



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS TRATAMIENTOS EN ESTEATOHEPATITIS NO  
ALCOHÓLICA EXPERIMENTAL**

**Combinación de estatinas y antagonistas del receptor A de endotelina para la  
recuperación del fenotipo alterado de las células del sinusoides hepático**

Memoria para optar al grado de Doctora de  
**Miren Bravo Garmendia**

**Directores de la tesis:**

Dra. María Martell

Dr. Joan Genescà

**Tutora de la tesis:**

Dra. Anna Meseguer

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas  
Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Barcelona 2020



# Índice



# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abreviaciones .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1. Introducción .....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1. Enfermedad hepática crónica .....                              | 15        |
| 1.1.1. <i>Enfermedad hepática grasa no alcohólica (MAFLD)</i> ..... | 16        |
| 1.1.1.1. <i>Prevalencia y epidemiología</i> .....                   | 16        |
| 1.1.1.2. <i>Fisiopatología y progresión</i> .....                   | 17        |
| <i>Resistencia a insulina</i>                                       |           |
| <i>Lipotoxicidad</i>  |           |
| <i>Microbiota intestinal</i>  |           |
| 1.2. Hipertensión portal .....                                      | 21        |
| 1.3. Circulación intrahepática.....                                 | 23        |
| 1.3.1. <i>Células del sinusoide hepático</i> .....                  | 26        |
| <i>Célula endotelial sinusoidal hepática</i>                        |           |
| <i>Célula hepática estrellada</i>                                   |           |
| 1.3.2 <i>Regulación del tono vascular intrahepático</i> .....       | 30        |
| <i>Óxido nítrico</i>  |           |
| <i>Endotelina</i>   |           |
| 1.3.3. <i>Disfunción endotelial</i> .....                           | 34        |
| 1.4. Modelos animales de NASH .....                                 | 37        |
| 1.4.1. <i>Modelos genéticos</i> .....                               | 40        |
| 1.4.2. <i>Modelos nutricionales</i> .....                           | 41        |
| 1.4.2.1. <i>Exportación reducida de lípidos</i> .....               | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.4.2.2 Aumento del aporte de lípidos.....                      | 42        |
| <i>Dieta alta en grasas, alta en glucosa y fructosa (HFGFD)</i> |           |
| 1.5 Opciones terapéuticas en NASH.....                          | 44        |
| 1.5.1. Estatinas .....  | 46        |
| 1.5.2. Antagonistas de los receptores de endotelina.....        | 48        |
| <b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>                            | <b>51</b> |
| <b>3. Materiales y Métodos.....</b>                             | <b>55</b> |
| 3.1. Técnicas de experimentación animal .....                   | 57        |
| 3.1.1. Modelo de dieta NASH.....                                | 57        |
| 3.1.2 Administración del fármaco.....                           | 58        |
| 3.1.3 Estudio hemodinámico .....                                | 60        |
| 3.1.4 Análisis bioquímico de muestras de sangre.....            | 62        |
| 3.1.5 Análisis histológico .....                                | 63        |
| 3.2. Aislamiento de tipos celulares.....                        | 65        |
| 3.2.1 Aislamiento de LSEC.....                                  | 65        |
| 3.2.2 Aislamiento de HSC.....                                   | 67        |
| 3.3. Técnicas de biología molecular .....                       | 68        |
| 3.3.1 Western Blot.....   | 68        |
| 3.3.2 Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....           | 72        |
| 3.3.3 Análisis de expresión génica .....                        | 73        |
| 3.3.4 Cuantificación de Vitamina A .....                        | 77        |
| 3.3.5 Ensayo de contracción celular .....                       | 77        |
| 3.4. Análisis estadístico.....                                  | 78        |

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| <b>4. Resultados .....</b>   | <b>79</b>  |
| 4.1 Estudio 1 .....          | 81         |
| 4.2 Estudio 2 .....          | 97         |
| <b>5. Discusión .....</b>    | <b>115</b> |
| <b>6. Conclusiones .....</b> | <b>129</b> |
| <b>7. Bibliografía .....</b> | <b>133</b> |
| <b>Anexo .....</b>           | <b>157</b> |
| <b>Agradecimientos.....</b>  | <b>161</b> |





## *Abreviaciones*



## Abreviaciones

Las abreviaciones aparecen ordenadas alfabéticamente por su término en inglés.

|                   |   |
|-------------------|---|
| AGL               | Ácido graso libre                                       |
| Akt               | Proteína quinasa B                                      |
| ALT               | Alanina aminotransferasa                                |
| Am                | Ambrisentan   |
| AST               | Aspartato aminotransferasa                              |
| Ato/At            | Atorvastatina   |
| BSA               | Albúmina de suero bovino                                |
| CD                | Dieta control   |
| CD31              | Molécula de adhesión endotelial de plaquetas-1, PECAM-1 |
| CD32b             | Receptor gamma FcIIb2                                   |
| CDD               | Dieta deficiente en colina                              |
| cGMP              | Guanosina monofosfato cíclica                           |
| CK                | Creatinina quinasa                                      |
| CRN               | Clinical Research Nerwotk                               |
| DAG               | Diacilglicerol  |
| dH <sub>2</sub> O | Agua destilada  |
| ECE               | Enzima de conversión de la endotelina                   |
| eNOS              | Óxido nítrico sintetasa endotelial                      |
| ERA               | Antagonista de los receptores de endotelina             |
| ERK1/2            | Extracellular signal-regulated kinase                   |
| ET-1              | Endotelina-1  |
| ETRA              | Receptor de endotelina A                                |
| ETRB              | Receptor de endotelina B                                |
| FA                | Fosfatasa alcalina                                      |
| FACS              | Fluorescence-activated cell sorting                     |
| GAPDH             | Glyceraldehyde-3-phophate dehydrogenase                 |

|         |   |
|---------|---|
| GPCR    | Receptor acoplado a proteína G                                |
| HFGFD   | Dieta alta en grasas, alta en glucosa y fructosa              |
| HOMA-IR | Modelo de homeostasis del índice de resistencia a la insulina |
| HP      | Hipertensión portal   |
| HSC     | Célula hepática estrellada                                    |
| IHVR    | Resistencia vascular intrahepática                            |
| IP3     | Inositol 1, 4, 5-trifosfato                                   |
| KC      | Célula Kupffer  |
| KLF2    | Kruppel-like factor 2   |
| LIVE-1  | Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1            |
| LSEC    | Célula endotelial sinusoidal hepática                         |
| MAFLD   | Enfermedad hepática grasa metabólica                          |
| MAP     | Presión arterial media  |
| MCDD    | Dieta deficiente en metionina y colina                        |
| MLCK    | Quinasa de la cadena ligera de miosina                        |
| NAFLD   | Enfermedad hepática grasa no alcohólica                       |
| NAS     | NAFLD Activity Score  |
| NASH    | Esteatohepatitis no alcohólica                                |
| NO      | Óxido nítrico   |
| PBF     | Flujo de la vena porta  |
| PI3K    | Fosfatidilinositol-3-quinasa                                  |
| PKC     | Proteína quinasa C  |
| PKG     | Proteína quinasa G  |
| PP      | Presión portal  |
| PPM     | Pulsaciones por minuto  |
| ROCK    | Rho-quinasa   |
| SEM     | Error estándar de la media                                    |
| Sim     | Simvastatina  |
| SMABF   | Flujo de la arteria mesentérica superior                      |

|              |   |
|--------------|---|
| SMAR         | Resistencia de la arteria mesentérica     |
| TGL          | Triglicéridos                             |
| VEGF         | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| Veh          | Vehículo                                  |
| $\alpha$ SMA | Alpha-actina del músculo liso             |

# *Introducción*

## 1. Introducción

### 1.1. Enfermedad hepática crónica

La enfermedad hepática crónica se caracteriza por el desarrollo de fibrosis y la conversión de la arquitectura normal del hígado en una estructura nodular anormal. Como consecuencia del daño hepático continuo, la respuesta inflamatoria activada para reparar el daño tisular falla y los hepatocitos son sustituidos por matriz extracelular y la formación de nódulos. Las fibras se extienden desde el área central o portal, y finalmente los tabiques fibrosos se forman completamente rodeando los nódulos regenerativos<sup>1</sup>.

Las enfermedades hepáticas representan aproximadamente 2 millones de muertes al año en todo el mundo. La mortalidad relacionada con la cirrosis y el carcinoma hepatocelular representan el 3,5% de todas las muertes a nivel mundial, siendo la undécima causa más común de muerte, mientras que el trasplante de hígado es el segundo trasplante de órganos sólidos más común<sup>2</sup>.

Las principales causas de la enfermedad hepática avanzada son el consumo de alcohol, la infección por hepatitis virales (VHB y sobre todo VHC) y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) asociada al síndrome metabólico y a la obesidad, recientemente denominada enfermedad hepática grasa metabólica (MAFLD, metabolic associated fatty liver disease)<sup>3</sup>. Otras etiologías menos frecuentes, son los distintos tipos de colangitis y la hepatitis autoinmune<sup>4</sup>.

En aquellos países donde el acceso a los recursos sanitarios es limitado, la hepatitis viral seguirá teniendo una gran importancia. Sin embargo, en países desarrollados, se estima que la vacunación y el desarrollo de nuevos medicamentos reducirán la carga de las hepatitis virales. Estos avances junto con la gran epidemia de obesidad que afecta hoy en día de forma global, conducen a pensar que la MAFLD se convertirá cada vez más en la principal causa de enfermedad hepática crónica<sup>4</sup>.



### **1.1.1. Enfermedad hepática grasa no alcohólica (MAFLD)**

La MAFLD es una de las enfermedades hepáticas más prevalentes en todo el mundo, y una causa cada vez más frecuente de cirrosis. Representa la manifestación hepática del síndrome metabólico, ya que comúnmente se asocia con comorbilidades metabólicas como la obesidad, la resistencia a insulina, la dislipidemia y la hipertensión arterial<sup>5</sup>.

#### **1.1.1.1. Prevalencia y epidemiología**

La prevalencia de MAFLD está aumentando a nivel mundial paralelamente al aumento de obesidad. La causa fundamental de la obesidad y sobrepeso es el desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas. El aumento en el consumo calórico diario junto con la disminución de la actividad física debido al sedentarismo explica la epidemia mundial de obesidad que se está dando actualmente<sup>6</sup>.

Como consecuencia de la propagación pandémica de la obesidad, la MAFLD es una de las causas más importantes de enfermedad hepática en todo el mundo. Concretamente, se estima que el 25% de la población presenta MAFLD lo que supone una presión creciente sobre los sistemas sanitarios<sup>7</sup>.

Sin embargo, el hígado graso también se puede encontrar en pacientes sin sobrepeso. Esto puede deberse a trastornos metabólicos genéticos, como la lipodistrofia, la hipobetalipoproteinemia o la enfermedad del almacenamiento del glucógeno, entre otros. También se conocen casos en los que personas con un índice de masa corporal normal tienen anomalías metabólicas similares a la obesidad. Este subconjunto de pacientes muestra perfiles metabólicos característicos de la obesidad como la resistencia a la insulina y la dislipidemia aterogénica<sup>8,9</sup>.

A pesar de que los pacientes con esteatosis simple tienen una progresión histológica muy lenta, un subgrupo de estos puede desarrollar NASH, un tipo más progresivo de enfermedad hepática grasa, asociada a la aparición de inflamación y daño hepatocelular<sup>10</sup>. La prevalencia general de NASH en la población adulta es del 3-5%, con una distribución heterogénea en relación a la etnicidad, edad y sexo<sup>11</sup>. El NASH

predispone a los pacientes a desarrollar complicaciones relacionadas con el hígado, y es hoy en día, una de las principales causas de cirrosis y, por lo tanto, una de las indicaciones de trasplante hepático más común<sup>4</sup>.

### 1.1.1.2. Fisiopatología y progresión

La MAFLD se define por una excesiva acumulación de lípidos en los hepatocitos, principalmente triglicéridos, que excede el 5% del peso del hígado, conocida como esteatosis hepática, en ausencia de cualquier otra etiología de enfermedad hepática<sup>7</sup>.

Engloba un espectro de lesiones que van desde la esteatosis hepática simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, non-alcoholic steatohepatitis) con inflamación y daño hepático, combinados o no con fibrosis, que progresa a cirrosis y eventualmente a carcinoma hepatocelular<sup>12</sup> (Figura 1).

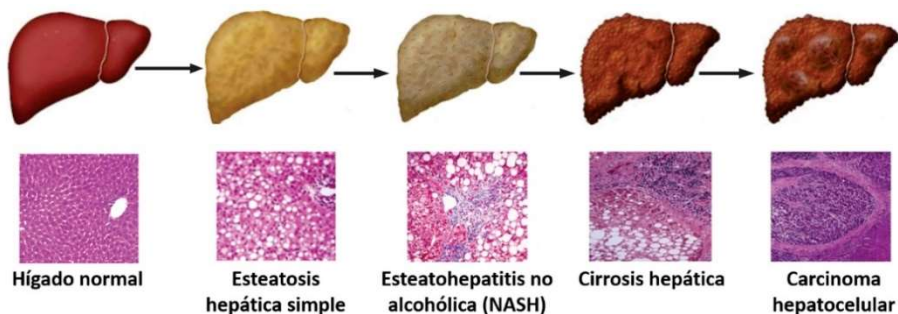


Figura 1. Espectro de lesiones de la MAFLD. Adaptado de Bessone F et al., 2019<sup>9</sup>.

El mecanismo subyacente para el desarrollo y progresión de la MAFLD es complejo y multifactorial, incluyendo factores genéticos, nutricionales y de estilo de vida. Además, su fisiopatología comprende múltiples componentes como la disfunción del tejido adiposo, la resistencia a insulina y la alteración de la microbiota intestinal<sup>13</sup>. La esteatosis hepática simple parece ser una manifestación relativamente benigna de la acumulación de triglicéridos hepáticos. Sin embargo, la desregulación del metabolismo lipídico promueve la lipotoxicidad, la disfunción mitocondrial con estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático. Todos estos factores afectan el contenido de grasa de los hepatocitos y el entorno inflamatorio del hígado, lo que conduce a un estado de

inflamación hepática crónica que predispone al desarrollo de NASH y su progresión a fibrosis y cirrosis<sup>14,15</sup>.

El mecanismo subyacente para el desarrollo y la progresión de MAFLD es complejo y multifactorial. Se han formulado diferentes teorías, que inicialmente condujeron a la hipótesis de los “dos impactos”. De acuerdo con esta teoría, la acumulación hepática de lípidos secundaria al estilo de vida sedentario, la dieta rica en grasas, la obesidad y la resistencia a la insulina, actúa como primer impacto, sensibilizando el hígado, donde un segundo impacto activa las cascadas inflamatorias y la fibrogénesis<sup>16</sup>.

Sin embargo, es evidente que este punto de vista es demasiado simplista para recapitular la complejidad de la MAFLD humana, donde actúan sinérgicamente múltiples factores paralelos, en individuos genéticamente predispuestos. En consecuencia, la hipótesis de “múltiples impactos” ha sustituido la hipótesis de “dos impactos” para comprender la progresión de la MAFLD<sup>14</sup> (Figura 2).

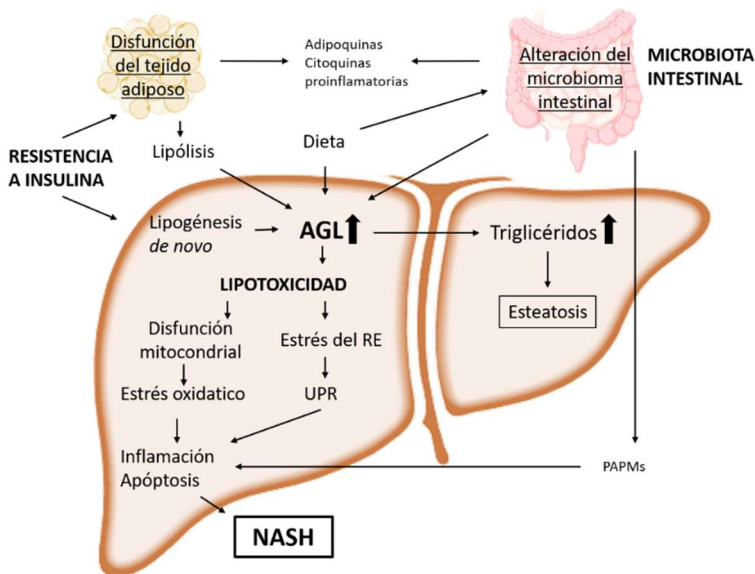


Figura 2. Teoría de “múltiples impactos” para la progresión de la MAFLD. AGL, ácidos grasos libres; UPR, unfolded protein response; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns. Adaptado de Buzzetti E et al., Metabolism 2016<sup>14</sup>.

### ***Resistencia a insulina***

En condiciones fisiológicas la unión de la insulina a su receptor inhibe la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) y estimula su absorción y consumo. Además, durante el estado postprandial promueve la lipogénesis *de novo* e inhibe la lipólisis en el tejido adiposo<sup>17</sup>.

Una dieta no saludable, junto con un estilo de vida sedentario, conducen al desarrollo de resistencia a insulina. En estas condiciones, disminuye la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y del tejido adiposo. La resistencia a insulina también promueve la disfunción del tejido adiposo con la consiguiente alteración de la producción y secreción de adipocinas y citoquinas proinflamatorias<sup>18</sup>.

Además, en el tejido adiposo, el efecto reducido de la insulina inhibiendo la lipólisis, resulta en un mayor aporte de ácidos grasos libres (AGL) al hígado y por lo tanto en el desarrollo de esteatosis hepática<sup>19</sup>. Esta acumulación de AGL en el hígado provoca resistencia a insulina hepática, caracterizada por un incremento de la lipogénesis *de novo* y la falta de supresión de la producción endógena de glucosa, es decir, a la disminución en la síntesis de glucógeno y aumento de gluconeogénesis. El aumento de la glucosa circulante y de los AGL aumenta la secreción de insulina pancreática contribuyendo aún más al estado de hiperinsulinemia<sup>12</sup>.

Por lo tanto, la MAFLD es un proceso dinámico que ocurre entre las alteraciones metabólicas periféricas y hepáticas, donde la esteatosis hepática y la resistencia a insulina se potencian entre sí<sup>20</sup>.

### ***Lipotoxicidad***

Los hepatocitos con esteatosis reflejan una alteración de la homeostasis lipídica debida al exceso de entrada de lípidos al hígado. El aumento de la ingesta de grasas, así como el aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y de la lipogénesis *de novo* en el hígado, inducidos estos últimos por la resistencia a insulina, conducen a un aumento excesivo de AGL en el hígado<sup>21</sup>. El exceso de AGL conlleva a su esterificación para formar

triglicéridos, que se almacenan como gotitas lipídicas, dando como resultado la esteatosis hepática<sup>13</sup>.

Una de las principales funciones de los AGL hepáticos es proporcionar energía al hígado a través de su oxidación, sobre todo mediante la  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias. Sin embargo, la sobrecarga de AGL satura la vía de la  $\beta$ -oxidación, produciendo disfunción mitocondrial y estrés oxidativo<sup>15,22</sup>.

La lesión mitocondrial que conlleva una menor producción de energía, junto con el estrés oxidativo, la acumulación de AGL y la hiperglucemia, conducen a la acumulación de proteínas mal plegadas y al estrés del retículo endoplasmático (RE), activando la llamada "respuesta de proteína desplegada" (UPR, unfolded protein response), que puede producir una respuesta inflamatoria o incluso en un exceso de estrés, provocar la muerte celular por apoptosis<sup>23</sup>.

### ***Microbiota intestinal***

La microbiota intestinal tiene importantes efectos metabólicos sobre la homeostasis energética en el huésped, de forma que su alteración puede afectar el metabolismo de los lípidos hepáticos y contribuir al desarrollo de la esteatosis<sup>17</sup>. La alteración en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) puede ocurrir en respuesta a modificaciones en la dieta, trastornos de la motilidad gastrointestinal, medicamentos u otros factores ambientales<sup>24</sup>.

Se han descrito dos grupos de individuos que difieren en la riqueza bacteriana intestinal. Los individuos con baja riqueza bacteriana se caracterizan por una adiposidad general más marcada, resistencia a insulina, dislipidemia y un fenotipo inflamatorio más pronunciado, en comparación con los individuos con alta riqueza bacteriana<sup>25,26</sup>.

Por otro lado, el aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal puede promover la translocación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) a la circulación portal, estimulando la respuesta inflamatoria del hígado y perturbando la homeostasis sinusoidal. A su vez, la

progresión de la MAFLD, asociada a una mayor liberación sistémica de citoquinas proinflamatorias, amplifica el impacto de la disbiosis y deteriora aún más las uniones estrechas intestinales creando así un círculo vicioso<sup>27</sup>.

La importancia de estos cambios en la fisiopatología del eje intestino-hígado sigue sin estar del todo clara, aunque cada vez hay más pruebas de que la microbiota juega un papel muy importante en la progresión de la MAFLD<sup>28,29</sup>.

## **1.2. Hipertensión portal**

La hipertensión portal (HP) es responsable de la mayoría de las complicaciones asociadas a la enfermedad hepática crónica avanzada, y por tanto también de la MAFLD avanzada. Se trata de un síndrome clínico caracterizado por un aumento patológico de la presión del sistema venoso portal, y se define como el aumento del gradiente de presión portal (PP) por encima de 5 mmHg, considerándose clínicamente significativa por encima de 10 mmHg, ya que es cuando pueden aparecer las complicaciones clínicas asociadas<sup>30</sup>. Entre estas complicaciones se encuentran el sangrado de varices esófago-gástricas, la ascitis, el síndrome hepatorenal, la encefalopatía hepática y el síndrome hepatopulmonar<sup>31</sup>.

Cualquier proceso que interfiera en el flujo de la sangre portal puede provocar HP. Dependiendo de dónde tenga lugar el impedimento, la HP se puede clasificar como HP prehepática (que involucra la vena esplénica, mesentérica o portal, como en el caso de la trombosis de la vena porta), HP intrahepática (enfermedades hepáticas como la cirrosis) o HP posthepática (enfermedades que bloquean el flujo venoso posthepático, como en el síndrome de Budd-Chiari) (Figura 3).

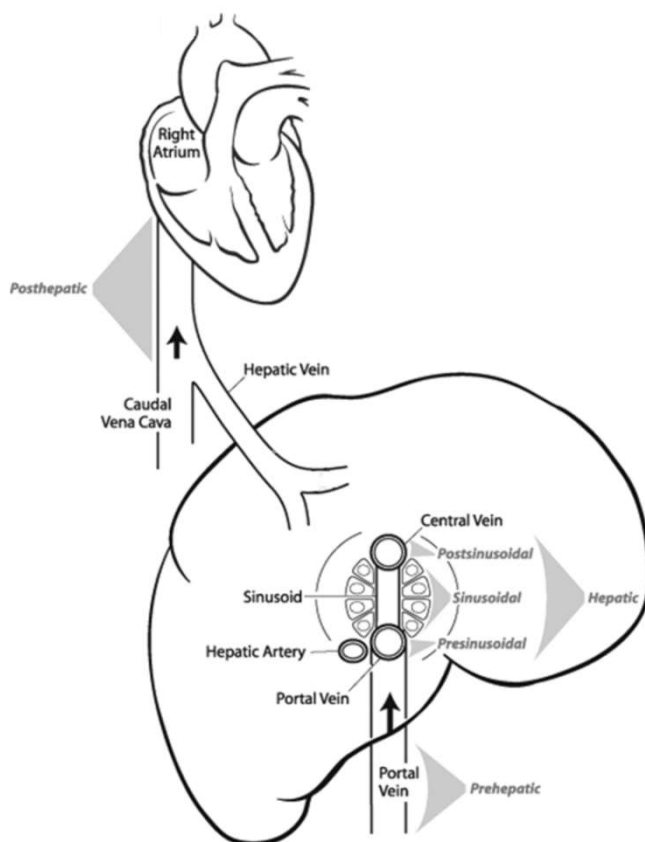


Figura 3. Representación esquemática de la clasificación de la hipertensión portal (HP). Adaptado de Buob J et al., 2011<sup>32</sup>.

Al igual que en el resto de sistemas vasculares, el gradiente de presión a lo largo del sistema venoso portal es el producto del flujo sanguíneo portal y la resistencia vascular que se opone al mismo. Por lo tanto, según la ley de Ohm esta relación se define como:

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

Donde  $\Delta P$  es el gradiente de presión entre dos puntos, Q es el flujo sanguíneo del sistema venoso portal y R la resistencia del sistema venoso portal. Por lo tanto, los mecanismos que pueden aumentar la PP pueden deberse a un aumento del flujo sanguíneo portal, de la resistencia vascular hepática o de una combinación de ambas<sup>33</sup>.

La HP intrahepática puede producirse por diferentes afecciones del hígado, aunque el 90% de los casos es debido a la cirrosis<sup>30</sup>. En la cirrosis hepática, el factor principal que conduce a la HP es un aumento de la resistencia vascular intrahepática (IHVR, intrahepatic vascular resistance). A medida que la enfermedad progresa se produce además, un aumento en el flujo sanguíneo esplácnico que conduce a un estado de circulación hiperdinámica contribuyendo a mantener y agravar la HP y sus complicaciones<sup>31,34</sup>. El aumento de IHVR en la cirrosis resulta de la combinación de alteraciones estructurales causadas por procesos fibróticos y alteraciones funcionales que conducen a la disfunción endotelial y aumento del tono vascular hepático<sup>35,36</sup>.

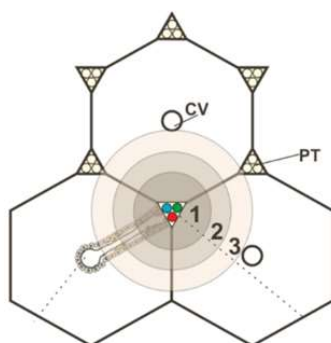
En el caso de la MAFLD, se ha demostrado que hay un aumento de la PP en ausencia de fibrosis, lo que indica un defecto en la regulación endotelial previo a la alteración de la arquitectura del hígado<sup>37-39</sup>. Sin embargo, la importancia de estos cambios tempranos en la biología sinusoidal y el papel del aumento de la PP en la progresión de la fibrosis no están del todo claros aún.

### **1.3. Circulación intrahepática**

El hígado es el órgano visceral más grande del cuerpo y recibe aproximadamente una cuarta parte del gasto cardíaco. La microcirculación intrahepática presenta un doble suministro de sangre. La mayor parte (70-80%) proviene de la vena porta y corresponde a sangre venosa que llega del área esplácnica, a baja presión y muy rica en nutrientes. El 20-30% restante es sangre oxigenada que llega por la arteria hepática. Estos vasos se ramifican repetidamente, hasta confluir en los sinusoides capilares que ocupan el espacio entre las células parenquimales<sup>40</sup>.



La circulación intrahepática está representada con mayor precisión por una estructura de unidad conocida como el acino hepático, la unidad funcional más pequeña del hígado. Se basa en el suministro de sangre y representa una unidad microcirculatoria. Cada unidad está formada por dos tríadas portales (formadas por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta hepática y un conductillo biliar) conectadas con dos venas centrales adyacentes (Figura 4). Se divide en tres zonas: la zona 1 se encuentra alrededor de las tríadas portales, es decir la zona periportal; la zona 2 es la zona intermedia; y la zona 3, alrededor de la vena central, es la zona perivenosa o pericentral<sup>41</sup>.

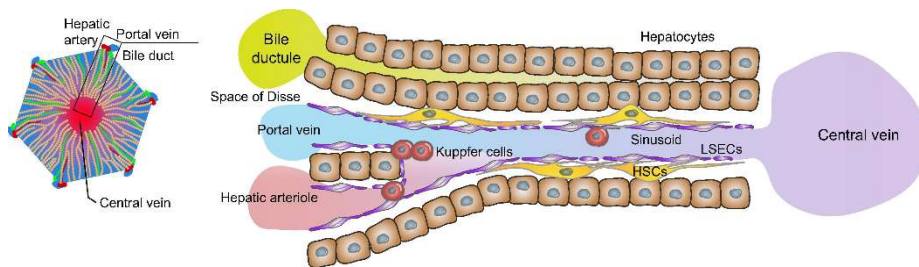


*Figura 4. Representación esquemática del acino hepático. Cada hexágono representa un lobulillo hepático. 1, zona 1; 2, zona 2; 3, zona 3; CV, vena central; PT, tríada portal. De Kietzmann T, Redox Biol 2017<sup>42</sup>.*

Por lo tanto, la sangre proveniente de la vénula portal terminal alta en nutrientes y de la arteriola hepática terminal alta en oxígeno, emergen a lo largo del sinusoides, donde tiene lugar el suministro de nutrientes y la eliminación de productos metabólicos, hasta llegar a la vena central, que finalmente lleva la sangre a la vena hepática<sup>40,43</sup>. De esta forma se crea un gradiente de oxígeno de la zona 1 a la zona 3 lo que produce la zonificación metabólica, es decir, la diferenciación funcional entre las células dependiendo de su ubicación. En la zona pericentral, donde la tensión de oxígeno es

menor, los hepatocitos presentan más glucólisis, mientras que los de la zona periportal están más dedicados a la gluconeogénesis<sup>42,44</sup>.

Además de hepatocitos, el sinusoides hepático está formado principalmente por tres tipos de células no parenquimales (Figura 5). Las células endoteliales sinusoidales (LSEC, liver sinusoidal endothelial cell), las células hepáticas estrelladas (HSC, hepatic stellate cell) y las células de Kupffer (KC, Kupffer cell). Las KC son los macrófagos residentes del hígado. Las LSEC forman las paredes del lumen de los sinusoides y regulan el tono vascular. Es importante destacar que entre el revestimiento de las células endoteliales y la membrana apical de los hepatocitos se encuentra el espacio de Disse, que participa en el drenaje linfático y proporciona un nicho de residencia para las HSC. La localización y actividades funcionales de estas células no parenquimales están también zonadas<sup>41</sup>.



*Figura 5. Representación de la morfología sinusoidal hepática con los diferentes tipos celulares sinusoidales. De Iwakiri Y et al., J Hepatol 2014<sup>45</sup>.*

Este trabajo de tesis se centra principalmente en el papel indispensable de las LSEC en la patología hepática y su estrecha interacción con la HSC, por lo que a continuación se explican las características de ambos tipos celulares.

### **1.3.1. Células del sinusoides hepático**

#### ***Célula endotelial sinusoidal hepática***

Las células endoteliales sinusoidales del hígado (LSEC) recubren los sinusoides hepáticos y representan aproximadamente un 20% de las células hepáticas, aunque solo el 3% del volumen total del hígado<sup>46</sup>.

Al igual que el resto de las células endoteliales de otros órganos, las LSEC son responsables de mantener el tono vascular, en este caso de los sinusoides hepáticos. Sin embargo, a pesar de las similitudes generales, las LSEC difieren considerablemente de otras células endoteliales, siendo altamente especializadas. Tienen una membrana discontinua que se compone de poros, llamados fenestras, que se agrupan y regulan dinámicamente para formar las llamadas "*sieve plates*" (Figura 6). Junto con las fenestras, las LSEC se caracterizan por la falta de una membrana basal, lo que facilita el intercambio transvascular de pequeñas moléculas entre las células sanguíneas y el espacio de Disse. Las fenestras actúan como un sistema de ultrafiltración permeable y selectivo, de forma que su tamaño afecta en la absorción hepática de muchos sustratos<sup>47,48</sup>.

Las LSEC no solo forman una barrera dentro de los sinusoides hepáticos, sino que tienen funciones fisiológicas e inmunológicas vitales, que incluyen la homeostasis inmune, mediante la presentación de antígenos y reclutamiento de leucocitos. Tienen además, una alta capacidad endocítica, por lo que junto con las KC juegan un papel importante en la captación y procesamiento de diferentes moléculas circulantes que incluyen la eliminación de patógenos, coloides y otras macromoléculas<sup>49</sup>.

