexpression of HO-1, was observed in livers from vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM animals (Fig. 6C,D). We found no detectable changes in the expression of phospho-eNOS, total eNOS, or HO-1 in CBDL rats in response to sorafenib (Fig. 6C,D), indicating that the sorafenib-mediated reduction in intrahepatic vascular resistance is unlikely to be due to nitric oxide and/or carbon monoxide overproduction.

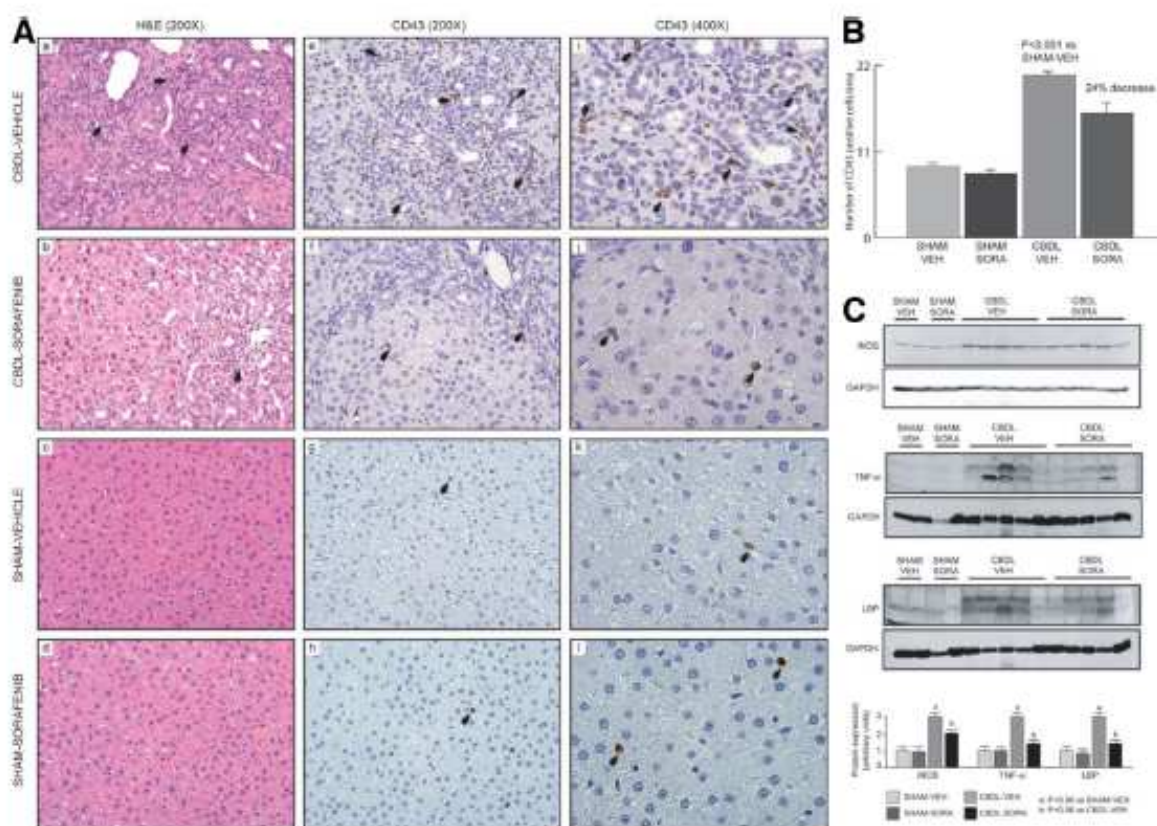


Fig. 5. Effects of sorafenib on intrahepatic inflammation in CBDL rats. (A) Photomicrographs of histology (H&E stain) and immunohistochemistry (CD43 immunostaining) in livers from sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats, showing increased inflammatory cell infiltrate (arrows) in the hepatic parenchyma of vehicle-treated CBDL rats compared with SHAM animals, and a marked attenuation of this inflammatory infiltration after sorafenib treatment (original magnification: a-h, $\times 200$; i-l, $\times 400$). (B) Quantification of the number of CD43-positive cells in livers from sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats. (C) Western blot analysis of proinflammatory mediators (iNOS, TNF- α , and LBP) in livers of CBDL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

Effects on Intestinal Inflammation. Next, we wanted to determine whether sorafenib had anti-inflammatory effects, not only in the liver, but also in splanchnic organs. To this end, histological studies using H&E were performed on portions of the jejunum from all experimental groups. Small intestinal mucosa of vehicle-treated PPVL rats had decreased intestinal villus height and abundant inflammatory infiltration compared with SHAM animals (Fig. 7A). These histological changes were also present and even more prominent in CBDL animals (Fig. 7A). Interestingly, daily treatment with sorafenib produced a marked attenuation of the intestinal inflammation observed in both PPVL and CBDL rats (Fig. 7A). In addition, the expression of the proinflammatory proteins TNF- α and iNOS was increased in mesenteries from PPVL and CBDL rats receiving vehicle, and markedly reduced by sorafenib (Fig. 7B). Sorafenib also decreased the IL-1 β overexpression observed in PPVL rats (Fig. 7B). Interestingly, the expression of LBP was also elevated in

PPVL and CBDL rats, as compared with SHAM rats, and sorafenib attenuated this overexpression (Fig. 7B).

Discussion

Remarkable and very promising amelioration of portal hypertension has been observed in animal models with several antiangiogenic strategies.^{4-9,21-23} Our present study determined, in a comprehensive and systematic manner, whether the multiple kinase inhibitor sorafenib causes beneficial effects on the splanchnic, intrahepatic, and systemic circulations and on portosystemic collateral vessels in two different experimental models of portal hypertension: prehepatic portal hypertension induced by PPVL and intrahepatic portal hypertension with secondary biliary cirrhosis induced by CBDL. This approach, which focused simultaneously on several pathophysiological processes associated with portal hypertension, is necessary for any careful translational research directed

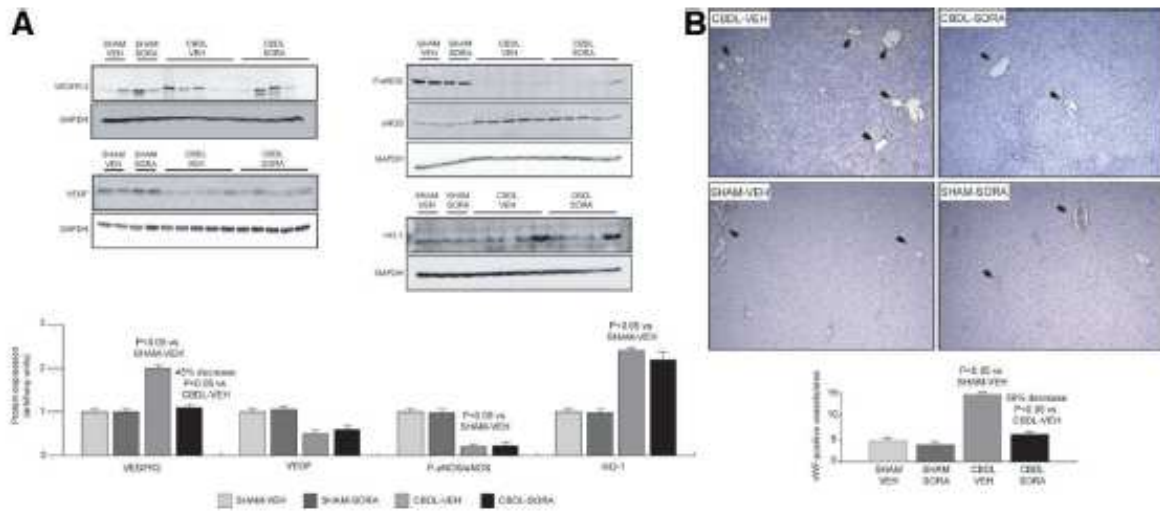


Fig. 6. Effects of sorafenib on liver neovascularization and hepatic protein expression of eNOS and HO-1 in CBDL rats. (A) Western blot analysis of VEGFR-2, VEGF, phospho-eNOS, total eNOS, and HO-1 in livers from sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats. (B) Immunohistochemical detection of vWF-positive vessels (arrowheads) in livers from sorafenib- or vehicle-treated CBDL and SHAM rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

toward defining the efficacy and potential clinical application of new agents. Importantly, the use of sorafenib as an orally active multikinase inhibitor has an additional advantage in that its efficacy, safety, and clinical benefit in the treatment of several human ma-

lignancies has been documented,^{11,12} including renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. The latter is a common complication of advanced cirrhosis, which means that sorafenib is currently being used in patients with portal hypertension.

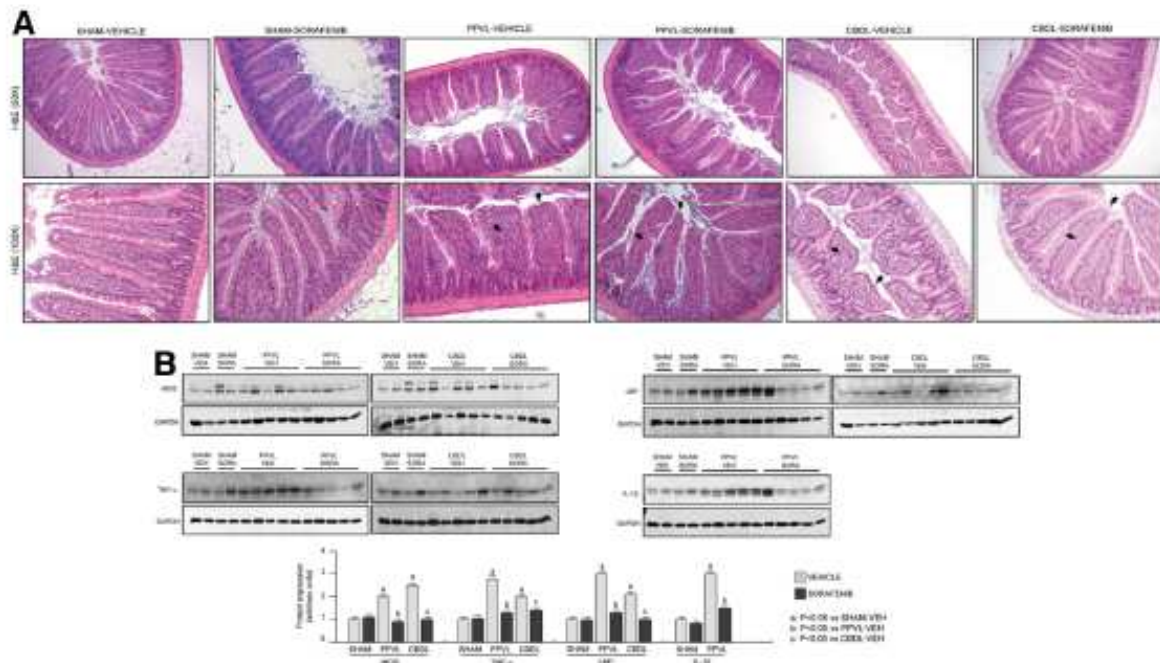


Fig. 7. Effects of sorafenib on intestinal inflammation in PPVL and CBDL rats. (A) Histological images of intestines showing intestinal damage and abundant inflammatory infiltration in vehicle-treated PPVL and CBDL rats (arrowheads), and a marked attenuation of these disturbances by sorafenib (H&E stain; original magnification $\times 50$ [top row], $\times 100$ [bottom row]). (B) Western blot analysis of proinflammatory mediators (iNOS, TNF- α , LBP, and IL-1 β) in mesenteries of PPVL and CBDL rats. SORA, sorafenib; VEH, vehicle.

Our study demonstrated that sorafenib has several protective effects on splanchnic, intrahepatic, systemic, and portosystemic collateral circulations in PPVL and CBDL rats. First, our results indicate that a 2-week course of treatment with sorafenib administered orally to PPVL and CBDL rats is efficacious in interfering with the VEGF and PDGF signal transduction pathways, as well as with the Raf/MEK/ERK signaling cascade, all of which are crucial to the tightly regulated multistep angiogenic process contributing to the formation, stabilization, and maturation of newly formed vessels.^{3,10} Accordingly with the ability of sorafenib to target several proangiogenic signaling pathways, it also showed substantial angioinhibitory efficacy, inducing an approximately 80% decrease in splanchnic neovascularization in both PPVL and CBDL animals. It is important to note that these effects were not observed in SHAM animals, indicating that sorafenib acts only against migrating and proliferating capillary endothelial cells at sites of angiogenesis, but it does not affect the normal nonproliferating vessels.

The prolonged suppression of pathologic neovascularization after sorafenib also translated into a marked attenuation of the hyperdynamic splanchnic and systemic circulations, and decreased the extent of portosystemic collateral vessels as well. In the PPVL model, the decrease in splanchnic blood flow caused by sorafenib did not translate into a significant reduction in PP. That could be due to the significant decrease observed in the extent of portosystemic collaterals after sorafenib treatment, which increases portocollateral resistance and, therefore, increases the vascular resistance of the portal venous system. However, in the CBDL model, the sorafenib-induced attenuation of splanchnic hyperemia (28% reduction in SMABF and 39% increase in SMAR) resulted in a 25% decrease in PP, despite a similar decrease in portosystemic collateralization as in the prehepatic portal hypertensive model, indicating that the vascular resistance of the cirrhotic liver was lowered by sorafenib.

