



# Caracterización de la disfunción vascular sanguínea y linfática en la cirrosis hepática: Evaluación de la inhibición del factor de crecimiento placentario y del óxido nítrico como estrategias terapéuticas

Jordi Ribera Sabaté

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**CARACTERIZACIÓN DE LA DISFUNCIÓN VASCULAR SANGUÍNEA Y LINFÁTICA  
EN LA CIRROSIS HEPÁTICA:  
EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO  
Y DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**

Memoria presentada por

**JORDI RIBERA SABATÉ**

para optar al título de Doctor en Bioquímica por la Universitat de Barcelona

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Manuel Morales Ruiz**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular

Hospital Clínic de Barcelona

Tesis inscrita en el programa de doctorado de Medicina

Departamento de Medicina, Facultad de Medicina



*Aquesta tesi està dedicada  
als meus pares i a tota la meva família*



## ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de la angiotensina
ADH	Hormona antidiurética
$\alpha$ SMA	Actina de músculo liso $\alpha$
Ang-II	Angiotensina-2
AVP	Vasopresina
BODIPY	Boro-dipirrometeno
BrdU	Bromodeoxiuridina
Cav-1	Caveolina-1
CCL21	Ligando de quimioquinas C-C 21
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CCR7	Receptor de quimioquinas C-C tipo 7
CH	Cirrosis, cirrótico
CLEC-2	Familia 2 del dominio de lectina tipo C
CLEVER-1	Receptor endotelial vascular y endotelial linfático común-1
CT	Control
CXCL12	Ligando de quimioquinas CxC 12
CXCR4	Receptor de quimioquinas CxC tipo 4
DETANONOate	Dietilentriamina NONOate
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ET-1	Endotelina-1
FDA	Food and Drug Administration
FAK	Quinasa de adhesiones focales
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
HSC	Célula estrellada hepática
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN	Interferón
IL	Interleuquina

iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JAM-2	Molécula de adhesión cruzada tipo B
KC	Célula de Kupffer
LDL-R	Receptor de las lipoproteínas de baja densidad
L-NAME	Metil éster de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
L-NOArg	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
LPS	Lipopolisacárico
LSEC	Célula endotelial sinusoidal
LyEC	Célula endotelial linfática
LYVE-1	Receptor endotelial de vasos linfáticos-1
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MEK	Proteína quinasa quinasa
MMP	Metaloproteinasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMPc
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción
RTK	Receptor tirosina quinasa
SLP-76	Proteína leucocitaria de 76 KDa
SMC	Célula muscular lisa
SNS	Sistema nervioso simpático

SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SYK	Tirosina quinasa de bazo
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidor de las metaloproteinasas
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
vWF	Factor de Von Willebrand





## ***ÍNDICE***



## **INTRODUCCIÓN**

<b>EL HÍGADO</b>	1
<b>CIRROSIS HEPÁTICA</b>	2
1. Aspectos generales	2
2. Tipos celulares hepáticos	5
2.1 Células estrelladas hepáticas	7
3. Alteraciones intrahepáticas:	7
3.1 Inflamación	7
3.2 Fibrosis	9
4. Alteraciones hemodinámicas:	11
4.1 Hipertensión portal	11
4.2 Circulación hiperdinámica	11
5. Formación de ascitis	13
<b>ANGIOGÉNESIS</b>	15
1. Aspectos generales	15
2. Factores proangiogénicos:	16
2.1 La familia de VEGF y sus receptores	16
2.2 PlGF	18
2.3 PDGF	20
3. Vías de señalización asociadas de RTKs	21
4. Angiogénesis e inflamación	22
5. Terapias antiangiogénicas	23

<b>EL ÓXIDO NÍTRICO</b>	24
1. Características y funciones generales	24
2. Sintetasas del óxido nítrico	26
3. Inhibidores de las NOS	27
4. Papel fisiopatológico del óxido nítrico en la cirrosis	28

<b>EL SISTEMA LINFÁTICO</b>	29
1. Aspectos generales	29
2. Estructura y funcionamiento	30
3. Desarrollo del sistema linfático a partir del sistema sanguíneo	32
4. Célula endotelial linfática (LyEC)	34
5. El sistema linfático en un contexto patológico	36
5.1 Contribución del sistema linfático en la inflamación	36
5.2 Contribución del sistema linfático en el cáncer	38
5.3 Contribución del sistema linfático en la formación de edema	40

<b>OBJETIVOS</b>	43
------------------	----

## **RESULTADOS**

**ARTÍCULO 1:** La inhibición de la actividad del factor de crecimiento placentario reduce la severidad de la fibrosis, la inflamación, y la hipertensión portal en ratones cirróticos.

*Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice.*

**ARTÍCULO 2:** La sobreproducción de óxido nítrico en células endoteliales linfáticas provoca una disfunción en el drenaje linfático en ratas cirróticas.

*Increase nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats.* 52

**DISCUSIÓN** 56

**CONCLUSIONES** 64

**BIBLIOGRAFÍA** 67

**AGRADECIMIENTOS** 86

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del hígado	1
<b>Figura 2.</b> Tipos celulares hepáticos	6
<b>Figura 3.</b> Respuesta inflamatoria tras un daño hepático	8
<b>Figura 4.</b> Proceso de fibrosis en el territorio hepático	10
<b>Figura 5.</b> Fisiopatología de la formación de ascitis	14
<b>Figura 6.</b> Mecanismos básicos de formación de vasos	15
<b>Figura 7.</b> Esquema de la familia de VEGF y sus receptores	18
<b>Figura 8.</b> Vías de señalización activadas por receptores tirosina quinasa	21
<b>Figura 9.</b> Generación de NO y efecto sobre las células musculares lisas	25
<b>Figura 10.</b> Funciones de la vasculatura linfática	30
<b>Figura 11.</b> Estructura y funcionamiento del sistema linfático	32
<b>Figura 12.</b> Desarrollo embrionario del sistema linfático	33
<b>Figura 13.</b> Función de los vasos linfáticos en los procesos inflamatorios	37
<b>Figura 14.</b> Metástasis linfática del cáncer	39
<b>Figura 15.</b> Vasculatura linfática en el linfedema	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis	12
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los diferentes tipos de sintasas de NO	26
<b>Tabla 3.</b> Inhibidores de las NOS	28

## ***INTRODUCCIÓN***



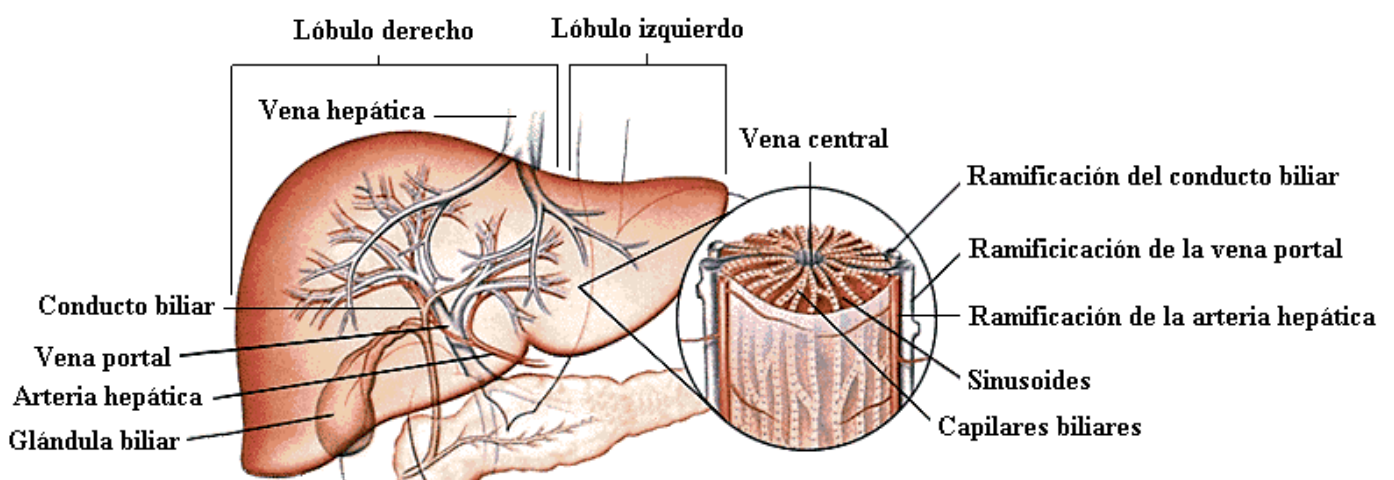


## EL HÍGADO

El hígado es uno de los órganos más importantes del cuerpo humano. Está ubicado en la zona superior del abdomen en el lado derecho, por debajo de las costillas y pesa aproximadamente 1.5 Kg. Un hígado normal es de contorno liso y elástico, está conectado directamente al intestino delgado por medio del conducto biliar, que transporta la bilis que se produce en el hígado para ser utilizada en la digestión. Casi toda la sangre que sale del estómago e intestino pasa por el hígado. Entre las muchas funciones que el hígado cumple están las siguientes:

- Producción de bilis y otras enzimas (proteínas) digestivas.
- Control de infecciones.
- Producción de proteínas que ayudan a la coagulación de la sangre.
- Metabolismo del colesterol.
- Almacenamiento de glicógeno que sirve de combustible a los músculos.
- Mantenimiento y regulación de los niveles hormonales.
- Metabolización de medicamentos, alcohol y otras drogas.

Considerando todas las funciones del hígado, no es sorprendente que las enfermedades hepáticas alteren todas las demás funciones del cuerpo. Una de las enfermedades asociadas al hígado con más mortalidad y morbilidad es la cirrosis.



**Figura 1.** Estructura del hígado

## CIRROSIS HEPÁTICA

### 1. ASPECTOS GENERALES

La cirrosis es la consecuencia final de un daño acumulado en el hígado, habitualmente durante varios años, que se caracteriza por la acumulación de fibra en el tejido hepático y por una disminución del tejido hepático funcional. Estos cambios del hígado interfieren con la estructura y el funcionamiento normal del hígado, ocasionando serias complicaciones en la circulación de la sangre a través de dicho órgano y en sus funciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente mueren más de 200.000 personas por esta enfermedad en los países desarrollados, siendo la sexta causa de muerte más frecuente en el mundo (Anderson et al., 2003).

De forma similar a lo que acontece en otros tejidos, la inflamación hepática es un proceso necesario en la reparación tisular. En condiciones normales, este tipo de respuesta restaura la estructura y las funciones originales del hígado, y mantiene la homeostasis tisular. Sin embargo, hay ocasiones en que la lesión es demasiado intensa o persistente, y el propio proceso inflamatorio compromete la integridad estructural del órgano a través de mecanismos como una excesiva formación de matriz extracelular (fibrosis), con posterior esclerosis (Schuppan, 1990). El exceso de matriz se acumula en la zona perisinusoidal, formándose una barrera que impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes a través del hígado, provocando la muerte celular de los hepatocitos. Esto conduce a la distorsión de la arquitectura lobular normal del parénquima hepático y de la red vascular, derivando en la formación de nódulos hepáticos separados por fibras (nódulos de regeneración). Esta fase final del proceso es la que se conoce como cirrosis (Erlinger y Benhamou, 1999).