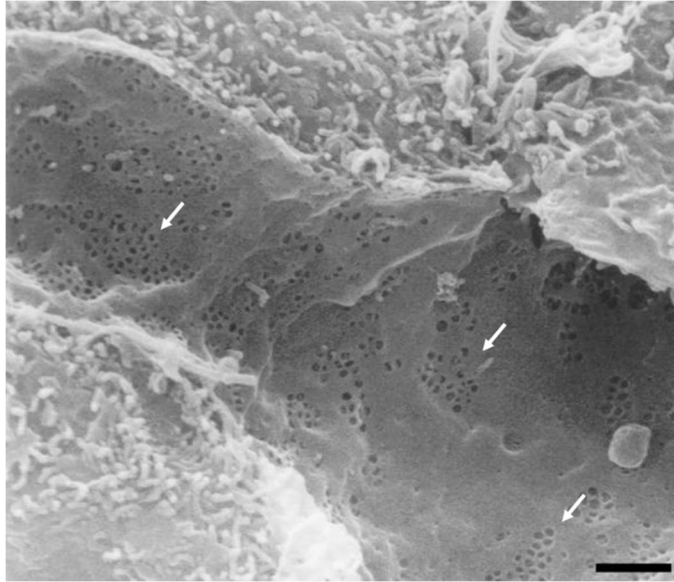


Figura 6. Micrografía electrónica de barrido (SEM) del endotelio sinusoidal hepático de rata, que muestra la membrana fenestrada (flechas). Barra de escala, 1µm. De Braet F y Wisse E, *Comp Hepatol* 2002<sup>50</sup>.

La endocitosis por LSEC implica diferentes receptores de endocitosis de alta afinidad, en los que se incluyen los receptores *scavenger* (SR), el receptor de ácido hialurónico LYVE-1 y el receptor gamma FcIIb2 (CD32b).

Los receptores SR-H (Stabilin1 y Stabilin2) son los principales receptores scavenger presentes en la superficie de las LSEC y median la endocitosis de moléculas polianiónicas, como lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) o acetiladas (acLDL), productos finales de la glicación y productos de desecho<sup>51</sup>.

El receptor LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1), se encarga de la absorción de ácido hialurónico y la regulación de la adhesión o migración de leucocitos dentro de la circulación linfática, ya que su expresión está predominantemente restringida a células endoteliales linfáticas. Sin embargo, las LSEC también expresan LYVE-1 constitutivamente<sup>46,52</sup>.

Finalmente, el receptor gamma FcIIb2 (CD32b) es el único receptor gamma Fc expresado por LSEC y media la eliminación de pequeños complejos inmunes circulantes, debido a que las LSEC juegan un papel en la inmunidad vascular a través de este receptor<sup>51,53</sup>.

Por lo tanto, las LSEC necesitan mantener un fenotipo endotelial diferenciado para poder llevar a cabo todas estas funciones especializadas. Esta diferenciación que las distingue del resto de células endoteliales comunes ocurre durante la embriogénesis. Durante la diferenciación del sinusoides hepático, las LSEC pierden gradualmente los marcadores celulares de superficie de las células endoteliales comunes, incluida la molécula de adhesión endotelial de plaquetas-1 (PECAM-1, también llamada CD31), CD34 y el antígeno 1F10; y adquieren marcadores de células sinusoidales endoteliales adultas, que incluyen los receptores nombrados hasta ahora (CD32b, Stabilins, LYVE-1 y las fenestras)<sup>53</sup> (Figura 7).

Esta diferenciación de LSEC está regulada por hepatoblastos, tanto a través de la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor), como por interacciones intercelulares directas<sup>54,55</sup>. En el hígado adulto a su vez, la liberación de VEGF por parte de los hepatocitos y HSC mantiene el fenotipo diferenciado de las LSEC, junto con el efecto autocrino de la producción de óxido nítrico (NO, nitric oxide) por parte de las LSEC<sup>56</sup>.

Cuando se produce daño hepático, las LSEC pierden este fenotipo característico, perdiendo la expresión de estos marcadores y volviendo a expresar marcadores de endotelio común (Figura 7). También desaparecen las fenestras y se forma la membrana basal, de forma que deja de ser un endotelio discontinuo. Este proceso conocido como capilarización o desdiferenciación se acompaña de la pérdida de funciones características de las LSEC, dando lugar a LSEC disfuncionales y a la disfunción endotelial<sup>57-59</sup>.

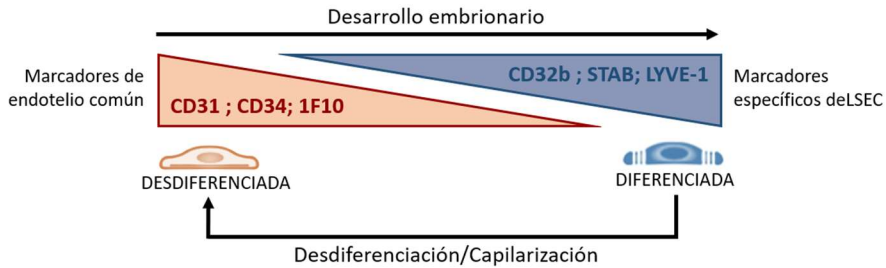
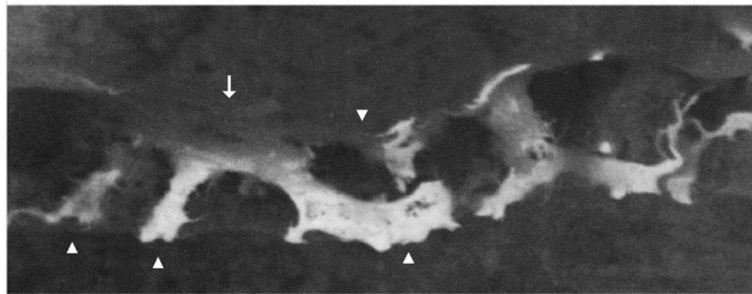


Figura 7. Desarrollo y desdiferenciación de LSEC. Adaptado de Poisson J et al., *J Hepatol* 2017<sup>53</sup>.

### ***Célula hepática estrellada***

Las células hepáticas estrelladas (HSC) se encuentran en el espacio de Disse en contacto con hepatocitos y LSEC. El número total de HSC constituye un pequeño porcentaje del número total de células hepáticas (aproximadamente 5-8%), aunque gracias a su disposición y extensión espaciales son suficientes para cubrir toda la red microcirculatoria sinusoidal hepática<sup>60</sup>.

En el hígado adulto, el rasgo más característico de estas células es la presencia de gotas perinucleares citoplasmáticas cargadas con retinol (vitamina A). En condiciones fisiológicas, su principal función es regular el metabolismo del retinol y modular el flujo sanguíneo sinusoidal, interaccionando con las LSEC. Estas células se encuentran alrededor de los vasos sinusoidales y mediante su contracción regulan la apertura de estos, para acomodarlos al flujo sanguíneo (Figura 8). También están implicadas en el crecimiento y actividades metabólicas de otras células, como la preservación de la masa de hepatocitos, ya sea a través de la interacción directa célula-célula o por la liberación de citoquinas y factores de crecimiento<sup>61,62</sup>.



*Figura 8. Célula hepática estrellada rodeando el sinusoides hepático. Las extensiones (punta de flecha) salen desde el cuerpo de la célula (flecha) para rodear el sinusoides. De Wake K y Sato T, Cell Tissue Res 1993<sup>63</sup>.*

Las HSC son las encargadas de la homeostasis de la matriz extracelular. Mantienen su recambio en el espacio de Disse secretando cantidades concretas y limitadas de matriz, con una estrecha regulación de liberación de metaloproteinasas y sus inhibidores<sup>64</sup>.

Aunque tengan estas funciones en el hígado sano, donde se las conoce en estado quiescente, frente al daño hepático adquieren un fenotipo activado y un rol mucho más activo en la fisiopatología. Las características de la activación incluyen cambios morfológicos y funcionales, como la pérdida de vitamina A, y la adquisición de un fenotipo pro-contráctil (expresión de  $\alpha$ SMA) y pro-fibrótico (expresión de colágeno)<sup>61,65</sup>.

Al igual que las LSEC, el fenotipo de las HSC depende de su microambiente. En concreto, las LSEC son las encargadas de mantener la quiescencia de las HSC mediante la liberación de NO y otros mediadores aún no definidos. Sin embargo, las LSEC capilarizadas, al expresar menor cantidad de NO, pierden esta capacidad de bloquear la activación de las HSC, que a su vez contribuyen a la desdiferenciación de las LSEC<sup>46,66</sup>.

### **1.3.2 Regulación del tono vascular intrahepático**

El tono vascular intrahepático se determina por el balance entre vasoconstrictores y vasodilatadores que actúan regulando el flujo sanguíneo sinusoidal y modulando la IHVR mediante su acción sobre las células del sinusoides hepático. Los principales

vasoconstrictores son la endotelina-1 (ET-1), angiotensina (Ang II) y el tromboxano A2 (TXA2), mientras que entre los vasodilatadores se encuentran el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y las prostaciclinas (PGI2) entre otros. En condiciones fisiológicas estos factores vasoactivos tienen un efecto menor y siempre equilibrado. Sin embargo, cualquier cambio en este equilibrio afecta a la regulación del flujo microvascular intrahepático, por lo que mantener un balance adecuado es esencial para su correcta regulación<sup>67</sup>.

Aunque la regulación del flujo microvascular hepático es un proceso complejo que comprende la participación de innumerables moléculas vasomoduladoras, cabe destacar la relación íntima entre el sistema enzimático que libera NO y el sistema de ET-1.

### ***Óxido nítrico***

El óxido nítrico es una molécula gaseosa encargada de regular el tono vascular, aunque está implicado en muchas otras funciones biológicas como la inhibición de la agregación plaquetaria y la modulación de la angiogénesis y de la adhesión leucocitaria<sup>68</sup>.

El NO es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS, nitric oxide synthase), la cual presenta diferentes isoformas: la NOS neuronal (nNOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS endotelial (eNOS). A nivel hepático la iNOS y la eNOS son las que presentan una función más relevante<sup>69</sup>.

La iNOS es expresada por varias células sinusoidales, y es inducida bajo condiciones patológicas, a través de citoquinas proinflamatorias y endotoxinas. Por otro lado, la eNOS es expresada constitutivamente por las LSEC y produce NO en respuesta a estímulos como el estrés de rozamiento del flujo sanguíneo (shear stress), el VEGF, insulina o agonistas de receptores acoplados a proteína G (GPCR, G protein-coupled receptor). De este modo, la eNOS mantiene la homeostasis del hígado y el tono vascular sinusoidal<sup>70</sup>. La producción de NO por parte de las LSEC, es también indispensable para



mantener el fenotipo quiescente de las HSC, así como de forma autocrina, mantener las fenestras y el fenotipo diferenciado de las LSEC<sup>56,71</sup>.

La actividad de la enzima eNOS puede regularse a través de diferentes mecanismos, aunque su fosforilación mediada por la proteína quinasa B (Akt) juega un papel muy importante en su activación. Las LSEC expresan grandes cantidades de eNOS, pero liberan NO en pequeña cantidad. Tras las diversas formas de estímulo comentadas, la Akt es activada mediante su fosforilación por un mecanismo fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) dependiente, y puede fosforilar directamente la eNOS, activándola, lo que conduce al aumento de producción de NO<sup>72</sup>.

El mecanismo de acción por el cual el NO regula el tono vascular se muestra en la Figura 9. El NO derivado de la eNOS en las LSEC difunde a las HSC modulando su contracción mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), enzima responsable de la conversión de guanosina trifosfato (GTP) en guanosina monofosfato cíclica (cGMP). La cGMP conduce a la activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP o proteína quinasa G (PKG) que lleva a la reducción de Ca<sup>2+</sup> intracelular, produciendo la relajación de la célula<sup>73,74</sup>. Por lo tanto, la producción de NO por parte de las LSEC es esencial en el mantenimiento del tono vascular adecuado en el sinusoide hepático.

### **Endotelina**

La familia de las endotelinas (ET) está formada por tres péptidos de 21 aminoácidos conocidos como ET-1, ET-2 y ET-3, cuya síntesis puede controlarse a nivel transcripcional y/o postranscripcional<sup>75</sup>. La pre-pro ET-1, el precursor canónico es inducido por estímulos extracelulares (shear stress), hormonas vasopresoras (vasopresina), insulina y citoquinas (interleuquina-1). Esta es escindida por enzimas similares a la furina a productos intermedios denominados Big ET-1, que tienen poco o ningún efecto biológico. El Big ET-1 se corta por enzimas específicas de conversión de endotelina (ECE), para producir la endotelina biológicamente activa. Por lo tanto, los niveles de ET se controlan a nivel transcripcional, así como por las ECE<sup>76</sup>.

Estos péptidos se encuentran entre los vasoconstrictores más potentes y se unen a 2 receptores acoplados a proteína G (GPCR), denominados receptor de endotelina A (ETRA) y receptor de endotelina B (ETRB), siendo la afinidad del ETRA por la ET-1 mucho mayor que por la ET-2 y ET-3, aunque el ETRB tiene la misma afinidad por todos los subtipos de ET<sup>77</sup>. El ETRA se expresa predominantemente en células vasculares del músculo liso, mientras que el ETRB está ampliamente distribuido. De forma paralela al sistema vascular general, en la microcirculación intrahepática, el ETRB es expresado por varias células sinusoidales, incluidas las LSEC y las HSC, y el ETRA se encuentra únicamente en las HSC<sup>78</sup>.

Típicamente, la ET-1 es producida por las LSEC y ejerce un efecto constrictor de forma paracrina sobre las HSC adyacentes mediante su unión a los ETRA y ETRB. Sin embargo, la unión de la ET-1 al ETRB en las LSEC estimula la actividad eNOS y la liberación de NO, con la consiguiente relajación de las HSC. Por lo tanto, la producción y liberación de ET-1, produce una vasoconstricción del sinusoide mediante la contracción de las HSC, pero lleva consigo una regulación autocrina induciendo también vasodilatación.

Los mecanismos de los efectos contrapuestos de la ET-1, sobre las diferentes células sinusoidales se ilustran en la Figura 9. En la HSC, al unirse a sus receptores afines, la ET-1 conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC), que produce la escisión de la fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP2) y la posterior liberación de segundos mensajeros, inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La IP3 estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico, lo que produce un rápido incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que conduce a la activación de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, myosin light-chain kinase), que a su vez estimula la contracción de la célula<sup>79,80</sup>. El DAG activa la proteína quinasa C (PKC). La activación de PKC en el músculo liso produce una respuesta contráctil lenta y sostenida, que implica la fosforilación de filamentos intermedios (desmina, sinemina, etc.)<sup>81</sup>. Sin embargo, el papel de la PKC en la contracción de HSC ha sido poco estudiado.

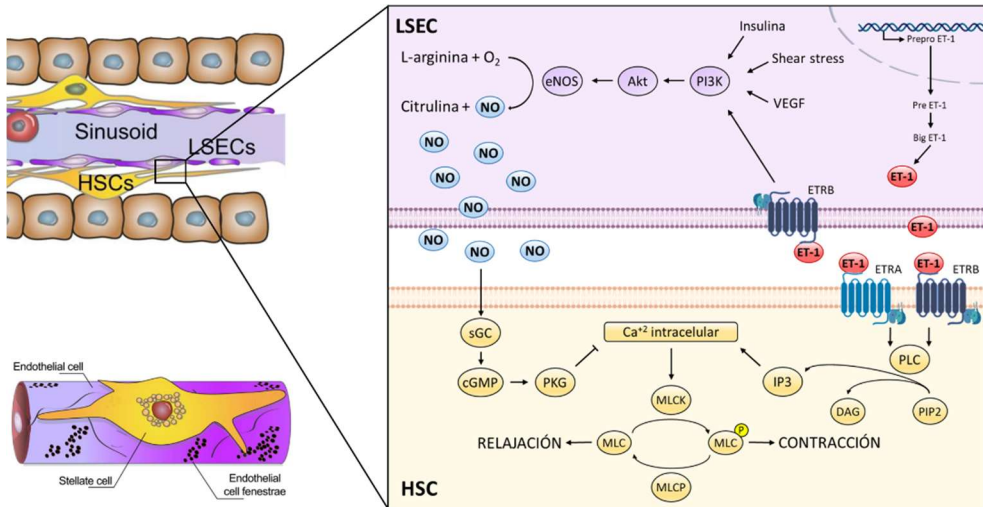


Figura 9. Mecanismos intracelulares de regulación del tono vascular intrahepático. Adaptado de Iwakiri Y et al. *J Hepatol* 2014<sup>45</sup>.

En contrapartida, la ET-1 estimula la producción de NO en las LSEC mediante la activación de la eNOS. Esto ocurre a través del ETRB, que activa la vía PI3-K/Akt, que a su vez estimula la fosforilación de eNOS, generando NO que difunde a las HSC<sup>80</sup>. Además, se ha demostrado que el NO inhibe la producción de ET-1 por parte de las células endoteliales<sup>82</sup>. Por lo tanto, en situaciones fisiológicas, tras un aumento de producción de ET-1, se produce un aumento de producción de NO y bloqueo de la expresión de más ET-1.

### 1.3.3. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial se define como la incapacidad del endotelio para producir vasodilatación en respuesta a un aumento del flujo. El aumento de la IHVR se puede deber tanto a factores estructurales (fibrosis, remodelación vascular, etc.) como a dinámicos. El deterioro de la función vasodilatadora dependiente del endotelio sinusoidal es el responsable del componente dinámico en el aumento de la IHVR en las enfermedades hepáticas crónicas<sup>83</sup>.



Otro punto importante es que el NO es responsable del mantenimiento de la quiescencia de las HSC, ya que la exposición reducida de las HSC al NO, debido a LSEC disfuncionales facilita su activación<sup>66</sup>. Además, las HSC activadas, ejercen una respuesta disminuida a NO debido a defectos en la ruta de señalización sGC/cGMP<sup>91</sup>. Las HSC activadas exhiben un fenotipo contráctil aumentado, donde el grado de aumento de la contractilidad parece ser proporcional a la expresión de la proteína contráctil esencial, la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ SMA, alpha smooth muscle actin)<sup>92</sup>. Además, en el hígado dañado, los receptores de ET-1 se encuentran positivamente regulados, particularmente en las HSC<sup>92</sup>. La menor respuesta a NO, así como la expresión aumentada de receptores de ET-1 en las HSC activadas, contribuyen a una mayor contractilidad.

En la HSC ambos receptores de ET-1 juegan un papel importante en la regulación de la contracción, sin embargo, varias publicaciones demuestran que la ET-1 produce un efecto divergente a través de los diferentes receptores. La estimulación de los ETRA con ET-1 provoca un aumento de crecimiento celular mediada por la activación de la vía Ras/ERK y la expresión de c-Fos<sup>93</sup>. Por el contrario, la activación del ETRB estimula la producción de prostaglandinas, lo que se traduce en un aumento de AMPc intracelular, lo que a su vez reduce la activación de ERK e induce un efecto antiproliferativo<sup>94</sup>. Finalmente, algunos estudios sugieren que las vías de señalización que regulan la contracción de las HSC requieren siempre la activación de un pequeño número de ETRA y que esta contracción, además de por el aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, también podría estar parcialmente mediada por la activación de la Rho-quinasa<sup>95</sup>(Figura 11).

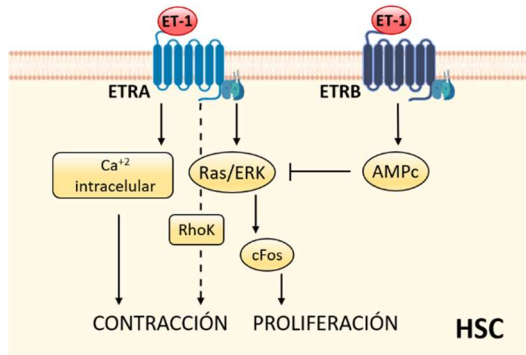


Figura 11. Efecto de la endotelina-1 (ET-1) sobre las células hepáticas estrelladas (HSC): efectos divergentes a través de diferentes receptores. Adaptado de Pinzani M y Marra F, *Semin Liver Dis* 2001<sup>95</sup>.

El desequilibrio entre la hiperreactividad y la sobreproducción de vasoconstrictores (principalmente ET-1) y la hipoactividad y la producción deteriorada de vasodilatadores (principalmente NO) es responsable del aumento del tono vascular en el espacio sinusoidal y por lo tanto de la hipertensión portal.

#### 1.4. Modelos animales de NASH

La investigación biomédica a menudo se ve condicionada por la disponibilidad limitada tanto de tejido sano, como enfermo, lo que hace que los modelos animales sean una herramienta esencial para el estudio de las enfermedades. Los modelos animales adecuados pueden ayudarnos a comprender la compleja patogénesis de la MAFLD y a descubrir nuevas intervenciones para el tratamiento de la enfermedad, así como a identificar factores de riesgo de su progresión<sup>96</sup>. Con este objetivo, se han desarrollado diversos modelos que reflejan grados variables de similitud con la patología descrita en pacientes, tanto desde el punto de vista histológico, como metabólico. Sin embargo, no existe un modelo animal ideal para la MAFLD que refleje todos los aspectos de la etiopatogenia humana, así como las características histológicas típicas de cada uno de sus estadios<sup>96</sup>.

Las ratas y los ratones son las especies más utilizadas como animales experimentales de la MAFLD. Todos ellos tienen en común el desarrollo de esteatosis hepática, y algunos son capaces de desarrollar características de la esteatohepatitis; pero solo una minoría progresa a fibrosis<sup>97</sup>.

Los modelos desarrollados hasta ahora se pueden clasificar en genéticos y nutricionales. Las características básicas de los más empleados que se describen en el texto se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los modelos de enfermedad hepática grasa metabólica más empleados.

| Modelo                                       | Obesidad                                   | RI | Esteatosis | Esteatohepatitis                           | Fibrosis  |
|--|--|----|------------|--|---|
| <b>Modelos genéticos</b>                     |  |    |            |  |   |
| Ratones ob/ob <sup>98</sup>                  | Sí   | Sí | Sí         | No<br>(Sí, en combinación con dieta grasa) | No<br>(Cierta resistencia a fibrogénesis <sup>99,100</sup> )                |
| Ratons db/db <sup>98,101</sup>               | Sí   | Sí | Sí         | No<br>(Sí, en combinación con dieta grasa) | No<br>(Sí, en combinación con dieta grasa <sup>98</sup> )                   |
| Ratas Zucker <sup>102,103</sup>              | Sí   | Sí | Sí         | No<br>(Sí, en combinación con dieta grasa) | No<br>(Leve fibrosis portal en combinación con dieta grasa <sup>103</sup> ) |
| <b>Modelos nutricionales</b>                 |  |    |            |  |   |
| <b>Exportación reducida de lípidos</b>       |  |    |            |  |   |
| MCDD <sup>104,105</sup>                      | No<br>(Pérdida de peso)                    | No | Sí         | Sí   | Sí  |
| CDD <sup>105,106</sup>                       | Sí   | Sí | Sí         | Sí<br>(Ligera inflamación)                 | No  |
| <b>Aumento de aporte de lípidos</b>          |  |    |            |  |   |
| Dieta rica en grasas <sup>107-110</sup>      | Sí   | Sí | Sí         | Sí *                                       | No  |
| Dieta rica en colesterol <sup>111,112</sup>  | Sí   | Sí | Sí         | No<br>(Sí en combinación con dieta grasa)  | No  |
| Dieta rica en fructosa <sup>113,114</sup>    | No<br>(Sí, en combinación con dieta grasa) | Sí | Sí         | Sí   | No  |
| Dieta de cafetería (CafD) <sup>115,116</sup> | Sí   | Sí | Sí         | Sí   | No  |
| HFGFD <sup>29</sup>                          | Sí   | Sí | Sí         | Sí   | No  |

\*Las características de los modelos con alto contenido en grasa dependen principalmente de la especie, cepa, cantidad y composición de grasa, y duración de la dieta. IR, resistencia a insulina; MCDD, dieta deficiente en colina y metionina; CDD, dieta deficiente en colina.



### **1.4.1. Modelos genéticos**

La gran mayoría de los modelos genéticos son aquellos que se desarrollan a partir de mutaciones en genes involucrados en el comportamiento de alimentación o en el metabolismo lipídico. Entre los más utilizados se encuentran aquellos que presentan defectos en las vías de señalización de la leptina, una hormona peptídica secretada por el tejido adiposo que promueve la sensación de saciedad y el gasto energético actuando sobre el sistema nervioso central<sup>117</sup>.

Los ratones ob/ob son homocigotos para una mutación autosómica recesiva en el gen de la leptina, mientras que en el caso de los ratones db/db y en el de las ratas Zucker, la mutación se encuentra en el gen que codifica para el receptor de la leptina. Estos modelos desarrollan hiperfagia, obesidad, resistencia a insulina y esteatosis hepática, pero sin signos de progresión a esteatohepatitis<sup>98,102</sup>. Por lo tanto, se trata de buenos modelos de MAFLD, pero no de NASH. A pesar de esto, se puede inducir la esteatohepatitis al administrarles un “segundo impacto” como puede ser una dieta rica en grasas<sup>98</sup>.

La leptina es un importante potenciador de la fibrosis hepática, por lo que se ha llegado a considerar que los ratones ob/ob son resistentes a la fibrogénesis<sup>99</sup>. Sin embargo, algunos estudios defienden que a pesar de que la deficiencia en leptina disminuye la producción de fibrosis, no la inhibe por completo<sup>100</sup>. No obstante, los ratones db/db y las ratas Zucker, al tener la leptina intacta, en presencia de este “segundo impacto” son capaces de generar fibrosis con más facilidad<sup>98,103</sup>.

La ventaja de estos modelos es que muestran características típicas del síndrome metabólico y en combinación con una dieta hipercalórica pueden servir para estudiar estadios más avanzados de la enfermedad. Sin embargo, la deficiencia congénita de leptina y la resistencia a la leptina causada por mutaciones genéticas en humanos son extremadamente raras, por lo que, la mayor limitación de estos modelos es su incapacidad de reflejar la etiología humana.

### **1.4.2. Modelos nutricionales**

Los modelos dietéticos se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo por el cual inducen la esteatosis. El primer grupo se define por la reducción de la exportación o catabolismo de lípidos en el hígado, mientras que el segundo incluye modelos con una mayor absorción o síntesis de lípidos<sup>118</sup>.

#### **1.4.2.1. Exportación reducida de lípidos**

La dieta deficiente en colina (CDD) y la dieta deficiente en metionina y colina (MCDD) son modelos dietéticos muy utilizados para el estudio de MAFLD y NASH. La colina es una sustancia esencial que participa en muchas reacciones metabólicas, entre ellas el transporte de lípidos. En ausencia de colina en la dieta, es posible sintetizarla a partir de metionina. Sin embargo, la ausencia de ambas perturba la formación de fosfatidilcolina, que es esencial para la formación de VLDL y su secreción del hígado, dando como resultado esteatosis hepática<sup>119</sup>.

Dependiendo de la duración de la dieta, la MCDD induce esteatosis hepática, esteatohepatitis o esteatohepatitis con fibrosis, mientras que la CDD por sí sola no bloquea completamente la excreción hepática de VLDL, lo que lleva al desarrollo de esteatosis con un menor grado de inflamación y a la ausencia de fibrosis<sup>104–106</sup>. Sin embargo, la esteatosis producida por la CDD se acompaña del desarrollo de obesidad, dislipidemia y resistencia a insulina, mientras que la MCDD produce pérdida de peso significativa, caquexia y ausencia de resistencia a insulina<sup>120–122</sup>.

En resumen, la CDD y la MCDD son dos modelos distintos, ya que difieren no solo en la histopatología, sino que también en las características metabólicas. Por lo tanto, aunque la equivalencia para el resultado de ambas dietas se puede encontrar en la esteatosis, los resultados de los estudios que usan estas dietas deben compararse con precaución<sup>105</sup>.

#### **1.4.2.2 Aumento del aporte de lípidos**

A diferencia de los modelos animales mostrados hasta ahora, los animales alimentados con una dieta rica en grasa imitan tanto la histopatología como los factores patogénicos más distintivos del MAFLD: la obesidad y la resistencia a insulina<sup>96,123</sup>.

El uso de estas dietas es muy popular, comportando que existan muchas variaciones tanto en su composición, como en el protocolo experimental del modelo; por lo que los resultados de diferentes estudios pueden ser inconsistentes<sup>96</sup>. La mayoría de ellos coinciden en provocar alteraciones metabólicas con esteatosis hepática, aunque no es muy frecuente la presencia de inflamación o fibrosis. Además, el grado de esteatosis hepática, así como el desarrollo del resto de características del NASH y el síndrome metabólico, dependen también de la cepa y sexo del animal<sup>124</sup>.

El colesterol en la dieta es un factor de riesgo importante en la progresión de la esteatosis simple a NASH y su consumo ha sido asociado al desarrollo de cirrosis hepática<sup>125</sup>. Los animales alimentados con únicamente una dieta rica en colesterol muestran niveles elevados de insulina en suero, pero solo un ligero aumento del peso del hígado. Sin embargo, cuando se administra una dieta rica en grasa suplementada con colesterol, las características típicas del NASH son más pronunciadas<sup>111,112</sup>.

Estas dietas también pueden suplementarse con fructosa. El consumo de fructosa estimula la lipogénesis *de novo* y bloquea la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos contribuyendo así al desarrollo de la MAFLD<sup>113</sup>. Además, se ha demostrado que un exceso de fructosa en la dieta, puede provocar un aumento de la permeabilidad intestinal, facilitando la endotoxemia, que a su vez exacerba el proceso lipogénico del hígado<sup>126</sup>.

Finalmente, la dieta de cafetería es una dieta combinada especial que refleja con mayor precisión la variedad de alimentos poco saludables que se consumen en los países occidentales<sup>96</sup>. Consiste en alimentos apetitosos procesados industrialmente que contienen altos niveles de grasa, azúcar y sal. Por lo tanto, esta dieta proporciona un

modelo robusto de síndrome metabólico humano y causa un fenotipo de obesidad exagerada con intolerancia a la glucosa<sup>115,116</sup>. El principal inconveniente de este modelo es la heterogeneidad que se genera entre individuos, ya que cada animal presenta preferencias propias por un tipo de alimento<sup>127</sup>.

### ***Dieta alta en grasas, alta en glucosa y fructosa (HFGFD)***

Aunque no existe un modelo ideal de MAFLD que refleje todos los aspectos clínicos, histológicos, etiológicos y patógenos de la enfermedad humana, los modelos de sobrenutrición crónica con una progresión espontánea de esteatosis a esteatohepatitis son los modelos más válidos, ya que exhiben una interacción más compleja entre las anomalías metabólicas y la lesión hepática. Con el objetivo de desarrollar un modelo con la etiología lo más similar posible a la de los humanos, varios grupos de investigación tratan de combinar diferentes factores de riesgo<sup>111,114</sup>.

En este sentido, nuestro grupo ha desarrollado un modelo de NASH que trata de comprender todas las variables de la dieta comentadas hasta ahora, es decir, un modelo alimentado con una dieta hipercalórica, rica en grasas, suplementada con colesterol y combinada con una bebida de glucosa y fructosa (HFGFD, high fat glucose-fructose diet). Este modelo desarrolla todas las características histológicas de NASH, además de aspectos del síndrome metabólico como la obesidad y la resistencia a la insulina<sup>29</sup>.

Además del síndrome metabólico, la administración de esta dieta a ratas Sprague Dawley macho durante 8 semanas, provoca una disminución de la diversidad de especies bacterianas en la microbiota, reproduciendo la disbiosis descrita en pacientes obesos<sup>128</sup>.

Por otro lado, el uso de este modelo permite analizar el desarrollo de la HP en el contexto de la MAFLD. La principal limitación del modelo es la ausencia de fibrosis, por lo que el uso de este modelo se limita al estudio de las etapas más tempranas de NASH. Sin embargo, lo que por una parte puede ser un limitante del modelo, por otra,

constituye una ventaja, ya que permite estudiar el componente funcional del aumento de la PP, sin que haya interferencias por el componente estructural.

### **1.5 Opciones terapéuticas en NASH**

Los datos epidemiológicos sugieren la existencia de una estrecha relación entre un estilo de vida poco saludable y la MAFLD, lo cual conduce a que la primera indicación en estos pacientes sea la modificación del estilo de vida, donde el principal objetivo es la pérdida de peso, a través de una dieta restringida en calorías y una mayor actividad física<sup>129</sup>. Una ligera reducción del peso puede ayudar a reducir la esteatosis hepática y mejorar la resistencia a insulina<sup>130</sup>. Sin embargo, es necesaria una reducción mayor, de alrededor de un 10% del peso corporal, para mejorar el resto de aspectos histopatológicos de NASH como la inflamación y la fibrosis<sup>131,132</sup>. Desafortunadamente, el mayor inconveniente de esta intervención es que solo un pequeño porcentaje de los pacientes consigue reducir su peso. Además, los datos que evalúan su eficacia a largo plazo son muy limitados por lo que son necesarias nuevas estrategias terapéuticas.