Indeed, we found a remarkable improvement in liver damage and intrahepatic fibrosis and inflammation in CBDL rats following sorafenib treatment, which is likely to be the basis for the diminished intrahepatic resistance to portal blood flow. Histopathological analyses using H&E and Sirius red stainings revealed a robust attenuation in bile duct proliferation, and reduction of fibrillar collagen accumulation and fibrosis in livers from sorafenib-treated CBDL rats compared with the vehicle-treated group. Sorafenib also induced a marked decrease in intrahepatic inflammation, as demonstrated in histological sections by immunostaining for CD43, which is typically expressed by infiltrating inflammatory cells,¹⁶ as well as in protein extracts analyzed by western blotting for

the proinflammatory mediators TNF- α , iNOS, and LBP.^{17,24,25} The mechanisms by which sorafenib attenuates fibrosis and inflammation are most likely mediated through inhibition of hepatic stellate cell activation, evidenced by strong reduction of α -SMA and PDGFR- β expressions, which are markers of activated stellate cells.^{16,19} Of note, sorafenib also markedly decreased PDGF expression, which is the most potent proliferative factor for hepatic stellate cells.^{16,19,26} It is important to note that activation of perisinusoidal hepatic stellate cells is a critical step in hepatic fibrogenesis.^{16,19} Consistent with our data, antifibrotic effectiveness has been also observed with some VEGF and PDGF inhibitors in different animal models.²¹⁻²³

In the present study, we also found a higher degree of neovascularization in livers from CBDL rats than in SHAM animals, as evidenced by elevated VEGFR-2 protein expression and vWF-positive vessels. The occurrence of hepatic angiogenesis has been frequently described in chronic liver disease,²⁰ where it appears to play a critical pathogenic role, either as part of the formation of liver fibrosis and inflammation or as a compensatory response to decreased blood supply in the cirrhotic liver. We observed a marked reduction of this neovascularization following sorafenib treatment. Intriguingly, the increased intrahepatic angiogenesis observed in CBDL rats was not associated with VEGF overexpression. Instead, the expression of VEGF was even lower in CBDL rats than in SHAM animals, and it was not modified by sorafenib. The reason why VEGF expression is decreased in livers of CBDL rats despite having increased intrahepatic neovascularization is at present unknown. Notably, reduced VEGF expression associated with VEGFR-2 overexpression and increased vascular density has also been found recently in cirrhotic livers.^{27,28} In addition, studies in CBDL rats have shown a transient up-regulated expression of VEGF in the liver, almost limited to the first days after the BDL procedure.²⁹ It can be proposed, but not yet proven, that VEGF production increases in the early stages of cirrhosis to induce endothelial cell proliferation and formation of new vessels, whereas in advanced stages, stabilization and maturation of newly formed vessels is mainly mediated by other growth factors.^{30,31} In any case, angiogenesis is a multifactorial, extremely complex process involving a huge number of molecules and cells regulated at different levels by various factors.³ Hence, it is not surprising that different angiogenic factors may be observed depending on the fibrosis stage, grade of inflammation, or maturation of vasculature.

The protective effects of sorafenib against tissue damage and inflammation were observed not only in livers of cirrhotic rats, but also in splanchnic organs from both

PPVL and CBDL animals. Indeed, we found increased inflammation in the intestines of PPVL and CBDL rats, as well as elevated mesenteric expression of the proinflammatory mediators TNF- α , IL-1 β , and iNOS, compared with the SHAM group.^{17,24} The LPS-binding protein LBP, which enhances cellular responses to LPS,²⁵ was also overexpressed in PPVL and CBDL animals. These data support that small intestinal bacterial overgrowth and translocation of bacteria across the intestinal wall play an important role in the intestinal inflammation associated with portal hypertension.^{6,7,32} Interestingly, sorafenib markedly reduced the splanchnic inflammatory response in both portal hypertensive experimental models. In addition, the finding that iNOS protein expression was increased in mesenteries from PPVL and CBDL rats could suggest that, although the main enzymatic source of the splanchnic NO overproduction that contributes to hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertension is eNOS,^{13,17} a small part of NO derived from iNOS could also participate in the portal hypertensive splanchnic hyperemia.

As noted earlier, sorafenib caused a marked 80% decrease in splanchnic neovascularization, but only a moderate (18%) reduction in the extent of portosystemic collaterals. It is likely that a greater decrease in collateralization may take longer than the 2-week course of treatment evaluated in this study. It should be noted in this regard that patients with cirrhosis who undergo orthotopic liver transplantation maintain an increased portocollateral blood flow for months.³³ On the other hand, it is also possible that there are intrinsic differences in the sensitivity of vessels to the lack of growth factors or differences in the extent of vessel maturation.^{3,34} In this regard, it is important to point out that collaterals are frequently large vessels, suggesting a high degree of vessel maturation.³⁵ Therefore, the integrity of mature collateral vessels may be less influenced by antiangiogenic therapy than that of the newly formed splanchnic vasculature. The marked decrease in PP and splanchnic hyperemia in response to sorafenib is a very relevant effect, because even if collaterals are still present, their potential risk to result in clinical complications would be substantially reduced by this treatment.³⁵⁻³⁷

In conclusion, our current study provides *in vivo* evidence that sorafenib has several beneficial effects in experimental models of portal hypertension by inducing an approximately 80% decrease in splanchnic neovascularization, which translates into a marked attenuation of the hyperdynamic splanchnic and systemic circulations, as well as a significant 18% decrease in the extent of portosystemic collateral vessels. In cirrhotic rats, treatment with the multitargeted tyrosine kinase inhibitor also resulted in

a 25% reduction in portal pressure and a remarkable improvement in liver damage and intrahepatic fibrosis, inflammation, and angiogenesis. Notably, the beneficial effects of sorafenib against tissue damage and inflammation were observed not only in livers of cirrhotic rats, but also in splanchnic organs from portal hypertensive and cirrhotic animals, as described above. Keeping in mind the limitations of translating results in animal models into clinical practice, we believe that our findings will be stimulating for consideration of this therapeutic approach in patients suffering from advanced portal hypertension, and we predict accelerated progress in this field of research.

Acknowledgment: We thank Hector Garcia for technical assistance and Raul Mendez for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

References

- Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-13.
- Thalheimer U, Bosch J, Burroughs AK. How to prevent varices from bleeding: shades of grey. The case for nonselective beta blockers. *Gastroenterology* 2007;133:2029-2036.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-1155.
- Fernandez M, Vizutti 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.
- 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. *J Hepatol* 2005;43:98-103.
- 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. *J Hepatol* 2006;44:1033-1039.
- 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 hyperemia in portal hypertensive rats. *Gut* 2007;56:560-564.
- 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;46:1208-1217.
- Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Bosch J, Fernandez M. The somatostatin analogue octreotide inhibits angiogenesis in the earliest, but not in advanced, stages of portal hypertension in rats. *J Cell Mol Med* 2008;12:1690-1699.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-7109.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-134.
- Llover JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390.
- Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Bernadich C, Piersa C, Whittle BJ, et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase

- in the hyperdynamic circulation of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:1487-1495.
14. Fernandez M, Pizcueta P, Garcia-Pagan JC, Feu F, Cirera I, Bosch J, et al. Effects of ritanerisn, a selective and specific 52-serotonergic antagonist, on portal pressure and splanchnic hemodynamics in rats with long-term bile duct ligation. *HEPATOLOGY* 1993;18:389-393.
 15. Franco D, Gigou M, Szekeley AM, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. *Arch Surg* 1979;114:1064-1067.
 16. Batailler R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-218.
 17. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *HEPATOLOGY* 2002;35:478-491.
 18. Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *HEPATOLOGY* 1999;29:1672-1679.
 19. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989;84:1786-1793.
 20. Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *HEPATOLOGY* 2007;45:817-825.
 21. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unternährer 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;313:952-961.
 22. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:786-796.
 23. Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-Laque 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;46:1919-1926.
 24. Bendtsen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 1988;19:183-191.
 25. Albillos A, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;363:1608-1610.
 26. Semela D, Das A, Langer D, Kang N, Leof E, Shah V. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-B2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;135:671-679.
 27. Brodsky S, Mendeleev N, Melamed M, Ramaswamy G. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:373-377.
 28. Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:2349-2357.
 29. Tanaka A, Taneyama 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;22:1993-2000.
 30. Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 1999;103:341-345.
 31. Medina J, Caveda L, Sanz-Cameno P, Arroyo AG, Marin-Vilchez S, Majano PL, et al. Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. *J Hepatol* 2003;38:660-667.
 32. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *HEPATOLOGY* 1993;17:1081-1085.
 33. Navasa M, Forns X, Sanchez V, Andreu H, Marcos V, Borrás JM, et al. Quality of life, major medical complications and hospital service utilization in patients with primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *J Hepatol* 1996;25:129-134.
 34. 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;60:1388-1393.
 35. Escorsell A, Bosch J. Pathophysiology of variceal bleeding. In: Groszmann RJ, Bosch J, eds. *Portal Hypertension in the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004:155-166.
 36. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2003;37:902-908.
 37. D'Amico G, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology* 2006;131:1611-1624.

Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension

Marc Mejias¹, Ester Garcia-Pras¹, Javier Gallego¹, Raul Mendez², Jaime Bosch¹, Mercedes Fernandez^{1,*}

¹Liver Unit, Institute of Biomedical Research IDIBAPS, CIBERhd, Hospital Clinic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; ²Centre for Genomic Regulation (CRG), University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Background & Aims: Splenomegaly is a frequent hallmark of portal hypertension that, in some cases, can be very prominent and cause symptoms like abdominal pain, splenic infarction, and cytopenia. This study characterizes the pathogenetic mechanisms leading to spleen enlargement in portal hypertensive rats and focuses on mTOR pathway as a potential modulator of splenomegaly in portal hypertension.

Methods: Characterization of splenomegaly was performed by histological, hematological, immunohistochemical and Western blot analyses in rats with portal hypertension induced by portal vein ligation, and compared with sham-operated animals. The contribution of the mTOR signaling pathway to splenomegaly was determined in rats with fully developed portal hypertension and control rats by treatment with rapamycin or vehicle.

Results: Our results illustrate that splenomegaly in portal hypertensive rats arises as a consequence of the interplay of several factors, including not only spleen congestion, as traditionally thought, but also enlargement and hyperactivation of the splenic lymphoid tissue, as well as increased angiogenesis and fibrogenesis. Since mTOR signaling plays a central role in immunological processes, angiogenesis and fibrogenesis, we next determined the involvement of mTOR in splenomegaly. Interestingly, mTOR signaling was overactivated in the spleen of portal hypertensive rats, and mTOR blockade by rapamycin profoundly ameliorated splenomegaly, causing a 44% decrease in spleen size. This effect was most likely accounted for the inhibitory action of rapamycin on lymphocyte proliferation, neovascularization and fibrosis.

Conclusions: These findings shed light on the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertension, and identify mTOR signaling as a potential target for therapeutic intervention in this disease.

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

Introduction

Splenomegaly is a commonly encountered consequence of portal hypertension and chronic liver diseases that can potentially contribute to morbidity and detriment to patients' quality of life [1]. Spleen enlargement can lead to the development of cytopenias from splenic sequestration, including thrombocytopenia [1,2], which may impact routine care and limit treatment options of patients with chronic liver disease [1]. The bulk of the spleen can also result in areas of ischemia and episodes of splenic infarction [1]. Very enlarged spleens may also be at risk of spontaneous rupture or rupture after minor trauma [1]. In addition, in patients with cirrhosis, the observation of enlargement of the spleen during the follow-up is associated with increased probability of complications of portal hypertension [3]. To date, there is no specific medical therapy for splenomegaly.

The precise pathogenetic mechanisms leading to spleen enlargement in portal hypertension have been poorly characterized. Traditionally, splenomegaly was thought to be due to passive splenic congestion, as a mere consequence of the rise in portal venous pressure and the increased resistance to splenic blood outflow [4]. More recently, the role of tissue hyperplasia besides congestion has also been suggested [5]. The present study addresses these questions and demonstrates that the pathophysiology of splenomegaly in portal hypertensive rats is complex and involves several complementary mechanisms that, most likely, act in concert, including, not only blood congestion in the splenic red pulp, but also a combination of angiogenesis and fibrogenesis, as well as enlargement and hyperactivation of the lymphoid compartment of the spleen.

In addition to shedding light on the regulation of splenomegaly development and spleen function in portal hypertension, these observations are also suggestive of potential benefits for a treatment strategy that drives down the aforementioned abnormalities observed in the enlarged spleen to mitigate splenomegaly and portal hypertension. An attractive target for such therapeutic strategy could be the mammalian target of rapamycin (mTOR). The rationale for it is that mTOR is an ubiquitously expressed serine/threonine kinase that regulates cell growth and proliferation, and plays a pivotal role in immunological processes [6–8], angiogenesis [9–12], and fibrogenesis [13,14], which, as we report in the present study, are enhanced in the spleen of portal hypertensive rats.

Keywords: Portal hypertension; Splenomegaly; mTOR signaling

Received 29 June 2009; received in revised form 25 September 2009; accepted 12 October 2009; available online 4 February 2010

* Corresponding author. Tel.: +34 93 2275400; fax: +34 93 2279348.

E-mail address: mercefernandez@ub.edu (M. Fernandez).

Abbreviations: mTOR, mammalian target of rapamycin; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, VEGF receptor-2; PDGFR-β, platelet-derived growth factor receptor-β; TNF-α, tumor necrosis factor-α; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; p70S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase; IgG, immunoglobulin G; PVL, partial portal vein ligation; SHAM, sham-operation; H&E, hematoxylin and eosin; α-SMA, α-smooth muscle actin.



Research Article

Therefore, a further goal of our study was to determine whether the mTOR signaling pathway is implicated as a contributor factor in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats, and to ascertain whether splenomegaly could be improved by inhibiting mTOR. To accomplish this goal, we utilized rapamycin, which is a potent and exquisitely specific inhibitor of mTOR that has been used clinically in several disease states [15–18]. Our results demonstrate that the activity of mTOR signaling is increased in the spleen of portal hypertensive rats, and that chronic mTOR blockade by rapamycin leads to a dramatic regression of splenomegaly in rats with established portal hypertension, an effect that was most likely due to the inhibitory action of rapamycin on cellular proliferation, angiogenesis and fibrogenesis.

Materials and methods

Materials

Rapamycin was purchased from Wyeth Europe (Berkshire, United Kingdom). Antibodies against vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor-2 (VEGFR-2), platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), CD3, CD45RA, thrombopoietin, c-Mpl, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against heme oxygenase-1 and peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Stressgen (Sidney, Canada). Antibodies against eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and their phosphorylated forms were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibody against CD43 was from Serotec (Raleigh, NC). Anti-immunoglobulin G (IgG) antibody was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma (St. Louis, MO).

Animals and rapamycin treatment schedule

Portal hypertension was induced in male Sprague-Dawley rats (300–350 g body weight) by partial portal vein ligation (PPVL), as previously described [19]. Sham-operated (SHAM) rats underwent the same surgical procedure, with the portal vein being isolated and manipulated, but not ligated. Rapamycin ($2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$; PPVL: $n = 7$; SHAM: $n = 8$) or vehicle (0.9% sodium chloride; PPVL: $n = 8$; SHAM: $n = 7$) was administered intraperitoneally, over a 2-week period, starting one week after ligation, when portal hypertension and splenomegaly are fully established [19]. The choice of rapamycin dose was based on our earlier studies that showed inhibition of VEGF production and angiogenesis in portal hypertensive rats at this dose [19], and that steady-state concentrations are reached after 7 days [20]. All animals received humane care according to the guidelines of the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Western blot analysis

Proteins were separated by SDS-PAGE and Western blotting was performed using the corresponding primary antibodies and detected by enhanced chemiluminescence. Loading accuracy was evaluated by membrane rehybridization with anti-GAPDH antibodies [19,21].