En la evolución de la enfermedad, podemos distinguir dos fases: cirrosis compensada y descompensada. Las complicaciones que definen la cirrosis descompensada son (Conn and Atterbury, 1987; Friedman, 2003):

- *Ascitis*: acúmulo de líquido libre intraabdominal con características de transudado (filtrado de plasma con bajo contenido en proteínas). Este transudado además puede infectarse (peritonitis bacteriana espontánea), habitualmente a causa de la traslocación bacteriana. Es la complicación más común y más temprana de la cirrosis.
- *Síndrome hepatorenal*: insuficiencia renal funcional y reversible sin que exista alteración de la estructura renal. Se produce debido a una intensa vasoconstricción renal que conduce a una insuficiencia que se establece en el plazo de días o semanas. Suele aparecer de forma muy agresiva y tiene un pronóstico fatal a corto plazo, en la mayoría de los casos en semanas (síndrome hepatorenal tipo I) o de forma más insidiosa, con un pronóstico ligeramente mejor y una supervivencia media de alrededor de seis meses (síndrome hepatorenal tipo II).
- *Encefalopatía hepática*: síndrome neuropsiquiátrico secundario producido por el deterioro de la función neurológica, habitualmente episódico y reversible. Aparece cuando determinados metabolitos, como por ejemplo amonio, pasan directamente de la circulación portal a la circulación sistémica, y acaban afectando al sistema nervioso.
- *Hemorragia digestiva por varices gastroesofágicas*: dilataciones de las venas gástricas y del esófago producidas por aumento de la presión en la vena porta, como consecuencia de la cirrosis hepática. Al aumentar la presión dentro de las varices, se rompen produciendo hemorragias.
- *Ictericia*: tinte amarillento de la piel y las mucosas a consecuencia del acúmulo de bilirrubina.

La cirrosis descompensada predice habitualmente una importante disminución de la supervivencia, y tiene un mal pronóstico a corto plazo. Además de las complicaciones

descritas los pacientes con cirrosis hepática tienen un riesgo aumentado de desarrollar hepatocarcinoma (Gines et al, 2004; Bataller and Brenner, 2005).

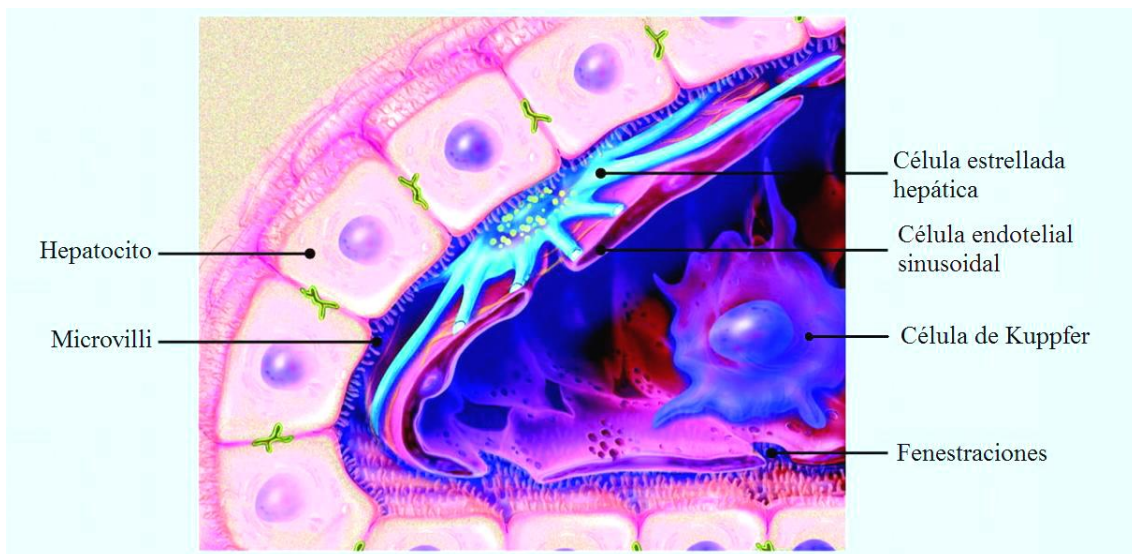
Existen numerosas causas que pueden desencadenar la cirrosis hepática, entre las principales están (Anthony et al., 1978; Fattovich et al., 1997):

- Virus de la hepatitis B, hepatitis C, y hepatitis D (los virus de la hepatitis son la causa de cirrosis más habitual en la actualidad).
- Consumo excesivo de alcohol (sigue siendo todavía la causa del 40% de los casos de cirrosis).
- Enfermedad del hígado graso no alcohólico, también llamada esteatohepatitis no alcohólica. Es una condición frecuente en la población general debido al cambio de hábitos alimentarios y al sedentarismo. Está asociada a diabetes y obesidad.
- Enfermedades autoinmunes, como la hepatitis autoinmune o la cirrosis biliar primaria.
- Enfermedades hereditarias o congénitas como la hemocromatosis, en la cual se acumula hierro dentro del hígado dañando el tejido. Otro ejemplo sería la enfermedad de Wilson, que es causada por una alteración en el transporte de cobre, acumulándose en el hígado y otros tejidos.
- Obstrucción prolongada del conducto biliar, como pasa en la colangitis esclerosante.
- Ausencia de proteínas específicas o enzimas para metabolizar diferentes sustancias en el hígado, como la deficiencia de la alfa 1-antitripsina.
- Ciertas enfermedades del corazón, como la insuficiencia cardíaca.
- Reacción severa a drogas o medicamentos.
- Exposición prolongada a agentes tóxicos en el medio ambiente.

La cirrosis como tal carece de tratamiento médico específico. El tratamiento definitivo de la cirrosis es el trasplante hepático, pero el rechazo crónico del injerto y el desequilibrio existente entre la demanda y la disponibilidad de órganos comprometen esta estrategia.

## 2. TIPOS CELULARES HEPÁTICOS

El hígado está formado por células parenquimales, hepatocitos, y células no-parenquimales. Mientras que los hepatocitos ocupan casi el 80% del volumen total del hígado y realizan la mayor parte de sus funciones, las células no-parenquimales contribuyen sólo en un 20% al volumen total del hígado. El 40% del total de células se localizan en el sinusoides hepático. Las paredes del sinusoides hepático están formadas por tres tipos de células diferentes: las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer, y las células estrelladas hepáticas (también conocidas como células almacenadoras de grasa, células de Ito, lipocitos, células perisinusoidales, o células ricas en vitamina A). Tanto en condiciones normales, como en condiciones patológicas, muchas de las funciones de los hepatocitos se regulan a través de sustancias secretadas por las células no-parenquimales (Kmiec, 2001).



**Figura 2.** Tipos celulares hepáticos  
(Figura adaptada de Friedman et al., 2004)

Las células endoteliales sinusoidales forman la pared del sinusoides hepático. Realizan importantes funciones de filtración, debido a que presentan pequeñas fenestraciones en su membrana para permitir la libre difusión de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. Además, son células activas en cuanto a la secreción de citoquinas, eicosanoides, sustancias vasoactivas como endotelina-1 u óxido nítrico, y algunos componentes de la matriz extracelular. Las células de Kupffer son los

macrófagos residentes del hígado, tienen capacidad endocítica y fagocítica, y producen potentes mediadores de la respuesta inflamatoria (especies reactivas de oxígeno, eicosanoides, óxido nítrico, monóxido de carbono, TNF-alfa, y otras citoquinas) (Luckey and Petersen, 2001; Melgert et al., 2001). Por ello, controlan las primeras fases de la inflamación hepática (Titos et al., 2003; Claria and Titos, 2004). Durante la enfermedad hepática, las células de Kupffer secretan enzimas y citoquinas que pueden dañar a los hepatocitos, y son activas en el remodelado de la matriz extracelular (Bouwens et al., 1992; Wisse et al., 1996).

### 2.1 CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

Las células estrelladas hepáticas están ubicadas en el espacio perisinusoidal de Disse, que es la zona limitada por los hepatocitos y la pared sinusoidal formada por las células endoteliales sinusoidales (Friedman, 2003). En el hígado sano las células hepáticas estrelladas almacenan vitamina A, controlan la degradación y formación de matriz extracelular, y regulan la contractibilidad del sinusoides (Flisiak, 1997). En este estado expresan marcadores característicos de adipocito (PPAR $\gamma$ , SREBP-1c y leptina). Sin embargo, el daño hepático activa estas células, transformándolas de un estado quiescente a un fenotipo miofibroblástico, que tiene un papel muy importante en el desarrollo de inflamación y fibrosis. En este estado expresan marcadores miogénicos ( $\alpha$ -SMA, c-myb, miosina o desmina), algunos marcadores neuroendocrinos (reelina, nestina, neurotrofinas, sinaptofisina y GFAP) y receptores de neurotransmisores. Estos nuevos miofibroblastos constituyen una nueva fuente de múltiples tipos de proteínas colágenas y no colágenas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I, tipo III, tipo IV, laminina, elastina, fibronectina y diversos proteoglicanos como el condroitinsulfato, el dermatansulfato y el heparansulfato. Además, la velocidad de proliferación de las células estrelladas hepáticas se incrementa después de su activación, amplificando así el número de células fibrogénicas presentes en el hígado (Sarem et al., 2006; Pinzani et al., 2005; Alcolado et al., 1997; Bataller and Brenner, 2005).

---

### 3. ALTERACIONES INTRAHEPÁTICAS

#### 3.1 INFLAMACIÓN

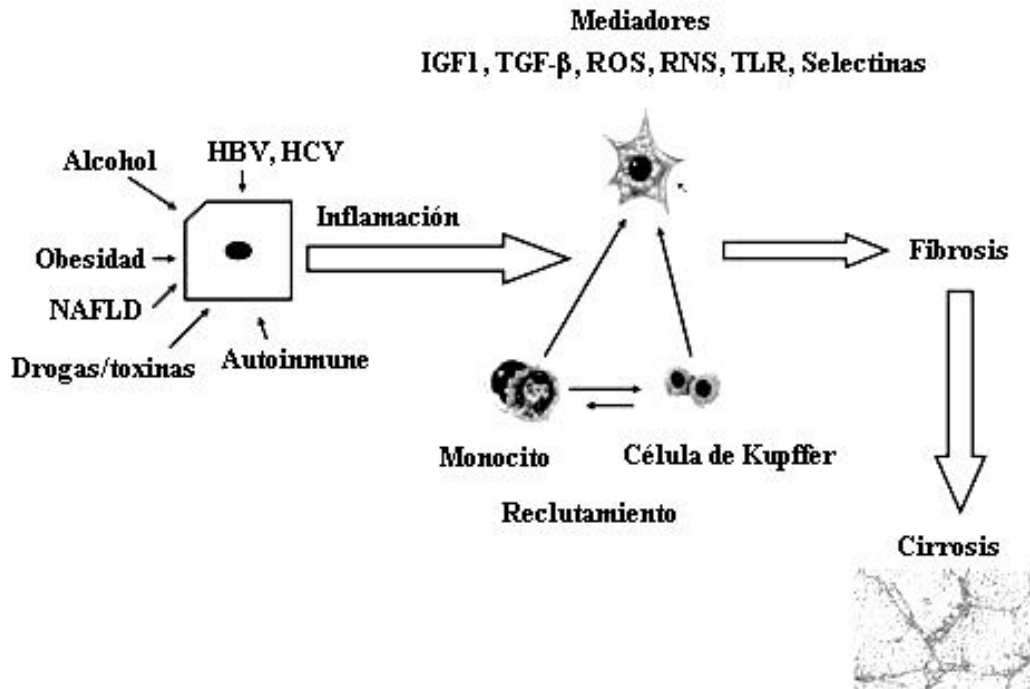
La inflamación es un proceso clave en la progresión de diversas enfermedades como el cáncer, el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal o las enfermedades hepáticas crónicas, y tiene como finalidad la reparación de una lesión tisular eliminando las células y tejidos necróticos (Vinay et al., 2005).