También hay estudios que indican que la microbiota intestinal juega un papel importante en la resistencia a insulina y la MAFLD. La integridad de la barrera intestino-hígado es un factor clave en la patogénesis de MAFLD y NASH ya que las bacterias y sus productos pueden escapar a la circulación sistémica causando una respuesta inflamatoria masiva del hígado<sup>133,134</sup>. En este sentido, un estudio realizado por nuestro grupo demostró que el trasplante de una microbiota intestinal sana consigue recuperar la sensibilidad intrahepática a insulina en ratas con NASH<sup>29</sup>. Siguiendo esta línea, estudios con probióticos sugieren una mejora de la inflamación y sensibilidad a insulina, aunque se necesitan más estudios que evalúen su seguridad, dosis y beneficios para el tratamiento de la MAFLD<sup>135,136</sup>.

Hoy en día no disponemos de ningún fármaco evaluado y autorizado para el tratamiento de NASH por parte de las agencias reguladoras<sup>10,137</sup>. Por ello, para el manejo de la

enfermedad se recomienda el tratamiento de las comorbilidades, tales como la resistencia a insulina y la dislipidemia.

Se han llevado a cabo diferentes estudios con fármacos sensibilizantes a la insulina. La metformina es un fármaco antidiabético que ha mostrado mejorar las aminotransferasas en suero<sup>138</sup>. Sin embargo, no mejora la histología hepática por lo que no se recomienda en el tratamiento de NASH<sup>139</sup>. El tratamiento con pioglitazona, en cambio, que pertenece al grupo de las tiazolidionas, mejora además de la sensibilidad a insulina, las aminotransferasas, la esteatosis, la inflamación y la balonización<sup>140</sup>. En este caso son los efectos secundarios, como el aumento de peso y de fracturas óseas en el caso de las mujeres, los que limitan su uso para el tratamiento de NASH<sup>141,142</sup>.

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de la vitamina E, un potente antioxidante liposoluble. Varios ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento con esta vitamina mejora la histología del NASH<sup>140,143</sup>. En lo que respecta a la seguridad, el uso de dosis altas se ha relacionado con una mayor mortalidad, aunque los datos al respecto son contradictorios<sup>144,145</sup>.

Es importante destacar que, en el tratamiento de la enfermedad hepática crónica, ya sea por hígado graso o por cualquier otra etiología, el principal objetivo es prevenir las complicaciones asociadas a la HP, como el sangrado de varices, la ascitis y la encefalopatía hepática. Las opciones farmacéuticas actuales para el tratamiento de la HP, incluyen el uso de  $\beta$ -bloqueantes no selectivos, y otros fármacos vasoconstrictores espláncnicos como la vasopresina, octreótido y somatostatina que han demostrado disminuir la PP, mediante la corrección del aumento del PBF<sup>35,146,147</sup>. Sin embargo, la mayoría de fármacos candidatos a reducir la IHVR se encuentran aún en fases preclínicas y solo tenemos evidencia experimental de sus efectos reductores sobre la PP<sup>148</sup>. Desde el punto de vista de la MAFLD no cirrótica, las intervenciones que se dirigen a los componentes reversibles de la IHVR, como la disfunción endotelial y la circulación sinusoidal alterada pueden ser de particular interés.

### 1.5.1. Estatinas

Las estatinas son fármacos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA) reductasa, la enzima limitante de la síntesis de colesterol, por lo que se utilizan para tratar la hipercolesterolemia. Por otro lado, el mevalonato, el producto de la reacción de la HMG-CoA reductasa, es el precursor no solo del colesterol, sino también de muchos otros compuestos isoprenoides, por lo que la inhibición de esta enzima clave presenta también efectos pleiotrópicos<sup>149</sup>. Los isoprenoides son necesarios para la isoprenilación postranscripcional de pequeñas proteínas GTPasas, como la Ras, Rac y Rho. Esta unión de isoprenoides les sirve como unión lipofílica para anclarse a la membrana celular donde serán activadas mediante GTP, para la transducción de señales involucradas en la proliferación celular, organización del citoesqueleto y activación de factores de transcripción, que modulan tanto la función endotelial (regulando la producción de NO y ET-1), como la síntesis de especies reactivas de oxígeno y la expresión de factores inflamatorios<sup>150,151</sup> (Figura 12). Por lo tanto, los efectos pleiotrópicos de las estatinas se deben a la inhibición de estas proteínas GTPasas que incluyen acciones antiinflamatorias y antioxidantes y una mejora en la función endotelial<sup>152</sup>.

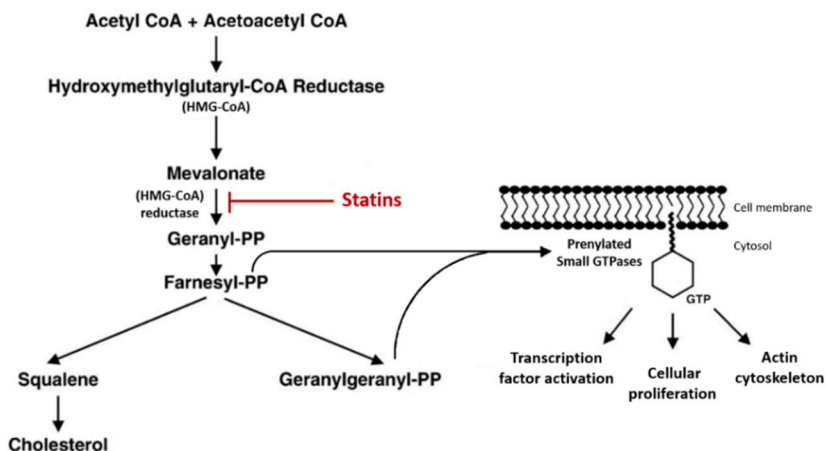


Figura 12. Efecto de las estatinas sobre la vía de biosíntesis de colesterol e isoprenoides. Adaptado de Beckan JA et al., *Trends Cardiovasc Med* 2006 y Sawada N et al., *Antioxid Redox Signal* 2014<sup>151,153</sup>.

Los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos intrahepáticos de las estatinas subyacen a la inhibición de RhoA y, en consecuencia, a la de Rho-quinasa (ROCK), lo que resulta en vasorelajación. En el caso de las LSEC, la inhibición de esta vía aumenta la actividad de la eNOS, mediante su fosforilación por parte de la Akt, incrementando así la biodisponibilidad de NO<sup>154,155</sup>. El NO derivado de la LSEC difunde a las HSC adyacentes y activa la vía cGMP/PKG. La estimulación de esta, provoca la relajación de las HSC inhibiendo la ruta RhoA/ROCK, lo que también provoca la inhibición de la proliferación, la migración y la expresión de genes profibróticos por parte de estas células<sup>153,156</sup>. Por otro lado, las estatinas también inhiben esta misma vía RhoA/ROCK de forma directa en las HSC activadas. Por lo tanto, las estatinas previenen la activación de cascadas de contracción, mediante la inhibición de RhoA, de forma independiente al NO y simultáneamente aumentando la producción de NO por parte de las LSEC<sup>157</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que las estatinas aumentan la expresión hepática del factor de transcripción Krüppel-like factor 2 (KLF2) que confiere vasoprotección endotelial hepática, en respuesta al estrés por rozamiento<sup>158</sup> (Figura 13).

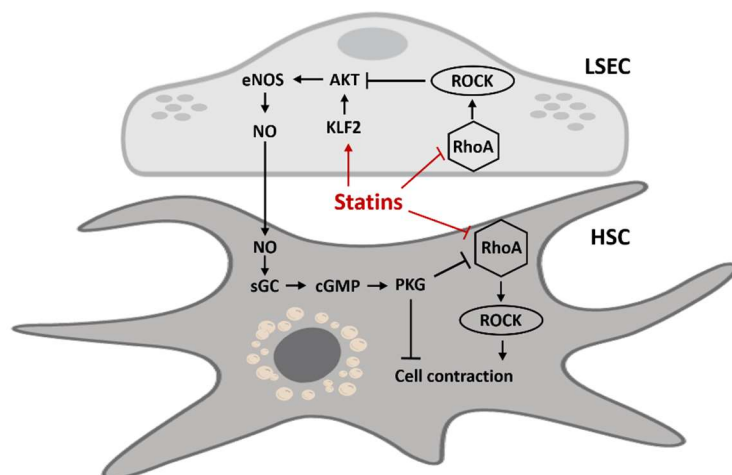


Figura 13. Mecanismo molecular de los efectos de las estatinas en las células endoteliales sinusoidales (LSEC) y células hepáticas estrelladas (HSC) que afectan al control de la presión portal.



Asimismo, y dado que el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las LSEC requiere la producción autocrina de NO, las estatinas podrían contribuir al restablecimiento del fenotipo funcional de las LSEC.

La eficacia de las estatinas se ha estudiado en diferentes modelos de ratas cirróticas<sup>157,159,160</sup>, e incluso en pacientes cirróticos<sup>161,162</sup>, y en todos ellos han demostrado ser eficaces a la hora de reducir la IHVR.

A pesar de que el tratamiento con estatinas puede producir un aumento de las aminotransferasas, se consideran generalmente seguras, ya que la presencia de enfermedad hepática no aumenta el riesgo de hepatotoxicidad por estatinas, e incluso algunos estudios han demostrado que pueden mejorar la función hepática<sup>163-165</sup>. Estudios preliminares han demostrado que las estatinas posiblemente puedan mejorar la histología hepática en pacientes con MAFLD; sin embargo, se deben realizar más estudios para evaluar los efectos a largo plazo de las estatinas en la histología hepática<sup>166,167</sup>.

### ***1.5.2. Antagonistas de los receptores de endotelina***

Los antagonistas de los receptores de endotelina (ERAs) son moléculas que compiten por la unión del receptor de ET-1. Se denominan selectivos o no-selectivos dependiendo de su capacidad para unirse al ETRA, al ETRB o a ambos. Los ERAs han sido estudiados ampliamente para el estudio de diferentes enfermedades. Por ejemplo, el bosentan, un ERA no selectivo, se emplea en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar y la esclerodermia<sup>168,169</sup>. El ambrisentan es un ERA selectivo del ETRA que en los últimos años también ha sido indicado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar<sup>170</sup>.

Varios estudios han demostrado la capacidad de estos fármacos para modular la hemodinámica hepática. Aunque existe cierta discordancia entre los resultados, estos estudios sugieren que los ERAs pueden ser eficaces a la hora de atenuar la HP, y más en concreto, que el antagonismo del ETRA puede ser suficiente para conseguir una

reducción significativa de la PP. Es importante tener en cuenta que quizás, la discrepancia entre estudios radica en los diferentes modelos, dosis o vías de administración empleados, pero que también pueden existir diferencias en las densidades y relaciones de los receptores de ET-1 en los diferentes modelos y en diferentes momentos de la enfermedad<sup>60,171</sup>.

Si bien la evidencia preclínica sugiere un papel para la ET-1 y los ERA en la hipertensión portal, los escasos y equívocos datos resaltan la necesidad de realizar nuevos estudios. Por otro lado, a pesar de que se desconocen los efectos que estos fármacos puedan tener sobre NASH, podrían ser útiles a la hora de mejorar la circulación intrahepática.



# *Hipótesis y Objetivos*



## 2. Hipótesis y Objetivos

A día de hoy, no existe ningún tratamiento farmacológico indicado para MAFLD, ya que la mayoría de fármacos candidatos para el control de la HP aún se encuentran en fase de investigación y solo se tiene evidencia experimental de sus efectos reductores sobre la PP<sup>10,137,148</sup>. Desde el punto de vista de la MAFLD no cirrótica, las intervenciones que se dirijan a los componentes reversibles de la disfunción endotelial y a la alteración de la circulación sinusoidal pueden ser de gran interés.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis doctoral es evaluar nuevas estrategias terapéuticas que puedan reestablecer el tono vascular intrahepático y mejorar la HP en el marco de NASH, caracterizando los mecanismos implicados en la desdiferenciación de las LSEC.

### Estudio 1

La disfunción de las LSEC se ha asociado con estadios tempranos de enfermedades hepáticas, contribuyendo al desarrollo de la HP, ya que juegan un papel muy importante a la hora de regular el tono vascular intrahepático. Sin embargo, este proceso de desdiferenciación no ha sido estudiado en profundidad en la etiología de NASH. Se ha demostrado que las estatinas, gracias a sus efectos pleiotrópicos, son capaces de mejorar la función endotelial, aumentando la disponibilidad de NO<sup>157,159</sup>. Dado que el mantenimiento del fenotipo especializado de las LSEC requiere de la producción autocrina de NO<sup>56</sup>, la hipótesis del estudio fue que el tratamiento con estatinas podría revertir la desdiferenciación de las LSEC y así mejorar la progresión de la HP en NASH.

Objetivos:

- Caracterizar la desdiferenciación de las LSEC y su contribución a la HP en NASH.
- Estudiar el papel de las LSEC desdiferenciadas en la patología de NASH.
- Evaluar la utilidad de las estatinas para reestablecer el fenotipo funcional de las LSEC en NASH.

## Estudio 2

Las primeras etapas de NASH se asocian con disfunción endotelial y un aumento de la resistencia vascular intrahepática. La disfunción de las LSEC se caracteriza no solo por la disminución de la capacidad de producir vasodilatadores, sino por el aumento de producción de potentes vasoconstrictores, como la ET-1, que actúa promoviendo la contracción de las HSC<sup>84</sup>. El ambrisentan es un antagonista selectivo del receptor de endotelina A (ETRA) aprobado para el tratamiento de pacientes con hipertensión arterial pulmonar<sup>170</sup>, aunque sus efectos sobre NASH son aún desconocidos.

La hipótesis de este estudio fue que la combinación del aumento de NO inducido por estatinas, con la inhibición de la contracción de las HSC inducido por el ambrisentan, podría producir un efecto sinérgico sobre la reducción de la IHVR y así mejorar la HP.

### Objetivos:

- Estudiar el efecto del ambrisentan en la fisiopatología de NASH.
- Analizar el efecto combinado de la atorvastatina y el ambrisentan en NASH.
- Evaluar la capacidad de la atorvastatina y el ambrisentan, individualmente o en combinación, de revertir el fenotipo sinusoidal contráctil, analizando los mecanismos moleculares sobre las LSEC y las HSC.

# *Materiales y Métodos*





### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Técnicas de experimentación animal

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Instituto de Investigación del Vall d'Hebron (VHIR, Barcelona) y autorizados por el *Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat* con el número de autorización 9481. Los procedimientos se desarrollaron en las instalaciones del *Vall d'Hebron Institut de Recerca* (VHIR) de acuerdo con la normativa europea (EC Directive 86/609/EEC for animal experiments).

##### 3.1.1. Modelo de dieta NASH

El modelo experimental se desarrolló con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley Oncins France Strain A (OFA) (Charles River Laboratories, Francia) de 200-220 g al inicio de cada protocolo realizado. Los animales fueron alojados en jaulas en condiciones de estabulación estándar, con temperatura constante de  $22\pm 2$  °C, humedad del 50% y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* durante 8 semanas con dieta hipercalórica (HFGFD, high fat glucose-fructose diet) con un aporte calórico de 5,73 kcal/g, compuesta por un 30% de grasa (mantequilla, aceite de coco, aceite de palma, sebo de vacuno) con ácidos grasos principalmente saturados y suplementada con colesterol (1 g/Kg) (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania), combinada con una bebida de glucosa-fructosa (42 g/L, 45% glucosa y 55% de fructosa) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania) que aporta 157,72 kcal/L. Los animales del grupo control fueron alimentados con dieta estándar (CD, control diet) con un aporte calórico de 3,43 kcal/g que contiene un 4,8% de grasa (Safe-150, SAFE, Augy, Francia) y agua.

El peso fue evaluado una vez por semana hasta la finalización del procedimiento, así como la ingesta de comida y bebida.

### 3.1.2 Administración del fármaco

En ambos estudios las ratas fueron aleatoriamente asignadas a cada grupo de tratamiento. Al cabo de las 8 semanas de dieta, se administró diariamente y de forma oral con sonda gavage el fármaco o vehículo correspondiente según el grupo experimental durante 2 semanas. Las dosis administradas a cada grupo se representan en la Tabla 2.

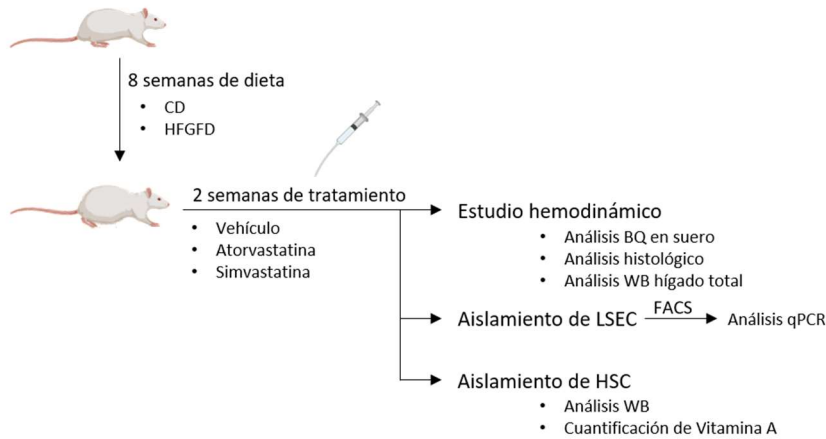
Tabla 2. Dosis de fármacos.

| Grupo                    | Fármaco y dosis  |
|--------------------------|--|
| HFGFD-Sim                | Simvastatina 10 mg/kg/día                              |
| HFGFD-Ato/HFGFD-At       | Atorvastatina 10 mg/kg/día                             |
| HFGFD-Am <sup>hi</sup>   | Ambrisentan 30 mg/kg/día                               |
| HFGFD-AtAm <sup>hi</sup> | Atorvastatina 10 mg/ml/día<br>Ambrisentan 30 mg/kg/día |
| HFGFD-Am <sup>lo</sup>   | Ambrisentan 2 mg/kg/día                                |
| HFGFD-AtAm <sup>lo</sup> | Atorvastatina 10 mg/kg/día<br>Ambrisentan 2 mg/kg/día  |

Simvastatina (Ratiopharm, Ulm, Alemania), Atorvastatina (Prevenor<sup>®</sup>, Pfizer, NY, USA), Ambrisentan (GlaxoSmithKline, Brentford, UK).

El diseño experimental de ambos estudios se representa en la figura 14.

### Estudio 1



### Estudio 2

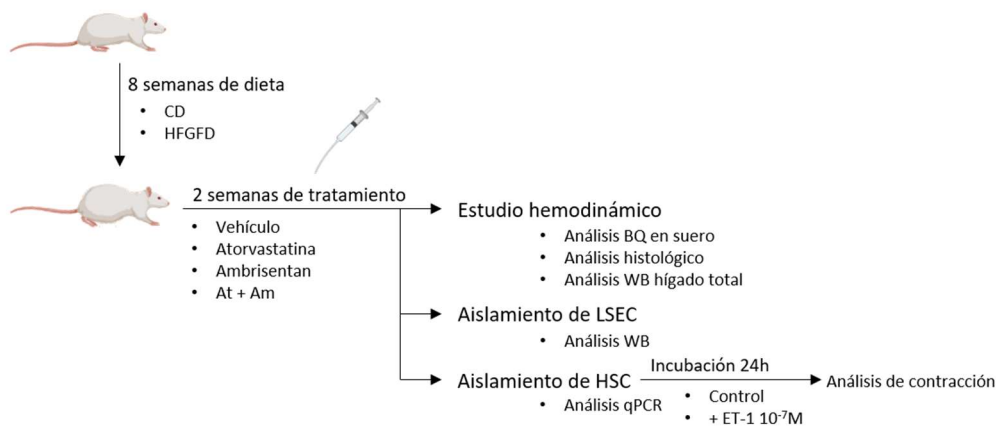


Figura 14. Diagrama de diseño de los estudios. Cada estudio comprendió tres grupos de ratas. El primer grupo se dedicó al estudio hemodinámico, bioquímico e histológico, además del análisis de muestras de hígado completo. El segundo grupo se empleó para el aislamiento de células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC), y el tercero para el aislamiento de células hepáticas estrelladas (HSC). CD, control diet; HFGFD, high fat glucose-fructose diet; BQ, bioquímica; FACS, fluorescence-activated cell sorting; qPCR, PCR cuantitativa; ET-1, endotelina-1.

### **3.1.3 Estudio hemodinámico**

La medida de los parámetros hemodinámicos se realizó tras 90 min de la última dosis de fármaco o vehículo, con el animal en ayuno (6 h) y bajo anestesia con 100 mg/kg de ketamina (Ketolar®, Pfizer, NY, USA) y 5 mg/kg de midazolam (B. Braun, Melsungen, Alemania) por vía intraperitoneal (aguja de 25 G). Durante el registro se controló que el animal estuviese anestesiado profundamente y que en todo momento el reflejo podal fuera negativo. En los casos en los que se perdió el efecto anestésico se administró una dosis de refuerzo (0,2 ml de anestesia al 50% de ketamina y midazolam). Se rasuraron las regiones quirúrgicas (parte interna de la pierna y abdomen) y se colocó el animal en decúbito supino. Durante el registro se mantuvo la temperatura del animal a 37 °C con la ayuda de una manta térmica y una sonda rectal. Las medidas se registraron mediante la unidad de adquisición de datos PowerLab (Harvard apparatus, Holliston, Ma, USA) asociada al software Chart 5.0.

#### ***Presión arterial media***

La medida de la presión arterial media (MAP, mmHg) se obtuvo mediante la canulación intravascular de la arteria femoral derecha del animal con un catéter de polietileno PE50, conectado a un transductor de señal de alta sensibilidad (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Inicialmente, se realizó una incisión en la ingle derecha del animal abriendo paso hasta localizar el paquete compuesto por arteria, vena y nervio femoral. Una vez se aisló la arteria, se realizó una incisión con una aguja de 23 G y se introdujo la cánula. Mediante dos nudos (seda 3.0) se inmovilizó el catéter dentro de la arteria.

#### ***Frecuencia cardíaca***

La frecuencia cardíaca (PPM, pulsaciones por minuto) se midió durante todo el registro de las medidas hemodinámicas a partir del registro de la presión arterial media, lo que permite saber en todo momento el estado de consciencia de la rata.

***Presión portal***

La presión portal (PP, mmHg) se midió mediante la canulación intravascular de la vena ileocólica con un catéter de polietileno PE50 conectado al transductor de señal de alta sensibilidad. Tras una incisión abdominal, se extendieron los intestinos sobre una gasa mojada con suero fisiológico. Una vez localizada la vena ileocólica, se introdujo el catéter y se inmovilizó con pegamento instantáneo (cianocrilato).

***Flujo mesentérico***

El flujo de la arteria mesentérica superior (SMABF, ml/[min·100g]) se midió mediante una sonda perivascular ultrasónica (Doppler) de 1 mm de diámetro (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA). Tras la incisión abdominal se aisló la arteria mesentérica superior (SMA) del tejido conectivo y la grasa que la rodea. Posteriormente, se aplicó un gel de transmisión de ultrasonidos a la sonda para facilitar la transmisión de la señal, y finalmente se pinzó la arteria disecada con la sonda.

***Flujo portal***

El flujo de la vena porta (PBF, ml/[min·100g]) se midió también mediante una sonda perivascular ultrasónica (Doppler) de 1 mm de diámetro (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA).

***Resistencia mesentérica***

La resistencia de la arteria mesentérica superior (SMAR, mmHg/ml·min·100g) se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$SMAR = \frac{(MAP - PP)}{SMABF}$$

### ***Resistencia vascular intrahepática***

La resistencia vascular intrahepática (IHVR, mmHg/ml·min·100g) se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$IHVR = \frac{PP}{PBF}$$

#### ***3.1.4 Análisis bioquímico de muestras de sangre***

Las muestras de sangre fueron recogidas en ayunas, inmediatamente después del estudio hemodinámico, por la vena cava inferior. Parte de la muestra se guardó en tubos de plástico sin anticoagulante (BD Vacutainer®) para el análisis bioquímico de suero en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Se analizaron los niveles en suero de glucosa, creatinina, bilirrubina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), creatinina quinasa (CK), colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y albumina.

Los niveles de ALT y CK del grupo vehículo con dieta hipercalórica (HFGFD-Veh) fueron utilizados para determinar la toxicidad hepática y muscular producida por las estatinas. De esta forma, definimos la toxicidad hepática como un incremento en los niveles de ALT superiores a 150 UI/L y la toxicidad muscular como un incremento en los niveles de CK superiores a 8500 UI/L. Los animales con toxicidad fueron descartados del estudio.

Otra parte de la muestra de sangre se recogió en un tubo *ependorf* y se centrifugó a 4000 g a 4 °C durante 10 min. Se recogió el suero y se guardó a -20 °C para posteriores análisis mediante inmunoensayo ELISA.

#### ***ELISA de insulina***

Los niveles de insulina se midieron mediante el Insulin ELISA Kit (Merck, Darmstadt, Alemania). Las lecturas de la placa se realizaron con el espectrofotómetro Synergy MX (Biotek, Winooski, VT, USA) y el software Gen 5 v2.9. La resistencia a la insulina se

estimó aplicando el índice HOMA-IR (modelo de homeostasis del índice de resistencia a la insulina) que se calcula con la siguiente fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{\text{Insulina en ayunas (ng/ml)} \cdot \text{Glucosa en ayunas (mg/dl)}}{405}$$

### ***ELISA de endotelina-1***

Los niveles de endotelina-1 (ET-1) se midieron mediante el Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las lecturas de la placa se realizaron con el espectrofotómetro Synergy MX (Biotek, Winooski, VT, USA) y el software Gen 5 v2.9.

### ***3.1.5 Análisis histológico***

Las muestras de hígado fueron fijadas en 4% paraformaldehído durante 24 h y posteriormente se pasaron a etanol al 50%. Los siguientes pasos de deshidratación, inclusión en bloques de parafina, cortes de 4 µm y tinción de hematoxilina-eosina (H&E) fueron realizados por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

La tinción de Picro-Sirius Red también se realizó en cortes histológicos de 4 µm. Los cortes fueron hidratados y teñidos con Picro-Sirius Red 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave. Tras la tinción fueron lavados con agua acidificada, secados y montados con DPX, medio de montaje rápido (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania).

La tinción de H&E fue empleada para la evaluación del parénquima hepático, mientras que la de Picro-Sirius Red para la evaluación de la fibrosis. Todas las muestras fueron evaluadas por una patóloga experta en hígado y a ciegas para la intervención realizada en los animales.

Se puntuó el grado de esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar de acuerdo con el sistema NASH-Clinical Research Network (NASH-CRN)<sup>172</sup> (Tabla 3). La



suma de puntuaciones de estos tres componentes, denominada NAFLD Activity Score (NAS), clasifica la patología según su severidad, siendo imprescindible para el diagnóstico de NASH histológico no solo que la suma de puntuaciones sea superior a tres, sino que también se dé la concurrencia de los tres componentes. La fibrosis también fue clasificada de acuerdo con el sistema NASH-CRN.

Tabla 3. Sistema de puntuación NASH Clinical Research Network (CRN)<sup>172</sup>.

| Ítem                              | Definición  | Score |
|-----------------------------------|---|-------|
| <b>Esteatosis</b>                 | Evaluación de la afectación parenquimatosa por esteatosis |       |
|                                   | <5%   | 0     |
|                                   | 5%-33%  | 1     |
|                                   | 33%-66%   | 2     |
|                                   | >66%  | 3     |
| <b>Inflamación lobulillar</b>     | Evaluación general de todos los focos inflamatorios       |       |
|                                   | Sin focos   | 0     |
|                                   | <2 focos por campo 200x                                   | 1     |
|                                   | 2-4 focos por campo 200x                                  | 2     |
|                                   | >4 focos por campo 200x                                   | 3     |
| <b>Balonización hepatocelular</b> | Ninguna   | 1     |
|                                   | Pocas células balonizadas                                 | 2     |
|                                   | Muchas células/balonización prominente                    | 3     |

### **3.2. Aislamiento de tipos celulares**

El aislamiento de LSEC y HSC se realizó tras 90 min desde la última dosis de fármaco o vehículo, con el animal en ayuno (6 h) y bajo anestesia con 100 mg/kg de ketamina (Ketolar®, Pfizer, New York City, NY, USA) y 5 mg/kg de midazolam (B. Braun, Melsungen, Alemania) por vía intraperitoneal (aguja de 25 G). Se rasuró y se limpió con etanol 70% el abdomen del animal y se colocó en decúbito supino. Tras una incisión abdominal, se abrió el vientre del animal cortando por la línea alba hasta llegar al diafragma. Se realizaron dos cortes a los laterales y se extendieron los intestinos sobre una gasa mojada con suero fisiológico. Se inyectaron 0,5 ml de heparina al 1% por la vena cava inferior e inmediatamente se cerró la vena porta de forma distal con un nudo (seda 3.0). A continuación, se procedió a canular la vena porta, se inmovilizó dentro de la vena mediante dos nudos y se conectó con el tubo de la bomba peristáltica MiniPlus 3 (Gilson, Middleton, WI, USA). Inmediatamente después, se cortó la vena cava inferior por debajo de la vena renal y se perfundió el hígado con 200 ml de buffer (el adecuado para cada tipo celular) de forma no recirculante para eliminar la sangre.

#### **3.2.1 Aislamiento de LSEC**

Para la obtención de LSEC el hígado se perfundió con 200 ml de buffer HANKS I a un flujo de 20 ml/min. Tras eliminar toda la sangre del hígado, se perfundió con colagenasa A (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 0,15 mg/ml en 200 ml de buffer HANKS II. Se perfundieron 50 ml a un flujo de 10 ml/min y a continuación, se bajó el flujo a 5 ml/min y se cerró la vena cava inferior con un nudo (seda 3.0) para perfundir los 150 ml restantes y así realizar la digestión *in vivo* del hígado. Una vez hecha la digestión *in vivo*, se extrajo el hígado y fue traspasado a una placa p100 para continuar con la digestión *in vitro*. Se acabó de disgregar el hígado con ayuda de un bisturí y se

incubó durante 10 min en 100 ml de buffer HANKS II con 0,1 mg/ml de colagenasa A en un baño a 37 °C y agitación constante.

A partir de este punto la muestra se conservó a 4 °C en todo momento. Se filtró (100 µm) el hígado digerido y se añadió el mismo volumen de buffer KREB'S previamente filtrado. Se centrifugó dos veces a 50 g durante 3 min para eliminar los hepatocitos y una tercera vez a 800 g durante 10 min. El pellet se resuspendió en 20 ml de PBS 1X frío (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Alemania), se volvió a centrifugar a 50 g durante 3 min y después a 800 g durante 10 min. Este último pellet que contenía las células no parenquimales se resuspendió en 10 ml de PBS 1X y se prepararon 3 tubos con el gradiente de percol. Cada tubo contenía 5 ml de Percoll® (Merck, Darmstadt, Alemania) al 50% en el fondo y 6,6 ml de Percoll® al 25%, sobre los que se colocaron 3,3 ml de muestra. Este gradiente se centrifugó a 800 g durante 25 min de forma que las LSEC y las células Kupffer (KC) quedaran en la interfase entre los dos percoles. Se recogieron las células, se lavaron con PBS 1X y se sembraron en una placa de cultivo con medio RPMI (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado (Tabla 4) durante 30 min a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda para que se adhiriesen las KC y así separarlas de las LSEC. Se recogió el sobrenadante con las LSEC y se sembraron en una placa recubierta con colágeno R (SERVA, Heidelberg, Alemania) en las mismas condiciones. Al cabo de 45 min se realizó un lavado y se dejaron en cultivo durante la noche.