Histological and immunohistochemical analyses

Sections from paraffin-embedded spleens, fixed in 10% buffered formalin solution, were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Sirius Red, or immunostained for detection of CD3, CD45RA, CD43, Ki67 and α -SMA. Sections were visualized by light microscopy and images were acquired using an AxioCam camera (Carl Zeiss Vision, Germany). Analysis of digitalized images was performed with the assistance of AxioVision softwares [19,21].

Hematological analysis

Blood samples were obtained from the rats via the femoral artery. Complete blood cell count analysis was performed with a hematology analyzer.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM and compared with Student *t* test and ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons, and with the Mann-Whitney *U* test for non-parametric data. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results

Increased spleen size in portal hypertension

As expected, portal hypertensive rats exhibited splenomegaly 3 weeks after PPVL. Thus, spleen weight was $1.69 \pm 0.12 \text{ g}$ in PPVL rats and $1.01 \pm 0.08 \text{ g}$ in SHAM animals ($p < 0.01$). The ratio of splenic weight to body weight, which is a measure of spleen size, also increased, by 78%, in vehicle-treated PPVL animals, compared with vehicle-treated SHAM rats ($p < 0.05$; Fig. 1).

Enlargement and hyperactivation of splenic lymphoid tissue in portal hypertension

To get further insight into the pathophysiology of splenomegaly in portal hypertension, we first focused our attention on the lymphoid tissue of the spleen, also known as white pulp. Morphometric quantification on spleen sections stained with H&E

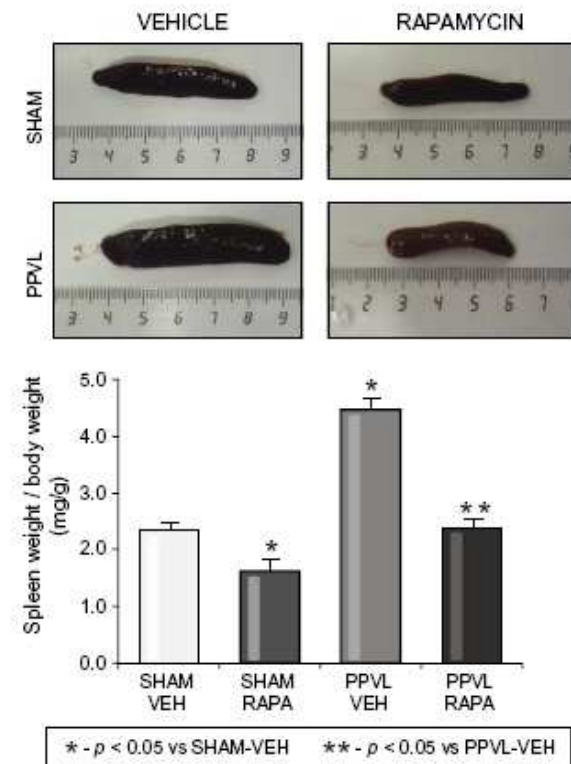


Fig. 1. Effects of portal hypertension on spleen size: changes after mTOR inhibition. Photographs of spleens from rapamycin- or vehicle-treated PPVL and SHAM rats. Quantification of the ratio of splenic weight to body weight.

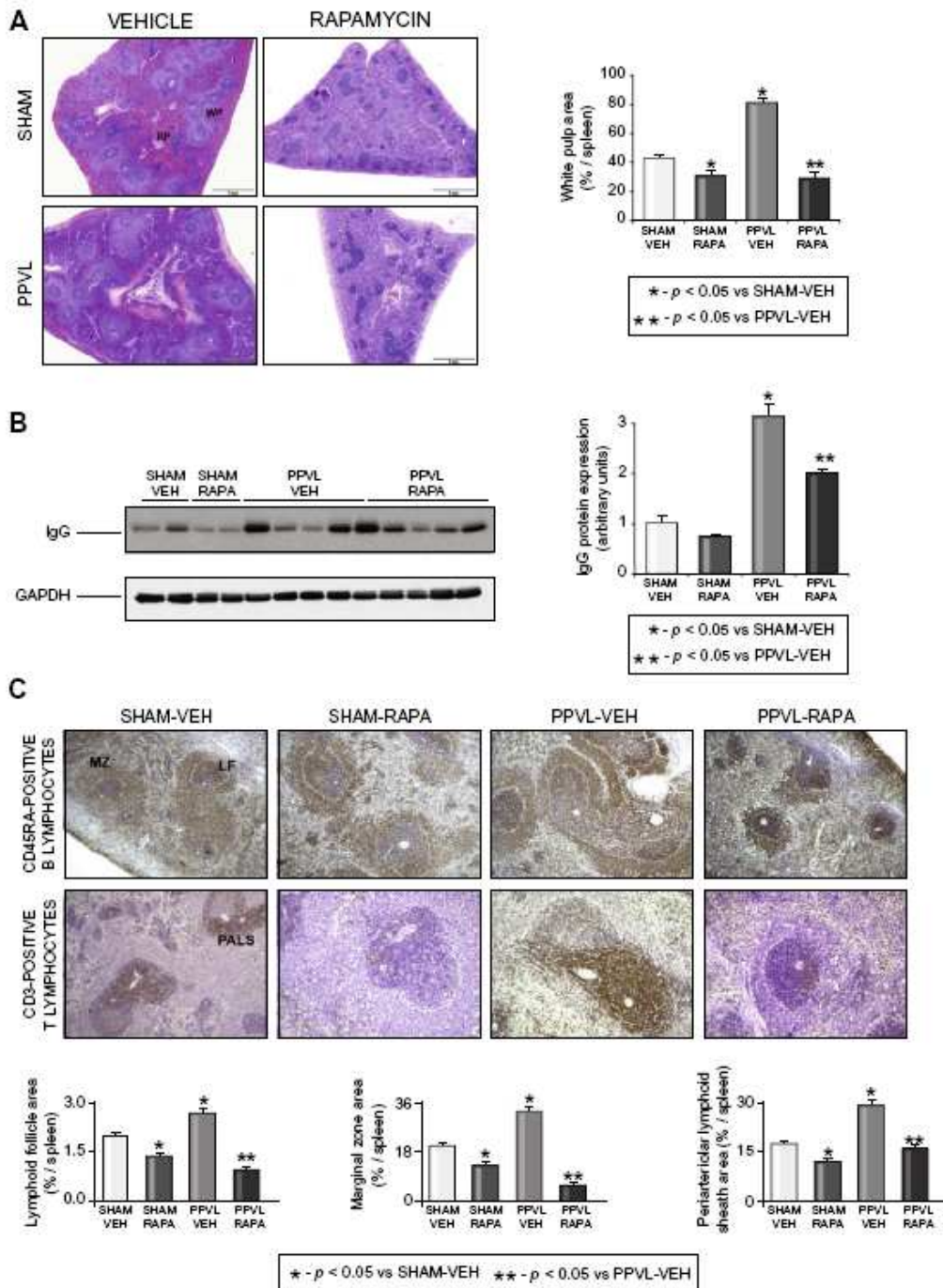


Fig. 2. Effects of portal hypertension on splenic immunoarchitecture and immune function: changes after mTOR inhibition. (A) Photomicrographs of H&E-stained spleen sections (magnification 12.5 \times) showing white pulp (WP) and red pulp (RP). Quantification of WP area. (B) Immunoblot of splenic IgG. (C) Immunohistochemical detection of CD45RA and CD3 in spleens. Quantification of the area occupied by WP compartments: marginal zone (MZ), lymphoid follicles (LF), and periarteriolar lymphoid sheath (PALS).

Research Article

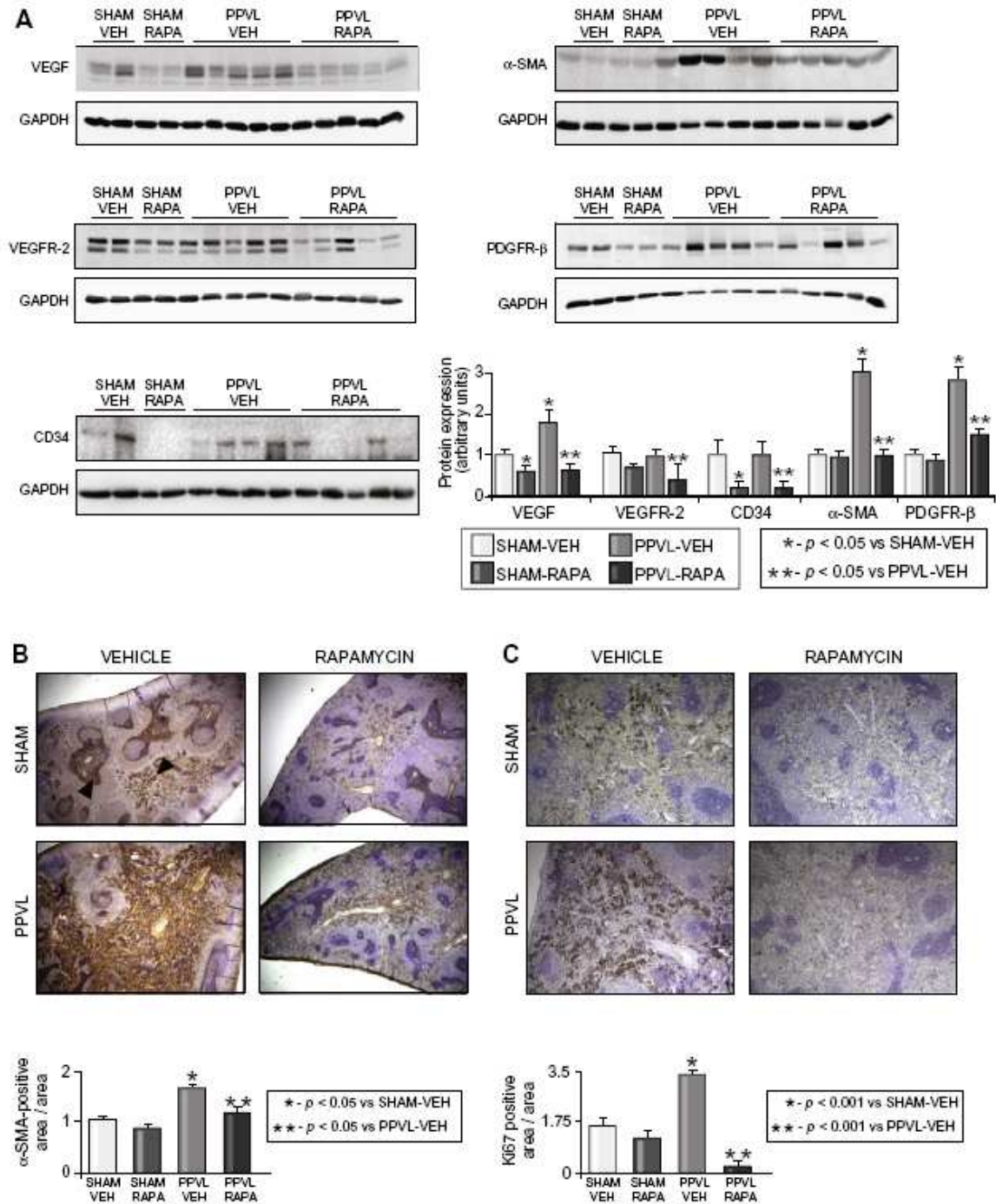


Fig. 3. Effects of portal hypertension on splenic neovascularization: Changes after mTOR inhibition. (A) Immunoblot of splenic VEGF, VEGFR-2, CD34, α-SMA and PDGFR-β. (B) Immunohistochemical detection of α-SMA-positive cells (arrows) in spleens (magnification 25×). Quantification of α-SMA-positive area. (C) Spleen sections immunostained for Ki67 (magnification 50×). Quantification of Ki67-positive area.

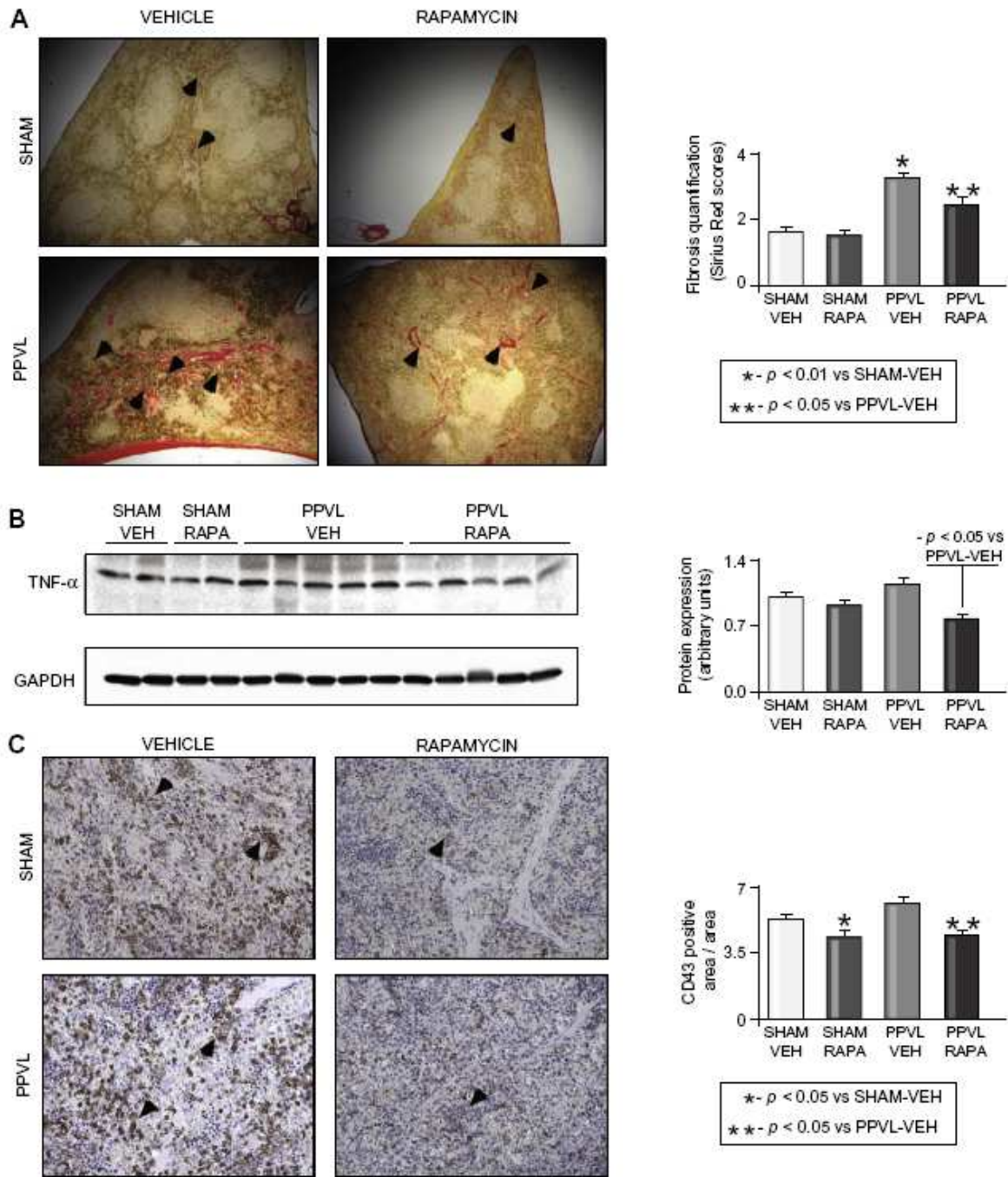


Fig. 4 Effects of portal hypertension on fibrosis and inflammation: Changes after mTOR inhibition. (A) Photomicrographs of Sirius Red-stained spleen sections from rapamycin- or vehicle-treated PPVL and SHAM rats (magnification 50 \times). Quantification of fibrosis. (B) Immunoblot of splenic TNF- α . (C) CD43 immunostaining in spleens. Quantification of CD43-positive area.