Debido a su función y situación anatómica, el hígado está constantemente expuesto a agresiones que pueden inducir inflamación. El proceso inflamatorio en el hígado es dinámico y si no se resuelve adecuadamente se cronifica en el tiempo y se acaba llegando al estado de fibrosis (Iredale, 2007). El primer paso es la activación de los hepatocitos cuando éstos son dañados por metabolitos tóxicos. Los hepatocitos activados liberan citoquinas que, junto con las propias moléculas causantes del daño, inducen la activación del resto de células hepáticas y el reclutamiento de leucocitos del torrente sanguíneo (Ramadori et al., 2008). Hay un incremento en la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1, y el reclutamiento se realiza gracias a la interacción entre las moléculas de adhesión existentes en la superficie de las células inflamatorias y las células endoteliales hepáticas. La composición de este infiltrado inflamatorio incluye monocitos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, células NK y mastocitos. La primera función del infiltrado es eliminar el daño hepático provocando la muerte de los hepatocitos no viables. Adicionalmente, otras subpoblaciones de células hepáticas también pueden ser dianas para la respuesta inflamatoria, como las células endoteliales o las estrelladas. Esto provoca una disfunción en estas células y aumentan la síntesis de sustancias proinflamatorias. (Maher, 2001; Dasarathy, 2008).

Los leucocitos, junto con las células inflamatorias residentes en el hígado (células de Kupffer), inician la respuesta inflamatoria en el tejido y empiezan a producir una serie de moléculas que acaban alterando el funcionamiento de los demás tipos celulares hepáticos. Se producen grandes cantidades de NO, especies reactivas de oxígeno, factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias, como el TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ ,



IL-1 o IL-6, que tienen un efecto directo en la activación de las células estrelladas y en la síntesis de colágeno (Song et al., 2000; Luckey et al., 2001; Melgert et al. 2001).



**Figura 3.** Respuesta inflamatoria tras un daño hepático (Figura adaptada de Dasarathy, 2008)

Los hepatocitos también pueden contribuir al proceso inflamatorio ya que responden directamente a LPS y a otras citoquinas proinflamatorias secretadas por las células de Kupffer. Por ejemplo, expresan receptores para TNF y IL-1, que activan la vía de las caspasas, involucrada en apoptosis y necrosis (Monshouwer and Hoebe, 2003). Las células de Kupffer también producen IL-12 y IL-18, dos interleuquinas capaces de regular la diferenciación y la expansión de las células NK. Una vez activadas, las células NK producen grandes cantidades de citoquinas y moduladores de la respuesta inmune (por ejemplo IFN- $\gamma$  que es un potente activador de macrófagos) que actúan como elementos indispensables de la respuesta inmunológica no-específica para la eliminación de virus y células malignas (Ahmad and Álvarez, 2004).

Por último, las células de Kupffer, junto con los macrófagos y hepatocitos, segregan IL-8, un poderoso quimioatrayente de neutrófilos, basófilos y células T

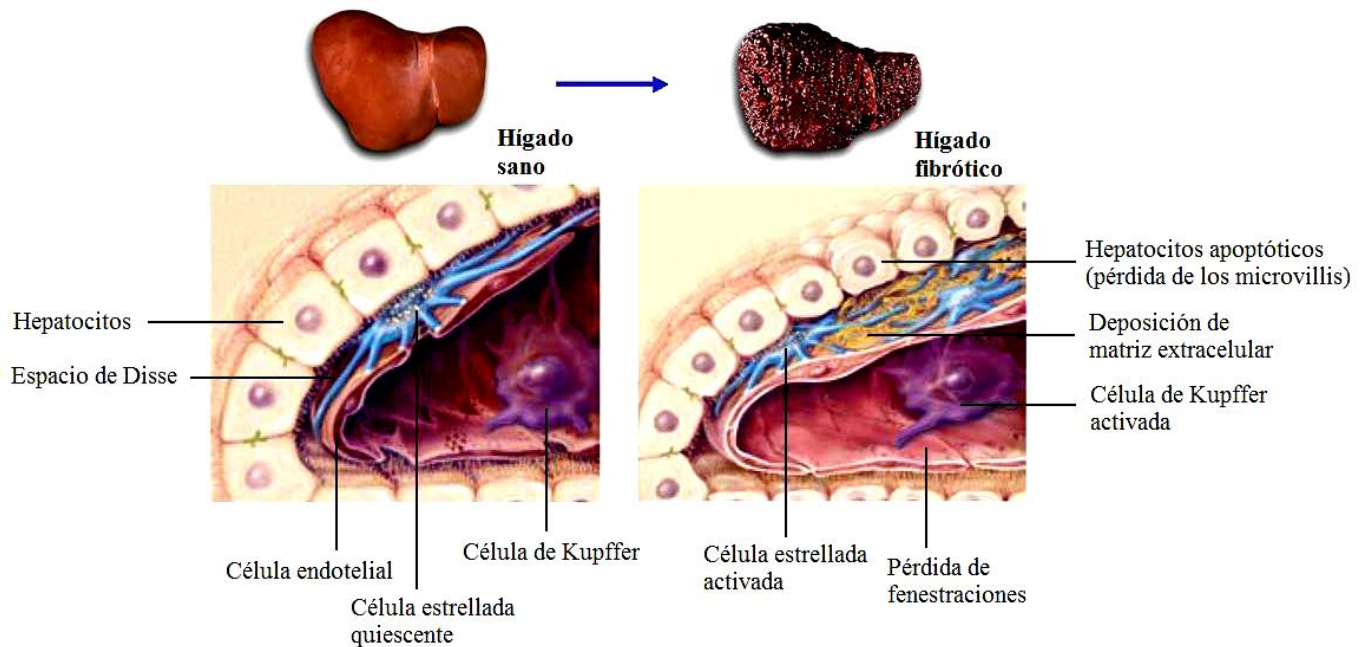
(Kershenovich and Bonder, 2003). La función de los linfocitos B y T en el proceso de inflamación hepática no está bien descrita, aunque hay evidencias que sugieren que los linfocitos T podrían activar las células de Kupffer y aumentar su producción de TNF $\alpha$  (Iredale, 2007).

### **3.2 FIBROSIS**

La fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular en respuesta a un daño hepático crónico y está precedida siempre por una fase inflamatoria. Este proceso provoca cambios en la formación, composición y degradación de la matriz extracelular en el hígado. Si el daño perdura y se vuelve crónico, el proceso de degradación de matriz extracelular no puede contrarrestar al de síntesis. Como consecuencia de esto, se secreta un exceso de matriz extracelular que se acumula en la zona perisinusoidal e impide la correcta difusión de oxígeno y nutrientes. Al final de este proceso, la estructura del parénquima hepático queda totalmente alterada y el hígado deja de llevar a cabo sus funciones; es la fase conocida como cirrosis (Iredale, 2003; Gutiérrez-Ruiz and Gómez-Quiroz, 2007).

Durante el proceso de fibrosis, existe una interacción compleja entre todos los tipos celulares hepáticos. Los hepatocitos son la primera diana de los agentes hepatotóxicos, una vez dañados liberan ROS y mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de más infiltrado inflamatorio. De todas las citoquinas y factores de crecimiento producidos durante el proceso inflamatorio, IL-6, TGF- $\beta$  y PDGF son las principales citoquinas profibrogénicas (Friedman, 2000). PDGF está producido principalmente por las células de Kupffer y por las células endoteliales, y actúa como factor mitogénico y quimiotáctico sobre las células estrelladas. Es la activación celular la que induce la expresión del receptor de PDGF en las HSC, ya que en estado quiescente no presentan receptores para este factor de crecimiento (Friedman et al., 1989; Wong et al., 1994). TGF- $\beta$  también es un potente activador de las células estrelladas hepáticas, aumenta la transcripción de genes de colágeno e induce la expresión de TIMP-1, un inhibidor de las MMPs involucradas en la degradación del colágeno (Benyon et al., 2001). Además, TGF- $\beta$  induce la transcripción de su propio RNAm, de manera que se crea una retroalimentación circular que mantiene los niveles

de esta citoquina elevados continuamente en los hígados fibróticos, estableciéndose un círculo vicioso donde células inflamatorias y fibrogénicas se estimulan entre ellas perpetuando la patología (Bissell, 1998; Kershenobich and Bonder, 2003; Iredale, 2003).



**Figura 4.** Proceso de fibrosis en el territorio hepático (Figura adaptada de Friedman et al., 2004)

Cuando las células estrelladas se activan adoptan un fenotipo de miofibroblasto, caracterizado por un incremento en la expresión de la actina de músculo liso, y por un incremento de su proliferación, migración y síntesis de componentes de matriz extracelular, sobre todo colágeno I y III (Pinzani et al., 2005; Cao et al., 2010). Además, las células estrelladas activadas producen IL-6 que de forma autocrina aumenta la expresión de TGF- $\beta$ , de manera que se convierten en una fuente importante de TGF- $\beta$  y en el tipo celular que más contribuye al acúmulo de productos de matriz extracelular durante el daño hepático (Kershenobich and Bonder, 2003).

## **4. ALTERACIONES INTRAHEPÁTICAS**

### **4.1 HIPERTENSIÓN PORTAL**

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente en la cirrosis hepática. Se caracteriza por un aumento patológico de la presión hidrostática en el territorio venoso portal por encima de su intervalo de normalidad (1-5 mmHg). Esto da lugar a la formación de una extensa red de vasos colaterales que derivan parte del flujo sanguíneo portal hacia la circulación sistémica e impiden su paso a través del hígado. Como consecuencia de este síndrome pueden aparecer algunas de las complicaciones más importantes de la cirrosis como las varices gastroesofágicas o la ascitis (Abralde and Bosch, 2002).