Tabla 4. Suplementación de medio RPMI para LSEC

| Reactivo       | Casa comercial                             | Concentración final |
|----------------|--|---------------------|
| FBS            | Biowest, Nuaillé, Francia                  | 10%                 |
| Pen-Estrep     | Biowest, Nuaillé, Francia                  | 1%                  |
| Amphotericin B | Labclinics, Barcelona, España              | 1%                  |
| L-glutamina    | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA | 1%                  |
| Heparina       | Merck, Darmstadt, Alemania                 | 1%                  |
| ECGS           | Merck, Darmstadt, Alemania                 | 1%                  |

Pen-Strep, penicilina-estreptomicina; ECGS, endothelial cell growth supplement

### 3.2.2 Aislamiento de HSC

Para la obtención de HSC, el hígado se perfundió con 200 ml de buffer GBSS (Merck, Darmstadt, Alemania) a un flujo de 20 ml/min. Tras eliminar toda la sangre del hígado, se perfundió con pronasa a 1,5 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania); colagenasa A a 0,15 mg/ml y DNAsa a 0,05 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en 200 ml de GBSS. Se perfundieron 50 ml a un flujo de 10 ml/min y a continuación, se bajó el flujo a 5 ml/min, se cerró la vena cava inferior (seda 3.0) y se perfundieron 150 ml más para la digestión *in vivo*. Después, se extrajo el hígado y se pasó a una placa de p100 para disgregarlo con ayuda de un bisturí. Para la digestión *in vitro*, se incubó durante 10 min en 100 ml de buffer GBSS con pronasa a 0,4 mg/ml; colagenasa A a 0,1 mg/ml y DNAsa a 0,1 mg/ml en un baño a 37 °C y agitación constante.

Se filtró (100 µm) el hígado digerido y se centrifugó a 50 g durante 4 min para eliminar los hepatocitos. Después se centrifugó a 800 g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 25 ml de GBSS dos veces. Este último pellet se resuspendió en 7,5 ml de GBSS y se le añadieron 7,5 ml de OptiPrep™ (Merck, Darmstadt, Alemania) al 23%. Se prepararon 3 tubos en los que se pusieron 5 ml de la mezcla de células y OptiPrep™ (que quedó al

11,5%) y sobre ellos 2 ml de GBSS. Se centrifugaron a 1400 g durante 21 min de forma que las HSC quedaran en la interfase. Se recogieron las células, se lavaron con GBSS y se sembraron en una placa de cultivo con medio IMDM (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado (Tabla 5) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Al día siguiente se lavaron y se les añadió medio nuevo.

*Tabla 5. Suplementación de medio IMDM para HSC*

| <b>Reactivo</b> | <b>Casa comercial</b>                      | <b>Concentración final</b> |
|-----------------|--|----------------------------|
| FBS             | Biowest, Nuaille, Francia                  | 10%                        |
| Pen-Estrep      | Biowest, Nuaille, Francia                  | 1%                         |
| Amphotericin B  | Labclinics, Barcelona, España              | 1%                         |
| L-glutamina     | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA | 1%                         |

Pen-Strep, penicilina-estreptomina

### **3.3. Técnicas de biología molecular**

#### **3.3.1 Western Blot**

##### ***Extracción y conservación de proteínas***

Para el análisis de proteínas hepáticas se perfundió el hígado con suero fisiológico para así, eliminar la sangre. Después fue fragmentado y directamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. Las muestras congeladas se trituraron en frío, evitando su descongelación, hasta convertirlas en polvo y se homogeneizaron en tampón de lisis Tritón (400 µl/muestra).

Para la extracción de proteínas de los cultivos celulares se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1X y se añadió directamente el tampón de lisis Tritón en la placa (40 µl/pocillo placa de 6). Se rascaron las células en hielo y se transfirió a un *Eppendorf*.

Los siguientes pasos fueron los mismos para ambas extracciones. Los lisados se agitaron en vortex, se sonicaron en 3 ciclos de 10 s y tras dejarlos durante 10 min en hielo se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo *Eppendorf* y se mantuvo a -20 °C para la posterior estimación de proteínas.

### ***Cuantificación de proteínas***

La concentración de proteína se cuantificó con el BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mediante detección colorimétrica por Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para las muestras de hígado se emplearon diluciones de 1/30 y para las extracciones celulares se utilizó una dilución de 1/5.

### ***Electroforesis SDS-PAGE y electrotransferencia***

La electroforesis se realizó utilizando el sistema XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) en geles de SDS-poliacrilamida al 10% NuPAGE® Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Las soluciones de las muestras se prepararon como se indica en la Tabla 6 y seguidamente fueron hervidas a 95 °C durante 10 min. Se cargaron 11 µl de solución de muestra, y los geles se corrieron a 200 v, 120 mA.

*Tabla 6. Preparación muestras para la carga de gel de electroforesis NUPAGE®*

| <b>Reactivo</b>                  | <b>Volumen (µl)</b> |
|----------------------------------|---------------------|
| Extracto de proteína             | X (60 µg)           |
| dH <sub>2</sub> O                | 7,8 µl – X          |
| NuPAGE® LDS sample buffer (4x)   | 3 µl                |
| NuPAGE® LDS reducing agent (10x) | 1,2 µl              |

dH<sub>2</sub>O, agua destilada; Volumen total = 12 µL (se cargaron 11 µL/pocillo); Reactivos NuPAGE® (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)

La transferencia se realizó con el módulo XCell II™ Blot (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 µm (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) previamente hidratada. La transferencia se realizó a 30 v y 400 mA durante 1 h y 45 min en hielo.

### ***Inmunodetección***

Una vez realizada la transferencia, las membranas se tiñeron con solución de Ponceau S (Merck, Darmstadt, Alemania) para garantizar que las proteínas se hubieran transferido correctamente. Todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación constante. Las membranas se lavaron con TTBS 1X tres veces durante 10 min, y se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con 5% albúmina de suero bovino (BSA) (Merck, Darmstadt, Alemania) o en el caso de las proteínas fosforiladas con 5% PhosphoBLOCKER™ (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA).

Después del bloqueo, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Se lavaron tres veces con TTBS 1X durante 10 min, se incubaron con el anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa) correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo 3 veces con TTBS 1X durante 10 min. Los anticuerpos primarios y secundarios, así como las diluciones se detallan en la Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7. Anticuerpos primarios para Western blot.

| Anticuerpos primarios |          |              |                                   |                              |
|-----------------------|----------|--------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Proteína              | PM (KDa) | Especie (AC) | Casa Comercial                    | Dilución                     |
| P-eNOS                | 140      | Conejo       | Cell Signaling, MA, USA           | 1/250 en 5% BSA              |
| eNOS                  | 140      | Mouse        | BD transduction Labs., CA, USA    | 1/500 en TTBS1x              |
| P-AKT                 | 60       | Conejo       | Cell Signaling, MA, USA           | 1/500 en 5% PhosphoBLOCKER™  |
| AKT                   | 60       | Conejo       | Cell Signaling, MA, USA           | 1/500 en 5%BSA               |
| KLF2                  | 37       | Cabra        | Santa Cruz biotechnology, TX, USA | 1/200 en TTBS1x              |
| P-ERK1/2              | 42-44    | Conejo       | Cell Signaling, MA, USA           | 1/1000 en 5% PhosphoBLOCKER™ |
| ERK1/2                | 42-44    | Conejo       | Cell SignalingMA, USA             | 1/1000 en 5%BSA              |
| P-moesin              | 77       | Conejo       | Santa Cruz biotechnology, TX, USA | 1/200 en TTBS1x              |
| cFOS                  | 40       | Conejo       | Santa Cruz biotechnology, TX, USA | 1/200 en TTBS1x              |
| αSMA                  | 42       | Conejo       | Abcam, Cambridge, UK              | 1/200 en TTBS1x              |
| ETRA                  | 48       | Conejo       | Alomone Labs, Jerusalem, Israel   | 1/200 en TTBS1x              |
| ETRB                  | 50       | Conejo       | Alomone Labs, Jerusalem, Israel   | 1/200 en TTBS1x              |
| ET-1                  | 21       | Ratón        | Abcam, Cambridge, UK              | 1/250 en 5% BSA              |
| GAPDH                 | 36       | Ratón        | Ambion, TX, USA                   | 1/5000 en TTBS1x             |

PM, peso molecular; AC, anticuerpo; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; AKT, protein kinase B; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase; KLF2, Kruppel-like factor 2; cFOS, early transcription factor; αSMA, alpha-smooth muscle actin; ETRA, endothelin receptor subtype A; ETRB, endothelin receptor subtype B; ET-1, endotelina-1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. La GAPDH se utilizó como control de carga.



Tabla 8. Anticuerpos secundarios para Western blot.

| Anticuerpos secundarios |                          |          |
|-------------------------|--------------------------|----------|
| Anticuerpo              | Casa Comercial           | Dilución |
| Anti-conejo IgG-HRP     | Cell Signaling           | 1/30.000 |
| Anti-ratón IgG-HRP      | GE Healthcare            | 1/30.000 |
| Anti-cabra IgG-HRP      | Santa Cruz biotechnology | 1/30.000 |

Las diluciones de anticuerpos secundarios se prepararon en TTBS 1X, excepto para p-AKT y p-moesina, que se prepararon en 5 % PhosphoBLOCKER™.

Las membranas se revelaron con el kit ECL prime (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) en el sistema de imagen Odyssey®Fc (LI-COR, Lincoln, NE, USA) y se cuantificaron con el software Image Studio Lite (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Para la detección de proteína fosforilada y total en la misma membrana, las membranas se incubaron con Restore™ WB Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) durante 30 min a 55 °C. Se lavaron con TTBS 1X y se volvieron a bloquear.

### 3.3.2 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

#### Preparación de muestras

Tras la incubación durante la noche de las LSEC se despegaron con Trypsin-EDTA 10X (Biowest, Nuaille, Francia). Se prepararon alícuotas de  $10^6$  células, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C y las células sedimentadas se resuspendieron en 1 ml de FACS buffer. Se volvieron a centrifugar para ser resuspendidas e incubadas con anticuerpos marcados con fluorocromo: CD32b-FITC (1:10; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) durante 1 h a temperatura ambiente y CD11b/c-APC (1:10; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) durante 10 min a 4 °C y en oscuridad. El control negativo fue incubado con FACS buffer en las mismas condiciones. Terminada la incubación se añadieron 300 µl de FACS buffer y 2 µl de DAPI (0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se filtraron (30 µm).

### ***Sorting y análisis***

Las muestras fueron procesadas mediante el separador celular digital de alta velocidad BD FACSAria™ (BD Biosciences, San José, CA, USA). Se analizaron las células marcadas identificando como eventos todos aquellos que cumplían con el tamaño y morfología. Los voltajes se basaron en el control negativo y la compensación se estableció usando controles positivos de un solo marcaje para cada fluorocromo. Las células viables se clasificaron por tinción con DAPI, los dobletes y los agregados se excluyeron del análisis mediante el perfil de dispersión frontal (Forward Scatter, FSC-H y FSC-A) y la morfología se determinó por la dispersión lateral (Side Scatter, SSC).

Las células positivas para CD11b/c fueron excluidas y el resto se separaron como células CD32b positivas o negativas. Se recogieron en 1 ml de Trizol (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y fueron almacenadas a -80 °C para una posterior extracción de RNA. Los resultados fueron evaluados con el programa FCS Express 4 Flow Research Edition (De Novo Software, Pasadena, CA, USA).

#### ***3.3.3 Análisis de expresión génica***

##### ***Extracción de RNA y Retrotranscripción***

El RNA de las HSC fue extraído con el RNeasy Mini Kit (QUIAGEN, Venlo, Nederland) y cuantificado mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La retrotranscripción se realizó con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Tabla 9).

Tabla 9. Retrotranscripción mediante High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

| Reactivo                           | Volumen (μl) |
|------------------------------------|--------------|
| 10x RT buffer                      | 2            |
| 25x dNTP Mix (100mM)               | 0,8          |
| 10x RT Random Primers              | 2            |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1            |
| RNase Inhibitor                    | 1            |
| RNase-free H <sub>2</sub> O        | 3,2          |
| RNA                                | 10           |

Todos los reactivos son de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

El RNA de ambos subtipos de LSEC (CD32b<sup>+</sup>/CD11b/c<sup>-</sup> y CD32b<sup>-</sup>/CD11b/c<sup>-</sup>) fue extraído con el RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Venlo, Nederland). En primer lugar, tras dejar descongelar las células guardadas en Trizol, se añadieron 200 μl de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania). Tras agitar las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugaron a 10.500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recogió la fase acuosa y se continuó con el procedimiento del RNeasy Micro Kit para la extracción de RNA total. Una vez extraído el RNA, se cuantificó mediante el sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) y se realizó la retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) con el SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Tabla 10).

Tabla 10. Retrotranscripción mediante SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit

| Reactivo                     | Volumen (μl) |
|------------------------------|--------------|
| Super Script VILO Master Mix | 4            |
| RNA                          | 16           |

Super Script VILO master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

### **Preamplificación**

A continuación, se llevó a cabo una preamplificación específica dirigida de los genes a analizar en las LSEC con TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se preparó un pool de sondas de interés (Tabla 11) en TE 1X buffer, siendo la concentración final de las sondas de 0,2X. La preparación de reactivos para la reacción de la preamplificación se indica en la Tabla 12.

*Tabla 11. Sondas para la preamplificación y qPCR*

| <b>Sondas</b>  |   |               |               |
|----------------|---|---------------|---------------|
| <b>Símbolo</b> | <b>Nombre completo</b>  | <b>Alias</b>  | <b>Código</b> |
| Nos3           | Nitric oxide synthase 3   | eNOS          | Rn02132634_s1 |
| Gapdh          | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                        | BARS-38, Gapd | Rn99999916_s1 |
| Pecam1         | Platelet cell adhesion molecule 1                               | CD31          | Rn01467262    |
| Edn1           | Endothelin 1  | Et1           | Rn00561129    |
| STAB1          | Stabilin 1  |               | Rn01453547    |
| Lyve1          | Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1              | Xlkd1         | Rn01510421    |
| Fcgr2b         | Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor                  | CD32, FCRII   | Rn01490232    |
| Emr1           | EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1 | F4/80         | Rn01527631    |
| Des            | Desmin  |               | Rn00574732    |
| Cyp3a2         | Cytochromo P450, family 3, subfamily a, polypeptide 2           | Cyp3a11       | Rn00756461    |
| Ednra          | Endothelin receptor type A                                      | ETRA          | Rn00561137    |
| Ednrb          | Endothelin receptor type B                                      | ETRB          | Rn00569139    |
| Col1a1         | Collagen, type I, alpha 1                                       | COL1A1        | Rn01463848    |
| Acta2          | Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta                            | $\alpha$ SMA  | Rn01759928    |
| Pdgfrb         | Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide       | PDGFR $\beta$ | Rn00709573    |
| Mmp2           | Matrix metalloproteinase 2                                      |               | Rn01538170    |
| KLF2           | Kruppel-like factor 2   | Lklf          | Rn01420496    |

Todas las sondas son de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). La Gapdh se utilizó como control de carga. Todas las sondas están marcadas con el fluoróforo FAM-MGB.

Tabla 12. Preparación de reactivos para la preamplificación

| Reactivo                      | Volumen ( $\mu$ l) |
|-------------------------------|--------------------|
| TaqMan PreAmp Master Mix (2X) | 25                 |
| Pool de sondas (0,2X)         | 0,5                |
| cDNA                          | 12,5               |

Taqman Preamp master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

### **PCR cuantitativa**

Las muestras preamplificadas fueron diluidas (1:10) en TE 1X buffer. La PCR cuantitativa (RT-PCR) se realizó en placas de 384 pocillos con triplicados para cada muestra. Las soluciones para cada reacción se indican en la Tabla 13 y las sondas empleadas en la Tabla 11. Para la cuantificación de la reacción se utilizó el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y el análisis se realizó con la aplicación *on line* Relative Quantification qPCR Thermofisher Cloud (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Tabla 13. Preparación de reactivos para qPCR

| Reactivo                        | Volumen ( $\mu$ l) |
|---------------------------------|--------------------|
| Taqman universal PCR master mix | 4,5                |
| Sonda específica                | 0,5                |
| cDNA/cDNA preamplificado (1:10) | 5                  |

Taqman universal PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

### **3.3.4 Cuantificación de Vitamina A**

#### ***Autofluorescencia***

Las HSC se cultivaron en *Well chamber slides* (Ibidi, Martinsried, Alemania) y tras adherirse durante la noche, fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 4% paraformaldeido durante 10 min. Las células fueron analizadas en el microscopio invertido Leica DM (Wetzlar, Alemania) empleando un filtro de excitación de 350/50 nm y un filtro de emisión de 450/50 nm.

#### ***Tinción Oil Red O***

Tras analizar la autofluorescencia de las células, se realizó un lavado con dH<sub>2</sub>O y se dejaron secar. Se incubaron con 1,2 propanediol 100% durante 5 min y fueron teñidas con 0,5% Oil Red O (Merck, Darmstadt, Alemania) precalentado a 65 °C durante 15 min en agitación. Después, se incubaron con 1,2 propanediol 85% durante 5 min, se lavaron dos veces con dH<sub>2</sub>O y se dejaron secar. La acumulación de gotitas de grasa se analizó con el mismo microscopio con luz transmitida.

#### ***Cuantificación***

El análisis y la cuantificación se realizó en ambos casos con el software Fiji<sup>173</sup>.

### **3.3.5 Ensayo de contracción celular**

Para examinar la capacidad contráctil de las HSC se emplearon placas de cultivo de 24 pocillos. Se prepararon geles de colágeno a concentración de 1,5 mg/ml como se especifica en la Tabla 14, utilizando NaOH para ajustar el pH. Se añadió 500 µl de la solución a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante al menos 1 h para permitir la solidificación del gel. Sobre cada gel se sembraron 2·10<sup>6</sup> células y se dejaron incubando durante la noche para que se adhirieran con medio suplementado con 10% FBS.

Tabla 14. Preparación de geles de colágeno

| Reactivo          | Volumen (1ml) |
|-------------------|---------------|
| Colágeno (2mg/ml) | 750 $\mu$ l   |
| IMDM              | 200 $\mu$ l   |
| NaOH              | 50 $\mu$ l    |

Collagen R Solution 0.2% (SERVA, Heidelberg, Alemania). Medio IMDM (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado sin FBS. NaOH 1 N.

Tras adherirse las células, se lavaron y se incubaron durante 1 h con medio sin suero. Después, se les cambió el medio por medio con FBS 10% o medio con FBS 10% y ET-1  $10^{-7}$  M. Se desengancharon los geles de la placa utilizando una punta de pipeta de 200  $\mu$ l y se incubaron durante 24 h. Las placas se fotografiaron para medir el área de los geles. La contracción mediada por las células se evaluó midiendo el cambio en el área del gel usando el software Fiji<sup>173</sup>. Se realizaron triplicados de cada condición, con células aisladas de al menos 3 ratas de cada grupo de estudio.

### 3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM® SPSS® Statistics 20 (Armonk, NY, USA). Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se comparan mediante t de Student, Mann-Whitney o *one-way* ANOVA, seguido de una prueba post-hoc. Las diferencias se consideraron significativas a un valor de  $p < 0,05$ .

La composición de los buffers y reactivos se detalla en el Anexo 1.

## *Resultados*





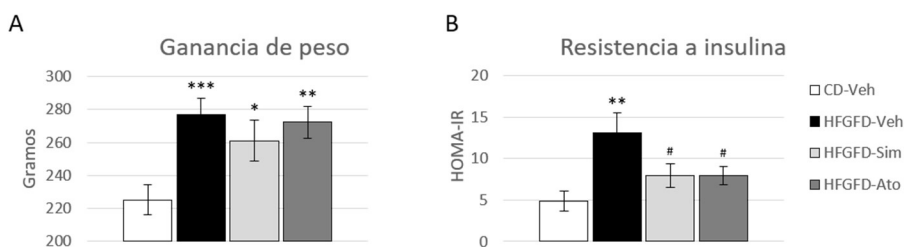
## 4. Resultados

### 4.1 Estudio 1

#### Efecto de las estatinas sobre el peso corporal y los parámetros bioquímicos.

Los animales alimentados con HFGFD mostraron una diferencia de ganancia de peso del 20% en comparación con las ratas CD. El tratamiento con estatinas (simvastatina o atorvastatina) no tuvo efecto sobre el peso corporal en comparación con las ratas HFGFD tratadas con vehículo (Figura 15A).

El incremento de los niveles de glucosa e insulina en sangre (Tabla 15) indicaron una posible resistencia a insulina en el modelo, que fue verificado con el análisis del HOMA-IR, donde el grupo vehículo mostró un aumento significativo del índice (Figura 15B). En los animales tratados con estatinas, los niveles de estos parámetros alcanzaron valores comparables a los del grupo CD-Veh, sugiriendo una mejora de la sensibilidad a insulina asociada con el tratamiento con estatinas. Los valores de ALT, triglicéridos y albúmina también aumentaron significativamente tras la HFGFD. Los niveles de ALT redujeron significativamente con el tratamiento con atorvastatina, mientras que los triglicéridos se vieron reducidos con ambas estatinas (Tabla 15).



*Figura 15. Cambios en el peso corporal y resistencia a insulina. (A) El aumento de peso corporal se evaluó al final de la 10ª semana en los grupos CD-Veh, n=15; HFGFD-Veh, n=15; HFGFD-Sim, n=12 y HFGFD-Ato, n=14. (B) Modelo de homeostasis de resistencia a insulina (HOMA-IR) en CD-Veh, n=7; HFGFD-Veh, n=7; HFGFD-Sim, n=8 y HFGFD-Ato, n=10. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM; \* $p$  <0,05; \*\* $p$  <0,01; \*\*\* $p$  <0,001 en comparación con CD-Veh; # $p$  <0,05 en comparación con HFGFD-Veh.*

Tabla 15. Parámetros bioquímicos.

|                  | Glucosa<br>(mg/dL) | Insulina<br>(ng/ml)  | Creatinina<br>(mg/dL) | Bilirrubina<br>(mg/dL) | AST<br>(UI/L)     | ALT<br>(UI/L)      | CK<br>(UI/L)        | FA<br>(UI/L)      | Colesterol<br>(mg/dL) | LDL<br>(mg/dL)  | HDL<br>(mg/dL)  | TGL<br>(mg/dL)      | Albumina<br>(g/dL) |
|------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| <b>CD-Veh</b>    | 209,87<br>± 20,14  | 11,668<br>± 2,57     | 0,75<br>± 0,02        | 0,08<br>± 0,01         | 182,75<br>± 33,39 | 40,93<br>± 2,61    | 2634,57<br>± 630,59 | 134,47<br>± 7,15  | 81,40<br>± 3,55       | 28,07<br>± 1,52 | 47,67<br>± 2,27 | 29,07<br>± 1,88     | 2,51<br>± 0,06     |
| <b>HFGFD-Veh</b> | 233,33<br>± 33,53  | 24,228<br>± 2,34***  | 0,79<br>± 0,04        | 0,11<br>± 0,01         | 146,83<br>± 14,27 | 49,47<br>± 2,72*   | 2265<br>± 528,67    | 154,13<br>± 11,70 | 79,80<br>± 4,03       | 28,67<br>± 2,93 | 42,60<br>± 2,04 | 42,33<br>± 4,35**   | 2,82<br>± 0,06***  |
| <b>HFGFD-Sim</b> | 195,00<br>± 23,35  | 16,377<br>± 1,91##   | 0,92<br>± 0,08        | 0,09<br>± 0,01         | 194,6<br>± 47,83  | 48,27<br>± 5,02    | 2243,75<br>± 497,47 | 144,67<br>± 9,32  | 67,63<br>± 3,98       | 23,5<br>± 4,66  | 45,67<br>± 4,2  | 31,75<br>± 2,79#    | 2,91<br>± 0,08***  |
| <b>HFGFD-Ato</b> | 219,29<br>± 20,12  | 15,565<br>± 1,12#### | 0,80<br>± 0,05        | 0,11<br>± 0,01         | 109,00<br>± 7,61  | 38,07<br>± 2,00### | 1220,71<br>± 164,71 | 132,50<br>± 7,22  | 74,43<br>± 3,45       | 21,79<br>± 1,95 | 47,14<br>± 2,19 | 28,00<br>± 1,83#### | 2,74<br>± 0,04**   |

Los valores se expresan como media ± SEM en CD-Veh, n=15; HFGFD-Veh, n=15; HFGFD-Sim, n=12 y HFGFD-Ato, n=14. AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FA, fosfatasa alcalina; CK, creatina quinasa. \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 en comparación con CD-Veh. #p <0,05; ##p <0,01; ###p <0,001 en comparación con HFGFD-Veh.

Las estatinas solo produjeron una toxicidad muscular leve en el 7,7% de las ratas tratadas con simvastatina y en el 12,5% de las ratas tratadas con atorvastatina. Hubo una ausencia total de toxicidad hepática en todos los animales (Tabla 16).

Tabla 16. Eventos adversos tras 2 semanas de tratamiento.

|                            | n  | Toxicidad hepática (%) | Toxicidad muscular (%) |
|----------------------------|----|------------------------|------------------------|
| <b>CD-Vehículo</b>         | 15 | 0                      | 0                      |
| <b>HFGFD-Vehículo</b>      | 15 | 0                      | 0                      |
| <b>HFGFD-Simvastatina</b>  | 13 | 0                      | 7,69                   |
| <b>HFGFD-Atorvastatina</b> | 16 | 0                      | 12,50                  |

n, número de ratas; toxicidad hepática, porcentaje de animales con niveles de ALT en suero > 150 UI/L; toxicidad muscular, porcentaje de animales con niveles de CK en suero > 8400 UI / L.

### Las estatinas mejoran el NASH histológico inducido por la HFGFD

En el grupo HFGFD-Veh un porcentaje significativamente mayor de animales desarrolló esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar en comparación a los del grupo CD-Veh (Figura 16A). Esto se tradujo en que las ratas alimentadas con la HFGFD desarrollaran NASH histológico en mayor proporción a las ratas con CD ( $p < 0,001$ ). En el caso de los grupos con tratamiento de estatinas, el porcentaje de animales con estas tres características fue semejante a los del grupo que recibió el vehículo. Sin embargo, los scores obtenidos fueron más bajos, lo que resultó en la disminución del porcentaje de individuos con NASH histológico (HFGFD-Sim:  $p = 0,03$ ; HFGFD-Ato:  $p = 0,04$ ), junto con una puntuación más bajas de actividad NAFLD (NAS) (Figura 16A-B).

Ningún animal de ningún grupo desarrolló fibrosis. Las tinciones con Sirius Red de las muestras hepáticas de los grupos CD-Veh y HFGFD tratadas con vehículo, simvastatina o atorvastatina se muestran en la Figura 16C.

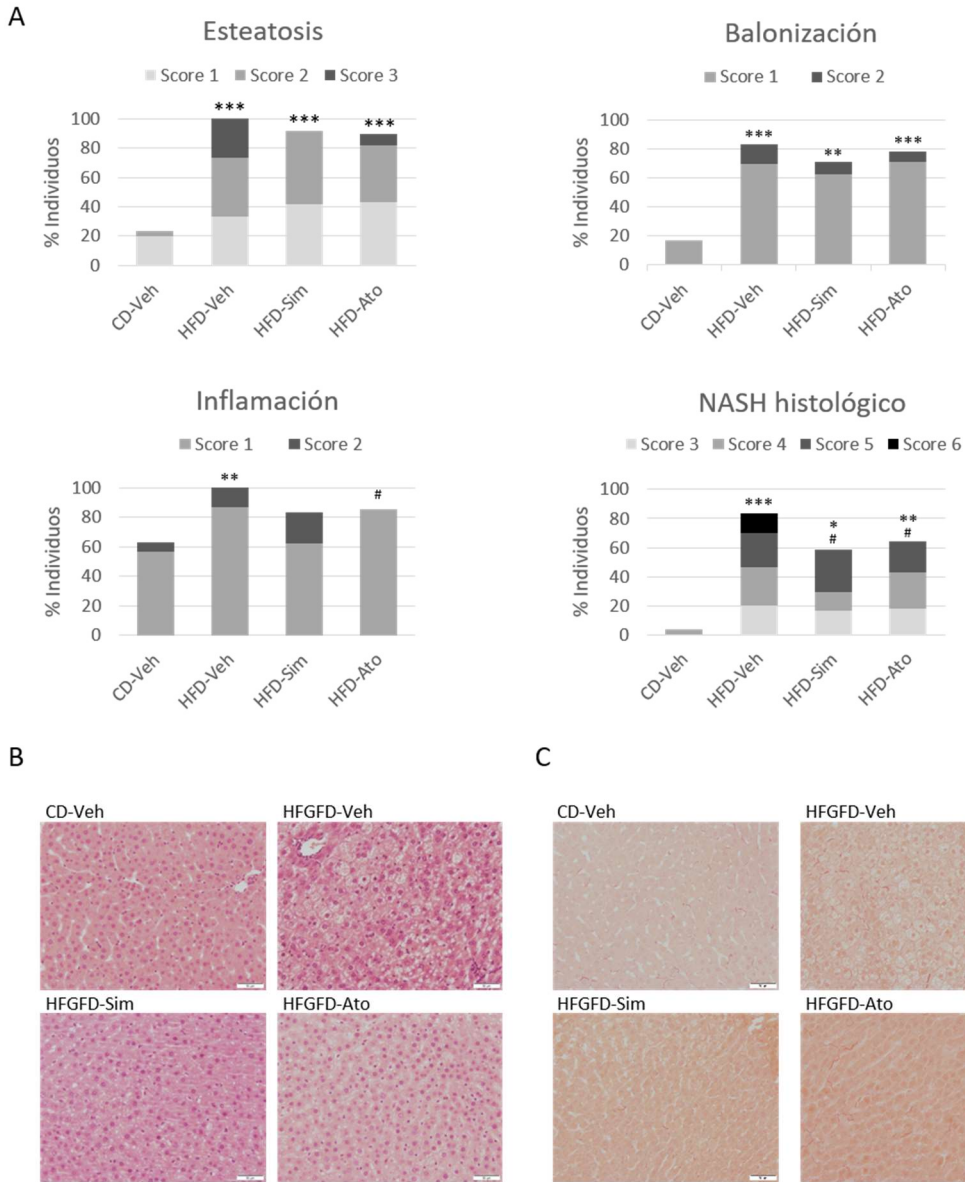


Figura 16. Histología hepática. Evaluación histológica de NASH siguiendo la puntuación histológica NASH-CRN en CD-Veh, n=15, HFGFD-Veh, n=15, HFGFD-Sim, n=12 y HFGFD-Ato, n=14. Los diagramas de barras representan el porcentaje (promedio de dos análisis histológicos separados) de individuos que presentan esteatosis, balonización hepatocelular, inflamación lobulillar, y NASH diagnosticada histológicamente (definida como NAFLD activity score (NAS)  $\geq 3$  y concurrencia de esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar). Los scores se representan en gris claro, medio, oscuro y negro. Imágenes representativas (aumento de 20x) de

*secciones de hígado teñidas con B) Hematoxilina-Eosina y C) Sirius Red para evaluar la fibrosis. Se usó la prueba U de Mann Whitney para comparar los porcentajes de cada score por pares de grupos para cada ítem (\*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 en comparación con CD-Veh. #p <0,05 en comparación con HFGFD-Veh).*

### **Las estatinas mejoran la hemodinámica hepática y la disfunción endotelial intrahepática**

La administración de la HFGFD durante diez semanas produjo un aumento significativo de la PP en comparación con la CD (incremento del 26%, p <0,001) (Tabla 17). En este modelo de NASH, tanto el tratamiento con simvastatina como con atorvastatina redujeron significativamente los niveles de la PP en comparación con el vehículo (HFGFD-Sim: 11%, p =0,006; HFGFD-Ato: 14%, p <0,001), sin producir cambios en la hemodinámica sistémica. La reducción de la PP tras ambos tratamientos es paralela a una disminución no significativa de la IHVR en ambos grupos en comparación con el grupo HFGFD-Veh.