revealed an evident expansion of the splenic lymphoid region in portal hypertensive rats. Taking into account the increase in spleen size, the area occupied by the white pulp was thus signif-

icantly greater in vehicle-treated PPVL rats than in vehicle-treated SHAM animals (91% increase; $p < 0.05$; Fig. 2A). The spleen of portal hypertensive rats also had an enhanced immunological

Research Article

function, since the expression of lymphocyte-derived IgG-class antibodies was clearly higher in the spleen of PPVL rats than in SHAM animals ($p < 0.05$; Fig. 2B). These findings suggest that enlargement and hyperactivation of the white pulp play an important role in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats.

Increased splenic angiogenesis and fibrogenesis in portal hypertension

Recent investigations have demonstrated that neovascularization is increased in splanchnic organs in experimental models of portal hypertension and cirrhosis, and have highlighted that angiogenesis is a pathological hallmark of portal hypertension [19,21–24]. With this in mind, we next sought to determine whether angiogenesis was increased in the spleen of portal hypertensive rats. Indeed, we detected, using the Western blot technique, a significant up-regulation of the potent angiogenic factor VEGF in the spleen from vehicle-treated PPVL rats, compared with SHAM animals receiving vehicle (Fig. 3A). In addition, even though the relative expression of the endothelial cell markers VEGFR-2 and CD34 per unit of weight was similar in the spleen from vehicle-treated PPVL rats than in SHAM animals (Fig. 3A), as spleen weight increased greatly in portal hypertension, it is plausible to assume that an overall increase in the absolute expression of these endothelial markers may occur in the whole spleen of PPVL rats. By immunoblotting and immunohistochemistry, we also found a robust increase in the expression of the perivascular cell markers α -SMA and PDGFR- β [25,26] in the splenic red pulp of vehicle-treated PPVL rats, compared with vehicle-treated SHAM animals ($p < 0.05$; Fig. 3A and B). Notably, the splenic red pulp from vehicle-treated PPVL rats exhibited a 99% increase in Ki67-positive cells ($p < 0.001$; Fig. 3C), which are presumed to be proliferating sinusoidal endothelial cells [27,28]. Taken these results together, angiogenesis appears to be involved in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats. Since angiogenesis is a process commonly related to progressive fibrogenesis [24], we also explored whether splenomegaly associated to portal hypertension was also driven by fibrogenesis. Our results suggest that this could be the case. Thus, we carried out histomorphological analysis to detect the presence of fibrosis in the spleen using Sirius Red staining, and found a considerable amount of fibrosis extending to the entire splenic parenchyma in vehicle-treated PPVL rats, compared with vehicle-treated SHAM animals (89% increase; $p < 0.01$; Fig. 4A).

Activation of mTOR signaling pathway in portal hypertension

mTOR is the central component of a complex signaling network that regulates cell growth and proliferation, promoting processes such as immunity, angiogenesis and fibrogenesis [6–8], which, as we report in this study, are key processes in splenomegaly progression during portal hypertension. Therefore, we hypothesized that the mTOR pathway could be implicated as a contributor factor in the splenomegaly secondary to portal hypertension. To assess this possibility, we performed immunoblots on spleens from rapamycin-treated and vehicle-treated rats to detect the expression of 4E-BP1 and p70S6K, which are two direct downstream targets of the mTOR kinase and whose phosphorylation states are a convenient and widely used measure of the activity of mTOR [8]. Interestingly, we found that spleens from vehicle-

treated PPVL rats exhibited elevated expression of phosphorylated p70S6K relative to the expression of total p70S6K, compared to vehicle-treated SHAM animals ($p < 0.05$; Fig. 5), strongly suggesting that mTOR signaling is overactivated in the spleen of portal hypertensive rats. The expression of phospho-4E-BP1, however, was not significantly different when comparing PPVL and SHAM animals (Fig. 5). Phosphorylated forms of p70S6K and 4E-BP1 can also be distinguished based on altered migration on immunoblots (slower migrating species).

Effects of mTOR inhibition on spleen size

To gauge the impact of targeting mTOR pathway on spleen enlargement, we treated portal hypertensive rats with the mTOR inhibitor rapamycin for 2 weeks, starting when splenomegaly and portal hypertension had already set in. Chronic rapamycin treatment efficiently down-regulated the mTOR signaling pathway in the spleen of PPVL rats, as shown by the significant reduction of 4E-BP1 and p70S6K phosphorylation, compared to

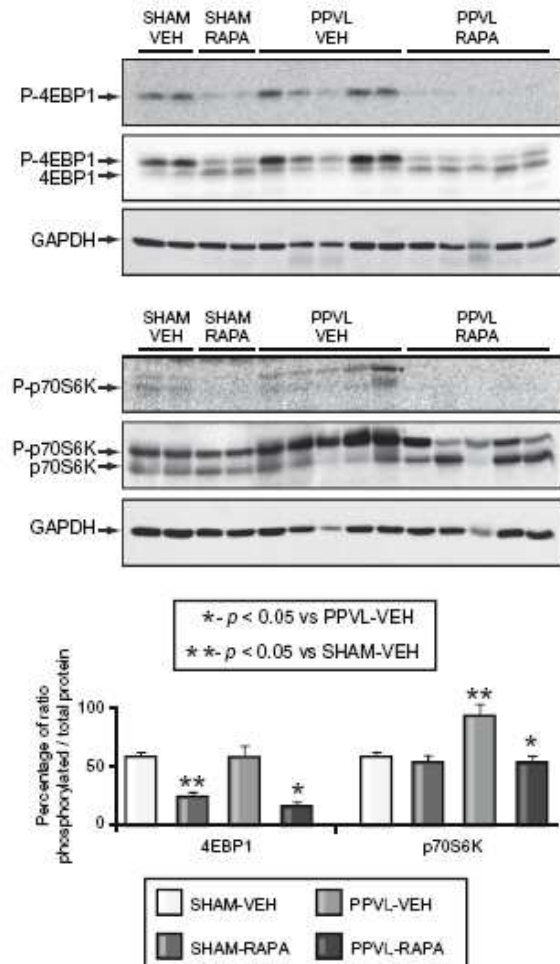


Fig. 5. Effects of portal hypertension on mTOR signaling pathway: down-regulation by rapamycin. Immunoblot of splenic 4E-BP1 and p70S6K.

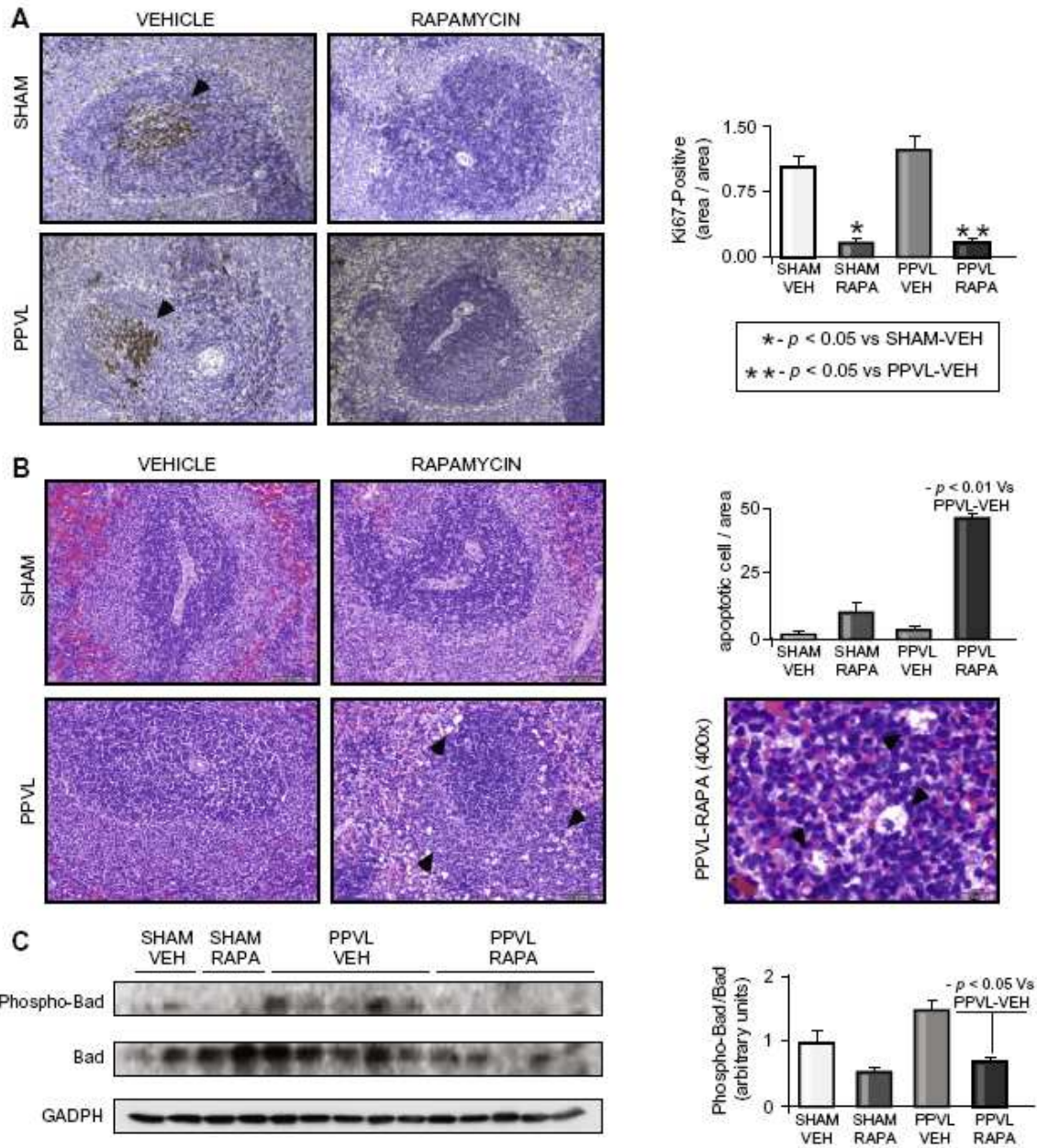


Fig. 6. Effects of rapamycin on lymphocyte proliferation and apoptosis. (A) Spleen sections immunostained with Ki67 showing Ki67-expressing cells in lymphoid follicles of the white pulp, and a marked decrease of this expression after rapamycin in PPVL rats. (B) Micrographs (magnification 100 \times) of H&E-stained sections indicating (arrows) the presence of apoptotic cells within the white pulp of spleens from rapamycin-treated PPVL rats. A higher magnification of this region (400 \times) is also shown. Apoptotic cells were counted and expressed as numbers of apoptotic cells per area. (C) Immunoblot of splenic Bad.

vehicle-treated PPVL animals ($p < 0.05$; Fig. 5). Impressively, rapamycin treatment caused a profound amelioration of established splenomegaly in portal hypertensive rats, as demonstrated by the statistically significant 44% decrease in spleen size observed when comparing rapamycin-treated PPVL rats with vehicle-trea-

ted PPVL animals ($p < 0.05$; Fig. 1). In SHAM rats, the reduction of spleen size by rapamycin was less pronounced (26% decrease; $p < 0.05$; Fig. 1). These results indicate that mTOR activation plays a major role in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats.