Durante el proceso de cirrosis existen dos componentes que afectan a la resistencia vascular intrahepática: 1) un componente mecánico caracterizado por anomalías anatómicas con la presencia de nódulos regenerativos que dificultan el paso de la sangre a través del hígado, y 2) un componente dinámico proporcionado por factores vasoactivos y el control del tono vascular. En condiciones normales existe un equilibrio entre la producción de sustancias vasodilatadoras (NO, prostaciclina, ...) y sustancias vasoconstrictoras (ET-1, Ang-II, norepinefrina, AVP, ...) Sin embargo, en condiciones patológicas este equilibrio se rompe y se decanta hacia la producción de vasoconstrictores, sobretudo ET-1, a la vez que disminuye la síntesis de vasodilatadores, sobretudo NO. Al efecto producido por el desequilibrio de agentes vasoactivos intrahepáticos hay que sumar el efecto derivado del incremento en el flujo portal que es el resultado de una marcada vasodilatación arterial en los órganos espláncnicos que drenan hacia el sistema venoso portal (Rockey, 2003).

### **4.2 CIRCULACIÓN HIPERDINÁMICA**

La vasodilatación espláncnica causa una disminución en las resistencias vasculares sistémicas y por consiguiente, una disminución en el volumen arterial efectivo, el cual estimula a nivel renal la reabsorción tubular de sodio y agua, resultando en la expansión del volumen plasmático. A nivel venoso, existe una

dilatación y un aumento de la capacidad vascular total como adaptación al aumento de la volemia. En esta fase inicial de la cirrosis, la homeostasis circulatoria se mantiene por el desarrollo de una circulación hiperdinámica, que se caracteriza por un aumento en el gasto cardíaco y la frecuencia cardíaca, además de una disminución en las resistencias vasculares periféricas. Con la progresión de la enfermedad hepática y de la vasodilatación esplácnica, disminuye la presión arterial y el volumen sanguíneo central, y como consecuencia la circulación hiperdinámica es insuficiente para mantener la homeostasis circulatoria. La hipovolemia, mediante un reflejo de los baroreceptores, activa los sistemas vasoactivos hormonales (sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nervioso simpático e hipersecreción no osmótica de hormona antidiurética) con carácter homeostático para mantener la presión arterial (Schrier et al., 1988).

**Tabla 1.** Alteraciones hemodinámicas en la cirrosis

<p><i>1. Circulación hepática:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Aumento de la resistencia intrahepáticas del flujo portal.</li><li>b. Disminución de la distensibilidad sinusoidal.</li><li>c. Incremento de la producción de vasoconstrictores.</li><li>d. Disminución intrahepática de óxido nítrico.</li></ul>
<p><i>2. Circulación esplácnica:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Aumento de la presión en el sistema venoso portal.</li><li>b. Vasodilatación de arteriolas espláncnicas</li><li>c. Aumento en el flujo de la vena porta.</li><li>d. Aumento de la presión intestinal capilar.</li><li>e. Desarrollo de la circulación portocolateral.</li></ul>
<p><i>3. Circulación sistémica:</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Disminución del volumen arterial efectivo.</li><li>b. Aumento del gasto cardíaco.</li><li>c. Disminución de la resistencia vascular sistémica.</li><li>d. Aumento de los sistemas vasoactivos endógenos (SNS, SRAA y ADH).</li><li>e. Disminución de la presión arterial sistémica.</li></ul>
<p>SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS, sistema nervioso simpático; ADH, hormona antidiurética.</p>

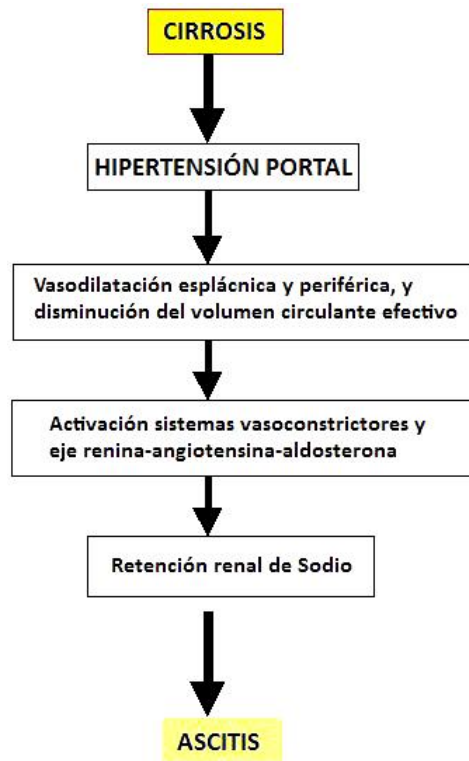
En la cirrosis avanzada, la disfunción circulatoria y la progresiva activación de los sistemas vasoactivos endógenos produce una alteración en diferentes territorios vasculares, afectando sobretodo la perfusión renal y pulmonar. Esto provoca una alteración en la filtración glomerular y en el intercambio de gases, respectivamente. Dichos fenómenos se conocen como síndrome hepatorenal y síndrome hepatopulmonar, y son dos de las principales causas de muerte en pacientes cirróticos (Arroyo and Jiménez, 2000).

## 5. FORMACIÓN DE ASCITIS

La ascitis se define como un exceso de líquido en la cavidad peritoneal, que en situaciones fisiológicas se cifra en sólo unos pocos centímetros cúbicos. La ascitis es, dentro de las descompensaciones mayores de una hepatopatía crónica evolucionada, la más frecuente. Aproximadamente el 50% de los pacientes con cirrosis compensada desarrollarán ascitis en un intervalo prospectivo de 10 años y la mitad de los pacientes con ascitis fallecerán en un plazo de 2 años.

El primer paso en la formación de ascitis consiste en el desarrollo del síndrome de hipertensión portal. En pacientes con cirrosis compensada, el grado de hipertensión portal y de vasodilatación esplácnica es moderado. En esta situación, el hecho de no poder llenar la vasculatura arterial se compensa con un incremento del volumen plasmático y del gasto cardíaco (Arroyo et al., 1988). Una vez que este estado empeora, el índice cardíaco y el volumen plasmático ya no pueden compensar las consecuencias de la vasodilatación esplácnica. Los mecanismos fisiológicos compensatorios se activan a través de los receptores de presión y volumen corporales posibilitando la retención renal de sodio y agua. Esta retención se produce mediante la actuación de distintos sistemas neuro-hormonales como la secreción de la hormona antidiurética, la activación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Dada la vasodilatación periférica, el fluido retenido es insuficiente para llenar el árbol vascular arterial, y el mecanismo se perpetúa y agrava (Arroyo and Jiménez, 2000). El exceso de líquido se escapa del compartimento

intravascular, debido a que existe un aumento de la permeabilidad vascular (Melgar-Lesmes et al., 2009) y a que el sistema linfático es incapaz de reabsorber este exudado. La consecuencia final de ambos desórdenes es el paso continuo de líquido a la cavidad abdominal y la formación de ascitis (Arroyo and Jiménez, 2000).



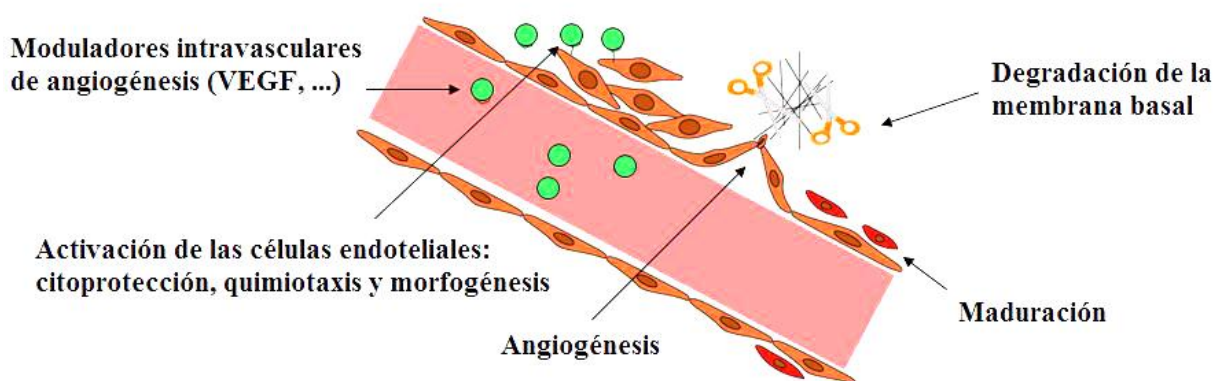
**Figura 5.** Fisiopatología de la formación de ascitis

La ascitis en los pacientes cirróticos está formada principalmente por sal, agua, cantidades variables de albúmina y globulina, y un relativamente bajo número de células mesoteliales y leucocitos. Debido a su simple composición, clásicamente se consideraba que la presencia de ascitis tenía poca o ninguna influencia en la red vascular peritoneal. Sin embargo, dicha afirmación ha sido puesta en duda en los últimos años, ya que se ha demostrado que la ascitis posee actividad proangiogénica en modelos *in vivo* y contiene gran número de citoquinas proinflamatorias, agentes vasoactivos y proteínas de la matriz extracelular. De hecho, algunos de dichos factores convierten a la ascitis en un fluido con propiedades vasodilatadores, proinflamatorias y proangiogénicas. Por lo tanto, la ascitis es un fluido bioactivo que puede contribuir a cronificar el proceso de extravasación vascular una vez que éste se ha iniciado (Morales-Ruiz et al, 2005).

## ANGIOGÉNESIS

### 1. ASPECTOS GENERALES

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sin la participación de los precursores endoteliales. Aunque los vasos formados por angiogénesis suelen ser principalmente capilares, en algunos modelos animales se ha observado que se pueden llegar a formar vasos de mayor tamaño (Carmeliet, 2005; Morales-Ruiz and Jiménez, 2005). Es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo también es un proceso fundamental en muchas patologías, como en la cirrosis, la artritis, la leucemia, la degeneración macular o en la transformación maligna del crecimiento tumoral. Como en cualquier otro proceso fisiológico, existe un estrecho equilibrio entre los agentes que colaboran para llevar a cabo la generación de un nuevo vaso sanguíneo a partir de uno ya existente. Algunos de estos factores se comportan como desestabilizadores de la estructura basal, volviéndola más elástica, para permitir la migración y proliferación de las células endoteliales de manera direccionada, o polarizada, hacia aquellas regiones que necesitan riego sanguíneo. Estos agentes proangiogénicos, juntos con otros factores, reclutarán finalmente células alrededor del vaso formado (pericitos) para estabilizar la nueva estructura.



**Figura 6.** Mecanismos básicos de formación de vasos



El hígado cirrótico experimenta un intenso proceso de angiogénesis en respuesta a la hipoxia tisular y al aumento de la resistencia intrahepática. Esto lleva a una disrupción de la arquitectura vascular hepática que acelera la progresión de la cirrosis, ya que aumenta la hipertensión portal y disminuye la perfusión de los hepatocitos. Por otra parte, la angiogénesis regula la formación de vasos colaterales e incrementa el flujo sanguíneo esplácnico. Complicaciones comunes en el progreso de la cirrosis (Morales-Ruiz and Jiménez, 2005; Tugues et al., 2007; Fernández et al, 2008).