Tabla 17. Medidas hemodinámicas.

|                  | MAP<br>(mmHg) | SMABF<br>(mL/[min100g]) | SMAR<br>(mmHg/mL·min·100 g) | PP<br>(mmHg)    | PBF<br>(mL/[min·100 g]) | IHVR<br>(mmHg/mL·min·100 g) | Frecuencia<br>cardíaca<br>(PPM) |
|------------------|---------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <b>CD-Veh</b>    | 108,85 ± 4,86 | 3,86 ± 0,58             | 31,98 ± 4,27                | 8,30 ± 0,22     | 2,56 ± 0,15             | 3,38 ± 0,27                 | 328,03 ± 7,14                   |
| <b>HFGFD-Veh</b> | 109,88 ± 3,84 | 3,36 ± 0,49             | 36,46 ± 4,79                | 10,47 ± 0,37*** | 2,89 ± 0,22             | 3,62 ± 0,34                 | 322,71 ± 10,09                  |
| <b>HFGFD-Sim</b> | 105,29 ± 7,26 | 3,10 ± 0,46             | 35,52 ± 2,92                | 9,29 ± 0,25##   | 3,00 ± 0,35             | 3,42 ± 0,46                 | 325,06 ± 8,60                   |
| <b>HFGFD-Ato</b> | 108,76 ± 5,90 | 3,34 ± 0,37             | 36,37 ± 3,11                | 8,85 ± 0,30###  | 2,81 ± 0,24             | 3,17 ± 0,31                 | 324,51 ± 9,30                   |

Los valores se expresan como media ± SEM en CD-Veh, n=15; HFGFD-Veh, n=15; HFGFD-Sim, n=12 y HFGFD-Ato, n=14. MAP, presión arterial media; SMABF, flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior; SMAR, resistencia de la arteria mesentérica superior; PP, presión portal; PBF, flujo sanguíneo portal; IHVR, resistencia vascular intrahepática; PPM, pulsaciones por minuto. \*\*\*p <0,001 en comparación con CD-Veh. ##p <0,01; ###p <0,001 en comparación con HFGFD-Veh.

El análisis de niveles de expresión proteica en hígado total por Western blot mostró una reducción de los niveles de KLF2 en el grupo HFGFD-Veh en comparación con el CD-Veh, y una recuperación parcial de la expresión en los grupos tratados con estatinas (Figura 17). También se evaluó la activación de Akt y eNOS mediante la cuantificación de los niveles de fosforilación de estas proteínas. Las ratas HFGFD-Veh mostraron niveles significativamente reducidos tanto de P-Akt, como PeNOS en comparación con las ratas CD-Veh (Figura 17). Tras el tratamiento con atorvastatina, esta situación tendió a revertirse, mostrando un aumento en los niveles de P-Akt y PeNOS. Sin embargo, en el grupo HFGFD-Sim, aunque se recuperaron los niveles de PeNOS, los de P-Akt aumentaron solo parcialmente.

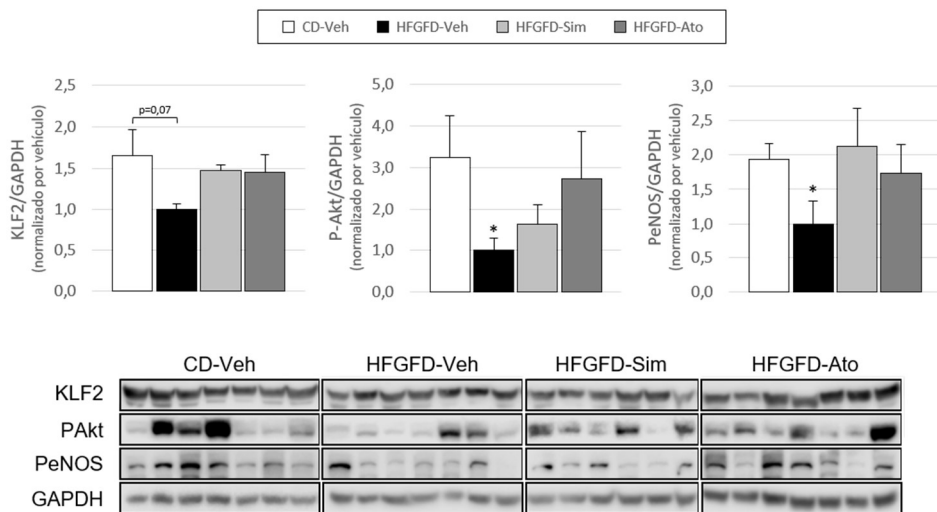


Figura 17. Análisis de Western blot de marcadores de disfunción endotelial intrahepáticos. Los diagramas de barras muestran la cuantificación de las proteínas KLF2, P-Akt y PeNOS en CD-Veh,  $n=7$ ; HFGFD-Veh,  $n=7$ ; HFGFD-Sim,  $n=6$  y HFGFD-Ato,  $n=7$ . Los niveles de proteína se muestran normalizados por el grupo HFGFD-Veh y se expresan como media  $\pm$  SEM. Debajo se enseñan los Western blot correspondientes. La GAPDH se utilizó como control de carga. \* $p < 0,05$  en comparación con CD-Veh.



## Las estatinas previenen la capilarización de las LSEC inducida por la HFGFD

Se aislaron LSEC de los diferentes grupos de estudio para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Tras clasificar las células viables y excluir agregados celulares y KC (Figura 18A-C), las LSEC primarias se subtiparon como células diferenciadas ( $CD32b^+/CD11b/c^-$ ) o desdiferenciadas ( $CD32b^-/CD11b/c^-$ ) (Figura 18D).

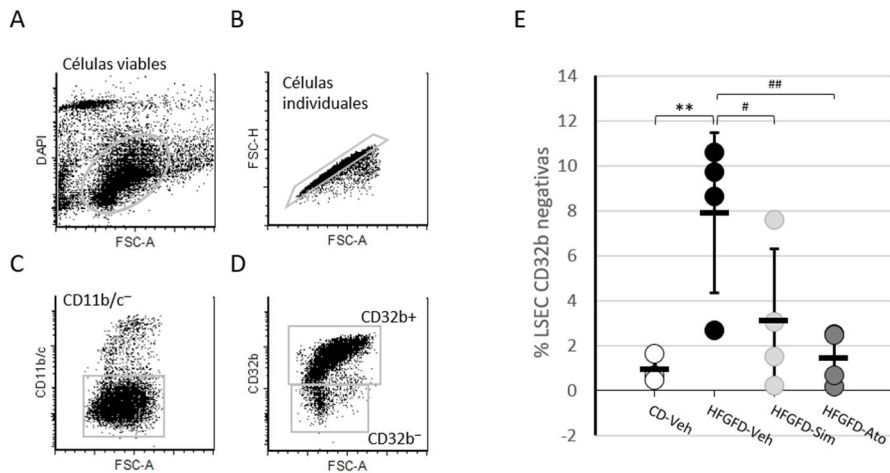
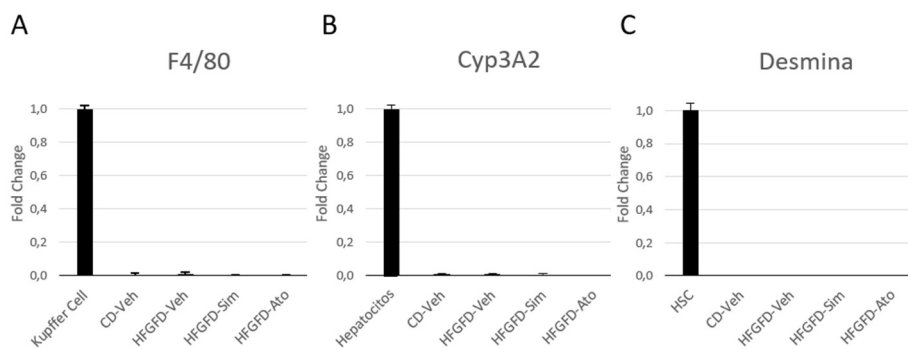


Figura 18. Clasificación de los subtipos de células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) por citometría de flujo. Estrategia de selección para el análisis y clasificación de LSEC primarias: (A) Células viables dentro de la muestra analizada. (B) Células individuales. Se excluyen los agregados y dobletes. (C) Se excluyen las células Kupffer ( $CD11b/c$  positivas). (D) Fenotipos de LSEC:  $CD32b^+$  (especializadas/diferenciadas) y  $CD32b^-$  (capilarizadas/desdiferenciadas). (E) Porcentaje de células  $CD32b^-$  identificadas en CD-Veh,  $n=4$ ; HFGFD-Veh,  $n=4$ ; HFGFD-Sim,  $n=4$  y HFGFD-Ato,  $n=4$ . Los valores del grupo se expresan como media  $\pm$  SEM. El porcentaje de cada individuo se muestra como un punto. \*\* $p < 0,01$  en comparación con CD-Veh; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  en comparación con HFGFD-Veh (ANOVA).

Las LSEC desdiferenciadas, fueron clasificadas siguiendo una estrategia de selección negativa ( $CD32b^-/CD11b/c^-$ ), por lo que se procedió a descartar la posible presencia de otros tipos celulares en esta subpoblación. Para ello se cuantificó la expresión de genes específicos para los principales tipos celulares hepáticos: F4/80 para las KC, Cyp3A2 para los hepatocitos y desmina para las HSC. La Figura 19 muestra la completa ausencia de expresión de cualquiera de estos genes en la subpoblación de LSEC desdiferenciadas en los diferentes grupos.



*Figura 19. Expresión génica de marcadores específicos de cada tipo celular en células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC)  $CD32b^-/CD11b/c^-$ . Los resultados se expresan como fold change normalizado por la expresión del marcador celular específico en cada tipo de célula de referencia. (A) F4/80 en KC; (B) Cyp3A2 en hepatocitos; y (C) Desmina en HSC. La GAPDH se utilizó como control endógeno. Los niveles de mRNA se expresan como media  $\pm$  SEM.*

Aunque en una proporción muy pequeña (1%), los animales sanos mostraron presencia de la subpoblación  $CD32b^-/CD11b/c^-$  de LSEC. Se encontró un aumento significativo de esta proporción de células  $CD32b^-/CD11b/c^-$  en ratas alimentadas con la HFGFD en comparación con las alimentadas con CD (8%,  $p = 0,005$ ) (Figura 18E). Además, el tratamiento con ambas estatinas disminuyó significativamente el porcentaje de estas LSEC desdiferenciadas, en comparación con los animales que habían recibido el vehículo (HFGFD-Sim: 3%,  $p = 0,024$ ; HFGFD-Ato: 1,5%,  $p = 0,005$ ) (Figura 18E).

### Los subtipos de LSEC son diferentes entre el grupo CD-Veh y HFGFD-Veh

Las LSEC CD32b<sup>-</sup> de los animales CD y HFGFD fueron caracterizadas en función de su perfil de expresión génica (Figura 20). En primer lugar, se analizó el nivel de expresión de tres genes relacionados con la endocitosis, Stab1, LYVE-1 y CD32b, la característica más distintiva de las LSEC especializadas. Las células CD32b<sup>-</sup> mostraron niveles de mRNA significativamente más bajos de estos genes en comparación con las células CD32b<sup>+</sup> en todos los grupos de animales (Figura 20A).

También se examinaron genes sensibles al estrés por rozamiento de flujo, como el KLF2 y la eNOS, para analizar la capacidad de regulación del tono vascular de estas células (Figura 20B). Los niveles de mRNA de KLF2 en las células CD32b<sup>-</sup> fueron significativamente más altos en comparación con las células CD32b<sup>+</sup> tanto en ratas CD-Veh como HFGFD-Veh. Los niveles de mRNA de eNOS también fueron más altos en las células CD32b<sup>-</sup>, pero alcanzaron significancia estadística solo en el grupo HFGFD-Veh, probablemente debido a la disminución de la expresión de este gen por parte de las células CD32b<sup>+</sup> en este grupo.

Finalmente, analizamos la expresión génica de CD31, asociada a la desdiferenciación de las LSEC, y ET-1, relacionada con la vasoconstricción (Figura 20C). No hubo diferencias con respecto a estos genes entre las células CD32b<sup>+</sup> y CD32b<sup>-</sup> en ratas CD-Veh. Sin embargo, al analizar ambas subpoblaciones de LSEC en los animales HFGFD-Veh, se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA de ambos genes en las células CD32b<sup>-</sup> respecto a las CD32b<sup>+</sup>. Además, la expresión de ET-1 en las células CD32b<sup>-</sup> de animales HFGFD-Veh fue significativamente superior a la de estas células en los animales CD-Veh.

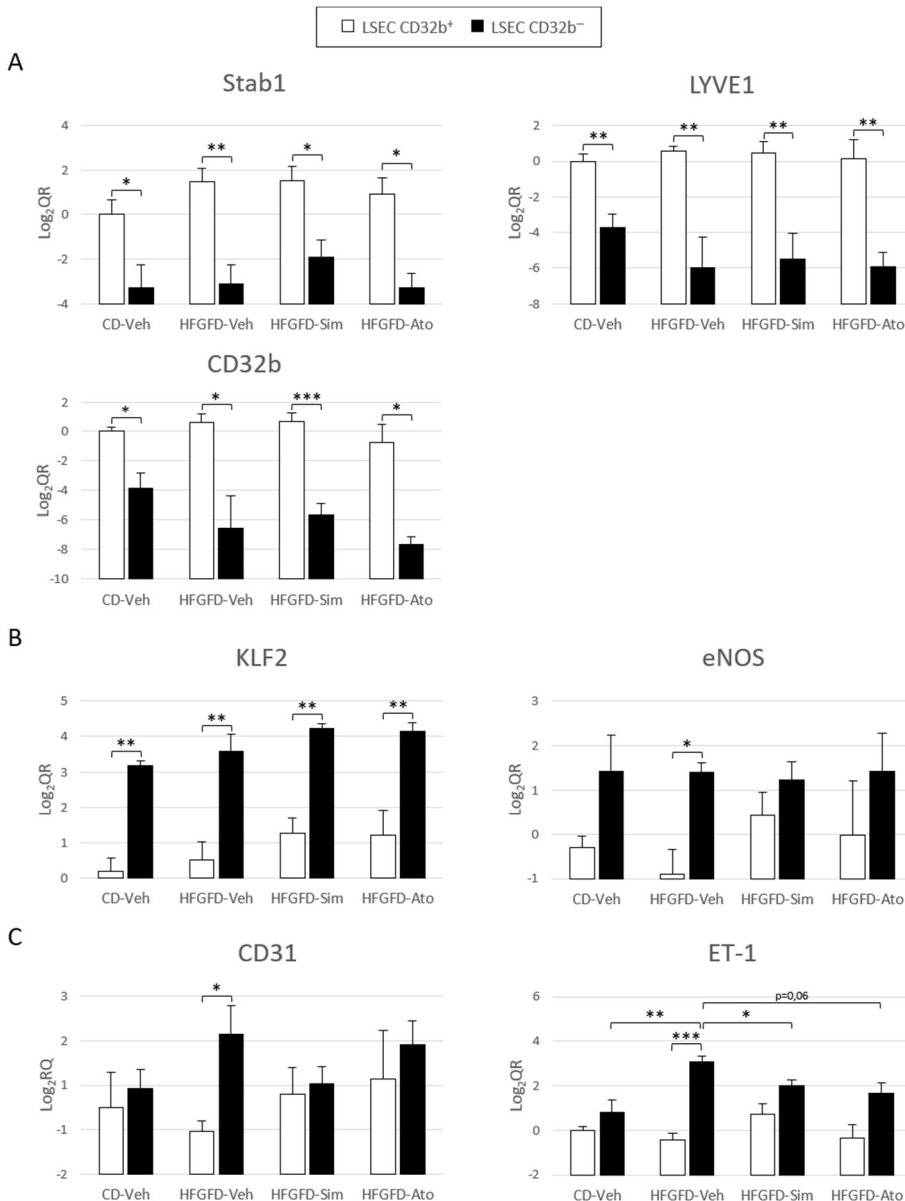


Figura 20. Análisis de expresión génica de subtipos de células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC). Cuantificación relativa de la expresión de mRNA de (A) *Stab1*, *LYVE-1* y *CD32b*; (B) *KLF2* y *eNOS*; y (C) *CD31* y *ET-1* por qRT-PCR, expresado como la ratio de LOG<sub>2</sub> fold change en LSEC CD32b<sup>-</sup> y CD32b<sup>+</sup> aisladas de CD-Veh, n=4; HFGFD-Veh, n=4; HFGFD-Sim, n=4 y HFGFD-Ato, n=4. La GAPDH se usó como control endógeno. Los resultados se normalizaron con respecto a las células CD32b<sup>+</sup> del grupo CD-Veh. Los niveles de mRNA se expresan como media ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p > 0,001 (prueba t para muestras independientes).

**Las estatinas restauran el perfil de expresión génica de las LSEC capilarizadas**

Las estatinas no produjeron diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con la endocitosis, Stab1, LYVE-1 y CD32b, en células CD32b<sup>+</sup>, ni en células CD32b<sup>-</sup> (Figura 20A). Por otro lado, sí que hubo una tendencia de aumento en los niveles de KLF2 en ambos subtipos celulares, superando los niveles de expresión del grupo HFGFD-Veh, tras el tratamiento con estatinas (Figura 20B). Este aumento de KLF2 se tradujo en un incremento no significativo en los niveles de mRNA de eNOS en las células CD32b<sup>+</sup>, mientras que en las células CD32b<sup>-</sup> el eNOS permaneció inalterable (Figura 20B). Además, ni el tratamiento con simvastatina ni con atorvastatina produjo ninguna diferencia en la expresión génica de CD31 o ET-1 en células CD32b<sup>+</sup> (Figura 20C). Sin embargo, las células CD32b<sup>-</sup> aisladas tanto de ratas tratadas con simvastatina, como con atorvastatina expresaron niveles significativamente más bajos de ET-1 (HFGFD-Sim:  $p = 0,03$ ; HFGFD-Ato:  $p = 0,059$ ), lo que sugiere una reversión del fenotipo vasoconstrictor de las LSEC CD32b<sup>-</sup>, mediada por estos fármacos (Figura 20C). Los niveles de expresión del gen CD31 en las células CD32b<sup>-</sup> siguieron el mismo patrón, con un aumento en las provenientes del grupo HFGFD-Veh y una disminución debido a las estatinas, principalmente en HFGFD-Sim, aunque sin significancia estadística (Figura 18C).

### **Las estatinas reestablecen el fenotipo quiescente de las HSC evitando la activación inducida por ET-1**

Con el fin de analizar el nivel de activación de las HSC de los diferentes grupos de estudio, se cuantificó la cantidad de vitamina A que contenían estas células mediante autofluorescencia y tinción con Oil Red O. Las HSC aisladas de los animales HFGFD-Veh mostraron una autofluorescencia media (Figura 21A-B) y un número de gotas lipídicas por célula (Figura 21D) significativamente menores a las HSC del grupo CD-Veh, junto con una morfología alargada con aspecto de miofibroblasto (Figura 21C).

Las HSC de las ratas tratadas con simvastatina mostraron una autofluorescencia media significativamente más alta en comparación con las HSC del grupo HFGFD-Veh, mientras que las células obtenidas del grupo tratado con atorvastatina mostraron una tendencia creciente no significativa (Figura 21A-B). Además, la tinción Oil Red O reveló una apariencia quiescente con una morfología similar a estrella en las HSC aisladas de estos grupos (Figura 21C), así como un número significativamente mayor de gotas lipídicas en comparación con HSC del grupo HFGFD-Veh (Figura 21D).

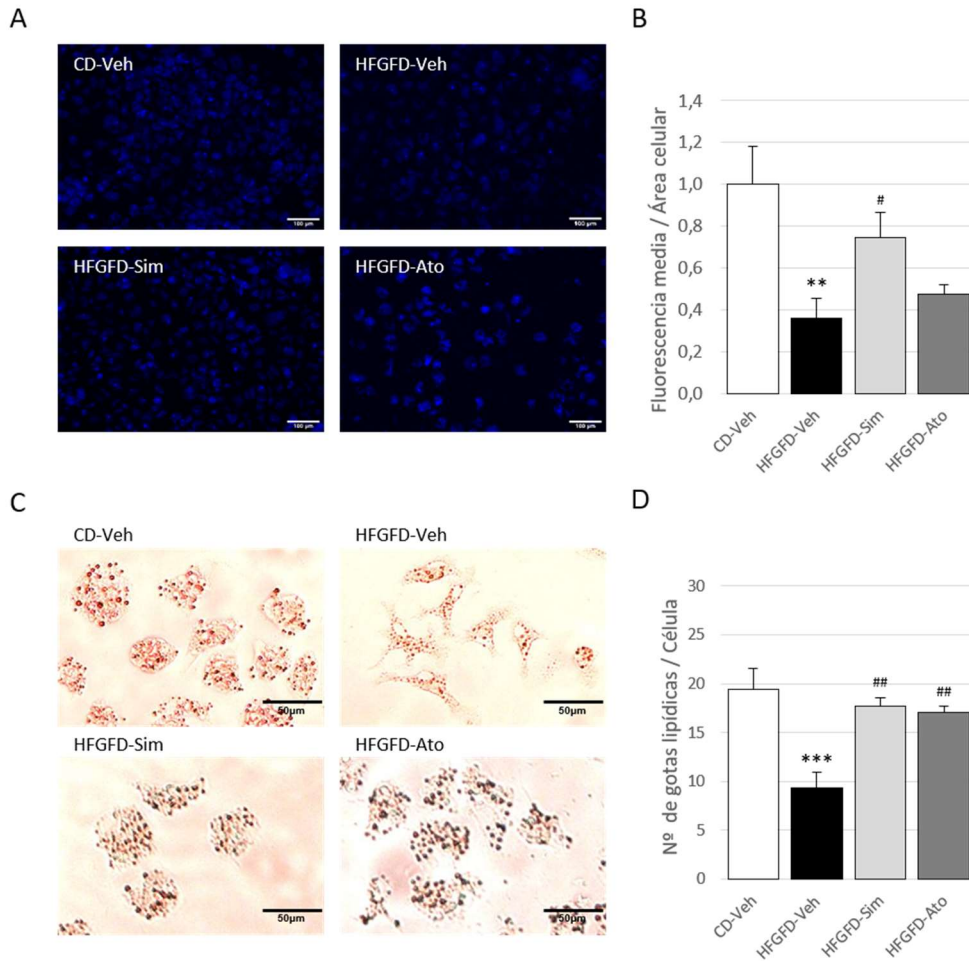
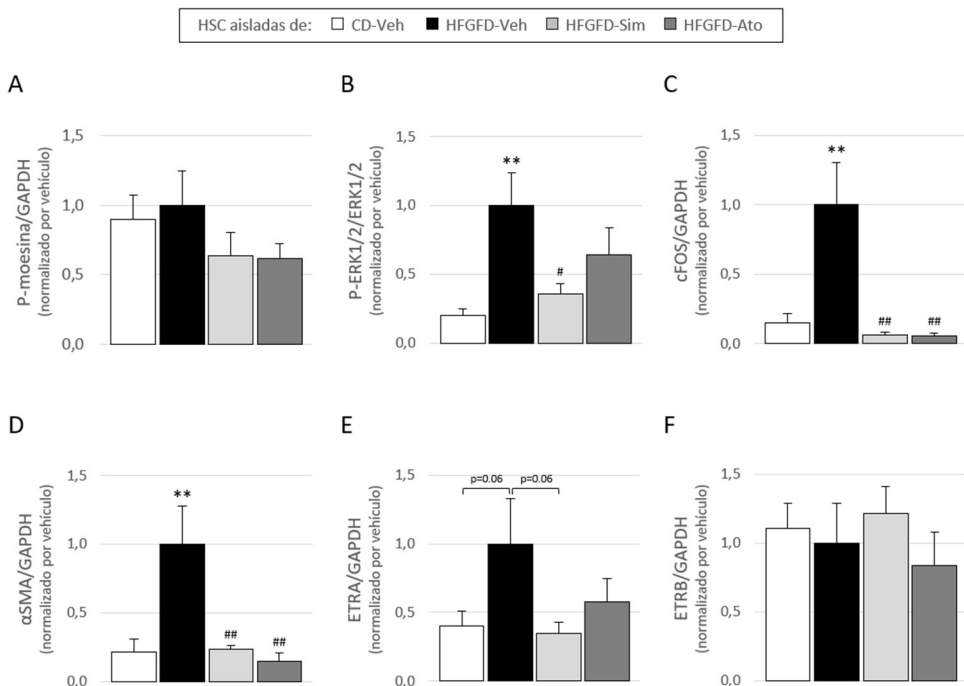


Figura 21. Detección de vitamina A en células hepáticas estrelladas (HSC). Cuantificación de vitamina A almacenada en las HSC primarias aisladas de CD-Veh,  $n=5$ ; HFGFD-Veh,  $n=5$ ; HFGFD-Sim,  $n=5$  y HFGFD-Ato,  $n=5$ . (A) Imágenes representativas de HSC recién aisladas visualizadas usando la autofluorescencia de la vitamina A (barra de escala,  $100\mu\text{m}$ ). (B) Cuantificación de la autofluorescencia media por área celular. (C) Imágenes representativas de la tinción Oil Red O de HSC (barra de escala,  $50\mu\text{m}$ ). (D) Número de gotas lipídicas por célula. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con CD-Veh. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  en comparación con HFGFD-Veh (ANOVA).

Finalmente, se evaluaron las vías de señalización de la ET-1 mediante análisis de Western blot en las HSC aisladas (Figura 22). No hubo diferencias en los niveles de fosforilación de moesina en las HSC del grupo HFGFD-Veh en comparación con las del grupo CD-Veh (Figura 22A). Sin embargo, exhibieron un aumento significativo en los niveles de P-ERK1/2, cFOS y  $\alpha$ SMA (Figura 22B-D). El tratamiento con simvastatina redujo significativamente los niveles de P-ERK1/2, mientras que la atorvastatina mostró una disminución discreta (Figura 22B). Ambas estatinas redujeron significativamente los niveles de expresión de cFOS y  $\alpha$ SMA, llegando a niveles comparables a los de los animales sanos (Figura 22C-D). Las HSC del grupo HFGFD-Veh mostraron un aumento casi significativo en los niveles de expresión del ETRA, que fue revertido por ambos tratamientos con estatinas (Figura 22E), mientras que no hubo diferencias en los niveles de expresión del ETRB entre los diferentes grupos (Figura 8F).





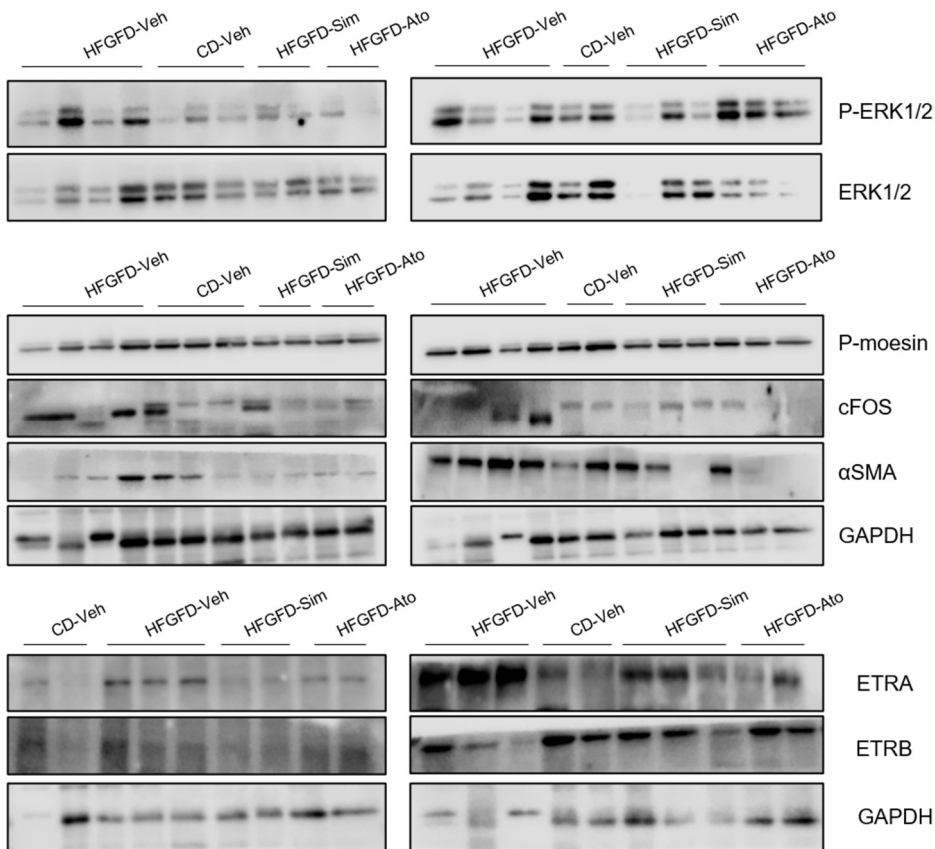


Figura 22. Marcadores de la vía de endotelina en células hepáticas estrelladas (HSC). Los diagramas de barras muestran la cuantificación de (A) P-moesina, (B) P-ERK1/2 (C) cFOS (D) αSMA (E) ETRA y (F) ETRB en las HSC aisladas de CD-Veh, n=5; HFGFD-Veh, n=5; HFGFD-Sim, n=5 y HFGFD-Ato, n=5. La GAPDH se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína se normalizaron respecto al grupo HFGFD-Veh y se expresan como media ± SEM. \*\*p <0,01 en comparación con CD-Veh. #p <0,05; ##p <0,01 en comparación con HFGFD-Veh (ANOVA). Western blots correspondientes. La GAPDH se utilizó como control de carga.

## 4.2 Estudio 2

### Efectos adversos asociados a dosis altas de ambrisentan

El estudio 2 se realizó con dos dosis diferentes de ambrisentan. En un inicio, se usó una dosis de 30 mg/kg/día ( $Am^{hi}$ ), pero ésta produjo efectos secundarios no deseados (comentados en cada apartado), por lo que se decidió probar una nueva dosis más baja de 2 mg/kg/día ( $Am^{lo}$ ). La dosis baja de ambrisentan demostró ser una dosis efectiva sin efectos secundarios asociados, por lo que fue la empleada en el resto del estudio para el análisis histológico y molecular.

### Efecto de los tratamientos sobre el incremento de peso

Los animales alimentados con la HFGFD mostraron una ganancia de peso significativamente mayor al grupo alimentado con la CD. Durante las 2 semanas de tratamiento, el peso corporal medio no difirió entre los grupos de ratas NASH tratadas (HFGFD-At; HFGFD- $Am^{hi}$ ) y no tratadas (HFGFD-Veh), excepto en el caso de las ratas que recibieron la combinación de atorvastatina con la dosis alta de ambrisentan (HFGFD-At $Am^{hi}$ ), donde la ganancia de peso fue significativamente inferior a la del grupo HFGFD-Veh (74% menos de incremento,  $p = 0,001$ ), pero también a la de los grupos HFGFD-Ato (60% menos de incremento,  $p = 0,047$ ) y HFGFD- $Am^{hi}$  (60% menos de incremento,  $p = 0,036$ ). Además, a pesar de estar alimentados con una dieta hipercalórica, el incremento de peso del grupo HFGFD-At $Am^{hi}$  fue un 59% menor que el del grupo CD (Tabla 18).

La reducción de la dosis de ambrisentan revirtió el efecto de disminución en la ganancia de peso al ser administrada junto con atorvastatina, de forma que el grupo HFGFD-At $Am^{lo}$ , mostró un incremento de peso comparable al grupo HFGFD-Veh durante las 2 semanas de tratamiento. Los animales tratados solo con ambrisentan a dosis baja (HFGFD- $Am^{lo}$ ), como era de esperar, también incrementaron de peso de forma semejante (Tabla 18).

Tabla 18. Ganancia de peso.

|                          | n | Ganancia de peso (g) |                             |
|--------------------------|---|----------------------|-----------------------------|
|                          |   | 8 semanas de dieta   | 2 semanas de tratamiento    |
| CD                       | 7 | 193,57 ± 10,08       | 19,2 ± 1,77                 |
| HFGFD-Veh                | 6 | 274,67 ± 14,97**     | 30,25 ± 5,02                |
| HFGFD-At                 | 8 | 265,5 ± 17,97**      | 19,75 ± 2,32                |
| HFGFD-Am <sup>hi</sup>   | 7 | 274,86 ± 25,98**     | 19,57 ± 4,49                |
| HFGFD-AtAm <sup>hi</sup> | 8 | 260,38 ± 17,55**     | 7,86 ± 5,67 <sup>##†§</sup> |
| HFGFD-Am <sup>lo</sup>   | 7 | 323,57 ± 10,41***    | 29,4 ± 2,82                 |
| HFGFD-AtAm <sup>lo</sup> | 8 | 248 ± 10,87*         | 26,67 ± 3,25                |

Los valores se expresan como media ± SEM. n, número de ratas. \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 en comparación con CD. ##p <0,01 en comparación con HFGFD-Veh; †p <0,05 en comparación con HFGFD-Ato; §p <0,05 en comparación con HFGFD-Am<sup>hi</sup>.