Research Article

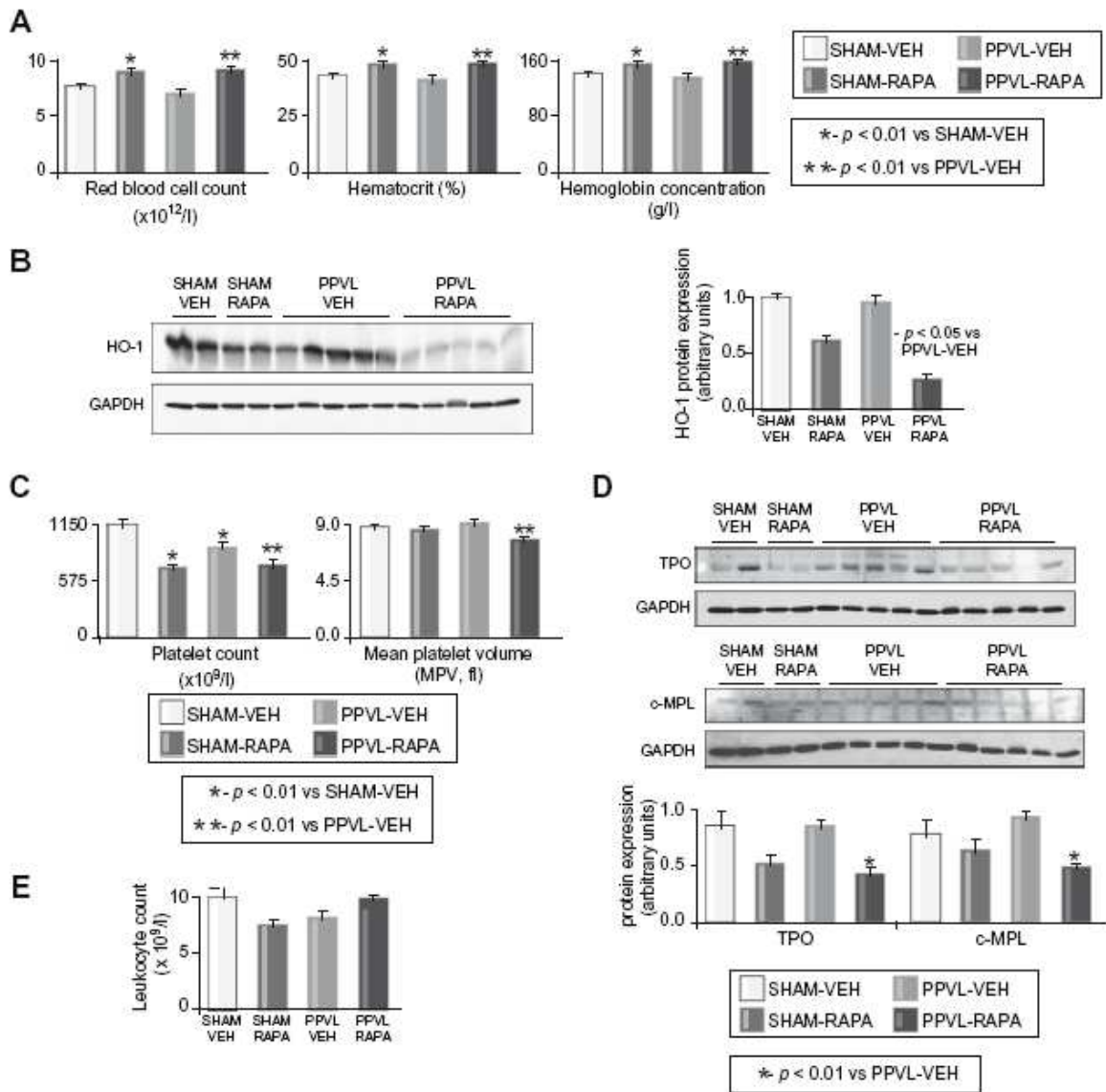


Fig. 7. Effects of mTOR inhibition on peripheral blood cell counts. (A) Red blood cell count, hematocrit and hemoglobin concentration in peripheral blood of rapamycin- or vehicle-treated PPVL and SHAM rats. (B) Immunoblot of splenic HO-1. (C) Platelet count and mean platelet volume. (D) Immunoblot of splenic TPO and cMPL. (E) Leukocyte count in peripheral blood.

Effects of mTOR inhibition on splenic immunoarchitecture and immune function

mTOR blockade also significantly abrogated the increased splenic lymphoid area in PPVL rats (64% decrease versus vehicle-treated PPVL animals; $p < 0.05$; Fig. 2A), and caused a marked regression of the various white pulp compartments. Thus, using immunohistochemistry for specific surface marker proteins, we found that lymphoid follicles and the marginal zone, which are mainly populated by CD45RA-positive B-lymphocytes [29], as well as periarteriolar lymphoid sheaths, in which CD3-positive T-lymphocytes predominate [29], were all markedly reduced after rapamycin in PPVL rats (Fig. 2C). Notably, rapamycin also significantly attenuated the overexpression of IgG observed in the spleen of PPVL rats ($p < 0.05$; Fig. 2B). These results indicate that hyperactivation of mTOR signaling is partly responsible for the excessive white pulp area and function observed in the spleen of portal hypertensive rats.

Since rapamycin, as an mTOR inhibitor, can reduce lymphocyte proliferation [7] and induce lymphocyte apoptosis [30], we

therefore asked whether the reduction of white pulp area, and the activity observed in the spleen of portal hypertensive rats, within 2 weeks of rapamycin treatment, was secondary to the effect of rapamycin on the cellular proliferation and/or activation of apoptosis of lymphocytes. Cellular proliferation was analyzed by an immunohistochemical method that detected the expression of Ki67, a nuclear protein that is expressed only in proliferating cells, but not in quiescent cells [28]. Treatment with rapamycin markedly reduced the Ki67-positive cells observed in the splenic lymphoid follicles of PPVL rats ($p < 0.05$; Fig. 6A), indicating suppression of lymphocyte proliferation by rapamycin. Next, apoptosis was quantified by counting apoptotic cells in H&E-stained spleen sections. We found a significant increase in the number of apoptotic cells in PPVL rats upon chronic rapamycin treatment (Fig. 6B). The majority of apoptotic cells were located in the white pulp (Fig. 6B), where it was apparent that the primary cells undergoing apoptosis were lymphoid cells. In SHAM rats, rapamycin had little proapoptotic effect (Fig. 6B). To confirm the induction of apoptosis by rapamycin, we assessed the phosphorylation status of the proapoptotic molecule Bad by Western immunoblotting. When phosphorylated, Bad remains inactive in the cytosol, but when dephosphorylated, it translocates to the mitochondria, providing proapoptotic effects on cells [31]. We found that rapamycin treatment led to a marked dephosphorylation of Bad in the spleen of PPVL rats, compared with vehicle-treated PPVL animals (Fig. 6C). Taken together, these results indicate that the molecular basis for the rapamycin-induced attenuation of the excessive white pulp area and function in PPVL rats involves reduction of lymphocyte proliferation and activation, as well as apoptotic elimination of immune cells.

Effects of mTOR inhibition on splenic angiogenesis and fibrogenesis

In addition to lymphocytes, mTOR inhibitors can act antiproliferatively for several other cell types such as endothelial cells and vascular smooth muscle cells [18,32]. Indeed, there is an extensive literature reporting the regulation of angiogenesis by mTOR [9–12]. Based on these considerations, we next determined whether increased splenic angiogenesis, stimulated by mTOR activation, is involved in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats. Remarkably, the splenic neovascularization observed in portal hypertensive rats was strongly and consistently suppressed after 2 weeks of rapamycin treatment, as demonstrated by the down-regulation of VEGF, VEGFR-2, CD34, α -SMA, and PDGFR- β in the spleen of PPVL rats, compared to vehicle-treated PPVL animals (Fig. 3A and B). Furthermore, the up-regulation of the cellular proliferation marker Ki67, found in the splenic red pulp of PPVL rats, was barely detectable after rapamycin therapy (Fig. 3C). These rapamycin-induced effects can be attributed to the ability of this drug to effectively inhibit the mTOR signaling pathway, suggesting that mTOR-dependent angiogenesis is involved in the pathogenesis of splenomegaly in portal hypertensive rats. In addition, mTOR blockade by rapamycin significantly decreased splenic fibrosis in PPVL rats (20% reduction versus vehicle-treated PPVL animals; $p < 0.05$; Fig. 4A). This antifibrotic effect was associated with a reduction in splenic inflammatory activity. We thus detected by Western blot a diminished expression of the proinflammatory cytokine TNF- α ($p < 0.05$; Fig. 4B), and by immunohistochemistry for CD43, a decreased inflammatory cell infiltrate in the splenic red pulp of rapamycin-treated PPVL rats as compared to vehicle-treated ani-

mals (25% reduction; $p < 0.05$; Fig. 4C); these findings highlighted the therapeutic effectiveness of rapamycin as an antifibrotic and anti-inflammatory treatment strategy in experimental portal hypertension [13,14].

Effects of mTOR inhibition on peripheral blood cell counts

Enlarged spleens have an enhanced capacity for sequestering circulating blood cells [1,2]. Accordingly, it is expected that agents that decrease splenomegaly, like rapamycin, will diminish the splenic blood cell pooling and increase cell counts in peripheral blood. Indeed, hematological analysis revealed that the reversal of splenomegaly observed in rapamycin-treated PPVL rats translated into a significant 29% increase in red blood cell counts, hematocrit (15% increase), and hemoglobin concentration (15% increase), compared to vehicle-treated PPVL rats ($p < 0.01$; Fig. 7A), probably indicating that erythrocyte sequestration within the enlarged spleen has been reduced after rapamycin treatment. Of note, the expression of heme oxygenase-1, which catabolizes heme released after splenic degradation of erythrocytes [33], was markedly down-regulated by rapamycin in the spleen from PPVL rats ($p < 0.05$; Fig. 7B), thus further suggesting that the presence of increased red blood cell counts after rapamycin was most likely due to decreased pooling and reduced destruction of red cells in the spleen.

Platelet counts, however, did not increase but rather decreased further after rapamycin treatment in PPVL rats, compared to vehicle-treated PPVL animals (20% reduction; $p < 0.01$; Fig. 7C). The precise mechanism by which rapamycin decreases blood platelet counts is not fully understood, but rapamycin-induced reduction of platelet production could be involved. In support of this possibility, we found that the mean platelet volume, which is a measurement of the average size of the platelets and gives information about platelet production, was significantly decreased by rapamycin in PPVL rats ($p < 0.01$; Fig. 7C). Furthermore, the expression of thrombopoietin and its cell surface receptor c-Mpl, which are the most important physiological regulators of platelet formation and are expressed in the spleen [34], was significantly down-regulated by rapamycin in PPVL rats ($p < 0.01$; Fig. 7D). Therefore, it is possible that a deficient production of thrombopoietin secondary to rapamycin treatment may well contribute to the drop in blood platelet count observed in PPVL rats. These results suggest that rapamycin, in combination with a thrombopoietic growth factor that stimulates platelet production, may yield augmented benefit in portal hypertensive patients [35]. There were no significant differences in the counts of leukocytes in peripheral blood between experimental groups (Fig. 7E).

Discussion

The results of the present study challenge the conventional hypothesis that splenic congestion is the major player in the pathogenesis of portal hypertension-associated splenomegaly, pointing to a critical role for angiogenesis, fibrogenesis, and expansion and hyperactivation of the splenic immune system as additional key players in splenomegaly. A major finding of this study is indeed the potential immunologic involvement in the genesis of splenomegaly in portal hypertension. Thus, the size of the white pulp compartment was significantly increased in

Research Article

the spleen from portal hypertensive rats, and the lymphocyte activity and ability to produce immunoglobulins were potentiated, suggesting that the enlarged spleen in portal hypertension may still have a relevant immune function. It is relatively straightforward to envisage that under circumstances where there is an unwanted increase in blood-borne antigens, like in the portal hypertensive syndrome, it would be highly desirable to maximize the efficient trapping and clearance of these antigens to re-establish immune homeostasis. Since the spleen plays a crucial role in this process [29], it seems reasonable to suggest that splenomegaly could be, in part, the result of a compensatory increase in the immunologic activity of the spleen when faced with a compromised situation during portal hypertension.

Another important outcome of our study is the presence of increased angiogenesis and fibrogenesis within the spleen of portal hypertensive rats, and the involvement of these processes in the pathological splenomegaly associated with portal hypertension. Thus, our results demonstrate a significant up-regulation of the powerful angiogenic growth factor VEGF [36], and the neo-vascularization markers VEGFR-2, CD34, α -SMA and PDGFR- β [25,26,36] in the spleen from portal hypertensive rats. In addition, the splenic parenchyma of rats with portal hypertension also contained an abundance of fibrosis, as demonstrated by Sirius Red staining. It is likely that both angiogenesis and fibrogenesis progress in a synchronized manner, primarily by the production of several key proangiogenic/inflammatory mediators, like VEGF and TNF- α , occurring in the microenvironment of the spleen during the portal hypertensive syndrome.

This improved understanding of the pathophysiology of spleen enlargement also led us to the identification of mTOR signaling pathway as a new and attractive therapeutic target for splenomegaly in portal hypertensive rats. We thus found that the expression of phospho-p70S6K, a key molecule activated by mTOR [8], was higher in spleens from portal hypertensive rats than in SHAM control animals, supporting a scenario in which mTOR signaling is fired up under chronic portal hypertension. In addition, pharmacological inhibition of mTOR by rapamycin markedly attenuated the severity of splenomegaly and increased red blood cell counts (by 29%) in experimental portal hypertension. It is worthwhile to mention that these rapamycin-induced effects occurred in addition to the the recently observed beneficial actions of rapamycin in portal hypertensive rats, with reduction (by 17%) in portal pressure and mitigation of the hyperdynamic splanchnic circulation (i.e., 17% decrease in superior mesenteric artery blood flow and 38% increase in the resistance of the superior mesenteric artery) [19]. On the basis of the findings reported here and in our previous publication [19], targeting mTOR signaling could therefore, represent a potentially effective therapeutic approach for portal hypertension ameliorating, not only splenomegaly, but also the hemodynamic disturbances that characterize the portal hypertensive syndrome. In this context, human studies have demonstrated that rapamycin is an effective and well-tolerated therapy against various illnesses [15–18]. However, the potential benefits of mTOR inhibition in portal hypertension should be treated with caution since they were accompanied by a reduction in platelet counts, which although slight, is of concern in patients that already have low platelet counts. For this reason, any attempt to use rapamycin in clinical settings should be very prudent and carefully monitor platelet counts and, if needed, supplemented by a thrombopoietic growth factor to stimulate platelet production [35]. In addition, in patients with massive splenomegaly, in which spleen enlarge-

ment may be responsible for pain or substantial discomfort, a course of rapamycin may be considered before a decision for a more invasive treatment such as surgery or splenic artery embolization.

Acknowledgements

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to declare regarding funding from industry or conflict of interest with respect to this manuscript. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN; SAF2008-02461, BFU2008-02373 and FIS06/0623) and Fundacio La Marato de TV3 (MARATO-081210). CIBERhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III (MICINN). M.M. is a recipient of a Fellowship from the MICINN. M.F. is a recipient of a contract from the I3 Programme (MICINN).

References

- [1] McCormick PA, Murphy KM. Splenomegaly, hypersplenism and coagulation abnormalities in liver disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:1009–1031.
- [2] Adhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008;48:1000–1007.
- [3] Berzigotti A, Zappoli P, Magalotti D, Tiani C, Rossi V, Zoli M. Spleen enlargement on follow-up evaluation: a non-invasive predictor of complications of portal hypertension in cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1129–1134.
- [4] Moschowitz E. The pathogenesis of splenomegaly in hypertension of the portal circulation: congestive splenomegaly. *Medicine* 1988;27:187–210.
- [5] Bolognesi M, Merkel C, Sacerdoti D, Nava V, Gatta A. Role of spleen enlargement in cirrhosis with portal hypertension. *Dig Liver Dis* 2002;34:144–150.
- [6] Inoki K, Guan KL. Complexity of the mTOR signaling network. *Trends Cell Biol* 2006;16:206–212.
- [7] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253–262.
- [8] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–1945.
- [9] Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J. P70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1999;274:26776–26782.
- [10] Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1 α , through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 2002;100:3767–3775.
- [11] Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battagay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis *in vitro* via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J* 2002;16:771–780.
- [12] Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Hegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128–135.
- [13] Blecker E, De Gottardi A, Neef M, Untermahrer 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;313:952–961.
- [14] Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:786–796.
- [15] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–348.
- [16] Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007;12:112–124.
- [17] Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 1996;273:239–242.