## **2. FACTORES PROANGIOGÉNICOS**

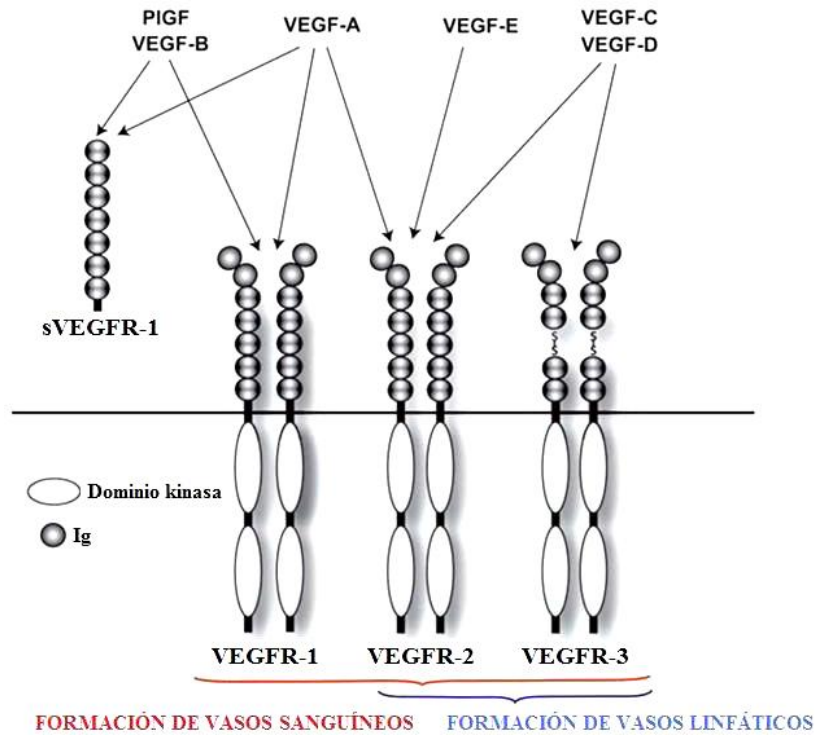
### **2.1 LA FAMILIA DE VEGF Y SUS RECEPTORES**

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína señalizadora con un gran potencial inductor de formación de vasos sanguíneos, tanto durante el desarrollo embrionario (vasculogénesis) como en el crecimiento de vasos nuevos en el adulto (angiogénesis). Además, promueve angiogénesis en los procesos de inflamación crónica, cicatrización y en tumores. VEGF es secretado por muchas células del mesénquima y del estroma, induce la migración de células precursoras endoteliales a partir de la médula ósea, y estimula la proliferación y diferenciación de estas células en los sitios de angiogénesis. Cuando la angiogénesis se origina a partir de vasos preexistentes (y no a partir de células precursoras), VEGF estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando la gemación de nuevos capilares. La familia de VEGF es esencial para los procesos de diferenciación, proliferación y quimiotaxis en la vasculogénesis, angiogénesis fisiológica y patológica, y en la linfangiogénesis. La importancia de la función de este sistema en el organismo se ejemplifica en que la pérdida de un solo alelo del gen VEGF o de alguno de sus receptores causa defectos vasculares embrionarios letales (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Ferrara et al., 2003; Holmes et al., 2007).

La familia de VEGF incluye a diferentes miembros: VEGF-A (existen 5 isoformas diferentes), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (del virus huérfano parapox), VEGF-F (del veneno de serpiente) y el factor de crecimiento placentario (PlGF), los cuales se unen a

distintos receptores tirosina quinasa desencadenando funciones biológicas únicas: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). Estos receptores están localizados en células endoteliales pero también en otros tipos celulares. El más importante en angiogénesis es el eje VEGF-A/VEGFR-2. La unión ligando-receptor produce la dimerización del receptor y su activación mediante transfosforilación, aunque en residuos aminoacídicos, momentos e intensidades diferentes (Ferrara et al., 2003; Holmes et al., 2007).

Los receptores de VEGF tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios similares a inmunoglobulinas, una única región transmembrana, y una región intracelular que contiene un dominio tirosina quinasa escindido. VEGF-A se une a VEGFR-1 y VEGFR-2. VEGFR-2 parece mediar casi todas las respuestas celulares conocidas de VEGF. VEGFR-1 tiene un papel muy importante durante el desarrollo de angiogénesis patológica, además se piensa que también podría modular la función de VEGFR-2, secuestrando VEGF para evitar su unión con VEGFR-2 (esto parece ser especialmente importante durante la vasculogénesis en el embrión). Existe una forma soluble de VEGFR-1 (sVEGFR-1) que podría funcionar como inhibidor natural de VEGF-A, ya que sólo contiene el dominio extracelular de VEGFR-1, sin el dominio tirosina quinasa. VEGF-C y VEGF-D, pero no VEGF-A, son ligandos del tercer receptor (VEGFR-3), que en condiciones normales se expresa sólo en células endoteliales linfáticas y media la linfangiogénesis. Sin embargo, VEGFR-3 está sobreexpresado en diferentes tipos de tumores, tanto vasculares como no vasculares, y en dichas condiciones también regula la angiogénesis. En algunos casos, neurofilinas, proteoglicanos heparan-sulfato, caderinas y la integrina  $\alpha v \beta 3$  sirven como correceptores para algunos miembros de la familia VEGF (Matsumoto and Claesson-Welsh, 2001).



**Figura 7.** Esquema de la familia de VEGF y sus receptores (Figura adaptada de Morales-Ruiz and Jiménez, 2005)

La expresión de VEGF se encuentra altamente regulada, principalmente a nivel transcripcional. En este sentido, la hipoxia es uno de los principales estimulantes de la síntesis de VEGF, tanto por la estimulación directa del promotor del gen como por estabilización del RNAm (Yla-Herttuala et al., 2007).

## 2.2 PIGF

El factor de crecimiento placentario (PIGF) es un miembro de la familia de VEGF y un ligando específico del receptor VEGFR-1. Se descubrió en 1991, dos años después de la identificación de VEGF, y se aisló originariamente de placenta humana (Maglione et al., 1991). El transcrito humano de PIGF genera 4 isoformas que difieren en tamaño y en afinidad de unión al receptor: PIGF-1 (131 aminoácidos), PIGF-2 (152 aminoácidos), PIGF-3 (203 aminoácidos) y PIGF-4 (contiene la misma secuencia que PIGF-3 pero además tiene el dominio de unión a heparina de PIGF-2). La única isoforma presente en roedores es PIGF-2 (DiPalma et al., 1996).

PlGF tiene acción sobre varios tipos celulares y está implicado en multitud de respuestas biológicas. Esta citoquina actúa principalmente sobre las células endoteliales estimulando el crecimiento y la maduración de los vasos (Ziche et al., 1997; Yonekura et al., 1999; Carmeliet et al., 2001), pero también estimula la proliferación de los fibroblastos, regula la capacidad contráctil de las células musculares lisas que recubren el endotelio (Bellik et al., 2005) y está implicada en el reclutamiento de macrófagos (Selvaraj et al., 2003). Sin embargo, la capacidad proangiogénica de PlGF en condiciones fisiológicas es menor que la de VEGF y la presencia de PlGF no es necesario para el mantenimiento de la quiescencia vascular en órganos sanos. De hecho, la expresión de PlGF es prácticamente indetectable en la mayoría de tejidos sanos, por el contrario, la sobreexpresión de PlGF se ha asociado a diferentes situaciones de angiogénesis patológica (Autiero et al., 2003; Van Steenkiste et al., 2009). Los estímulos que inducen la sobreexpresión de PlGF en condiciones patológicas son múltiples, incluyendo la hipoxia, factores de crecimiento, hormonas u oncogenes. Estudios recientes en ratones transgénicos deficientes en PlGF demostraron que PlGF ejerce su función únicamente en condiciones patológicas. Los ratones deficientes para PlGF no mostraron ningún fenotipo anormal aparente, indicando que PlGF no es indispensable para el desarrollo y la homeostasis vascular. Sin embargo, estos ratones presentaron una lenta recuperación después de inducirles infarto de miocardio y defectos en la formación de vasos colaterales en respuesta a una isquemia inducida en las extremidades (Carmeliet et al., 2001).

Debido a su efecto pleiotrópico, existen patologías caracterizadas por una deficiencia de PlGF y en las que la terapia con PlGF consigue mejorar la enfermedad, como por ejemplo en el infarto de miocardio (Luttun et al., 2002; Roncal et al. 2008) o en la isquemia cerebral (Liu et al., 2006). En otras patologías en cambio, es el bloqueo de la actividad de PlGF el que consigue mejorar la enfermedad, como pasa en el edema ocular (Van de Veire et al., 2010), el enfisema pulmonar (Cheng et al., 2009), la cirrosis hepática (Van Steenkiste et al., 2011) o en distintos tipos de cáncer (Van de Veire et al., 2010; Rolny et al., 2011). En este contexto, se ha demostrado que en contraposición con los inhibidores clásicos de VEGF, los anticuerpos monoclonales contra PlGF reducen la angiogénesis patológica en varios tipos de cáncer y en otros modelos de

enfermedades, sin afectar a la vasculatura sana y sin mayores efectos secundarios ni en ratones ni en humanos (Fischer et al., 2007).