### La combinación de atorvastatina y ambrisentan normaliza la hemodinámica hepática

Los parámetros de la circulación sistémica no se vieron afectados en el modelo y tampoco tras la administración de los diferentes tratamientos.

La PP fue significativamente más alta en ratas HFGFD-Veh que en ratas CD (incremento del 27,8%, p <0,001). Esto fue acompañado por un aumento en la IHVR y una disminución del PBF. En estas ratas con HP, el tratamiento con atorvastatina en monoterapia produjo una disminución significativa de la PP (HFGFD-At: 12,8%, p =0,001), asociada a una reducción moderada de la IHVR (Tabla 19).

Los tratamientos con la dosis alta de ambrisentan, solo o en combinación, produjeron una disminución significativa de la PP (HFGFD-Am<sup>hi</sup>: 9,5%, p =0,011; HFGFD-AtAm<sup>hi</sup>: 15,7%, p <0,011) en comparación al grupo HFGFD-Veh. Esta reducción de la PP fue a causa de una disminución significativa de la IHVR producida por el ambrisentan. Sin

embargo, estos grupos con dosis alta de ambrisentan también mostraron un aumento significativo del PBF en comparación con el grupo HFGFD-Veh. La reducción de la IHVR del grupo HFGFD-Am<sup>hi</sup> fue significativamente mayor a la del grupo HFGFD-Ato. Sin embargo, esto no se tradujo en un mayor efecto sobre la PP, probablemente debido al aumento de PBF producido por el ambrisentan a estas dosis elevadas.

La reducción de la dosis de ambrisentan, sólo o en combinación, mantuvo los efectos beneficiosos del fármaco, produciendo una disminución significativa de la PP (HFGFD-Am<sup>lo</sup>: 10,9%,  $p = 0,001$ ; HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>: 16,1%,  $p < 0,001$ ), acompañada de una reducción significativa de la IHVR en comparación con el vehículo. Pero, además, previno el efecto no deseado del fármaco sobre el PBF, de manera que los grupos HFGFD-Am<sup>lo</sup> y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup> no mostraron diferencias en los valores de PBF en comparación al grupo HFGFD-Veh.

La combinación de atorvastatina y la dosis baja de ambrisentan consiguió una mejora general de la hemodinámica hepática mayor a la obtenida con cada uno de los fármacos en monoterapia, ya que solo el grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup> mostró valores de PP, PBF y IHVR comparables a los del grupo CD.

Tabla 19. Medidas hemodinámicas.

|                                | n | MAP<br>(mmHg) | SMABF<br>(mL/[min100g]) | SMAR<br>(mmHg/mL·min·100 g) | PP<br>(mmHg)   | PBF<br>(mL/[min·100 g])  | IHVR<br>(mmHg/mL·min·100 g) | Frecuencia<br>cardíaca<br>(PPM) |
|--------------------------------|---|---------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <b>CD</b>                      | 7 | 122 ± 4,13    | 3,20 ± 0,29             | 36,70 ± 2,52                | 8,45 ± 0,25    | 2,99 ± 0,13              | 2,86 ± 0,14                 | 325,84 ± 13,19                  |
| <b>HFGFD-Veh</b>               | 6 | 125,67 ± 9,06 | 3,02 ± 0,42             | 40,51 ± 4,17                | 10,8 ± 0,12*** | 2,3 ± 0,18*              | 4,83 ± 0,37***              | 322,76 ± 10,74                  |
| <b>HFGFD-At</b>                | 8 | 113,95 ± 6,6  | 3,61 ± 0,51             | 32,96 ± 5,56                | 9,42 ± 0,27*## | 2,22 ± 0,15**            | 4,37 ± 0,31***              | 315,54 ± 12,05                  |
| <b>HFGFD-Am<sup>hi</sup></b>   | 7 | 118,86 ± 5,04 | 3,58 ± 0,37             | 32,75 ± 3,81                | 9,77 ± 0,32*## | 3,5 ± 0,25####†††        | 2,86 ± 0,18####†††          | 341,92 ± 15,41                  |
| <b>HFGFD-AtAm<sup>hi</sup></b> | 8 | 128,57 ± 6,11 | 4,15 ± 0,4              | 31,58 ± 4,57                | 9,11 ± 0,25### | 3,05 ± 0,18##††          | 3,04 ± 0,16####†††          | 333,72 ± 15,22                  |
| <b>HFGFD-Am<sup>lo</sup></b>   | 7 | 118,43 ± 2,67 | 2,97 ± 0,4              | 40,81 ± 5,81                | 9,62 ± 0,33*## | 2,72 ± 0,22              | 3,69 ± 0,36*##              | 322,12 ± 8,33                   |
| <b>HFGFD-AtAm<sup>lo</sup></b> | 8 | 122,10 ± 3,02 | 3,77 ± 0,35             | 32,36 ± 3,89                | 9,06 ± 0,16### | 2,82 ± 0,17 <sup>†</sup> | 3,31 ± 0,23####††           | 323,08 ± 6,76                   |

Los valores se expresan como media ± SEM. n, número de ratas; MAP, presión arterial media; SMABF, flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior; SMAR, resistencia de la arteria mesentérica superior; PP, presión portal; PBF, flujo sanguíneo portal; IHVR, resistencia vascular intrahepática; PPM, pulsaciones por minuto. \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 en comparación con CD; #p <0,05; ##p <0,01; ###p <0,001 en comparación con HFGFD-Veh; <sup>†</sup>p <0,05; <sup>††</sup>p <0,01; <sup>†††</sup>p <0,001 en comparación con HFGFD-At (ANOVA)

**Efecto de los tratamientos sobre los parámetros bioquímicos**

Se observó un aumento significativo de los niveles de ALT en el grupo HFGFD-Veh en comparación con los animales con CD. Todos los grupos de tratamiento redujeron significativamente los niveles de ALT en suero, en comparación al grupo HFGFD-Veh. Esta mejora de los niveles de transaminasas se mantuvo con la reducción de la dosis de ambrisentan (Tabla 20).

Hubo una ausencia total de toxicidad tanto hepática como muscular en todos los animales del estudio. Ni siquiera la administración de la dosis alta de ambrisentan mostró signos de toxicidad hepática, y la combinación de esta con la atorvastatina tampoco produjo toxicidad hepática o muscular.

Tabla 20. Parámetros bioquímicos.

|                                | n | Glucosa<br>(mg/dL) | Creatinina<br>(mg/dL) | Bilirrubina<br>(mg/dL) | AST<br>(UI/L)     | ALT<br>(UI/L)       | CK<br>(UI/L)       | FA<br>(UI/L)      | Colesterol<br>(mg/dL) | LDL<br>(mg/dL)  | HDL<br>(mg/dL)  | TGL<br>(mg/dL)  | Albumina<br>(g/dL) |
|--------------------------------|---|--------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| <b>CD-Veh</b>                  | 7 | 128,83<br>± 6,80   | 0,51<br>± 0,06        | 0,11<br>± 0,01         | 160,33<br>± 21,21 | 34,71<br>± 3,08     | 827<br>± 103,94    | 120,43<br>± 6,05  | 89,57<br>± 8,11       | 29,57<br>± 3,18 | 54,00<br>± 5,17 | 28,5<br>± 2,17  | 2,99<br>± 0,07     |
| <b>HFGFD-Veh</b>               | 6 | 151,67<br>± 14,91  | 0,50<br>± 0,03        | 0,12<br>± 0,02         | 168,17<br>± 20,08 | 73,00<br>± 16,63*** | 751,17<br>± 85,97  | 131,83<br>± 8,56  | 79,83<br>± 5,72       | 27,33<br>± 2,93 | 47,67<br>± 3,56 | 24,17<br>± 2,7  | 2,95<br>± 0,07     |
| <b>HFGFD-At</b>                | 8 | 152,50<br>± 16,26  | 0,66<br>± 0,03**      | 0,12<br>± 0,02         | 128,88<br>± 10,82 | 37,00<br>± 2,73###  | 787,86<br>± 97,28  | 130,00<br>± 13,13 | 76,13<br>± 3,45       | 25,25<br>± 1,83 | 45,38<br>± 2,78 | 27,25<br>± 4,55 | 2,95<br>± 0,08     |
| <b>HFGFD-Am<sup>hi</sup></b>   | 7 | 152,57<br>± 17,05  | 0,54<br>± 0,04        | 0,11<br>± 0,01         | 131,5<br>± 9,48   | 42,71<br>± 3,48###  | 882,83<br>± 72,75  | 148,86<br>± 10,02 | 79,43<br>± 8,75       | 24,57<br>± 2,64 | 47,71<br>± 6,92 | 36,14<br>± 3,92 | 3,06<br>± 0,06     |
| <b>HFGFD-AtAm<sup>hi</sup></b> | 8 | 141,5<br>± 10,65   | 0,57<br>± 0,04        | 0,10<br>± 0,02         | 127,88<br>± 10,14 | 34,25<br>± 2,47###  | 723,14<br>± 105,17 | 139,00<br>± 8,93  | 72,75<br>± 5,85*      | 23,88<br>± 2    | 42,13<br>± 4,21 | 33,75<br>± 4,6  | 2,90<br>± 0,06     |
| <b>HFGFD-Am<sup>lo</sup></b>   | 7 | 146,86<br>± 17,95  | 0,59<br>± 0,06        | 0,12<br>± 0,01         | 171,29<br>± 19,54 | 38,43<br>± 3,67###  | 857,00<br>± 123,09 | 127,86<br>± 14,35 | 77,71<br>± 3,56       | 24,14<br>± 2,05 | 46,29<br>± 2,83 | 36,57<br>± 5,42 | 2,97<br>± 0,03     |
| <b>HFGFD-AtAm<sup>lo</sup></b> | 8 | 133,13<br>± 13,35  | 0,50<br>± 0,03        | 0,14<br>± 0,01         | 135,13<br>± 18,10 | 39,75<br>± 4,75###  | 797,63<br>± 149,32 | 138,00<br>± 12,97 | 73,75<br>± 3,07*      | 23,50<br>± 1,97 | 45,38<br>± 2,06 | 23,75<br>± 4,04 | 2,96<br>± 0,05     |

Los valores se expresan como media ± SEM. n, número de ratas; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; CK, creatina quinasa; FA, fosfatasa alcalina; TGL, triglicéridos. \*p <0,05; \*\*\*p <0,001 en comparación con CD. #p <0,05; ###p <0,01; ####p <0,001 en comparación con HFGFD-Veh.

**La combinación de atorvastatina y ambrisentan revierte el NASH histológico**

El 100% de los animales HFGFD-Veh presentaron NASH histológico, definido como la concurrencia de esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar. El tratamiento de estos animales no afectó significativamente a la esteatosis hepática, aunque la combinación de atorvastatina y ambrisentan redujo notablemente el porcentaje de individuos con esta característica. La presencia de balonización disminuyó significativamente en el grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, mientras que la inflamación mejoró tanto en el grupo HFGFD-At como en el HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>.

Los animales HFGFD-Veh presentaron valores de NAFLD Activity Score (NAS) de 4 y 5, mientras que los animales tratados no superaron el score de 4. Además, tanto la atorvastatina como el ambrisentan redujeron el porcentaje de ratas con NASH histológico, y la combinación de ambas consiguió una reducción del 75% (Figura 23).



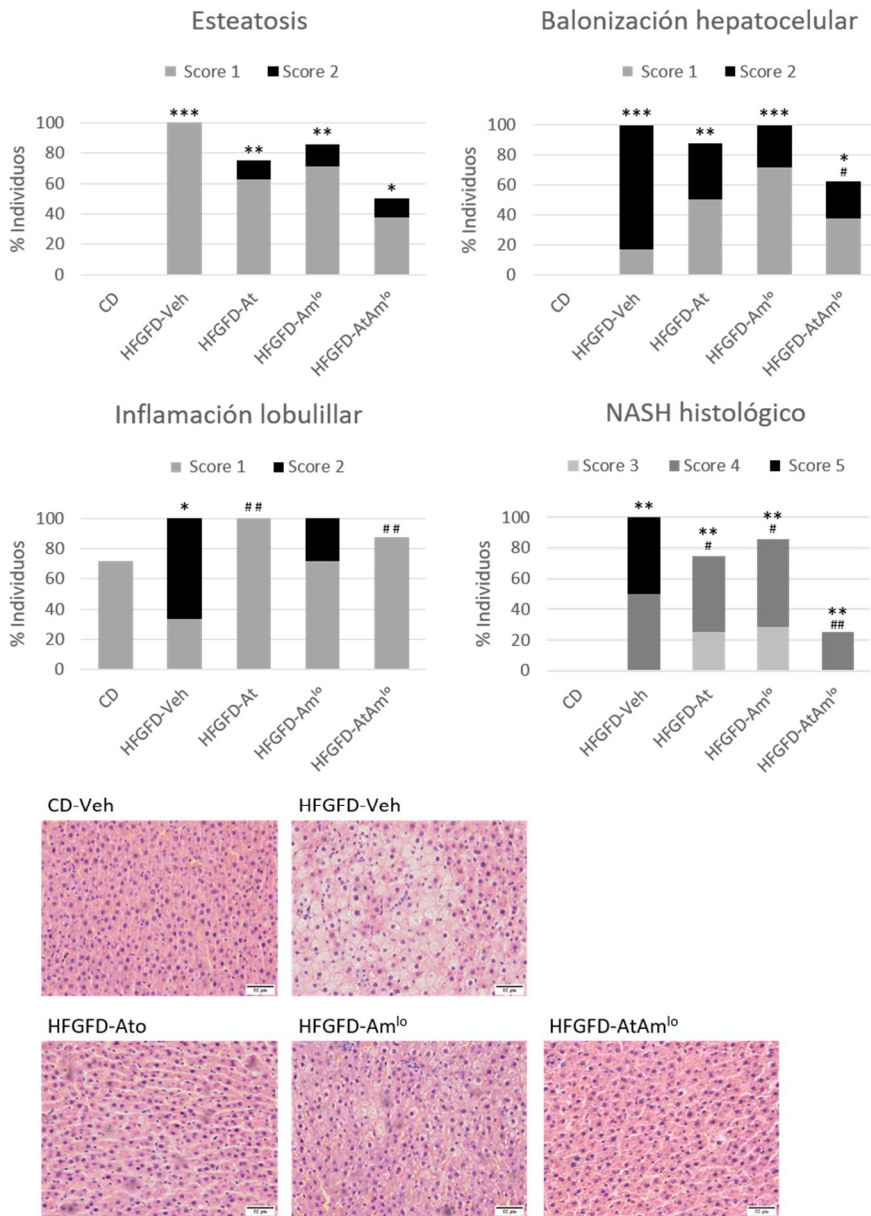


Figura 23. Histología hepática. Evaluación histológica de NASH siguiendo la puntuación histológica NASH-CRN en CD, n=7, HFGFD-Veh, n=6, HFGFD-At, n=8; HFGFD-Am<sup>lo</sup>, n=7; HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, n=8. Los diagramas de barras representan el porcentaje de individuos que presentan esteatosis, balonización hepatocelular, inflamación lobulillar, y NASH diagnosticada histológicamente (definida como NAFLD activity score (NAS) ≥3 y concurrencia de esteatosis, balonización hepatocelular e inflamación lobulillar). Los scores se representan en gris claro, gris

oscuro y negro. Imágenes representativas (aumento de 20x) de secciones de hígado teñidas con Hematoxilina-Eosina. Se usó la prueba U de Mann Whitney para comparar los porcentajes de cada score por pares de grupos para cada ítem (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con CD; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  en comparación con HFGFD-Veh).

### La atorvastatina mejora la sensibilidad a insulina

Los niveles de insulina en suero aumentaron significativamente con la dieta HFGFD. Estos valores fueron acompañados por un gran aumento del índice HOMA en estos animales. Los grupos tratados con atorvastatina sola o en combinación (HFGFD-At y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>) mostraron una reducción significativa en los niveles de insulina, mientras que en el grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> los niveles fueron semejantes a los del grupo HFGFD-Veh. El HOMA-IR disminuyó en los grupos HFGFD-At y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, aunque la disminución solo alcanzó la significancia estadística en el segundo grupo (Tabla 21).

Tabla 21. Resistencia a insulina

|                          | n | Insulina ng/ml           | HOMA-IR                  |
|--------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| CD                       | 7 | 4,47 ± 0,68              | 1,39 ± 0,17              |
| HFGFD-Veh                | 6 | 12,29 ± 2,26**           | 4,48 ± 0,69**            |
| HFGFD-At                 | 8 | 6,76 ± 1,27 <sup>#</sup> | 2,56 ± 0,71              |
| HFGFD-Am <sup>lo</sup>   | 7 | 12,59 ± 2,93**           | 4,51 ± 1,12**            |
| HFGFD-AtAm <sup>lo</sup> | 8 | 6,74 ± 0,57 <sup>#</sup> | 2,04 ± 0,29 <sup>#</sup> |

Los valores se expresan como media ± SEM. n, número de ratas. \*\* $p < 0,01$  en comparación con CD. # $p < 0,05$  en comparación con HFGFD-Veh. HOMA-IR, modelo de homeostasis de resistencia a insulina (ANOVA).

### **La atorvastatina y el ambrisentan reestablecen el balance de vasomoduladores intrahepáticos**

El análisis de proteínas por Western blot de muestras de hígado total mostró una reducción significativa de los niveles del factor de transcripción KLF2, junto con una disminución de la fosforilación de Akt y niveles significativamente menores de PeNOS en el grupo HFGFD-Veh en comparación con el grupo CD. El tratamiento con atorvastatina fue capaz de recuperar la expresión de KLF2, incrementando también la fosforilación intrahepática de Akt y eNOS. El tratamiento con ambrisentan por otra parte, consiguió recuperar los niveles de fosforilación de eNOS y de Akt, pero no los valores de expresión de KLF2. La expresión de ET-1 intrahepática se mostró significativamente elevada en ratas HFGFD-Veh en comparación con el grupo CD. En los grupos HFGFD-At y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup> los niveles de este vasoconstrictor disminuyeron de forma significativa, pero no en el grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> (Figura 24).

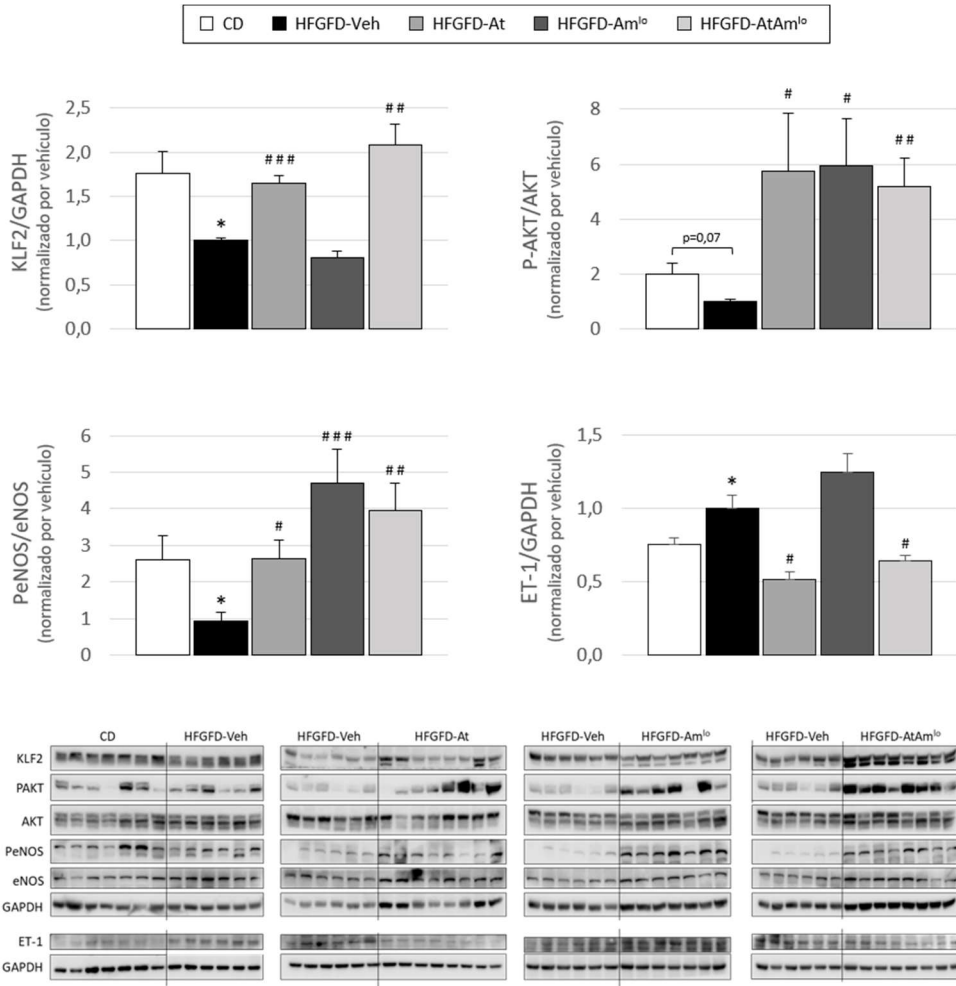


Figura 24. Análisis de la expresión de moduladores vasoactivos en hígado total por Western blot. Los diagramas de barras muestran la cuantificación de las proteínas KLF2, P-Akt/Akt, P-eNOS/eNOS y ET-1 en CD,  $n=7$ ; HFGFD-Veh,  $n=6$ ; HFGFD-At,  $n=8$ ; HFGFD-Am<sup>lo</sup>,  $n=7$  y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>,  $n=8$ . Los niveles de proteína se muestran normalizados por el grupo HFGFD-Veh y se expresan como media  $\pm$  SEM. Debajo se enseñan los Western blot correspondientes. La GAPDH se utilizó como control de carga. \* $p < 0,05$  en comparación con CD; # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$  en comparación con HFGFD-Veh.

### La atorvastatina reduce los niveles de ET-1 en suero incrementados por ambrisentan

La medición de la concentración de ET-1 en suero reveló un aumento significativo en el grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> en comparación con las ratas CD y HFGFD tratadas con vehículo o con atorvastatina. Sin embargo, el grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup> mostró niveles de ET-1 significativamente menores al del grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> (Figura 25).

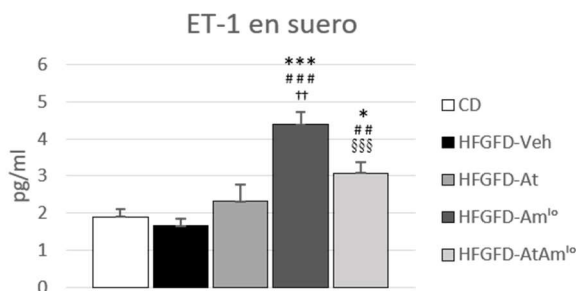


Figura 25. Concentración de endotelina-1 (ET-1) en suero. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM en CD,  $n=7$ ; HFGFD-Veh,  $n=6$ ; HFGFD-At,  $n=8$ ; HFGFD-Am<sup>lo</sup>,  $n=7$  y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>,  $n=8$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con CD. ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  en comparación con HFGFD-Veh; †† $p < 0,01$  en comparación con HFGFD-At; \$\$\$ $p < 0,001$  en comparación con HFGFD-Am<sup>lo</sup> (ANOVA).

### El ambrisentan y la atorvastatina mejoran la función endotelial

Las LSEC primarias aisladas de ratas HFGFD-Veh mostraron niveles inferiores de KLF2, P-Akt y PeNOS en comparación a las LSEC de ratas CD. Las células del grupo HFGFD-At recuperaron totalmente la expresión de estos marcadores de función endotelial, mientras que las del grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> mostraron un incremento parcial de KLF2 y PeNOS, y un aumento significativo en la expresión de PeNOS. Finalmente, las LSEC del grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup> presentaron niveles de expresión significativamente superiores de KLF2, P-Akt y PeNOS con respecto a las células aisladas del grupo HFGFD-Veh (Figura 26).

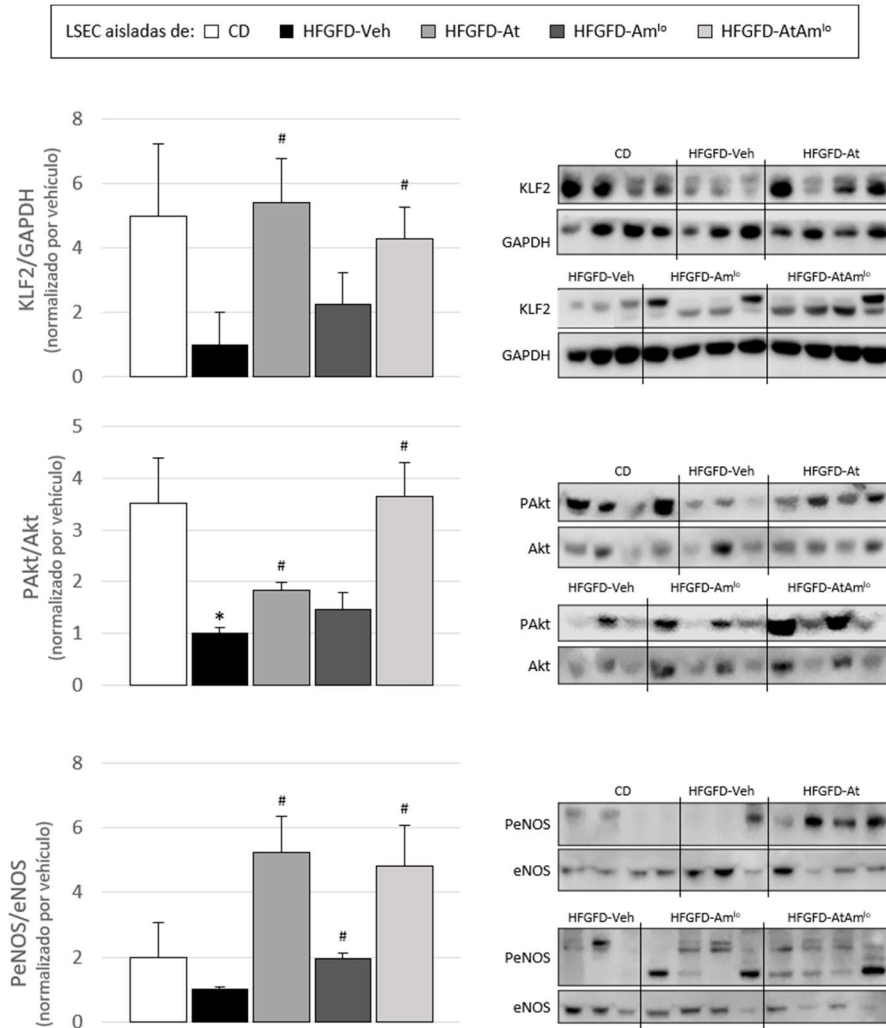


Figura 26. Análisis de western blot de marcadores de función endotelial en células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC). Los diagramas de barras muestran la cuantificación de las proteínas KLF2, P-AKT/AKT y P-eNOS/eNOS en CD, n=4; HFGFD-Veh, n=3; HFGFD-At, n=4; HFGFD-Am<sup>o</sup>, n=4 y HFGFD-AtAm<sup>o</sup>, n=4. Los niveles de proteína se muestran normalizados por el grupo HFGFD-Veh y se expresan como media ± SEM. En la parte derecha se enseñan los Western blot correspondientes. La GAPDH se utilizó como control de carga. Se comprobó la especificidad del patrón múltiple para las bandas de PeNOS (ver Anexo 2). \*p <0,05 en comparación con CD; #p <0,05 en comparación con HFGFD-Veh.

### **La atorvastatina inhibe la contracción de las HSC y el ambrisentan bloquea la respuesta contráctil a ET-1**

Las HSC aisladas de los diferentes grupos de estudio se cultivaron en geles de colágeno y en medio con o sin ET-1 ( $10^{-7}$  M). En cultivo con medio sin ET-1, las células aisladas del grupo HFGFD-Veh presentaron un porcentaje de contracción significativamente mayor a las células aisladas del grupo CD. La capacidad contráctil fue mucho menor en el caso de las células de los grupos con tratamiento, pero sobre todo en las HSC de los animales HFGFD-At y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, cuyo porcentaje de contracción fue muy similar al mostrado por las células del grupo CD.

La incubación *in vitro* de estas células con ET-1 ( $10^{-7}$  M), produjo una contracción del gel de colágeno superior en las ratas HFGFD-Veh, mientras que las HSC de las ratas CD mantuvieron su bajo porcentaje de contracción. Las HSC aisladas de las ratas HFGFD-At también mostraron un porcentaje de contracción significativamente mayor al incubarlas con ET-1. Las células aisladas del grupo HFGFD-Am<sup>lo</sup> incubadas con ET-1 *in vitro*, no mostraron un aumento de contracción, manteniendo el porcentaje significativamente inferior al del grupo HFGFD-Veh.

Finalmente, las HSC aisladas del grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, mostraron un porcentaje de contracción del gel de colágeno significativamente menor al de las HSC del grupo HFGFD-Veh e indistinguible de las del grupo de ratas sanas, tras la incubación tanto en medio sin ET-1 como con ET-1 (Figura 27).

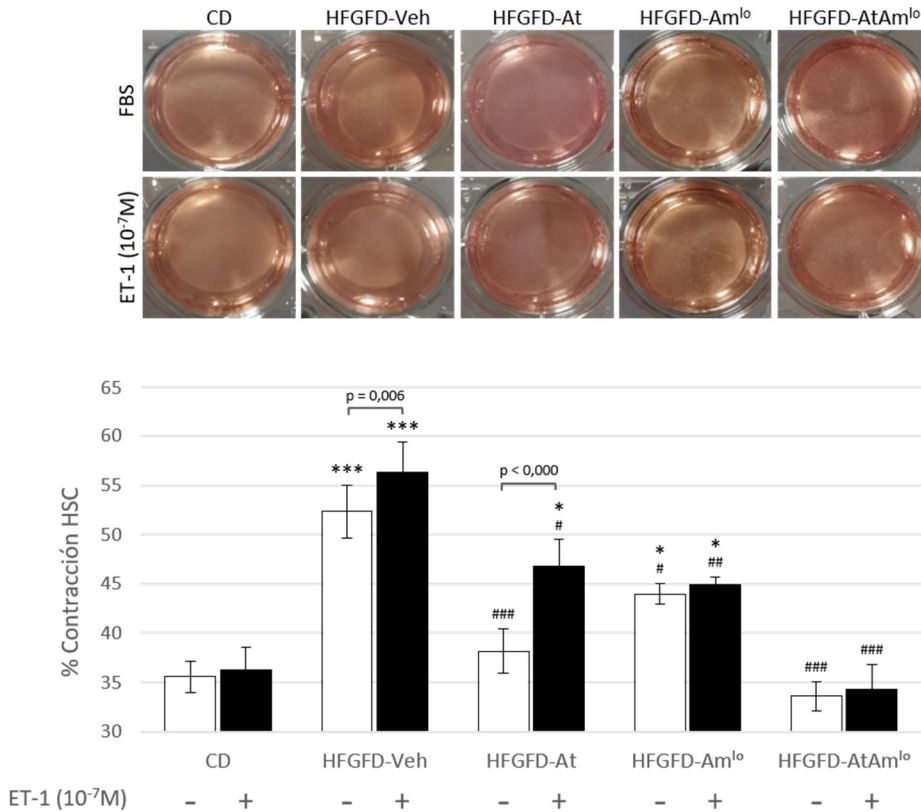


Figura 27. Contracción ejercida por las células hepáticas estrelladas (HSC) sobre geles de colágeno. La contracción se expresa como el porcentaje de diferencia del área inicial del gel como media  $\pm$  SEM en CD,  $n=3$ ; HFGFD-Veh,  $n=4$ ; HFGFD-At,  $n=5$ ; HFGFD-Am<sup>lo</sup>,  $n=4$  y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>,  $n=4$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con CD; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  en comparación con HFGFD-Veh; † $p < 0,05$ ; †† $p < 0,01$  (ANOVA).