- [18] Edinger AL, Linardic CM, Chiang GG, Thompson CB, Abraham RT. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res* 2003;63:8451–8460.
- [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;46:1208–1217.
- [20] Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit* 1995;17:666–671.
- [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;49:1245–1256.
- [22] 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.
- [23] 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. *J Hepatol* 2005;43:98–103.
- [24] Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604–620.
- [25] Drenckhahn D, Wagner J. Stress fibres in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *J Cell Biol* 1986;102:1738–1747.
- [26] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276–1312.
- [27] Maesawa C, Sakuma T, Sato T, Masuda T, Muro-oka G, Satodate R. Structural characteristics of splenic sinuses in idiopathic portal hypertension. *Pathol Int* 1995;45:642–648.
- [28] Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison M, Gerdes J. Ki-67 immunoreexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest* 1997;77:697–698.
- [29] Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005;5:606–616.
- [30] Abbas AK. Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 1996;84:655–657.
- [31] Downward J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1999;1:E33–E35.
- [32] Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:412–417.
- [33] Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008;60:79–127.
- [34] Lok S, Kauschansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565–568.
- [35] McHutchison JG, Dusheiko G, Shiffman ML, Rodriguez-Torres M, Sigal S, Bourliere M, et al. Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with cirrhosis associated hepatitis C. *N Engl J Med* 2007;357:2227–2236.
- [36] Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153–1155.

4. RESUM DE RESULTATS

4. RESUM DE RESULTATS

4.1. Estudi 1: Reversió de la hipertensió portal i la circulació hiperdinàmica esplàncnica mitjançant la inhibició combinada de VEGF i PDGF en rates amb hipertensió portal experimental.

- L'expressió dels factors proangiogènics VEGF i PDGF de les rates amb hipertensió portal induïda per lligadura parcial de la vena porta està regulada a l'alça en els òrgans esplàncnics, concretament en l'intestí prim. L'expressió de tots dos factors s'incrementa conforme progressa la hipertensió portal, però el pic de màxima expressió de VEGF precedeix el de PDGF.

- Els tractaments administrats quan la hipertensió portal es troba en desenvolupament, des del moment en que es lliga la vena porta i durant els cinc dies posteriors, van produir els següents resultats:
 - o El tractament amb Rapamicina va disminuir la neovascularització esplàncnica, tal i com mostra el descens de l'àrea vascular al mesenteri, a través de la reducció de la sobreexpressió de VEGF i va evitar l'establiment de la circulació hiperdinàmica esplàncnica, reduint el flux sanguini i incrementant la resistència vascular en el territori esplànncic. La pressió portal no es va reduir a causa de la dràstica reducció de vasos col·laterals portosistèmics.
 - o El tractament amb Glivec no va produir cap efecte significatiu en els paràmetres hemodinàmics examinats.
 - o El tractament combinat de Rapamicina i Glivec va oferir uns resultats equiparables a la Rapamicina per si sola en tots els paràmetres, llevat d'una lleugera tendència a reduir més la formació de vasos col·laterals portosistèmics.

- Els tractaments administrats quan la hipertensió portal es troba plenament establerta, a partir d'una setmana des de la lligadura de la vena porta i durant les dues setmanes posteriors, van produir els següents resultats:
 - o El tractament amb Rapamicina va disminuir la neovascularització esplàncnica, com demostra la menor àrea vascular detectada al mesenteri, a través de la prevenció de la sobreexpressió de VEGF i va

atenuar la circulació hiperdinàmica esplàncnica, reduint el flux sanguini i incrementant la resistència vascular en el territori esplànncic. En aquest cas, la pressió portal sí que es va reduir significativament, en un 17%, ja que la Rapamicina no va assolir una reducció de la col·lateralització portosistèmica.

- El tractament amb Glivec va ser eficaç en la inhibició de la sobreexpressió de PDGF, però aquesta no va traduir-se en una reducció de la neovascularització esplàncnica. A nivell hemodinàmic, el Glivec no va comportar canvis significatius en cap paràmetre, tret d'un lleuger augment de la pressió arterial. Tampoc va alterar la formació de vasos col·laterals portosistèmics.
 - El tractament combinat de Rapamicina i Glivec va inhibir la sobreexpressió tant de VEGF com de PDGF i, conseqüentment, va produir una reducció de la neovascularització esplàncnica. L'efecte antiangiogènec es va acompanyar d'efectes hemodinàmics, amb una reducció important del flux i un increment de la resistència vascular a nivell esplànncic. La pressió portal es va reduir marcadament, en un 40%. La col·lateralització esplàncnica va disminuir de manera modesta però significativa.
 - El tractament combinat amb els dos fàrmacs, doncs, va oferir efectes més importants que l'addició dels efectes de tots dos per separat
- Cap dels tractaments va tenir efectes significatius en els animals control (*sham*), als quals se'ls va realitzar una manipulació quirúrgica comparable a la lligadura de la vena porta però sense realitzar la lligadura del vas.

4.2. Estudi 2: Efectes beneficiosos de l'inhibidor multikinasa Sorafenib sobre la circulació esplàncnica, intrahepàtica i portocol·lateral en rates amb hipertensió portal i cirròtiques.

Efectes sobre la neovascularització esplàncnica:

- Tant en el model d'hipertensió portal prehepàtica (PPVL) com el de cirrosi biliar secundària (CBDL) es va observar una sobreexpressió en el mesenteri dels factors proangiogènics VEGF i PDGF, dels marcadors de cèl·lula endotelial

CD31 i VEGFR-2 i dels marcadors de cèl·lules perivasculares α -SMA i PDGFR- β .

- En els dos models, el tractament amb Sorafenib va inhibir la sobreexpressió de VEGF i PDGF, la qual cosa es va traduir en una reducció de la neovascularització esplàncnica, evidenciada pel descens de l'àrea vascular al mesenteri i el descens de l'expressió dels marcadors de cèl·lula endotelial (CD31 i VEGFR-2) i de cèl·lules perivasculares (α -SMA i PDGFR- β) en comparació amb els animals que van rebre vehicle.
- El tractament va inhibir la fosforilació de ERK1/2 en els òrgans esplànncics, concretament a l'intestí prim, cosa que indica que el Sorafenib va inhibir la senyalització a través de la via Raf/MEK/ERK en les rates PPVL i CBDL.
- No es va observar cap efecte antiangiogènic del Sorafenib en les rates control o *sham*.

Efectes sobre la circulació col·lateral portosistèmica:

- Els models d'hipertensió portal van desenvolupar un grau de col·lateralització portosistèmica molt alt, d'aproximadament el 98% de shunting en ambdós casos.
- El tractament amb Sorafenib va reduir en un 18% el shunting, tan en els animals PPVL com els CBDL, indicant una reducció en la formació de vasos col·laterals portosistèmics.

Efectes hemodinàmics:

- Les rates PPVL i CBDL van presentar les alteracions característiques de la hipertensió portal, amb una pressió portal (PP) elevada, un increment en el flux de l'artèria mesentèrica superior (SMABF) acompanyat d'una reducció en la resistència (SMAR) d'aquesta artèria i una baixada de la pressió arterial (MAP) en comparació amb les rates control o *sham*.

- El tractament amb Sorafenib en les rates PPVL va atenuar la circulació hiperdinàmica esplàncnica, amb una reducció del 17% en el flux de l'artèria mesentèrica superior i un increment del 30% en la seva resistència, en comparació amb els animals que van rebre vehicle. La pressió portal no es va reduir a causa de la reducció de vasos col·laterals portosistèmics provocada pel Sorafenib. A nivell sistèmic, la pressió arterial no es va modificar amb el tractament, però sí que es va reduir la despesa cardíaca en un 24%.
- El tractament amb Sorafenib en les rates CBDL també va atenuar la circulació hiperdinàmica esplàncnica, amb una reducció del 28% en el flux de l'artèria mesentèrica superior i un increment del 39% en la seva resistència, en comparació amb els animals que van rebre vehicle. En aquest cas, la millora en la circulació hiperdinàmica esplàncnica sí que es va traduir en un important descens de la pressió portal, que es va reduir en un 25%, tot i es va inhibir la formació de vasos col·laterals portosistèmics en una magnitud similar que a les rates PPVL. A nivell sistèmic, la pressió arterial no es va modificar amb el tractament, però sí que es va reduir la despesa cardíaca en un 31%, tot i que no va ser un canvi estadísticament significatiu.
- Tots aquests efectes hemodinàmics del Sorafenib són atribuïbles a la inhibició de la vascularització esplàncnica, descartant els seus possibles efectes sobre la dilatació vascular, ja que el tractament no va afectar l'expressió de la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) ni de l'hemoxygenasa-1 (HO-1), principals fonts dels vasodilatadors òxid nítric (NO) i monòxid de carboni (CO).

Efectes intrahepàtics: únicament es van examinar els fetges dels animals amb cirrosi biliar, ja que el fetge dels animals amb hipertensió portal prehepàtica no és susceptible de patir alteracions importants.

- El tractament amb Sorafenib en les rates CBDL va reduir en un 49% la fibrosi hepàtica en comparació amb les rates que van rebre vehicle. Aquest efecte podria estar mediat per l'atenuació de l'activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques, com indica la menor expressió de α -SMA i PDGFR- β detectada en el fetge.

- El Sorafenib també va disminuir l'infiltrat inflamatori al fetge, així com l'expressió de mediadors d'inflamació com el TNF- α , LBP o iNOS.
- L'increment de la neovascularització hepàtica que va acompanyar els processos d'inflamació i fibrogènesi va ser atenuat pel tractament amb Sorafenib, amb un descens del recompte de vasos positius pel Factor de Von Willebrand (vWF).
- L'expressió de VEGF en el fetge, tot i la neovascularització observada, va resultar menor en els animals CBDL que en els *sham*.
- Novament, el tractament no va afectar l'expressió de eNOS ni de HO-1, principals fonts dels vasodilatadors NO i CO, indicant que l'efecte reductor de la resistència vascular intrahepàtica no va ser depenent de l'efecte de Sorafenib sobre la producció de vasodilatadors.

Efectes sobre la inflamació intestinal:

- El tractament amb Sorafenib va millorar les alteracions provocades per la hipertensió portal i la cirrosi a nivell de l'intestí prim (PPVL i CBDL), concretament va corregir l'estructura anòmala de les vellositats intestinals, més curtes que en les rates *sham*, i va reduir l'infiltrat inflamatori i la producció dels mediadors d'inflamació TNF- α , LBP o iNOS.

En tots els casos, el tractament de dues setmanes amb Sorafenib va ser ben tolerat. Els animals no van presentar signes de toxicitat ni efectes adversos (pèrdua de pes, diarrea, hemorràgies), ni tampoc es va observar mortalitat deguda al tractament.

4.3. Estudi 3: Importància de la senyalització per mTOR en la patofisiologia de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal.

- Les rates amb hipertensió portal presenten esplenomegàlia tres setmanes després de la PPVL.

- A més a més de la congestió, a la melsa de les rates PPVL tenen lloc altres mecanismes amb una implicació en el desenvolupament de l'esplenomegàlia: proliferació i hiperactivació del teixit limfoide, angiogènesi i fibrogènesi:
 - o Les melses dels animals PPVL van mostrar una expansió de l'àrea de teixit limfoide, la polpa blanca, que es va acompanyar d'un increment en la funció immunològica, ja que es va observar una major producció d'immunoglobulina G.
 - o La sobreexpressió de VEGF, conjuntament amb la detecció de cèl·lules en proliferació en la polpa vermella, indica l'existència d'un procés angiogènic a la melsa de les rates PPVL. Aquest procés no es va traduir en una sobreexpressió dels marcadors de cèl·lula endotelial, CD34 i VEGFR-2, però sí dels marcadors de cèl·lules murals, α -SMA i PDGFR- β . De tota manera, pot assumir-se que l'increment de l'expressió dels marcadors endotelials hagi quedat emmascarat pel fet que la mida i el pes de la melsa s'hagin incrementat a causa de la hipertensió portal.
 - o Les rates amb hipertensió portal van desenvolupar un procés de fibrogènesi a la melsa, tal com va mostrar la tinció Sirius Red.

- La via de senyalització de mTOR, que intervé en la regulació de creixement i proliferació cel·lular i està implicada en processos immunològics, angiogènics i fibrogènics, es troba sobreactivada en les rates amb hipertensió portal, com demostra l'increment de la fosforilació de p70S6K, mediador situat per sota de mTOR en la seva via de senyalització (60,61).

- El tractament amb Rapamicina es va traduir en una menor senyalització a través de la via de mTOR, que es va acompanyar d'una atenuació de l'esplenomegàlia:
 - o La mida de la melsa de les rates amb hipertensió portal tractades amb Rapamicina es va reduir en un 44% respecte les rates que van rebre vehicle.
 - o La Rapamicina va reduir l'expansió de l'àrea de teixit limfoide i la seva funció immunològica, la qual cosa va suposar una menor producció d'immunoglobulina G. Analitzades per separat, la disminució de l'àrea de polpa blanca va tenir lloc per igual en les tres regions que la componen: els fol·licles limfoides i la zona marginal, àrees riques en limfòcits B, i la beina limfoide periarteriolar o PALS, rica en limfòcits T. Aquests efectes de la Rapamicina sobre l'àrea limfoide de la melsa van

ser mediat a través de dos mecanismes: la reducció de la proliferació cel·lular en aquesta àrea i la inducció de l'apoptosi de cèl·lules limfoides.