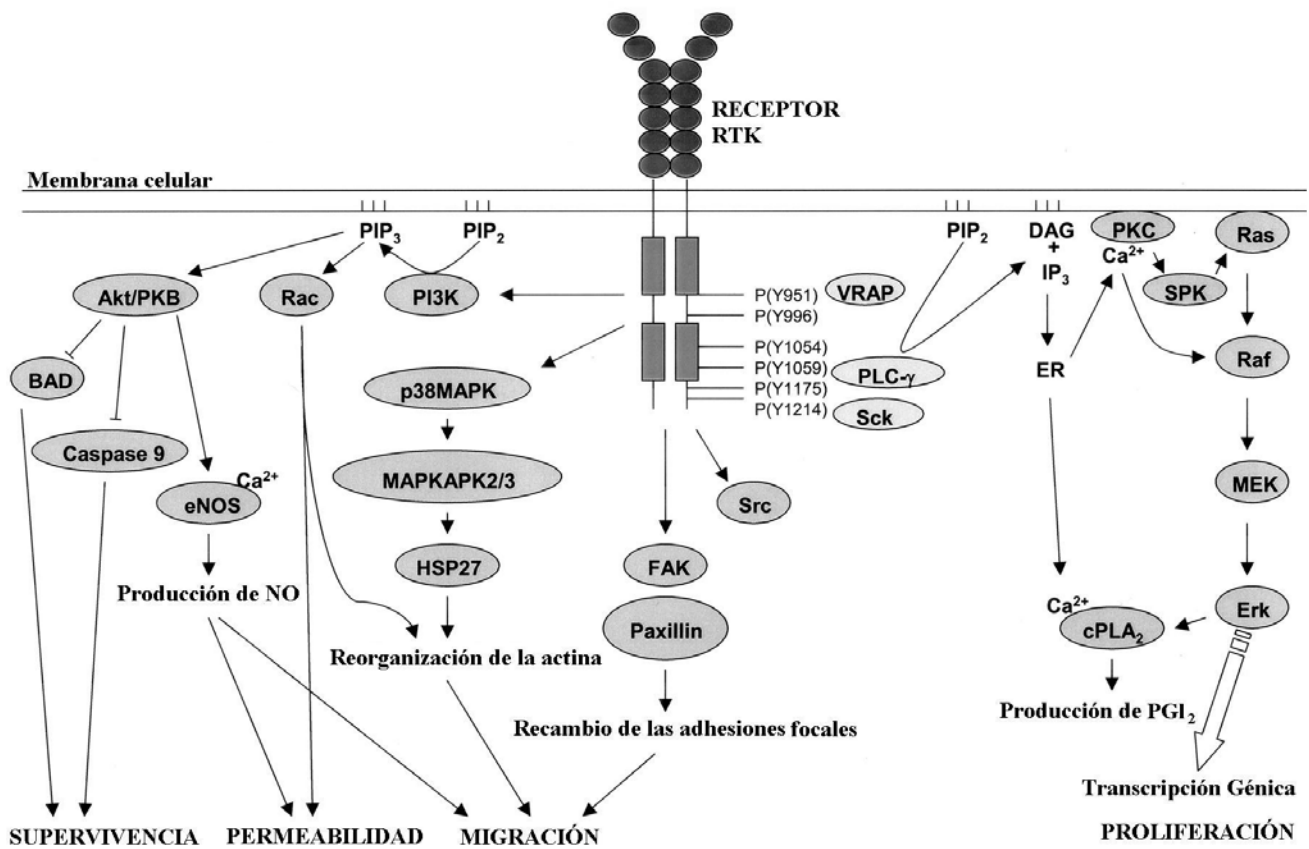
### 2.3 PDGF

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es uno de los numerosos factores de crecimiento que regulan el crecimiento y la división celular, sobre todo en células mesenquimales. Existen cinco isoformas diferentes de PDGF (A, B, C, D y el heterodímero AB) que activan la respuesta celular a través de dos receptores: el receptor alfa (PDGFRA) y el beta (PDGFRB), que se expresan principalmente en células endoteliales y células musculares lisas. El PDGF desempeña un rol significativo en el desarrollo embriogénico, proliferación celular, migración celular y en la angiogénesis (Heiradan et al., 1991).

Los receptores PDGFR pertenecen a la clase de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, dentro del grupo de receptores transmembrana. El PDGFR tipo alfa se une al PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB mientras el PDGFR tipo beta se une con alta afinidad al PDGF-BB y PDGF-AB. La vía de PDGF más implicada en angiogénesis es la activada por PDGF-BB y su receptor PDGFRB. Las células endoteliales liberan PDGF-BB y con ello estimulan el crecimiento, migración, supervivencia y diferenciación de las células mesenquimales que expresan PDGFRB, y las reclutan alrededor de los nuevos vasos estabilizándolos (Lindahl et al., 1997). PDGF-C i PDGF-D también promueven angiogénesis, pero su función en este proceso aun no está bien caracterizada.

### 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A RTKs

Las principales cascadas de señalización que se desencadenan en respuesta a la activación de los receptores tirosina quinasa son: i) la vía clásica de proliferación celular Ras-Raf-1-MEK-ERK (MAPK p42/p44), ii) vías de inducción de permeabilidad vascular como Src-PI3K-Akt-eNOS-VEcaderina, o PLC $\gamma$ -PKC-cAMP-PKA y iii) diferentes vías de migración celular como las GTPasas Cdc42 y Rac, FAK, la MAPK p38 o Src (Carmeliet et al., 1999; González et al., 2003; Alberts et al., 2004).



**Figura 8.** Vías de señalización activadas por receptores tirosina quinasa (Figura adaptada de Hoeben et al., 2004)

#### 4. ANGIOGÉNESIS E INFLAMACIÓN

Aunque la inflamación es un proceso crucial para defender nuestro organismo contra patógenos, cuando la respuesta inflamatoria perdura y se cronifica, aparecen efectos adversos que se intensifican con la activación de la angiogénesis. Hay muchas evidencias que demuestran que la inflamación crónica y la angiogénesis se pueden inducir por los mismos estímulos y que ambos procesos dependen uno del otro, ya que se han encontrado mecanismos moleculares compartidos por los dos (Costa et al., 2007). La inflamación crónica está relacionada con proliferación y migración celular, y con el reclutamiento de células inflamatorias que pueden llegar a ser extremadamente dañinas para el tejido. Muchos tipos celulares importantes durante los procesos inflamatorios liberan diferentes factores de crecimiento como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8 o IL-18, que estimulan la angiogénesis de manera directa sobre las células endoteliales (Ezaki et al., 2001).

Muchas enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por tener procesos de inflamación y fibrosis. El tejido inflamado/fibrótico ofrece resistencia al flujo sanguíneo y a la distribución de oxígeno, cosa que provoca que el tejido se vuelva hipóxico. Esto estimula la expresión de factores proangiogénicos inducibles por hipoxia y el crecimiento de nuevos vasos. Los macrófagos y las células T, por ejemplo, producen gran cantidad de factores angiogénicos bajo condiciones de hipoxia, como VEGF. Además las células T activadas expresan VEGFR-2, de manera que ellas mismas pueden responder a VEGF aumentando la síntesis de IFN- $\gamma$  (activador de macrófagos) e inhibiendo la secreción de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) (Mor et al., 2004).

Los mediadores de inflamación pueden promover, directa o indirectamente, angiogénesis. Y la angiogénesis, a su vez, contribuye a la inflamación. Los nuevos vasos mantienen el estado crónico de inflamación transportando células inflamatorias al tejido inflamado y aportándole nutrientes y oxígeno. Además, el incremento de la superficie endotelial conlleva un gran aumento de la producción de citoquinas, moléculas de adhesión y otros estímulos proinflamatorios (Jackson et al., 1997). Estas observaciones han llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra la angiogénesis y la inflamación crónica.

---

## 5. TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS

Las terapias antiangiogénicas están dirigidas en su mayoría al tratamiento del cáncer. En este caso, la angiogénesis no inicia la enfermedad, pero si promueve la progresión tumoral y la metástasis. Por ello se propuso que inhibir la angiogénesis podría ser un tratamiento antitumoral efectivo. Además, las células endoteliales no son como las células tumorales, son genómicamente estables y se consideran ideales como dianas terapéuticas no resistentes a la terapia antiangiogénica (Ferrara and Alitalo, 1999).

VEGF y sus receptores son la principal diana de las terapias antiangiogénicas clásicas. En el año 2004 fue aprobado por la FDA el anticuerpo monoclonal humano anti-VEGFA, llamado Bevacizumab, que se une de manera específica a VEGF y ha demostrado tener importantes beneficios clínicos en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Otros anticuerpos dirigidos contra los receptores de VEGF también han demostrado tener efectos antiangiogénicos, como el anticuerpo específico de VEGFR-2 DC101 (Prewett et al., 1999). Una manera de incrementar el efecto consiste en actuar no sólo sobre la vía de VEGF, sino también inhibiendo el reclutamiento de las células murales bloqueando los receptores de PDGF (Erber et al., 2004). En los últimos años se han desarrollado gran cantidad de pequeñas moléculas sintéticas con capacidad antiangiogénica dirigidas a bloquear de manera múltiple los receptores tirosina quinasa. Las más importantes son: Vatalanib, Sunitinib, Sorafenib y Pazopanib.

Sin embargo, estos tratamientos antiangiogénicos clásicos se han asociado a graves efectos adversos, ya que VEGF no sólo actúa en la formación de nuevos vasos, también es importante en la hematopoyesis, mielopoyesis y en la supervivencia de las células endoteliales. VEGF es necesario en la coagulación, en la cicatrización de heridas, activa a la célula endotelial para que produzca NO, regula parte de la función renal, está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis de la piel, en la maduración de las células dendríticas del sistema inmunitario, etc. De manera que el bloqueo de la actividad de VEGF bloquea múltiples vías de una gran importancia biológica. De entre los diferentes efectos secundarios asociados a las terapias antiangiogénicas clásicas destacan: sangrado, disminución de la densidad vascular en



órganos sanos, trombosis, hipertensión, hipotiroidismo, fatiga, proteinuria, edema, toxicidad en la piel, linfopenia y leucopenia (Wu et al., 2008).

## EL ÓXIDO NÍTRICO

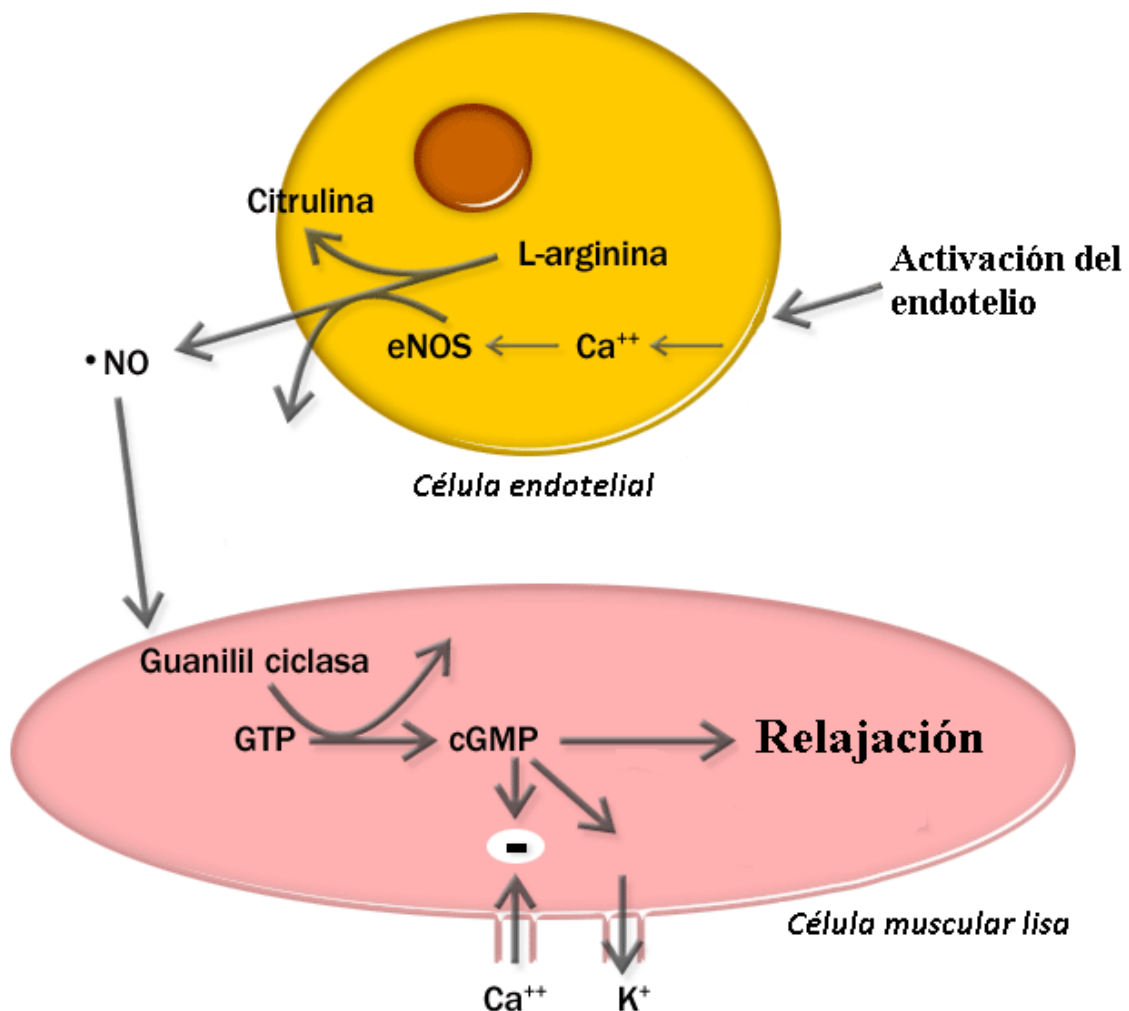
### 1. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES GENERALES

El óxido nítrico es un gas biológicamente activo, incoloro y poco soluble en agua presente en pequeñas cantidades en los mamíferos. Es una molécula altamente inestable en el aire, ya que presenta un electrón desapareado en su configuración electrónica, con lo se oxida rápidamente en presencia de oxígeno convirtiéndose en dióxido de nitrógeno. Por esta razón se la considera también un radical libre. En el cuerpo, tiene una vida media de sólo unos pocos segundos, en gran parte porque el anión superóxido ( $O_2^-$ ) tiene gran afinidad por él y reduce su biodisponibilidad. También se une al grupo hemo de la hemoglobina (en los glóbulos rojos) y al grupo hemo del enzima guanilato ciclasa, que se encuentra en muchos tipos celulares, como las células musculares lisas vasculares (Moncada et al., 1991).