### **La atorvastatina y el ambrisentan revierten el perfil de expresión génica pro-contráctil y pro-fibrogénico de las HSC**

Los niveles de mRNA de ET-1 en las HSC, a pesar de no mostrar diferencias entre los grupos CD y HFGFD-Veh, se encontraron disminuidos en los grupos HFGFD-Am<sup>lo</sup> y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, aunque solo de forma significativa en el primer grupo.

Los niveles de expresión génica de los receptores de ET-1, ETRA y ETRB se mostraron incrementados en las HSC del grupo HFGFD-Veh en comparación con el grupo CD. En el caso del ETRA, todos los grupos de tratamiento mostraron una reducción significativa en los niveles de mRNA de este receptor. Sin embargo, los niveles de mRNA del ETRB, aunque con una tendencia a su disminución en todos los grupos, solo se encontraron significativamente infraexpresados en las HSC del grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, en comparación al grupo HFGFD-Veh.

Las HSC procedentes de ratas HFGFD-Veh mostraron un aumento de la expresión de  $\alpha$ SMA, COL1A1 y desmina en comparación con el grupo CD. Los niveles de mRNA de  $\alpha$ SMA y COL1A1 disminuyeron de forma significativa en las células aisladas de todos los grupos con tratamiento. Sin embargo, a pesar de que los valores de expresión de desmina fueron inferiores en todos los grupos tratados, la reducción fue significativa únicamente en las HSC del grupo HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, mostrando una sinergia de ambos fármacos a la hora de reducir la expresión de este marcador de activación.

Los niveles de expresión del receptor  $\beta$  de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\beta$ ) y de la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2) en las HSC, no se vieron modificados en el grupo HFGFD-Veh, en comparación al grupo CD. Sin embargo, todos los grupos de tratamiento mostraron una reducción de los niveles de mRNA de PDGFR $\beta$ , sobre todo los grupos HFGFD-Am<sup>lo</sup> y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, que también mostraron niveles de expresión significativamente inferiores de MMP2 en comparación al grupo HFGFD-Veh (Figura 28).

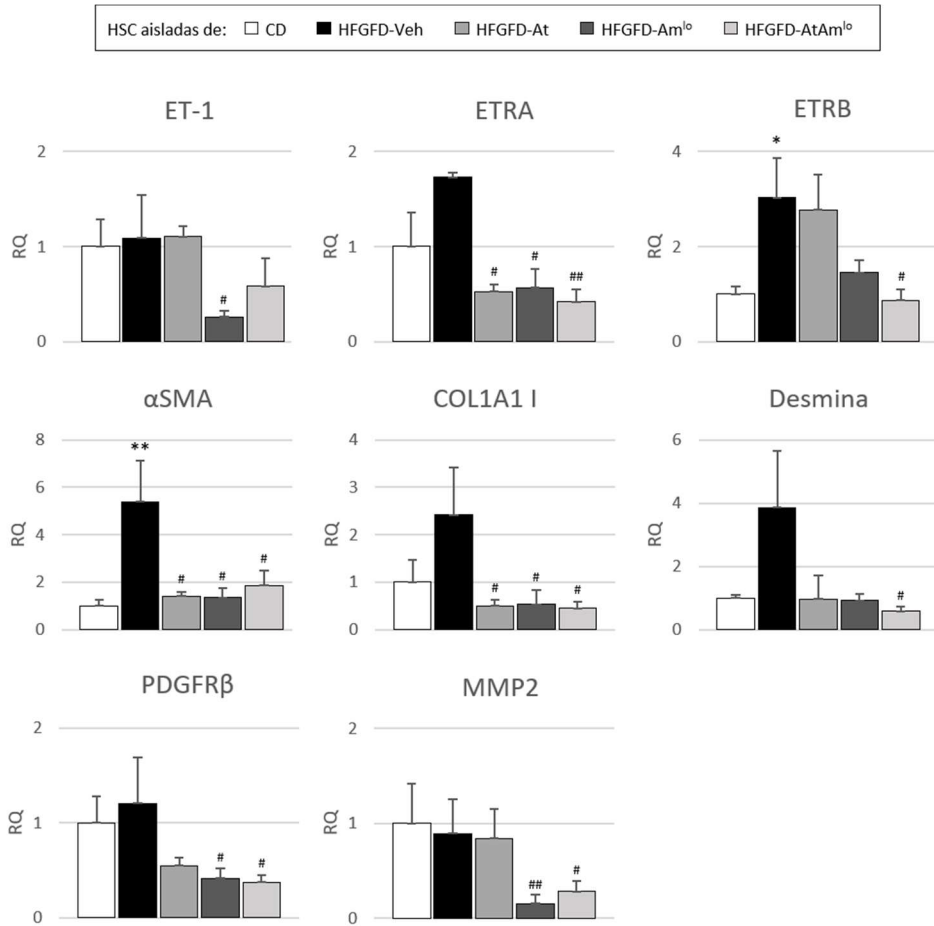


Figura 28. Expresión de marcadores procontráctiles y profibróticos en células hepáticas estrelladas (HSC). Cuantificación relativa de la expresión de mRNA de ET-1, ETRA, ETRB, αSMA, COL1A1, Desmina, PDGFRβ y MMP2 por qRT-PCR, expresado como el fold change en HSC aisladas de CD, n=4; HFGFD-Veh, n=4; HFGFD-At, n=6; HFGFD-Amb<sup>lo</sup>, n=4 y HFGFD-AtAm<sup>lo</sup>, n=5. La GAPDH se usó como control endógeno y los resultados se normalizaron con respecto a las HSC del grupo HFGFD-Veh. Los niveles de mRNA se expresan como media ± SEM. \*p <0,05 en comparación con CD; #p <0,05; ##p <0,01 en comparación con HFGFD-Veh (ANOVA).



*Discusión*



## 5. Discusión

La MAFLD representa un problema de salud a nivel mundial debido al drástico aumento de la prevalencia de obesidad<sup>7</sup>. Se considera el componente hepático del síndrome metabólico y cubre un amplio espectro de daño hepático que va desde la esteatosis simple, que puede progresar a NASH, fibrosis, cirrosis y finalmente, carcinoma hepatocelular<sup>9</sup>.

La HP es responsable de la mayoría de las complicaciones clínicas asociadas a las enfermedades hepáticas crónicas incluida la MAFLD. A día de hoy, no disponemos de ningún fármaco indicado para el tratamiento de NASH<sup>10,174</sup>, y las únicas terapias farmacológicas aprobadas para reducir la PP son las dirigidas a reducir el PBF, induciendo una vasoconstricción esplácnica mediante beta bloqueantes<sup>147</sup>. Sin embargo, varios estudios han verificado la presencia de HP en la MAFLD en ausencia de fibrosis, lo que plantea la teoría de que la HP precede al desarrollo de la cirrosis en pacientes con MAFLD<sup>38,39,175</sup>. Por lo tanto, son necesarios nuevos tratamientos dirigidos a reducir la IHVR, y en concreto al componente dinámico que hace que esta aumente.

En la presente tesis doctoral buscamos identificar mecanismos alterados en la modulación de la función sinusoidal hepática para así estudiar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de NASH con hipertensión portal. Para ello utilizamos un modelo de rata NASH inducido por dieta, desarrollado previamente por nuestro grupo, que desarrolla obesidad, resistencia a insulina, disfunción endotelial e HP en ausencia de fibrosis<sup>29</sup>. Esta ausencia de fibrosis limita el uso del modelo al estudio de NASH en sus estadios más tempranos, lo cual permite analizar la HP y sus mecanismos sin la interferencia de cambios estructurales provocados por la fibrosis o por factores extrahepáticos.

En el **primer estudio** aislamos por primera vez LSEC desdiferenciadas de un modelo de NASH para su posterior caracterización y demostramos que las estatinas actúan sobre estas células disfuncionales reestableciendo su fenotipo y función fisiológica, mejorando así la HP.

Los resultados del primer estudio muestran que las estatinas ejercen una mejora general en la fisiopatología de NASH con una clara reversión del NASH histológicamente diagnosticado. En este aspecto, varios estudios previos ofrecen resultados prometedores<sup>165,176</sup>, probablemente relacionados con los efectos pleiotrópicos de las estatinas, aunque se necesitan ensayos controlados con suficiente potencia para establecer un efecto directo sobre la histología hepática. A diferencia de experiencias previas en modelos preclínicos de cirrosis hepática donde las estatinas fueron tóxicas<sup>160</sup>, los efectos beneficiosos de las estatinas en nuestro modelo de NASH se observaron con efectos tóxicos mínimos donde la toxicidad hepática estuvo ausente y solo unos pocos animales presentaron toxicidad muscular leve. Más aún, además de no causar toxicidad hepática, las estatinas redujeron los niveles de ALT en suero que se encontraban incrementados en el modelo.

Como se ha explicado en la introducción, la disfunción endotelial sinusoidal del hígado en la MAFLD contribuye al aumento de la IHVR y, por lo tanto, a la HP, sin cambios estructurales del hígado<sup>37</sup>. De acuerdo con estos datos, el modelo de NASH de nuestro estudio mostró un aumento de la PP, junto con una disminución de la expresión de KLF2 y PeNOS. La disminución de la fosforilación y actividad de eNOS es probablemente resultado de la alteración de la capacidad vasoprotectora de KLF2, un factor de transcripción inducido en respuesta al estrés de rozamiento, lo que explica la incapacidad vasodilatadora del endotelio sinusoidal, debido a una menor producción de NO<sup>177</sup>. En este estudio, las estatinas resultaron ser efectivas a la hora de reducir la PP, probablemente reestableciendo la función endotelial, mediante el aumento de expresión de KLF2 y la consiguiente activación de eNOS<sup>158</sup>. Por otro lado, la insulina también juega un papel muy importante en la regulación de la actividad eNOS

intrahepática mediante la vía IRS/PI3K/Akt, mecanismo que hemos visto alterado en el modelo de NASH, evidenciado por la resistencia a insulina y la disminución de los niveles de P-Akt en hígado, en concordancia con estudios previos<sup>29,175</sup>. Nuestros datos muestran que el tratamiento con estatinas mejora la sensibilidad a insulina, aumentando los niveles intrahepáticos de P-Akt en ratas alimentadas con HFGFD, recuperando así la respuesta vasodilatadora del endotelio sinusoidal.

La disfunción endotelial es resultado del cambio funcional y estructural que experimentan las LSEC, y probablemente el primer paso clave para el desarrollo de la enfermedad. Para poder comprender en profundidad el mecanismo que subyace a la disfunción de estas células decidimos explorar el papel específico de las LSEC en la patología. Publicaciones recientes han demostrado la existencia de dos subpoblaciones de LSEC que se ubican de manera diferencial siguiendo el patrón acinar, para cumplir distintas funciones fisiológicas. En la zona pericentral, las LSEC muestran una gran expresión de CD32b, y activación de vías involucradas en funciones como la endocitosis; mientras que las de la zona periportal, con poca expresión de CD32b, están relacionadas con la angiogénesis<sup>178,179</sup>. De acuerdo con estos datos, nuestro análisis por citometría de flujo de LSEC aisladas de ratas sanas también identifico dos subtipos de LSEC. Además, el análisis de la expresión génica de ambas subpoblaciones reprodujo los resultados de los estudios previos, donde los dos subtipos se distinguían como células con expresión alta o media/baja de los marcadores CD32b, STAB1 y LYVE-1. En los animales control, obtuvimos un pequeño porcentaje de células CD32b<sup>-</sup>, probablemente correspondientes a las ubicadas en la zona periportal. Con respecto a los animales alimentados con HFGFD, encontramos un incremento significativo en este porcentaje. Tras el análisis de expresión génica de esta subpoblación de LSEC CD32b<sup>-</sup> se observaron claras diferencias entre las provenientes de ratas sanas o del modelo de NASH, dado que estas últimas mostraron un aumento de la expresión de marcadores de capilarización (CD31 y ET-1). Estos datos sugieren que el mayor número de LSEC CD32b<sup>-</sup> en el modelo corresponden a LSEC desdiferenciadas, en un proceso de capilarización que contribuye al desarrollo y avance de NASH.



Como se ha mencionado anteriormente, las estatinas confieren vasoprotección al endotelio sinusoidal hepático. Nuestros experimentos sugieren que parte de esta vasoprotección, se basa en el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las LSEC, ya que los animales tratados con estatinas presentaron porcentajes significativamente inferiores de LSEC CD32b<sup>-</sup> con niveles reducidos de expresión de ET-1, en comparación a los tratados con vehículo. Es importante señalar que el efecto beneficioso de las estatinas revirtiendo la expresión de este vasoconstrictor se produjo exclusivamente en las LSEC CD32b<sup>-</sup> y no en las células CD32b<sup>+</sup>.

Además de los efectos directos de las estatinas revirtiendo el fenotipo disfuncional de las LSEC, también demostramos el alcance del tratamiento sobre las HSC. La ET-1 es un vasomodulador que actúa principalmente sobre las HSC para producir vasoconstricción sinusoidal<sup>180</sup>. Las HSC del modelo de NASH presentaron un fenotipo activado, caracterizado por una morfología tipo miofibroblasto y una clara pérdida de vitamina A<sup>61</sup>. Además, observamos un aumento en la expresión de ETRA, pero no en ETRB, de acuerdo con la descripción de HSC en una fase temprana de activación<sup>60</sup>. En este estudio demostramos que las estatinas mejoraron el fenotipo HSC, reestableciendo el almacenamiento de vitamina A y la morfología quiescente, junto con la reducción de expresión de  $\alpha$ SMA, marcador de activación relacionado con la acción directa de ET-1<sup>92</sup>. Asimismo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con estatinas no solo normaliza la expresión del ETRA en las HSC, sino que también evita la consiguiente activación de la vía RAF/MEK/ERK que conduce a proliferación (probado por la expresión de cFOS) y contracción de la célula. Las HSC de nuestro modelo no mostraron un aumento de la actividad de la Rho-quinasa, evaluada por la fosforilación de la moesina (sustrato endógeno de Rho-quinasa), por lo que la contracción de las HSC esté probablemente siendo producida por un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducido por la estimulación de los receptores de ET-1<sup>76</sup>.

Aunque hipotetizamos que las estatinas actúan directamente en LSEC y que el efecto sobre HSC podría ser en parte una consecuencia indirecta de la mejora del fenotipo de

las LSEC, no se puede descartar un efecto directo de las estatinas sobre las HSC u otros efectos adicionales sobre otros tipos celulares hepáticos.

En resumen, nuestro estudio demuestra que las estatinas mejoran la microcirculación intrahepática, reduciendo el número de LSEC desdiferenciadas, disminuyendo así la expresión de ET-1 y restaurando el fenotipo quiescente de las HSC (Figura 29). En consecuencia, se recupera la función sinusoidal, mejorando la histología NASH y la HP, lo que conduce a una mejora del pronóstico de la enfermedad.

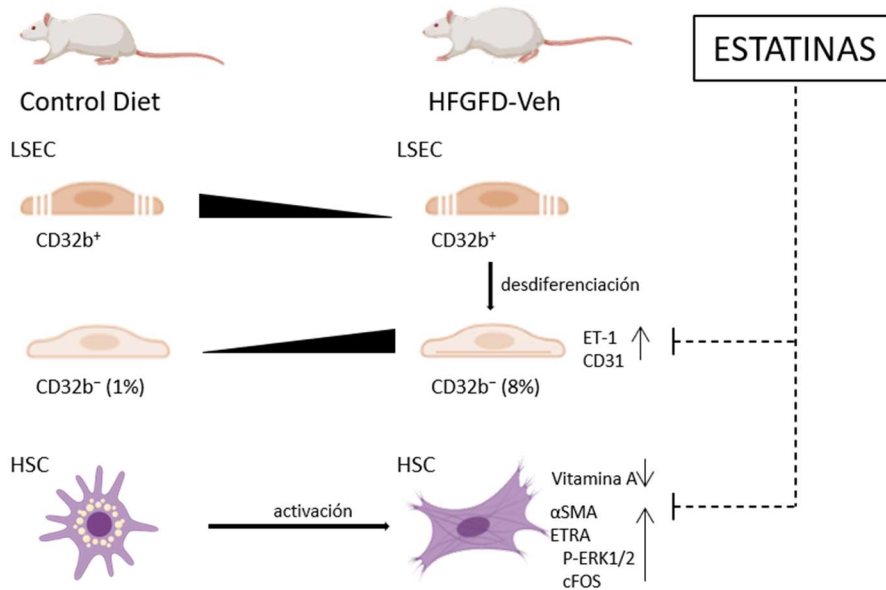


Figura 29. Efecto de las estatinas sobre los subtipos de células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) y sobre las células hepáticas estrelladas (HSC).

En el **segundo estudio** analizamos el efecto de combinar las estatinas, que habían demostrado ser eficaces a la hora de reestablecer el fenotipo funcional de las LSEC, con ambrisentan, un inhibidor selectivo del ETRA, para así bloquear la activación de las HSC por ET-1. Con este estudio, demostramos que la combinación de los fármacos revierte el fenotipo contráctil del sinusoide, mejorando la HP en el modelo de NASH.

A día de hoy, los ERAs (antagonistas de los receptores de ET-1) están indicados para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Más recientemente, varios estudios, han demostrado la capacidad de estos fármacos para modular la hemodinámica hepática en modelos cirróticos, aunque con resultados discordantes<sup>181-183</sup>. En un estudio previo, la administración de 5 mg de ambrisentan provocó una disminución significativa de la PP en pacientes cirróticos<sup>184</sup>. Sin embargo, en otro estudio realizado con ratas cirróticas, el ambrisentan a una dosis de 35 mg/kg/día no redujo la PP<sup>185</sup>. En base a estos estudios decidimos administrar una dosis de 30 mg/kg/día, equivalente a 5 mg en humanos, según la escala alométrica, en función del peso y la superficie corporal<sup>186</sup>.

Los animales que recibieron ambrisentan a 30 mg/kg/día coadministrado con atorvastatina mostraron una disminución significativa de la ganancia de peso, lo que podía ser ya un primer indicio de que a esta dosis el ambrisentan podría producir efectos adversos. Estos animales, además, mostraron una ligera dificultad respiratoria. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la administración de ambrisentan a 30 mg/kg/día produce una reducción significativa de la PP concomitante a una gran reducción de la IHVR y a pesar de un aumento significativo del PBF que podría estar obstaculizando la reducción de la PP. Estos datos iniciales sugirieron que la dosis inicial establecida era excesiva, y que, a pesar de mejorar la HP, conlleva la aparición de efectos desfavorables. Finalmente, la reducción de la dosis a 2 mg/kg/día revirtió la aparición de estos efectos secundarios no deseados, manteniendo los efectos beneficiosos intrahepáticos.

Se ha descrito que la administración de ERAs a largo plazo puede producir lesiones hepáticas, por lo que su prescripción se acompaña de una monitorización regular de la función hepática. Sin embargo, a diferencia de otros ERAS como el bosentan, cuyo uso se ha asociado repetidamente con lesiones hepáticas agudas y graves<sup>187</sup>, el ambrisentan no ha sido relacionado con hepatotoxicidad<sup>188,189</sup>, ni tan siquiera en pacientes que previamente habían descontinuado el tratamiento con bosentan debido a alteraciones en los niveles de aminotransferasas<sup>190</sup>. De acuerdo con estos datos, ningún animal de nuestro estudio mostró toxicidad hepática, ni siquiera los que recibieron la dosis alta de ambrisentan, y todos los grupos de tratamiento revirtieron el aumento de los niveles de ALT en el modelo de NASH. Estos resultados refuerzan la idea de que el ambrisentan es un fármaco seguro desde el punto de vista hepático, aunque debido a que la principal ruta de eliminación es por vía biliar, se podría esperar que la insuficiencia hepática incrementa su exposición.

Además de normalizar los niveles de aminotransferasas séricas, la combinación de ambos medicamentos mejoró notablemente la histopatología. La atorvastatina, sola o en combinación, al igual que en el primer estudio, mejoró significativamente la inflamación lobulillar. La balonización sin embargo, mejoró significativamente únicamente con el tratamiento combinado, por lo que a pesar de que todos los tratamientos redujeron los valores de NAS score en comparación con el vehículo, la combinación alcanzó una mejora superior, revirtiendo el NASH histológico en el 75% de los individuos.

En este estudio, corroboramos también el efecto de la atorvastatina sobre la reducción de la PP en ratas con NASH y demostramos que el ambrisentan a dosis baja disminuye la PP actuando sobre la IHVR y sin alterar la hemodinámica sistémica.

La disminución de la PP en los animales tratados con atorvastatina, tal y como demostramos en el primer estudio, se debe al restablecimiento de la función endotelial, evidenciado por la sensibilización a insulina y a la recuperación de los niveles intrahepáticos de KLF2, P-Akt y PeNOS, junto con una menor producción de ET-1.

El balance entre la biodisponibilidad de NO y ET-1 por parte del endotelio sinusoidal se traduce en una menor contracción de las HSC y la consiguiente reducción de la IHVR<sup>157</sup>. Nuestros datos respaldan esta hipótesis ya que, en nuestro modelo de NASH, la disfunción endotelial condujo a una mayor contracción de las HSC, y a una mayor expresión de  $\alpha$ SMA (marcador pro-contráctil) por parte de estas. La administración oral de atorvastatina, al mejorar la función endotelial, redujo significativamente la capacidad contráctil de las HSC.

La administración de ambrisentan a dosis baja redujo significativamente la IHVR y así la PP. En estos animales se recuperó la expresión intrahepática de P-Akt y PeNOS, pero no así la de KLF2 ni la sensibilidad a insulina. Tampoco se vieron reducidos los niveles de ET-1 hepática. Es posible que la activación de la vía P-Akt/PeNOS sea debida al efecto de la ET-1, que, al competir con el ambrisentan por los ETRA, se una más a los ETRB en las LSEC, donde conduce a la vasodilatación. Esto explicaría por qué en un ensayo con pacientes con cirrosis, el tezosentan (ERA no selectivo) no mejoró la HP<sup>191</sup>. Este fármaco, a pesar de bloquear la vasoconstricción mediada por el ETRA y ETRB en HSC, bloquearía al mismo tiempo el ETRB en LSEC, inhibiendo la vasodilatación inducida por la ET-1 a través de las LSEC. La contracción de las HSC aisladas de ratas HFGFD tratadas con ambrisentan fue inferior a la ejercida por las células del grupo vehículo, aunque sin alcanzar el efecto ejercido por la atorvastatina, demostrando que además de la ET-1 existen otros factores que son importantes en la contracción de las HSC<sup>192</sup>.

Como ya hemos comentado, la disfunción endotelial se define por la reducción de biodisponibilidad de NO, pero también por el aumento de expresión de vasoconstrictores como la ET-1<sup>84</sup>. Los niveles de ET-1 hepática se encuentran incrementados en nuestro modelo de NASH, pero no así los niveles en suero, lo que indica una alteración del sistema de ET-1 a nivel intrahepático. La ET-1 parece ser ante todo una sustancia paracrina de acción local, en lugar de una hormona endocrina circulante, por lo que los niveles séricos de ET-1 no reflejan su impacto fisiopatológico completo<sup>87</sup>. Sin embargo, el tratamiento con ambrisentan aumentó los niveles séricos

de este péptido de forma significativa. Es importante señalar que la concentración de ET-1 depende no solo de su generación, sino también del aclaramiento mediado por receptores<sup>193</sup>. Por lo tanto, es probable que el aumento de los niveles de ET-1 a nivel sistémico se deba a una reducción del aclaramiento resultado del desplazamiento del péptido unido al receptor. Se ha descrito que el bloqueo de los ETRB, pero no de los ETRA, aumenta las concentraciones plasmáticas de ET-1<sup>194,195</sup>. No obstante, los resultados de nuestro estudio demuestran que el ETRA también juega un papel importante en la eliminación de ET-1. Por otro lado, la administración de atorvastatina junto con el ambrisentan disminuyó significativamente el aumento de ET-1 sérica producido por el ambrisentan. Tal y como demostramos en el primer estudio, las estatinas disminuyen la producción de ET-1 por parte de las LSEC disfuncionales, efecto que también vemos reflejado en este segundo estudio mediante la reducción de los niveles de ET-1 hepática en los animales tratados con atorvastatina, ya sea sola o en combinación con ambrisentan.

Asimismo, la respuesta contráctil de las HSC a ET-1 aumenta con la progresión de la lesión hepática, siendo esta proporcional a su grado de activación<sup>192,196</sup>. De acuerdo con estos datos, nuestro modelo de NASH mostró niveles incrementados de ET-1 intrahepática, y una mayor respuesta de contracción por parte de las HSC al ser incubadas con este vasoconstrictor, a diferencia de las HSC de ratas sanas, que no mostraron diferencia en el porcentaje de contracción al ser incubadas con ET-1 o sin ella. Las HSC aisladas de ratas tratadas con atorvastatina también presentaron este incremento de contracción en respuesta a ET-1 exógena. Sin embargo, las HSC de ratas tratadas con ambrisentan no aumentaron su contracción al ser incubadas con ET-1, demostrando que gran parte de la contracción ejercida por las HSC en respuesta a ET-1 es vía ETRA (Figura 30). Estos resultados sugieren un papel importante para las HSC y su respuesta a ET-1 en la fisiopatología de la HP en este modelo de NASH. De esta forma, las HSC activadas (y por lo tanto altamente contráctiles) presentan una respuesta de contracción exagerada frente a ET-1, y así contribuyen al incremento de la PP por constricción sinusoidal.

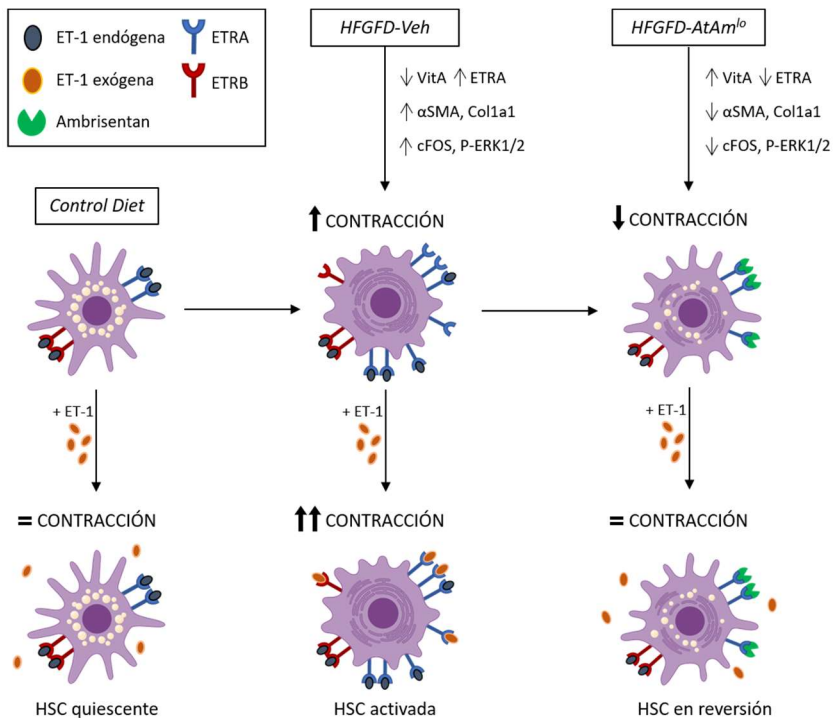


Figura 30. Efecto de la combinación de atorvastatina y ambrisentan sobre la contractilidad de las células hepáticas estrelladas (HSC).

De acuerdo con los resultados obtenidos de los grupos de tratamiento en monoterapia de atorvastatina o ambrisentan, las ratas tratadas con la combinación de ambos fármacos mostraron los beneficios ejercidos sinérgicamente con cada medicamento. Así pues, se observó un claro restablecimiento de la función endotelial, junto con la recuperación de la sensibilidad a insulina y una mayor expresión de KLF2 intrahepático, probablemente debidos al efecto de la atorvastatina. El incremento de los niveles intrahepáticos de P-Akt y PeNOS no fue mayor al obtenido por los fármacos por separado, por lo que deben estar involucrados otros mecanismos que también reduzcan la IHVR. En lo que respecta a la contracción de las HSC, las células aisladas de este grupo mostraron un porcentaje de contracción indistinguible al alcanzado por las células de los animales sanos, y al igual que estas no mostraron respuesta contráctil al ser incubadas con ET-1 (Figura 30). La combinación de los mecanismos de ambos fármacos

permitió una mayor reducción de la PP que la alcanzada por cada uno de los tratamientos en monoterapia. Tanto es así que los animales tratados con la combinación de ambos fármacos presentaron valores hemodinámicos hepáticos indistinguibles a los de las ratas alimentadas con dieta control.

La ET-1 juega un papel muy importante en la contractilidad de las HSC activadas, pero también induce otros efectos biológicos, como la proliferación, la migración celular y la fibrogénesis. Las HSC expresan receptores de ET-1, muy por encima de otras células hepáticas, particularmente cuando se encuentran activadas<sup>76</sup>. En este sentido, las HSC del modelo de NASH presentaron un aumento de la expresión génica de ambos tipos de receptores de ET-1, lo que explicaría la contracción exacerbada ejercida por estas células en respuesta a ET-1 exógena.

La atorvastatina normalizó los niveles de expresión del ETRA en las HSC, corroborando los resultados obtenidos en el primer estudio. El ambrisentan, además de revertir el aumento de los niveles de mRNA de ETRA, también produjo cierta disminución en los niveles de expresión de ETRB, e incluso redujo significativamente los de la ET-1 misma. La combinación de atorvastatina y ambrisentan fue el único tratamiento capaz de reducir significativamente los niveles de expresión de ambos tipos de receptores. Estos resultados evidencian una relación estrecha entre el proceso de activación de las HSC y el sistema de ET-1.

Por otro lado, tanto la atorvastatina como el ambrisentan obtuvieron efectos similares mejorando el fenotipo de las HSC, como indica la reducción en la expresión de marcadores de activación ( $\alpha$ SMA, COL1A1 y PDGFR $\beta$ ), demostrando así el papel de la ET-1 en la activación de las HSC vía ETRA en NASH. Sin embargo, solo la combinación de ambos redujo significativamente la expresión de desmina, lo que demuestra un efecto sinérgico de ambos fármacos sobre las HSC.

Como ya se ha comentado, la ET-1 tiene un efecto contráctil prominente sobre las HSC, que puede contribuir a la HP, pero, además, promueve su proliferación y migración en



estadios tempranos de la enfermedad<sup>61</sup>. Los resultados de nuestro estudio demuestran que el tratamiento con ambrisentan, inhibe la estimulación de la expresión de MMP-2 inducida por ET-1, impidiendo así la degradación de la matriz subendotelial normal y su posterior reemplazo por una matriz extracelular intersticial no funcional<sup>197</sup>. Estos hallazgos evidencian la necesidad de nuevas investigaciones en modelos más avanzados de NASH, que posibiliten el análisis del efecto de la combinación de los fármacos sobre la fibrogénesis.

En conclusión, los resultados de los dos estudios que incluye esta tesis doctoral sugieren que la combinación de atorvastatina y ambrisentan restablece el fenotipo sinusoidal funcional, proceso clave en la regulación de la circulación intrahepática. Los datos proporcionan evidencia de que las estatinas, confiriendo vasoprotección a través de la recuperación del fenotipo funcional de las LSEC, junto con ambrisentan, inhibiendo la proliferación y contracción de las HSC, equilibran el balance de vasomoduladores y normalizan el tono vascular intrahepático. Esto se traduce en la mejoría de la histología y la HP en estadios tempranos de NASH, y, en consecuencia, en la prevención de la progresión de la enfermedad. Por consiguiente, la combinación de atorvastatina y ambrisentan podría ser un tratamiento seguro y efectivo para el tratamiento de NASH.