- La inhibició de mTOR va atenuar el procés angiogènic observat en les rates amb hipertensió portal, regulant a la baixa l'expressió de VEGF i atenuant la proliferació cel·lular detectada a nivell de la polpa vermella. Els marcadors de vascularització, CD34 i VEGFR-2 per a l'endoteli i α -SMA i PDGFR- β per a les cèl·lules murals, van reduir-se conseqüentment.
 - Les rates amb hipertensió portal tractades amb Rapamicina van presentar menys fibrogènesi que les rates tractades amb vehicle.
 - Els efectes antiangiogènics i antifibrogènics de la Rapamicina es van acompanyar d'un efecte antiinflamatori, tal i com mostra la reducció en l'infiltrat inflamatori i la menor expressió de la citocina TNF- α .
- La reducció de la mida de la melsa es va traduir en una disminució de la seva capacitat de segrestar i destruir eritròcits, de manera que el tractament amb Rapamicina va suposar un increment en el nombre de glòbuls vermells circulants. En canvi, el recompte de plaquetes es va veure reduït, probablement degut a un efecte de la inhibició de mTOR disminuint la seva producció.

5. DISCUSIÓ DE RESULTATS

5. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

5.1. Estudi 1: Reversió de la hipertensió portal i la circulació hiperdinàmica esplàncnica mitjançant la inhibició combinada de VEGF i PDGF en rates amb hipertensió portal experimental.

Els resultats de l'estudi mostren que el desenvolupament de la circulació hiperdinàmica i de la neovascularització esplàncnica i la formació de vasos col·laterals portosistèmics en rates amb hipertensió portal són deguts, si més no en part, a processos d'angiogènesi promoguts pel VEGF, tal i com demostra la seva prevenció mitjançant l'administració de Rapamicina, un inhibidor de la via de senyalització de VEGF, durant el període en el qual la hipertensió portal s'està desenvolupant.

Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts anteriorment amb altres metodologies per interferir la via de senyalització del VEGF, afegint consistència a la idea que l'angiogènesi està implicada en la patogènesi de la hipertensió portal (14,23).

El fet innovador que posa en relleu aquest estudi s'extreu dels experiments en els quals la teràpia antiangiogènica s'administra a models animals amb una hipertensió portal plenament establerta. Aquesta situació s'aproxima de manera més precisa al context dels pacients amb hipertensió portal, els quals, en termes generals, són diagnosticats quan la síndrome ja es troba en un estadi avançat i presenten manifestacions clíniques. La idea, doncs, era determinar si una teràpia antiangiogènica podia ser capaç, no només de prevenir les alteracions hemodinàmiques associades a la hipertensió portal, sinó també de revertir-les un cop aquestes ja s'havien establert completament.

Donat que la regulació a l'alça dels factors de creixement VEGF i PDGF resulta imprescindible en els processos de formació, estabilització i maduració de nous vasos sanguinis a partir de la vasculatura preexistent, sorgeix la hipòtesi que tots dos factors estarien sobreexpressats en la hipertensió portal, i que incidint sobre les dues vies ahora és factible assolir una major eficàcia en la reducció de les anomalies circulatòries associades a aquesta síndrome que fent-ho sobre cadascuna d'elles per separat.

Així doncs, en primer lloc, aquest estudi demostra que en el territori esplàncnic de les rates amb hipertensió portal es produeix, a més a més d'una sobreexpressió de VEGF, tal i com ja ha estat reportat amb anterioritat, una sobreexpressió de PDGF.

El tractament amb Rapamicina administrat quan la hipertensió portal es troba plenament establerta, a partir d'una setmana des de la lligadura de la vena porta va disminuir la neovascularització esplàncnica a través de la prevenció de la sobreexpressió de VEGF i va atenuar la circulació hiperdinàmica esplàncnica, reduint el flux sanguini i incrementant la resistència vascular en el territori esplàncnic, fets que van traduir-se en un descens de la pressió portal. Aquests resultats indiquen que la via de senyalització de VEGF té una implicació, no només en el desenvolupament de la hipertensió portal, sinó també en el seu manteniment. L'efecte antiangiogènic de la Rapamicina va restringir-se a la neovascularització, ja que el tractament no va produir cap efecte en la vasculatura normal dels animals control.

El tractament amb Glivec únicament va oferir efectes a nivell del PDGF, reduint la seva expressió, i del recobriment dels vasos sanguinis per part de les cèl·lules murals, tal i com indica la menor expressió dels marcadors de pericits α -SMA i PDGFR- β .

El tractament combinat de Rapamicina i Glivec va assolir una inhibició tan de VEGF com de PDGF, així com dels marcadors de cèl·lula endotelial, CD31 i VEGFR-2, i de pericits, α -SMA i PDGFR- β . Aquests efectes antiangiogènics es van traduir en una reversió gairebé completa de l'increment de la pressió portal i del flux esplàncnic, d'una magnitud superior a l'addició dels efectes obtinguts amb cada fàrmac per separat, suggerint una interacció sinèrgica, entre les vies de VEGF i PDGF, en el manteniment de les alteracions circulatòries associades a la hipertensió portal.

Una altra dada que s'extreu d'aquests resultats és que, en absència de cèl·lules perivasculares, en el cas del present estudi quan s'inhibeix el seu reclutament per part de PDGF, l'endoteli és més vulnerable a estratègies antiangiogèniques que afecten les cèl·lules endotelials, com el bloqueig de la via de senyalització de VEGF.

Un fet que crida l'atenció és que el bloqueig de VEGF amb Rapamicina no va afectar els vasos col·laterals portosistèmics quan aquests ja s'havien format (tractament a partir d'una setmana després de la PPVL), i que el tractament combinat de Rapamicina i Glivec, incidint tant en les cèl·lules endotelials com en els pericits, va assolir una

modesta regressió dels vasos col·laterals portosistèmics, reduint el *shunting* en un 9%. El bloqueig de VEGF, en canvi, sí que va ser efectiu en prevenir la formació d'aquests vasos durant el seu desenvolupament. Aquestes observacions donen peu a diverses especulacions. Per exemple, seria possible que assolir una reducció mesurable de la col·lateralització requerís d'un tractament més llarg de dues setmanes. A favor d'aquesta explicació podem argumentar que els pacients cirròtics que reben un trasplantament de fetge i que, per tant, normalitzen automàticament la seva hemodinàmica hepàtica i esplàncnica, mantenen una circulació col·lateral durant mesos abans aquesta no es corregeix (66). D'altra banda, és possible que al llarg de les diferents etapes de la seva maduració, els vasos col·laterals presentin diferències respecte a la seva dependència dels factors de creixement, i que en les seves fases més madures, aquests vasos siguin poc sensibles a la manca de VEGF i PDGF (67). De tota manera, tot i que els vasos col·laterals es mantinguin presents, el fet de reduir dràsticament la pressió portal i l'hiperdinàmia esplàncnica fa que els riscos que porten associats, sobretot el risc d'hemorràgies, es redueixin (68).

5.2. Estudi 2: Efectes beneficiosos de l'inhibidor multikinasa Sorafenib sobre la circulació esplàncnica, intrahepàtica i portocol·lateral en rates amb hipertensió portal i cirròtiques.

Mitjançant estratègies antiangiogèniques es pot assolir una millora important de la hipertensió portal en models animals, com ja s'ha observat anteriorment (14,23). Aquest nou estudi determina que l'inhibidor multikinasa Sorafenib causa efectes beneficiosos en la circulació esplàncnica, la circulació intrahepàtica i també la circulació sistèmica, així com en els vasos col·laterals portosistèmics de dos models diferents d'hipertensió portal: rates amb hipertensió portal prehepàtica i rates amb cirrosi biliar secundària.

La recerca translacional és una manera de dissenyar i dirigir la recerca científica per tal que els resultats d'aquesta siguin traslladables a la pràctica clínica (69). Aquest treball té la intenció d'aportar informació sobre l'eficàcia terapèutica dels agents antiangiogènics, en aquest cas l'inhibidor multikinasa Sorafenib, en les alteracions associades a la hipertensió portal, de cara a definir la viabilitat dels tractaments d'aquest tipus com a estratègia terapèutica en pacients, i per tant, s'han explorat els

efectes d'aquest fàrmac sobre diferents processos fisiopatològics associats a aquesta síndrome.

Els resultats del treball mostren que el Sorafenib té efectes protectors a nivell de la circulació esplàncnica, la circulació intrahepàtica i també la circulació sistèmica, així com en els vasos col·laterals portosistèmics en rates PPVL i CBDL. El tractament va ser eficaç interferint la senyalització per part del VEGF i el PDGF, així com la via Raf/MEK/ERK, crucials per al procés de formació, estabilització i maduració de nous vasos sanguinis. L'efecte antiangiogènec del Sorafenib es va traduir en una disminució d'un 80% de la neovascularització esplàncnica, tant en el model PPVL com el model CBDL. A més a més, aquests efectes no es van observar en els animals *sham*, indicant que els efectes del Sorafenib es van limitar a la vasculatura en proliferació sense afectar els vasos quiescents. La inhibició de la neovascularització es va acompanyar d'una atenuació en la circulació hiperdinàmica esplàncnica i sistèmica, així com una reducció en la col·lateralització portosistèmica.

La reducció del flux esplàncnic provocada per Sorafenib no va comportar una baixada de la pressió portal en les rates PPVL. Aquest fet es pot atribuir a la inhibició parcial de la col·lateralització portosistèmica, la qual cosa suposaria una menor descompressió del territori portal a través de la derivació del flux a través dels vasos col·laterals. En canvi, en el model CBDL, l'atenuació de la hiperdinàmica esplàncnica va resultar en una reducció del 25% de la pressió portal, tot i que el Sorafenib va reduir la circulació col·lateral portosistèmica en la mateixa magnitud que en el model PPVL. Aquestes dades apunten a un efecte del Sorafenib reduint la resistència vascular a nivell del fetge cirròtic dels animals CBDL. En aquesta línia, es va observar una important atenuació del dany hepàtic, a nivell estructural amb una reducció de la fibrosi i la proliferació dels conductes biliars típica del model CBDL i a nivell de la inflamació amb una reducció de l'infiltrat inflamatori i de l'expressió de iNOS i de citocines proinflamatòries (TNF- α , LBP). El mecanisme responsable de l'atenuació de la inflamació i la fibrosi sembla ser la inhibició de l'activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques, tal com evidencia la marcada reducció de l'expressió dels marcadors de cèl·lula estrellada activada α -SMA i PDGFR- β , així com de PDGF, el principal factor de proliferació per aquestes cèl·lules (70). El present resultat està en consonància amb d'altres que ja han mostrar anteriorment la capacitat antifibròtica de certs inhibidors de VEGF i PDGF en diferents models animals (71-73).

A nivell hepàtic també es va observar un major grau de neovascularització en les rates CBDL, la qual va ser marcadament reduïda mitjançant el tractament amb Sorafenib. L'angiogènesi intrahepàtica ha estat descrita anteriorment en les malalties cròniques del fetge, i sembla estar implicada en la resposta compensadora a la manca de flux sanguini al fetge cirròtic, associant-se, a més, amb la fibrogènesi i la inflamació (74). Aquesta neovascularització té una estructura molt diferent dels sinusoides hepàtics, ja que té un endoteli continu i no fenestrat, fet que la fa molt menys permeable i empitjora la difusió d'oxigen de la sang als hepatòcits. La formació de nous vasos sanguinis, unida a la capillarització que experimenten els sinusoides, són alteracions implicats en l'empitjorament de la funció hepàtica (74,75).

El fet que el procés angiogènic detectat en el fetge no s'associï a una sobreexpressió de VEGF, sinó més aviat a una menor expressió d'aquest factor de creixement, no té, de moment, una explicació. De tota manera, aquesta observació està d'acord amb altres que s'han reportat recentment a nivell de fetge cirròtic, amb presència de neovascularització associada a una expressió reduïda de VEGF i una sobreexpressió de VEGFR-2 (76,77). D'altra banda, en el model CBDL s'ha descrit una sobreexpressió de VEGF a nivell hepàtic limitada als primers dies després de la lligadura del colèdoc (78). Això podria indicar que la producció de VEGF durant els primers dies de l'establiment de la cirrosi contribuiria a la proliferació de les cèl·lules endotelials, mentre que en etapes més avançades, l'estabilització i maduració dels vasos nouformats estaria mediada per altres factors.

Els efectes protectors del Sorafenib davant la inflamació i els danys estructurals dels teixits no es va limitar al fetge, sinó que també va ser observada en òrgans esplànquics, tan de rates PPVL com CBDL. A nivell de l'intestí prim es va observar inflamació acompanyada de l'expressió elevada de mediadors proinflamatoris, com l'enzim iNOS o les citocines TNF- α , IL-1 o LBP. Aquesta darrera, la proteïna que s'uneix a LPS, suggereix la presència d'un procés d'un sobrecreixement bacterià a nivell de l'intestí prim i la translocació bacteriana a través de la paret intestinal, la qual té una forta implicació en la inflamació intestinal associada a la hipertensió portal (79). El tractament amb Sorafenib va reduir marcadament la resposta inflamatòria en les rates PPVL i CBDL. Paral·lelament, tot i que eNOS, la forma constitutiva de l'enzim sintetitzador d'òxid nítric, és la principal font d'aquest vasodilatador contribuent a la hiperdinàmia esplànquica, la sobreexpressió de iNOS observada suggeriria una participació de l'òxid nítric produït per la forma induïble en la circulació hiperdinàmica esplànquica.

Com ja hem mencionat, el tractament amb Sorafenib va produir una disminució de la neovascularització esplàncnica d'un 80%, mentre que la reducció de la vasculatura col·lateral portosistèmica va ser tan sols d'un 18%. Tal i com ja s'especulava en la discussió de l'estudi anterior, aquesta diferència en la resposta dels vasos col·laterals portosistèmics i la neovascularització mesentèrica al tractament antiangiogènic podria explicar-se per les diferències intrínseques entre els diferents tipus de vasos a la privació de factors de creixement o a les diferències entre el grau de maduració dels dos llits vasculars (67). En aquesta línia, possiblement un tractament de dues setmanes sigui suficient per regressar els neovasos formats a nivell mesentèric, però no per afectar de la mateixa manera els vasos col·laterals, els quals són, generalment, vasos relativament grans amb un alt grau de maduració, cosa que els faria menys sensibles a la teràpia antiangiogènica.

Cal destacar que la dosi administrada als models animals, tant PPVL com CBDL, va ser, en proporció, molt menor que la que s'administra als pacients humans amb càncer hepatocel·lular. Això explicaria el fet que no s'observessin signes de toxicitat ni efectes adversos (pèrdua de pes, diarrea, hemorràgies), ni tampoc mortalitat deguda al tractament en els animals, cosa que contrasta amb els nombrosos efectes adversos, de naturalesa gastrointestinal, constitucional o dermatològica, reportats en els assaigs clínics del Sorafenib en humans, com la diarrea, la pèrdua de pes, reaccions cutànies, alopecia, anorèxia, etc (62).