El NO es producido por una amplia variedad de tipos celulares que incluyen células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias. La magnitud y la duración de la síntesis de NO por las células determina que su acción sea fisiológica o patológica. Las acciones fisiológicas son mediadas por pulsos de pequeñas cantidades de NO. Las actividades patológicas son el resultado de la producción sostenida de altos niveles de NO. En las neuronas puede funcionar como neurotransmisor, atravesando fácilmente las membranas celulares por su carácter lipófilo. Los macrófagos sintetizan NO para destruir los microorganismos que han sido fagocitados. Cuando es producido en las células endoteliales de los vasos sanguíneos induce vasodilatación. La activación del endotelio por el estrés de cizalla o por la activación de receptores por parte de agonistas, induce un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular. Este incremento estimula la producción de NO, que funciona como regulador paracrino; difunde desde la célula de origen hasta el interior de las células musculares lisas adyacentes, donde induce la producción de GMPc (guanosin monofosfato cíclico) por su unión al grupo hemo de la

enzima guanilato ciclasa soluble. El GMPc a su vez actúa como segundo mensajero en muchas funciones celulares, sobretodo en la relajación de la musculatura produciendo vasodilatación. Esto lo hace a través de diferentes mecanismos (Murad, 2006; Klabunde, 2008):

1. El incremento intracelular de GMPc inhibe la entrada de calcio a la célula.
2. Activa canales de potasio, lo que conlleva una hiperpolarización y relajación.
3. Estimula la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) que activa un enzima que desfosforila las cadenas ligeras de miosina, lo que lleva a la relajación de la célula muscular.



**Figura 9.** Generación de NO y efecto sobre las células musculares lisas

## 2. SINTASAS DEL ÓXIDO NÍTRICO

La síntesis de NO se realiza por acción de una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS), a partir del aminoácido L-arginina y requiriendo la presencia de un cofactor (específicamente, una coenzima, la nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido o nad-fosfato reducido (NADPH)) y de oxígeno. Los productos de la acción de NOS son NO y L-citrulina. Existen tres isoformas distintas de NOS, dos constitutivas y dependientes de calcio (cNOS): la endotelial (eNOS, NOS3) y la neuronal (nNOS, NOS1), que sintetizan NO en condiciones normales. Y una isoforma inducible e independiente de calcio (iNOS, NOS2), que no se expresa, o lo hace muy débilmente, en condiciones fisiológicas (Knowles and Moncada, 1994; Lamas et al., 1992).

**Tabla 2.** Clasificación de los diferentes tipos de sintasas de NO

Nombre	Gen	Ubicación	Función
NOS <i>neuronal</i> (nNOS o NOS1)	NOS1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tejido nervioso</li> <li>• Músculo esquelético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comunicación celular</li> </ul>
NOS <i>inducible</i> (iNOS o NOS2)	NOS2A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema inmune</li> <li>• Sistema cardiovascular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defensa inmune contra patógenos</li> </ul>
NOS <i>endotelial</i> (eNOS, NOS3)	NOS3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotelio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatación</li> </ul>

NOS es una de las enzimas más reguladas en la biología. Las NOS constitutivas responden a agonistas que elevan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la unión de la calmodulina a la NOS, que produce una activación transitoria de la enzima con síntesis de cantidades picomolares ( $10^{-12}$  M) de NO. Las enzimas constitutivas son sensibles a quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y a inhibidores de la calmodulina y son sintetizadas en forma continua. La fosforilación también regula la actividad de estas isoformas, en humanos eNOS es fosforilada en la Ser<sup>1177</sup> por la proteína quinasa Akt, incrementando su actividad (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999). Sin embargo, la fosforilación de nNOS en la Ser<sup>847</sup> por quinasas dependientes de calmodulina reduce su actividad (Alderton et al., 2001). En contraste con las isoformas constitutivas, la activación de la

NOS inducible es a nivel transcripcional. Los macrófagos, células prototípicas de la NOS inducible, comienzan a producir NO varias horas después de la estimulación con citoquinas. Después de la transcripción del gen y la expresión de la proteína, los macrófagos activados producen cantidades nanomolares ( $10^{-9}$  M) de NO durante días, hasta que la enzima es degradada por proteólisis. Los dos tipos de NOS pueden coexistir en la misma célula. Las células endoteliales, por ejemplo, liberan NO por un tiempo prolongado en respuesta a TNF-alfa y sólo brevemente cuando son estimuladas con un agonista de  $Ca^{2+}$  (Busconi et al., 1993).

### 3. INHIBIDORES DE LAS NOS

Los inhibidores de las NOS han sido esenciales para evaluar el rol del NO en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos. La mayoría de ellos son análogos de la L-arginina o contienen un grupo guanidínico (como la aminoguanidina). Los más utilizados son la  $N^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA), la  $N^G$ -nitro-L-arginina (L-NOArg) y su metil éster (L-NAME) y la N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO). Estos compuestos inhiben por competición con el sustrato, la L-arginina, uniéndose ellos al centro activo de la enzima inactivándola (Alderton et al., 2001). Cabe destacar que la potencia de estos inhibidores no es la misma frente a todas las isoenzimas (Rees et al., 1990).

**Tabla 3.** Inhibidores de las NOS

INHIBIDOR	SELECTIVIDAD
L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS
L-NOArg	nNOS > eNOS >> iNOS
L-NAME	nNOS > eNOS > iNOS
L-NIO	iNOS > nNOS > eNOS
Aminoguanidina	iNOS >> nNOS > eNOS

#### 4. PAPEL FISIOPATOLÓGICO DEL NO EN LA CIRROSIS

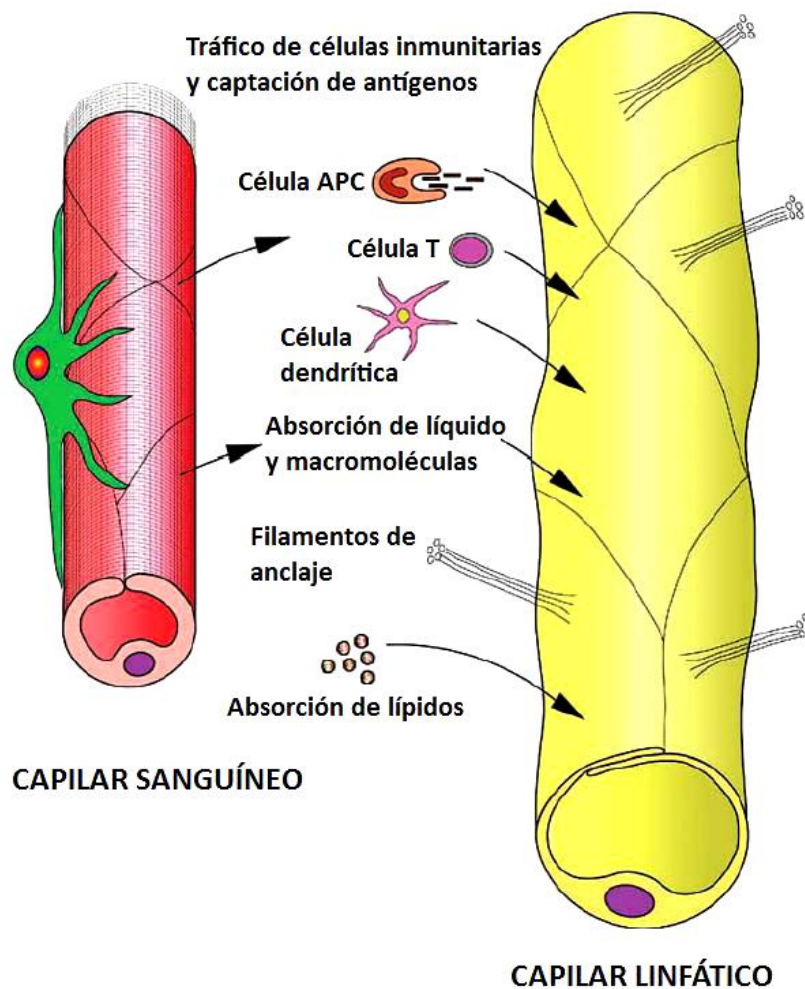
eNOS es una enzima extremadamente importante en el hígado y durante todo el proceso cirrótico. En condiciones normales, las células endoteliales hepáticas aumentan su producción de NO en respuesta a un incremento del flujo para disminuir la presión de perfusión intrahepática (Shah et al., 1999). Sin embargo, la producción de NO en el hígado cirrótico es muy reducida. La actividad de eNOS disminuye un 75% (Rockey et al., 1998), dando lugar a una vasoconstricción sinusoidal y a un aumento de la presión de perfusión en respuesta al incremento progresivo de flujo y al estrés celular. Al contrario de lo que se podría pensar, las células endoteliales de ratas cirróticas tienen igual cantidad de RNAm y de proteína eNOS que las de animales controles, sugiriendo un control postraduccional de la actividad de la enzima (Gupta et al., 1998). Por ejemplo, las células endoteliales de hígados cirróticos presentan un aumento en la expresión y en la interacción de Cav-1 con eNOS, cosa que impide que la enzima se una a la calmodulina (Hendrickson et al., 2003). También se ha demostrado que los hígados de animales cirróticos tienen una activación deficiente de la proteína quinasa Akt, lo que le impide fosforilar a eNOS y, como consecuencia, disminuye su actividad (Morales-Ruiz et al., 2003).