*Conclusiones*



## 6. Conclusiones

- La ingesta de HFGFD durante 8 semanas provoca NASH histológico sin fibrosis e hipertensión portal, promovidos por un aumento en el número de LSEC desdiferenciadas y la consiguiente disfunción endotelial.
- Las LSEC desdiferenciadas adquieren una mayor expresión de ET-1, y son precursoras del perfil pro-contráctil del sinusoides hepático, que conduce al aumento de la resistencia intrahepática.
- La simvastatina y la atorvastatina mejoran la hipertensión portal y el NASH histológico, confiriendo vasoprotección al endotelio sinusoidal hepático, mediante el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las LSEC y revirtiendo la activación de las HSC.
- El ambrisentan provoca una reducción de la presión portal asociada a una reducción de la resistencia intrahepática, mediante la inhibición de la activación y consiguiente contractilidad de las HSC.
- La combinación de atorvastatina, que revierte el fenotipo contráctil sinusoidal y de ambrisentan, que bloquea la respuesta a ET-1, logra una inhibición completa de la contracción de las HSC, con la consiguiente reducción de la resistencia intrahepática y de la presión portal, normalizando así la hemodinámica hepática.
- La combinación de atorvastatina y ambrisentan produce un efecto claramente superior sobre la histopatología que cada uno de los fármacos en monoterapia, revirtiendo el NASH histológico en un 75%.
- La combinación de atorvastatina y ambrisentan podría ser un tratamiento efectivo en las fases iniciales de NASH.



## *Bibliografía*



## 7. Bibliografía

1. Schuppan, D. & Afdhal, N. H. Liver cirrhosis. *Lancet* **371**, 838–851 (2008).
2. Mokdad, A. A. *et al.* Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *BMC Med.* (2014) doi:10.1186/s12916-014-0145-y.
3. Eslam, M. *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *Journal of Hepatology* vol. 73 202–209 (2020).
4. Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J. & Kamath, P. S. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology* vol. 70 151–171 (2019).
5. Marchesini, G. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **37**, 917–923 (2003).
6. Rinella, M. & Charlton, M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology* vol. 64 19–22 (2016).
7. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
8. Kim, D. & Kim, W. R. Nonobese Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* vol. 15 474–485 (2017).
9. Bessone, F., Razori, M. V. & Roma, M. G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 76 99–128 (2019).
10. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **67**, 328–357 (2018).
11. Younossi, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health



- perspective. *Journal of Hepatology* vol. 70 531–544 (2019).
12. Kitade, H., Chen, G., Ni, Y. & Ota, T. Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments. *Nutrients* **9**, 387 (2017).
  13. Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L. & Baker, S. S. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1969–1987 (2016).
  14. Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* **65**, 1038–1048 (2016).
  15. Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836–1846 (2010).
  16. Day, C. P. & James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two ‘Hits’? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
  17. Than, N. N. & Newsome, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* vol. 239 192–202 (2015).
  18. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 367–377 (2008).
  19. Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M. F. & Marchesini, G. Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1941–1951 (2010).
  20. Méndez-Sánchez, N., Arrese, M., Zamora-Valdés, D. & Uribe, M. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* **27**, 423–433 (2007).
  21. Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* vol. 21 697–738 (2000).
  22. Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D. & Fromenty, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*

- vol. 6 1–28 (2006).
23. Puri, P. *et al.* Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **134**, 568–576 (2008).
  24. Campo, L., Eiseler, S., Apfel, T. & Pysopoulos, N. Fatty Liver Disease and Gut Microbiota: A Comprehensive Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **7**, 1–5 (2019).
  25. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
  26. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
  27. Arab, J. P., Martin-Mateos, R. M. & Shah, V. H. Gut–liver axis, cirrhosis and portal hypertension: the chicken and the egg. *Hepatol. Int.* **12**, 24–33 (2018).
  28. Safari, Z. & Gérard, P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 76 1541–1558 (2019).
  29. García-Lezana, T. *et al.* Restoration of a healthy intestinal microbiota normalizes portal hypertension in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **67**, 1485–1498 (2018).
  30. Bosch, J., Berzigotti, A., Garcia-Pagan, J. C. & Abraldes, J. G. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J. Hepatol.* **48**, S68–S92 (2008).
  31. Tsochatzis, E. A., Bosch, J. & Burroughs, A. K. Liver cirrhosis. in *The Lancet* vol. 383 1749–1761 (Lancet Publishing Group, 2014).
  32. Buob, S., Johnston, A. N. & Webster, C. R. L. Portal Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 25 169–186 (2011).

33. Martell, M., Coll, M., Ezkurdia, N., Raurell, I. & Genescà, J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J. Hepatol.* **2**, 208–220 (2010).
34. Iwakiri, Y. & Groszmann, R. J. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: From the patient to the molecule. *Hepatology* vol. 43 S121–S131 (2006).
35. Sanyal, A. J., Bosch, J., Blei, A. & Arroyo, V. Portal Hypertension and Its Complications. *Gastroenterology* **134**, 1715–1728 (2008).
36. Bhathal, P. S. & Grossman, H. J. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J. Hepatol.* **1**, 325–337 (1985).
37. Pasarín, M. *et al.* Sinusoidal Endothelial Dysfunction Precedes Inflammation and Fibrosis in a Model of NAFLD. *PLoS One* **7**, e32785 (2012).
38. Francque, S. *et al.* Noncirrhotic human nonalcoholic fatty liver disease induces portal hypertension in relation to the histological degree of steatosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1449–1457 (2010).
39. Mendes, F. D., Suzuki, A., Sanderson, S. O., Lindor, K. D. & Angulo, P. Prevalence and Indicators of Portal Hypertension in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 1028-1033.e2 (2012).
40. Kan, Z. & Madoff, D. Liver Anatomy: Microcirculation of the Liver. *Semin. Intervent. Radiol.* **25**, 077–085 (2008).
41. Jungermann, K. & Keitzmann, T. Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 179–203 (1996).
42. Kietzmann, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biology* vol. 11 622–630 (2017).

43. Sasse, D., Spornitz, U. M. & Piotr Maly, I. Liver Architecture. *Enzyme* **46**, 8–32 (1992).
44. Schleicher, J. *et al.* Zonation of hepatic fatty acid metabolism - The diversity of its regulation and the benefit of modeling. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 641–56 (2015).
45. Iwakiri, Y., Shah, V. & Rockey, D. C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis – Current status and future directions. *J. Hepatol.* **61**, 912–924 (2014).
46. Maslak, E., Gregorius, A. & Chlopicki, S. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. *Pharmacol. Reports* **67**, 689–694 (2015).
47. Wisse, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastructure Res.* **31**, 125–150 (1970).
48. Svistounov, D. *et al.* The Relationship between Fenestrations, Sieve Plates and Rafts in Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
49. Smedsrød, B. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp. Hepatol.* **3**, S22 (2004).
50. Braet, F. & Wisse, E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: A review. *Comparative Hepatology* vol. 1 1 (2002).
51. Sørensen, K. K. *et al.* The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **303**, R1217–R1230 (2012).
52. Lalor, P. F., Lai, W. K., Curbishley, S. M., Shetty, S. & Adams, D. H. Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J. Gastroenterol.* **12**, 5429–5439 (2006).

53. Poisson, J. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* **66**, 212–227 (2017).
54. Walter, T. J., Cast, A. E., Huppert, K. A. & Huppert, S. S. Epithelial VEGF signaling is required in the mouse liver for proper sinusoid endothelial cell identity and hepatocyte zonation in vivo. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G849–G862 (2014).
55. Takabe, Y., Yagi, S., Koike, T. & Shiojiri, N. Immunomagnetic exclusion of E-cadherin-positive hepatoblasts in fetal mouse liver cell cultures impairs morphogenesis and gene expression of sinusoidal endothelial cells. *J. Anat.* **221**, 229–239 (2012).
56. DeLeve, L. D., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M. K. & McCuskey, R. S. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **287**, G757–G763 (2004).
57. March, S., Hui, E. E., Underhill, G. H., Khetani, S. & Bhatia, S. N. Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro. *Hepatology* **50**, 920–928 (2009).
58. Xie, G. *et al.* Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut* **62**, 299–309 (2013).
59. Deleve, L. D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* **61**, 1740–1746 (2015).
60. Marra, F. & Pinzani, M. Role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of portal hypertension. *Nefrologia* **22 Suppl 5**, 34–40 (2002).
61. Friedman, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* **88**, 125–172 (2008).
62. Puche, J. E., Saiman, Y. & Friedman, S. L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis.

- Compr. Physiol.* **3**, 1473–92 (2013).
63. Wake, K. & Sato, T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res.* **273**, 227–237 (1993).
  64. Senoo, H., Sato, M. & Imai, K. Hepatic stellate cells--from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. *Kaibogaku zasshi. Journal of anatomy* vol. 72 79–94 (1997).
  65. Kent, G. *et al.* Vitamin A containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3719–3722 (1976).
  66. DeLeve, L. D., Wang, X. & Guo, Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* **48**, 920–930 (2008).
  67. Vollmar, B. & Menger, M. D. The hepatic microcirculation: Mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiological Reviews* vol. 89 1269–1339 (2009).
  68. Moncada, S. & Higgs, E. A. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. in *The Vascular Endothelium I* 213–254 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/3-540-32967-6\_7.
  69. Knowles, R. G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* vol. 298 249–258 (1994).
  70. Iwakiri, Y. & Kim, M. Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 36 524–536 (2015).
  71. Xie, G. *et al.* Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. *Gastroenterology* **142**, 918–927.e6 (2012).
  72. Iwakiri, Y. *et al.* Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in

- early phases of portal hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **282**, H2084–H2090 (2002).
73. Murad, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **32**, 1317–1327 (1999).
74. Reynaert, H. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* **50**, 571–581 (2002).
75. Yanagisawa, M. *et al.* Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 6964–6967 (1988).
76. Khimji, A. K. & Rockey, D. C. Endothelin and hepatic wound healing. *Pharmacol. Res.* **63**, 512–518 (2011).
77. Elshourbagy, N. A. *et al.* Molecular characterization and regulation of the human endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 3873–3879 (1993).
78. Housset, C., Rockey, D. C. & Bissell, D. M. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9266–9270 (1993).
79. Simonson, M. S. & Dunn, M. J. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* **4**, 2989–3000 (1990).
80. Khimji, A. karim & Rockey, D. C. Endothelin-Biology and disease. *Cellular Signalling* vol. 22 1615–1625 (2010).
81. Rasmussen, H., Takawa, Y. & Park, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.* **1**, 177–185 (1987).
82. Mitsutomi, N., Akashi, C., Odagiri, J. & Matsumura, Y. Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **364**, 65–73 (1999).

83. Wiest, R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* **35**, 478–491 (2002).
84. Iwakiri, Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* **32**, 199–213 (2012).
85. Clapp, B. R. *et al.* Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc. Res.* **64**, 172–178 (2004).
86. Gracia-Sancho, J. *et al.* Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* **47**, 1248–1256 (2008).
87. Shah, V. *et al.* Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* **117**, 1222–1228 (1999).
88. Laleman, W. *et al.* A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* **42**, 1382–1390 (2005).
89. Morales-Ruiz, M. *et al.* Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* **125**, 522–531 (2003).
90. Liu, S., Premont, R. T., Kontos, C. D., Zhu, S. & Rockey, D. C. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat. Med.* **11**, 952–958 (2005).
91. Perri, R. E. *et al.* Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G535–G542 (2006).
92. Rockey, D. C. & Chung, J. J. Endothelin antagonism in experimental hepatic



- fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J. Clin. Invest.* **98**, 1381–8 (1996).
93. Pinzani, M. *et al.* Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **110**, 534–548 (1996).
94. Mallat, A. *et al.* Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: A cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway: Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. *J. Clin. Invest.* **98**, 2771–2778 (1996).
95. Pinzani, M. & Marra, F. Cytokine Receptors and Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Semin. Liver Dis.* **21**, 397–416 (2001).
96. Kucera, O. & Cervinkova, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology* vol. 20 8364–8376 (2014).
97. Schattenberg, J. M. & Galle, P. R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: Of mice and man. *Digestive Diseases* vol. 28 247–254 (2010).
98. Trak-Smayra, V. *et al.* Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int. J. Exp. Pathol.* **92**, 413–421 (2011).
99. Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Schriemer, R. & Robertson, G. R. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J. Hepatol.* **37**, 206–213 (2002).
100. Potter, J. J., Rennie-Tankesley, L. & Mezey, E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J. Hepatol.* **38**, 281–288 (2003).

101. Kim, K. E. *et al.* Caloric restriction of db/db mice reverts hepatic steatosis and body weight with divergent hepatic metabolism. *Sci. Rep.* **6**, 30111 (2016).
102. Godbole, V. & York, D. A. Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat (fa/fa): Role of hyperphagia and hyperinsulinaemia. *Diabetologia* **14**, 191–197 (1978).
103. Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A. I. & Nieto, N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* **19**, 136–138 (2005).
104. Machado, M. V. *et al.* Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLoS One* **10**, e0127991 (2015).
105. Veteläinen, R., Van Vliet, A. & Van Gulik, T. M. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1526–1533 (2007).
106. Al-Humadi, H., Zarros, A., Kyriakaki, A., Al-Saigh, R. & Liapi, C. Choline deprivation: An overview of the major hepatic metabolic response pathways. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* vol. 47 874–886 (2012).
107. Lieber, C. S. *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. in *American Journal of Clinical Nutrition* vol. 79 502–509 (2004).
108. Ito, M. *et al.* Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol. Res.* **37**, 50–57 (2007).
109. Zou, Y. *et al.* High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* **79**, 1100–1107 (2006).
110. Eccleston, H. B. *et al.* Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial

- proteome in mice. *Antioxidants Redox Signal.* **15**, 447–459 (2011).
111. Savard, C. *et al.* Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* **57**, 81–92 (2013).
  112. Xu, Z. J., Fan, J. G., Ding, X. D., Qiao, L. & Wang, G. L. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 931–940 (2010).
  113. Kohli, R. *et al.* High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **52**, 934–944 (2010).
  114. K. Panchal, S. *et al.* High-carbohydrate, High-fat Diet–induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 611–624 (2011).
  115. Maeda Júnior, A. S. *et al.* Cafeteria diet feeding in young rats leads to hepatic steatosis and increased gluconeogenesis under fatty acids and glucagon influence. *Nutrients* **10**, 1571 (2018).
  116. Sampey, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity* **19**, 1109–1117 (2011).
  117. Ahima, R. S. & Flier, J. S. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 413–437 (2000).
  118. London, R. M. & George, J. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clinics in Liver Disease* vol. 11 55–74 (2007).
  119. Lombardi, B., Pani, P. & Schlunk, F. F. Choline-deficiency fatty liver: impaired release of hepatic triglycerides. *J. Lipid Res.* **9**, 437–446 (1968).
  120. Corbin, K. D. & Zeisel, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **28**,

- 159–165 (2012).
121. Larter, C. Z. Not all models of fatty liver are created equal: Understanding mechanisms of steatosis development is important. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1353–1354 (2007).
  122. Rinella, M. E. & Green, R. M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J. Hepatol.* **40**, 47–51 (2004).
  123. Yki-Järvinen, H. Nutritional modulation of nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: human data. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 709–714 (2010).
  124. Kirsch, R. *et al.* Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: Species, strain and sex difference studies. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 1272–1282 (2003).
  125. Ioannou, G. N., Morrow, O. B., Connole, M. L. & Lee, S. P. Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the united states population. *Hepatology* **50**, 175–184 (2009).
  126. Jensen, T. *et al.* Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **68**, 1063–1075 (2018).
  127. Moore, B. J. The Cafeteria Diet—An Inappropriate Tool for Studies of Thermogenesis. *J. Nutr.* **117**, 227–231 (1987).
  128. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
  129. Zelber-Sagi, S. Nutrition and physical activity in NAFLD: An overview of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3377 (2011).
  130. Petersen, K. F. *et al.* Reversal of Nonalcoholic Hepatic Steatosis, Hepatic Insulin Resistance, and Hyperglycemia by Moderate Weight Reduction in Patients With

- Type 2 Diabetes. *Diabetes* **54**, 603–608 (2005).
131. Promrat, K. *et al.* Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **51**, 121–129 (2010).
  132. Vilar-Gomez, E. *et al.* Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **149**, 367–378.e5 (2015).
  133. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11070–11075 (2005).
  134. Compare, D. *et al.* Gut–liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **22**, 471–476 (2012).
  135. Abenavoli, L., Scarpellini, E., Rouabhia, S., Balsano, C. & Lizza, F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when. *Ann. Hepatol.* **12**, 357–363 (2013).
  136. Meroni, M., Longo, M. & Dongiovanni, P. The role of probiotics in nonalcoholic fatty liver disease: A new insight into therapeutic strategies. *Nutrients* **11**, 2642 (2019).
  137. Colombo, M. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines on the management of benign liver tumours. *J. Hepatol.* **65**, 386–398 (2016).
  138. Bugianesi, E. *et al.* Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: Sites and mechanisms. *Diabetologia* **48**, 634–642 (2005).
  139. Li, Y., Liu, L., Wang, B., Wang, J. & Chen, D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed. Reports* **1**, 57–64 (2013).
  140. Sanyal, A. J. *et al.* Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1675–1685 (2010).

141. Cusi, K. *et al.* Long-term pioglitazone treatment for patients with nonalcoholic steatohepatitis and prediabetes or type 2 diabetes mellitus a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **165**, 305–315 (2016).
142. Yau, H., Rivera, K., Lomonaco, R. & Cusi, K. The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diab. Rep.* **13**, 329–341 (2013).
143. Sato, K. *et al.* Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition* **31**, 923–930 (2015).
144. Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G. & Gluud, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* vol. 297 842–857 (2007).
145. Issa, D., Patel, V. & Sanyal, A. J. Future therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International* vol. 38 56–63 (2018).
146. de Franchis, R. Expanding consensus in portal hypertension. *J. Hepatol.* **63**, 743–752 (2015).
147. Bosch, J. & Iwakiri, Y. The portal hypertension syndrome: etiology, classification, relevance, and animal models. *Hepatol. Int.* **12**, 1–10 (2018).
148. Baffy, G. Origins of Portal Hypertension in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* **63**, 563–576 (2018).
149. Stancu, C. & Sima, A. Statins: mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med.* **5**, 378–387 (2001).
150. Liao, J. K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J. Clin. Invest.* **110**, 285–288 (2002).
151. Beckman, J. A. & Creager, M. A. The Nonlipid Effects of Statins on Endothelial

- Function. *Trends in Cardiovascular Medicine* vol. 16 156–162 (2006).
152. Margaritis, M., Channon, K. M. & Antoniades, C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: Beyond lipid lowering. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 20 1198–1215 (2014).
  153. Sawada, N. & Liao, J. K. Rho/Rho-Associated Coiled-Coil Forming Kinase Pathway as Therapeutic Targets for Statins in Atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1251–1267 (2014).
  154. Rikitake, Y. & Liao, J. K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circulation Research* vol. 97 1232–1235 (2005).
  155. Ming, X.-F. *et al.* Rho GTPase/Rho Kinase Negatively Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation through the Inhibition of Protein Kinase B/Akt in Human Endothelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8467–8477 (2002).
  156. Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. & Schlossmann, J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological Reviews* vol. 86 1–23 (2006).
  157. Trebicka, J. *et al.* Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* **46**, 242–253 (2007).
  158. Marrone, G. *et al.* KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: Behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* **64**, 1434–1443 (2015).
  159. Abraldes, J. G. *et al.* Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl<sub>4</sub> cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 1040–1046 (2007).
  160. Rodríguez, S. *et al.* A Nitric Oxide-Donating Statin Decreases Portal Pressure with a Better Toxicity Profile than Conventional Statins in Cirrhotic Rats. *Sci. Rep.* **7**,

- 40461 (2017).
161. Zafra, C. *et al.* Simvastatin Enhances Hepatic Nitric Oxide Production and Decreases the Hepatic Vascular Tone in Patients with Cirrhosis. *Gastroenterology* **126**, 749–755 (2004).
  162. Abraldes, J. G. *et al.* Simvastatin Lowers Portal Pressure in Patients With Cirrhosis and Portal Hypertension: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **136**, 1651–1658 (2009).
  163. Chalasani, N., Aljadhey, H., Kesterson, J., Murray, M. D. & Hall, S. D. Patients with Elevated Liver Enzymes Are Not at Higher Risk for Statin Hepatotoxicity. *Gastroenterology* **126**, 1287–1292 (2004).
  164. Lewis, J. H. *et al.* Efficacy and safety of high-dose pravastatin in hypercholesterolemic patients with well-compensated chronic liver disease: Results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Hepatology* **46**, 1453–1463 (2007).
  165. Dongiovanni, P. *et al.* Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J. Hepatol.* **63**, 705–712 (2015).
  166. Athyros, V. G. *et al.* Statins: An Under-Appreciated Asset for the Prevention and the Treatment of NAFLD or NASH and the Related Cardiovascular Risk. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **16**, 246–253 (2018).
  167. Dumas, M. *et al.* The Role of Statins in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4587–4592 (2019).
  168. Dwyer, N. & Kilpatrick, D. Bosentan for the treatment of adult pulmonary hypertension. *Future Cardiol.* **7**, 19–37 (2011).
  169. Heresi, G. A. & Minai, O. A. Bosentan in systemic sclerosis. *Drugs of Today* vol. 44 415–428 (2008).



170. Rivera-Lebron, B. N. & Risbano, M. G. Ambrisentan: a review of its use in pulmonary arterial hypertension. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **11**, 233–244 (2017).
171. Pitts, K. R. Endothelin receptor antagonism in portal hypertension. *Expert Opinion on Investigational Drugs* vol. 18 135–142 (2009).
172. Kleiner, D. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–21 (2005).
173. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
174. Marchesini, G. *et al.* EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **64**, 1388–1402 (2016).
175. Pasarín, M. *et al.* Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD. *J. Hepatol.* **55**, 1095–1102 (2011).
176. Nascimbeni, F. *et al.* Statins, antidiabetic medications and liver histology in patients with diabetes with non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterol.* **3**, e000075 (2016).
177. Beijert, I. *et al.* Endothelial dysfunction in steatotic human donor livers: A pilot study of the underlying mechanism during subnormothermic machine perfusion. *Transplant. Direct* **4**, e345 (2018).
178. Strauss, O., Phillips, A., Ruggiero, K., Bartlett, A. & Dunbar, P. R. Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver. *Sci. Rep.* **7**, 44356 (2017).
179. MacParland, S. A. *et al.* Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat. Commun.* **9**, 4383 (2018).
180. Zhang, J. X., Pegoli, W. & Clemens, M. G. Endothelin-1 induces direct constriction

- of hepatic sinusoids. *Am. J. Physiol.* **266**, G624-32 (1994).
181. Kojima, H. *et al.* Mixed endothelin receptor antagonist, SB209670, decreases portal pressure in biliary cirrhotic rats in vivo by reducing portal venous system resistance. *J. Hepatol.* **32**, 43–50 (2000).
  182. Cavasin, M. A. *et al.* Acute effects of endothelin receptor antagonists on hepatic hemodynamics of cirrhotic and noncirrhotic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 636–643 (2010).
  183. Feng, H. Q., Weymouth, N. D. & Rockey, D. C. Endothelin antagonism in portal hypertensive mice: Implications for endothelin receptor-specific signaling in liver disease. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **297**, G27 (2009).
  184. Zipprich, A., Schenkel, E., Winkler, M. & Ripoll, C. Selective Endothelin-A-Blocker decrease portal pressure in patients with cirrhosis. A feasibility study combining the local intraarterial and systemic administration. *Z. Gastroenterol.* **54**, 1343–1404 (2016).
  185. Hsu, S. J. *et al.* Endothelin receptor blockers reduce shunting and angiogenesis in cirrhotic rats. *Eur. J. Clin. Invest.* **46**, 572–580 (2016).
  186. Nair, A. & Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* **7**, 27 (2016).
  187. Humbert, M. *et al.* Results of European post-marketing surveillance of bosentan in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **30**, 338–344 (2007).
  188. Kenna, J. G. *et al.* Multiple compound-related adverse properties contribute to liver injury caused by Endothelin receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **352**, 281–290 (2015).
  189. Galiè, N. *et al.* Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **117**, 3010–3019 (2008).

190. McGoon, M. D. *et al.* Ambrisentan therapy in patients with pulmonary arterial hypertension who discontinued bosentan or sitaxsentan due to liver function test abnormalities. *Chest* **135**, 122–129 (2009).
191. Lebrec, D. *et al.* Hemodynamics and pharmacokinetics of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, in patients with cirrhosis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **68**, 533–541 (2012).
192. Rockey, D. C. & Weisiger, R. A. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* **24**, 233–240 (1996).
193. Haynes, W. G. & Webb, D. J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of Hypertension* vol. 16 1081–1098 (1998).
194. Fukuroda, T. *et al.* Clearance of Circulating Endothelin-1 by ETB Receptors in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1461–1465 (1994).
195. Löffler, B. M., Breu, V. & Clozel, M. Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett.* **333**, 108–110 (1993).
196. Kawada, N., Tran-Thi, T., Klein, H. & Decker, K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances: Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur. J. Biochem.* **213**, 815–823 (1993).
197. Koda, M. *et al.* Endothelin-1 enhances fibrogenic gene expression, but does not promote DNA synthesis or apoptosis in hepatic stellate cells. *Comp. Hepatol.* **5**, 5 (2006).

Anexo



## Anexo 1. Buffers y reactivos

### Picro-Sirius Red 0.1%

0,5 g Direct Red 80

500 ml Saturated aqueous solution of picric acid

### Agua acidificada

5 ml ácido acético glacial

995 ml dH<sub>2</sub>O

### TE 1x

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

### HANKS Hepes

62,5 ml HANKs 10X

25 mM NaHCO<sub>3</sub>

12 mM Hepes\*

dH<sub>2</sub>O hasta 625 ml

Gasear con carbógeno (95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>) durante 20 min.

\*Añadir el Hepes mientras se gasea el buffer con carbógeno.

Ajustar el pH a 7,4 (7,39-7,45).

### HANKS I

250 ml HANKS Hepes

0,6 mM EGTA

0,23 mM BSA

0,875 ml Heparina 1%

### HANKS II

300 ml HANKS Hepes

0,1755 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

### KREB'S

62,5 ml Kreb's 4X

2,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

25 mM Hepes\*

dH<sub>2</sub>O hasta 250 ml

Gasear con carbógeno (95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>) durante 20 min.

\*Añadir el Hepes mientras se gasea el buffer con carbógeno.

Ajustar el pH a 7,4 (7,39-7,45).

### Tampón de lisis Tritón (1 ml)

200 µl TBS5X

50 µl NaPPi 0,2 M (Sodio pirofosfato tetrabásico)

40 µl NaF 0,5 M (Fluoruro sódico)

100 µl Tritóx™ 10%

10 µl SOV 200mM(Ortovanadato de sodio)

10 µl A Ok (Ácido okadaico)

12 µl PIM 1µM (Mix inhibidor de proteasas)

4 µl PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

574 µl dH<sub>2</sub>O

Tris-buffered saline (TBS) 10X (1 L)

1,4 M NaCl  
27 mM KCl  
254 mM Tris-HCl  
dH<sub>2</sub>O hasta 1 L  
Ajustar el pH a 7,6

PIM

1 mg antipain en 1000 µl 15 mM Hepes pH 7,4  
1 mg aprotinin en 1000 µl 15 mM Hepes pH 7,4  
1 mg chymostatin en 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 y 200 µl DMSO  
1 mg leupeptin en 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 y 200 µl DMSO  
1 mg pepstatin A en 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 y 200 µl DMSO  
1 mg inhibidor de tripsina en 800 µl 15 mM Hepes pH 7,4 y 200 µl DMSO

PMSF

10 mg PMSF  
1 ml EtOH

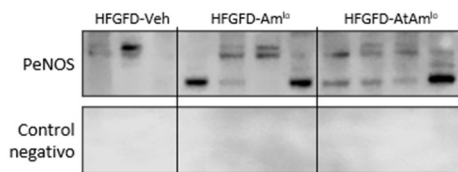
TTBS 1X (1 L)

100 ml TBS 10X  
900 ml dH<sub>2</sub>O  
1 ml Tween-20 +

FACS buffer (10 ml)

9,5 ml PBS 1X  
0,5 ml FBS



**Anexo 2. Determinación de especificidad de PeNOS.**

*La especificidad del patrón múltiple para las bandas de PeNOS se comprobó mediante el control negativo del anticuerpo primario para detectar posibles uniones inespecíficas. Para el control negativo se empleó el tampón de dilución del anticuerpo (5% BSA en TTBS 1X) sin el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se incubó de la misma forma en ambas membranas.*

# *Agradecimientos*



## **Agradecimientos**

Parecía imposible, pero por fin ha llegado el día. Desde el primer día en el que entre al VHIR, han pasado cuatro años en los que he tenido la suerte de estar acompañada de personas que me han ayudado a superar cada obstáculo. Ahora quiero daros las gracias, porque sin vosotros no lo habría conseguido.

En primer lugar, quiero agradecer a María y a Joan la oportunidad de realizar este trabajo. A Joan por tu capacidad de enseñar y guiarme durante toda la tesis con esas preguntas que me dejan pensando durante días. A ti María por tu dedicación y por estar siempre disponible para ayudarme con cualquier duda. Por estar siempre ahí para discutir y rediscutir los resultados antes de decidir el siguiente paso. Gracias a los dos por escuchar mis ideas y tener un espíritu crítico, pero siempre constructivo. Gracias también a Salva, siempre aportando nuevas ideas y positivismo frente a cualquier desastre.

Si a alguien tengo que agradecerle su ayuda es a Imma. Más que compañera, has sido mi hermana mayor durante todos estos años. Por contagiarme tu alegría día tras día. Por acompañarme durante tantas horas de estabulario. Por escucharme y aconsejarme, con los mil experimentos que nunca salían, con los westerns malditos, pero también por tus consejos sobre la vida. Pero sobre todo gracias por ser tan cabezota como yo.

No puedo dejar de agradecer a Teresa y a Manu haberme hecho sentir parte del grupo desde el primer día. Por haberme introducido en el mundo de las hemos, pero también en las cenas de becarios. Gracias por hacer que fuera una más de esta gran familia. Gracias también a Mónica, por tus consejos tan sabios, por todos esos ratitos de café que hemos compartido.

Mil gracias a todos los compañeros que han formado parte de este viaje: Elena, Sofía, Mer, Meri, Josep, Celia, Mariu, Qian, Aurora, Mar, Federico, ... por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del VHIR.

A diana, que me ha acompañado a tantos congresos. Contigo he podido disfrutar de todos esos viajes, desde Girona a Madrid, pasando por Paris y hasta Sydney. Gracias por estar siempre dispuesta a escucharme y a echarme una mano. He aprendido mucho contigo.

Esteve, gracias por acompañarme y aguantarme en los peores momentos. Incluso estando encerrados en casa durante meses. No sé cómo lo haces, pero siempre eres capaz de sacarme una sonrisa. Gracias por apoyarme, por transmitirme tu calma y estar siempre que te necesito.

Donostiko lagunei, beti noiz itzuliko naizen galdezka. Beti nitaz gogoratzten zaretelako, ni ere ez naiz zuetaz ahazten. Askotan ezin izan dut bidai, afari edo poteoan parte hartu, baina ala ere gogoan izan zaituztet. Donostira itzultzen naizen bakoitzean, etxean nagoela sentiarazteagatik, mila esker Onki Xin! Aipamen berezi bat egin behar diet Lore, Atxu eta Iratiri. Oroimena dudanetik zaudetelako nirekin. Bartzelonara etortzea erabaki genuenetik bizi izan ditugun momentu guztiengatik. Zuen mila bisitengatik. Une guzti horiek, bai onek eta bai txarrek, beti ondoan izango zaituztedala erakutsi didatelako.

Ivan, Miriam, Maria, Arnau, Natalia, Silvia, Ana, Ainoa. Este camino comenzó con vosotros y sin vosotros no hubiese llegado hasta aquí. Aún nos queda mucho camino por recorrer.

A todos los que habéis formado mi familia en Barcelona, siempre tan preocupados por mis ratis. Gracias Peter, por obligarme a apuntarme a todos los planes, gracias Tania, por enterarte siempre de todo y ser capaz de alegrar cada tarde, gracias Irene, Ade, Maria y Manu por formar parte de esta gran familia. Pero sobre todo gracias a ti Ana. Gracias por compartir todos estos años tan intensos. Con viajes, fiestas, alegrías y frustraciones. Espero que volvamos a coincidir cuando sea y donde sea.

Azkenik, eskerrak eman nahi dizkiet gurasoei. Zuen baldintzarik gabeko babesak beti aurrera egiteko behar izan dudan indarra eman didalako. Beti ni zaintzeko prest egoteagatik eta bizitzako erabaki bakoitzean lagundu didazuelako.

Gracias a todos vosotros puedo cerrar este capítulo de mi vida sintiendo que ha merecido la pena, porque estoy rodeada de personas increíbles.