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 l'aplicació d'una teràpia d'aquest tipus com a eina terapèutica en pacients amb hipertensió portal (80). En referència a un hipotètic tractament de tipus antiangiogènic en pacients amb hipertensió portal caldria realitzar una dosificació acurada per tal d'assolir eficàcia tenint en compte la tolerabilitat i la seguretat d'un tractament crònic d'aquest tipus, és a dir, que el tractament fos efectiu reduint la neovascularització patològica però no afectés la vasculatura normal. Així com en el cas dels pacients amb càncer hepatocel·lular es va utilitzar la dosi màxima tolerable (62), és factible que la dosi necessària per modular la fibrosi i les alteracions hemodinàmiques de la hipertensió portal fos molt menor (80).

5.3. Estudi 3: Importància de la senyalització per mTOR en la patofisiologia de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal.

Els resultats obtinguts en aquest treball complementen la hipòtesi convencional que assenyala la congestió esplènica com a principal responsable de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal, afegint altres mecanismes com l'angiogènesi, la fibrogènesi o l'expansió i hiperactivació del compartiment limfòide de la melsa, implicats en l'engrandiment de la melsa.

Un dels principals fets posats en relleu en el present estudi és la potencial implicació del sistema immunològic en l'origen de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal. En aquest sentit, es va observar l'expansió de la polpa blanca en la melsa de les rates amb hipertensió portal, així com la potenciació de la capacitat d'aquesta per produir immunoglobulines, indicant una funció immune de l'esplenomegàlia en la hipertensió portal. En un context en el qual es produeix un increment d'antígens circulants, com és la hipertensió portal, sembla lògic que l'eficiència a l'hora de retenir i eliminar aquests antígens es trobi augmentada. Donat que la melsa té un paper important en aquesta mena de processos (49), no és d'estranyar que durant la hipertensió portal tingui lloc un increment compensador de l'activitat immune d'aquest òrgan.

Un altre fet innovador proposat en aquest estudi és la presència de processos angiogènics i fibrogènics implicats en l'engrandiment de la melsa de les rates amb hipertensió portal. Els resultats mostren proliferació associada amb una sobreexpressió de VEGF, així com dels marcadors de cèl·lula endotelial, CD34 i VEGFR-2 (no en valor absolut, però sí en relació a l'increment de la mida de la melsa), i de cèl·lula mural, α -SMA i PDGFR- β . A més a més, el parènquima esplènic de les rates PPVL va presentar abundant dipòsit de fibra de col·lagen.

Aquests resultats indiquen el progrés en paral·lel de l'angiogènesi i la fibrogènesi estimulats per la sobreproducció de diversos mediadors proangiogènics i proinflamatoris, com són VEGF o TNF- α , en la melsa de les rates amb hipertensió portal.

El fet d'aprofundir en el coneixement de la patofisiologia de l'esplenomegàlia va permetre assenyalar la senyalització a través de mTOR com a diana terapèutica atractiva (81,82). Per aquest motiu, es va explorar l'estat d'activació d'aquesta via,

detectant un increment en la fosforilació de p70S6K, de la qual és responsable mTOR (64,65), donant peu a afirmar que la senyalització a través de mTOR es troba incrementada en el context de la melsa de les rates amb hipertensió portal.

La Rapamicina, com a inhibidor específic de mTOR, va ser capaç d'atenuar les manifestacions de l'esplenomegàlia en les rates PPVL, cosa que va comportar un increment del recompte d'eritròcits circulants. Aquests resultats, sumats als obtinguts en el primer dels estudis presentats, en els quals el mateix tractament administrat en aquest cas va assolir una reducció de la pressió portal i una reducció de la hiperdinàmia esplàncnica, indicarien que incidir en la senyalització a través de mTOR pot representar una prometedora estratègia de cara a millorar les alteracions hemodinàmiques de la hipertensió portal a nivell clínic. Per altra banda, a l'hora d'aplicar una teràpia d'aquest tipus caldria tenir en compte el fet que la inhibició de mTOR es va acompanyar d'una reducció en el recompte de plaquetes, que tot i ser lleu seria important en uns pacients que ja presenten un recompte baix de plaquetes. Per aquest motiu qualsevol hipotètic tractament amb Rapamicina en pacients amb hipertensió portal s'hauria d'acompanyar, per una banda, d'un seguiment precís dels nivells de plaquetes circulants, i d'altra banda, s'hauria de complementar amb algun factor trombopoiètic capaç d'estimular la producció de plaquetes.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

6.1. Estudi 1: Reversió de la hipertensió portal i la circulació hiperdinàmica esplàncnica mitjançant la inhibició combinada de VEGF i PDGF en rates amb hipertensió portal experimental.

- El desenvolupament de la hipertensió portal està associat a una sobreexpressió progressiva tant de VEGF com de PDGF.
- Quan la hipertensió portal s'està desenvolupant, la inhibició de la via de VEGF redueix la neovascularització i millora la circulació hiperdinàmica, a nivell esplànctic, i atenua la formació de vasos col·laterals portosistèmics
- Quan la hipertensió portal ja està plenament establerta, la inhibició de la via de VEGF millora la circulació hiperdinàmica esplàncnica i redueix la pressió portal. Si inhibim les vies de VEGF i PDGF alhora, els efectes són molt més importants que inhibint cada via per separat, revertint la circulació hiperdinàmica, reduint la neovascularització esplàncnica i abaixant la pressió portal de forma molt significativa
- Aquests resultats suggereixen una interacció entre les vies de VEGF i PDGF en el manteniment de la circulació hiperdinàmica i la neovascularització esplàncniques i de la pressió portal elevada en les rates amb hipertensió portal prehepàtica.

6.2. Estudi 2: Efectes beneficiosos de l'inhibidor multikinasa Sorafenib sobre la circulació esplàncnica, intrahepàtica i portocol·lateral en rates amb hipertensió portal i cirròtiques.

- El Sorafenib ofereix, mitjançant la inhibició dels processos angiogènics, fibrogènics i inflamatoris, efectes beneficiosos en el tractament de la hipertensió portal i la cirrosi a diversos nivells: la circulació esplàncnica, la circulació col·lateral portosistèmica, la circulació sistèmica i la microcirculació intrahepàtica.

- El tractament produeix una important disminució de la neovascularització esplàncnica que s'acompanya d'una atenuació de la circulació hiperdinàmica esplàncnica i sistèmica. El Sorafenib també és capaç de reduir la col·lateralització portosistèmica.
- En les rates cirròtiques, el tractament va resultar en una considerable reducció de la pressió portal, d'un 25%, a través d'una remarcable millora de la fibrosi, l'angiogènesi i la inflamació hepàtica.
- Els efectes beneficiosos del Sorafenib sobre les lesions estructurals dels teixits i la inflamació no es van limitar al fetge, sinó que també van tenir lloc en òrgans esplàncnics com l'intestí prim.
- Sempre tenint en compte 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 l'aplicació d'una teràpia d'aquest tipus com a eina terapèutica en pacients amb hipertensió portal.

6.3. Estudi 3: Importància de la senyalització per mTOR en la patofisiologia de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal.

- Els resultats de l'estudi posen en relleu la implicació d'altres mecanismes, a més a més de la congestió, en el desenvolupament de l'esplenomegàlia associada a la hipertensió portal: l'expansió i la hiperactivació del teixit limfoide esplènic, l'angiogènesi i la fibrogènesi.
- La via de senyalització de mTOR, implicada en la regulació de proliferació i creixement cel·lular, es troba hiperactivada a la melsa de les rates amb hipertensió portal i té un paper important en la esplenomegàlia.
- La inhibició de la via de mTOR mitjançant l'administració de Rapamicina es tradueix en una millora de l'esplenomegàlia, reduint la mida de la melsa i la seva capacitat de retenir i destruir eritròcits. Aquesta millora s'atribueix a l'acció inhibidora de la Rapamicina sobre la proliferació cel·lular, l'angiogènesi y la fibrogènesi.

- Considerant els resultats obtinguts anteriorment en rates amb hipertensió portal tractades amb Rapamicina (reducció de la pressió portal i atenuació de la circulació hiperdinàmica esplàncnica), la inhibició de mTOR podria representar una estratègia terapèutica prometedora per a la hipertensió portal.
- La principal reserva a l'hora de considerar aquesta estratègia és l'efecte de la Rapamicina sobre la producció de plaquetes, fet que obligaria a considerar la possibilitat de suplementar el tractament amb un factor estimulador de la trombopoiesi.

7. ALTRES PUBLICACIONS

7. ALTRES PUBLICACIONS EN EL MATEIX ÀMBIT TEMÀTIC

1. 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. **J Hepatol** 2005;43:98-103.
2. 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. **J Hepatol** 2006;44:1033-9.
3. 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;56(4):560-4.
4. Coll M, Genescà J, Raurell I, Rodríguez-Vilarrupla A, **Mejias M**, Otero T, Oria M, Esteban R, Guardia J, Bosch J, Martell M. Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. **J Hepatol** 2008;49:43-51.
5. **Mejias M**, Garcia-Pras E, Tiani C, Bosch J, Fernandez M. The somatostatin analogue octreotide inhibits angiogenesis in the earliest, but not in advanced, stages of portal hypertension in rats. **J Cell Mol Med** 2008;12:1690-9.
6. Tiani C, Garcia-Pras E, **Mejias M**, de Gottardi A, Berzigotti A, Bosch J, Fernandez M. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. **J Hepatol** 2009;50:296-305.

8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-13.
2. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141-56.
3. Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008;34:1715-28.
4. Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19:397-410.
5. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21(3):437-451
6. Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodes J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension. *Semin Gastrointest Dis* 1995;6:140-7.
7. Rockey DC. Vasoactive agents in intrahepatic portal hypertension and fibrogenesis: implications for therapy. *Gastroenterology* 2000;118:1261-5.
8. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-7.
9. Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-8.
10. Matei V, Rodríguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernández M, Bosch J, Garcia-Pagán JC. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl₄ cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:44-52.

11. Villanueva C, Balanzó J. Variceal bleeding: pharmacological treatment and prophylactic strategies. *Drugs* 2008;68:2303-24
12. Escorsell A, Bosch J. Pathogenesis of bleeding in portal hypertension. *Digestion* 1998;59(S2):2-5
13. Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology* 1985;5:419-24.
14. 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;126:886-94.
15. Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kviety PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984;247:G486-93.
16. Benoit JN, Womack WA, Hernandez L, Granger DN. "Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in the rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology* 1985;89:1092-6.
17. Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993;104:1750-4.
18. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993;18:1139-43.
19. Pizcueta P, Piqué JM, Fernández M, Bosch J, Rodés J, Whittle BJ, Moncada S. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992;103:1909-15.
20. Pizcueta MP, Piqué JM, Bosch J, Whittle BJ, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992;105:184-90.

21. Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, Sessa WC. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H2084-90.
22. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-91.
23. 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. *J Hepatol* 2005;43:98-103.
24. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003;9:653-60.
25. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
26. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
27. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006;20:1495-7.
28. Sumanovski LT, Battegay E, Stumm M, van der Kooij M, Sieber CC. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 1999;29:1044-9.
29. Sieber CC, Sumanovski LT, Stumm M, van der Kooij M, Battegay E. In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J Hepatol* 2001;34:644-50.
30. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-5.
31. Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-81.

32. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
33. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
34. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580:2879-87.
35. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-71.
36. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008;8:880-7.
37. Viñals F, Chambard JC, Pouyssegur J. P70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1999;274:26776-82.
38. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283-316.
39. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 2003;3:439-43.
40. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1241-57.
41. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276-312.
42. Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, Van Vlierberghe H, De Vos F, Olivevier K, Casteleyn C, Laukens D, De Vos M, Stassen JM, Carmeliet P, Colle I. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;137:2112-24.

43. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 2005;17:415-26.
44. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jiménez W. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 2008;48:1193-201.
45. Tiani C, Garcia-Pras E, Mejias M, de Gottardi A, Berzigotti A, Bosch J, Fernandez M. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol* 2009;50:296-305.
46. Moschowitz E. The pathogenesis of splenomegaly in hypertension of the portal circulation: congestive splenomegaly. *Medicine* 1988;27:187–210.
47. McCormick PA, Murphy KM. Splenomegaly, hypersplenism and coagulation abnormalities in liver disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:1009–31.
48. Bolognesi M, Merkel C, Sacerdoti D, Nava V, Gatta A. Role of spleen enlargement in cirrhosis with portal hypertension. *Dig Liver Dis* 2002;34:144–50.
49. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005;5:606–16.
50. Abralde JG, Pasarín M, García-Pagán JC. *World J Gastroenterol* 2006;12:6577-84.
51. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985;248:G618-25
52. Franco D, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. *Arch Surg* 1979;114:1064-67.
53. Centro Nacional de Epidemiología. Informe Mortalidad en España en 2007.

54. Thalheimer U, Bosch J, Burroughs AK. How to prevent varices from bleeding: shades of grey. The case for nonselective beta blockers. *Gastroenterology* 2007;133:2029-36.
55. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128-35.
56. Edinger AL, Linardic CM, Chiang GG, Thompson CB, Abraham RT. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res* 2003;63:8451-60.
57. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811-21.
58. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:493-502.
59. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-109.
60. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:835-44.
61. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
62. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359: 378-90.

63. Berzigotti A, Zappoli P, Magalotti D, Tiani C, Rossi V, Zoli M. Spleen enlargement on follow-up evaluation: a noninvasive predictor of complications of portal hypertension in cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1129–34.
64. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–45.
65. Inoki K, Guan KL. Complexity of the mTOR signaling network. *Trends Cell Biol* 2006;16:206–12.
66. Navasa M, Forns X, Sanchez V, Andreu H, Marcos V, Borrás JM, et al. Quality of life, major medical complications and hospital service utilization in patients with primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *J Hepatol* 1996;25:129-34.
67. 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;60:1388-93.
68. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:902-8.
69. Fang FC, Casadevall A. Lost in translation - basic science in the era of translational research. *Infect Immun* 2010;78:563-6
70. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
71. Biecker E, De Gottardi A, 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;313:952-61.
72. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:786-96.

73. Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-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;46:1919-26.
74. Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007;45:817-25.
75. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-20.
76. Brodsky S, Mendeleev N, Melamed M, Ramaswamy G. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:373-77.
77. Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:2349-57.
78. 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;22:1993-2000.
79. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17:1081-5.
80. Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: Not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009;49:1066-8.
81. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–48.
82. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007;12:112–24.