Contrariamente a lo que ocurre en la microcirculación hepática, los niveles de NO en la circulación esplácnica o sistémica están aumentados. Diversos estudios han demostrado que la actividad de eNOS está incrementada en los vasos sanguíneos de ratas cirróticas (Ros et al., 1995). Este exceso en la actividad de eNOS provoca una vasodilatación arterial y un remodelado vascular (Fernández-Varo et al., 2003), además del desarrollo del síndrome de circulación hiperdinámica que lleva a las graves complicaciones asociadas a la cirrosis y a otras enfermedades hepáticas crónicas (Langer and Shah, 2006). Una manifestación clásica de esta vasodilatación arterial es la hiporeactividad arterial a los vasoconstrictores (Sieber et al., 1993). Además, la inhibición de la síntesis de NO corrige, en parte, la hemodinámica esplácnica y sistémica en diferentes modelos experimentales de cirrosis (Clària et al., 1992).

## EL SISTEMA LINFÁTICO

### 1. ASPECTOS GENERALES

El sistema linfático es un sistema paralelo al sistema circulatorio sanguíneo cuya función principal es la de mantener la homeostasis de fluidos en los tejidos, recogiendo el líquido que se acumula en los espacios intersticiales y devolviéndolo a la circulación sanguínea (Jurisic and Detmar, 2009). Los vasos encargados de recoger el fluido extravasado son los vasos terminales de la red linfática, o capilares linfáticos, que devuelven su contenido a la sangre a través del gran vaso linfático colector a nivel del conducto torácico (Karpanen et al., 2008).



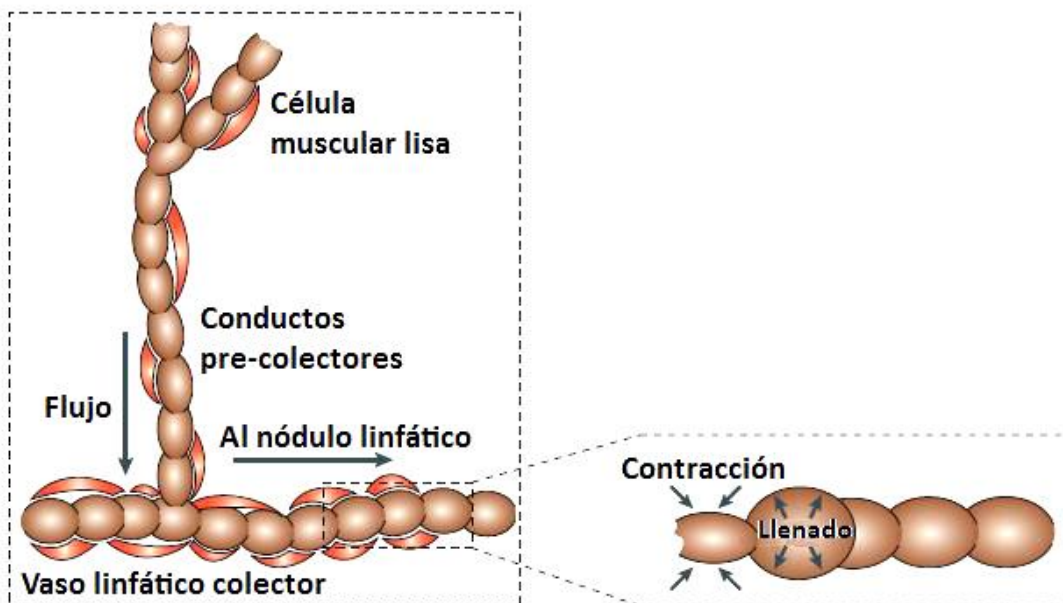
**Figura 10.** Funciones de la vasculatura linfática (Figura adaptada de Pepper and Skobe, 2003)

Además de su función principal como sistema de drenaje, el sistema linfático también forma parte del sistema inmunitario del cuerpo. Los vasos linfáticos transportan células dendríticas, células T, macrófagos, células presentadoras de antígeno (células APC) y antígenos, desde los espacios periféricos hasta los nódulos linfáticos donde se inicia la respuesta inmune (Olszewski, 2005). Por último, los vasos linfáticos también son esenciales para la absorción de los ácidos grasos de cadena larga ingeridos en la dieta, como las vitaminas solubles A, D, E y K, así como de los compuestos lipofílicos liberados en el intestino en forma de quilomicrones (Bruyère and Noël, 2010).

## 2. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO

La red linfática está compuesta por capilares linfáticos y por vasos linfáticos colectores. Los capilares linfáticos están formados por una fina capa de células endoteliales linfáticas, sin membrana basal y rodeados por muy pocos pericitos, que se anclan a la matriz extracelular a través de filamentos de fibrilina (Gerli et al., 2000). Este anclaje a la matriz permite que los capilares se abran cuando la presión aumenta debido al fluido intersticial, permitiendo el paso del líquido hacia el vaso (Schmid-Schönbein, 1990). El flujo linfático es unidireccional, desde los capilares hasta el gran vaso linfático colector del conducto torácico, que vacía su contenido en la vena cava inferior (Cueni and Detmar, 2006). Los vasos linfáticos colectores difieren de los capilares en diversos aspectos. Tienen un diámetro mayor, están recubiertos por una capa de células musculares lisas y, a intervalos regulares, tienen un sistema de válvulas internas que impiden el retroceso del contenido linfático, asegurando así un flujo unidireccional (Schmid-Schönbein, 1990). Los segmentos de vaso comprendidos entre dos válvulas se llaman linfangiones y se contraen secuencialmente. A lo largo de los vasos linfáticos colectores se encuentran los nódulos linfáticos, unas estructuras especializadas donde los sistemas circulatorio y linfático se comunican. En los nódulos linfáticos se almacenan los glóbulos blancos, más concretamente los linfocitos, que interaccionarán con los antígenos capturados por el sistema linfático en los espacios intersticiales de los tejidos para iniciar la respuesta inmune (Fu and Chaplin, 1999).

El sistema linfático carece de órgano muscular propulsor, a diferencia del sistema cardiovascular que tiene al corazón, de manera que el transporte linfático está promovido por diferentes fuerzas extrínsecas e intrínsecas. Entre las fuerzas extrínsecas predominan la contracción del músculo esquelético, la respiración, o los movimientos peristálticos del intestino, todas ellas ayudan a bombear la linfa (Aukland and Reed, 1993; Ikomi and Schmid-Schönbein, 1996; Gashev and Zawieja, 2001; Schmid-Schönbein, 1990). En cuanto a las fuerzas intrínsecas implicadas en el transporte linfático, la capacidad contráctil de las células musculares lisas de los vasos linfáticos colectores se ha propuesto como el motor principal de la circulación linfática (Aukland et al., 1993). De entre los mecanismos moleculares que controlan esta contracción intrínseca, hay evidencias de que las células endoteliales linfáticas regulan la capacidad contráctil de las células musculares lisas de los vasos linfáticos colectores a través de la producción de óxido nítrico, y con ello controlan el flujo linfático (Hagendoorn et al., 2004).



**Figura 11.** Estructura y funcionamiento del sistema linfático  
(Figura adaptada de Randolph et al., 2005)



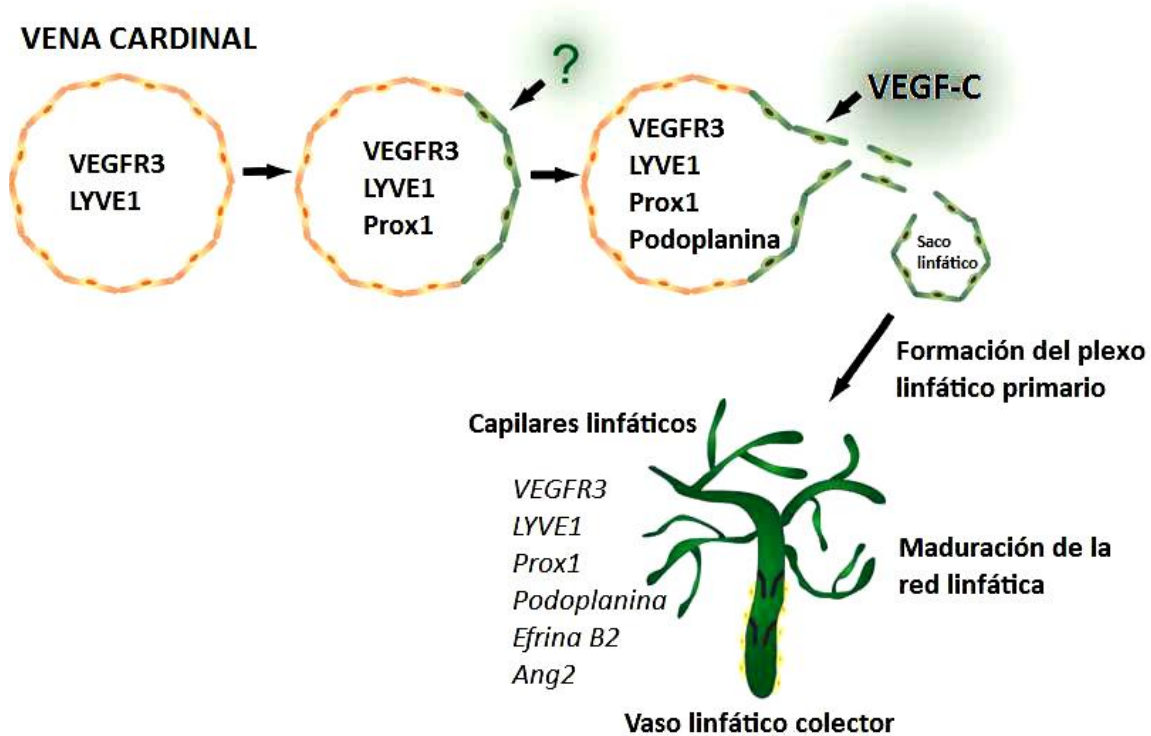
### 3. DESARROLLO DEL SISTEMA LINFÁTICO A PARTIR DEL SISTEMA SANGUÍNEO

Durante el desarrollo embrionario, los vasos sanguíneos se forman a partir de precursores endoteliales. Estos precursores forman un plexo primario, proceso conocido como vasculogénesis. Las células endoteliales empiezan a proliferar, este plexo se expande y se forma la red vascular (angiogénesis). A través del reclutamiento de células musculares lisas y de la especialización vascular, la red de vasos madura y se forma el sistema vascular sanguíneo, altamente organizado, compuesto por arterias, venas y capilares. Este proceso está regulado por gran cantidad de factores, de entre los cuales, VEGF y sus receptores son los que ejercen un control más importante (Carmeliet, 2005).

Posteriormente durante el desarrollo, se origina otro sistema vascular importante, el sistema linfático. Las células endoteliales linfáticas se diferencian a partir de células endoteliales venosas de la vena cardinal embrionaria durante las primeras etapas del desarrollo fetal. Primero se forman los sacos linfáticos, y a partir de ellos se desarrolla todo el sistema linfático periférico rodeando tejidos y órganos, donde se forman finalmente los capilares linfáticos (Sabin, 1902).

Durante las etapas más tempranas del desarrollo vascular, las células endoteliales de la vena cardinal embrionaria expresan dos marcadores linfáticos: LYVE1 y VEGFR3. La estimulación de estas células, por señales mesenquimales todavía desconocidas, induce la expresión del factor de transcripción Prox1 en una subpoblación de células endoteliales. Esta subpoblación está localizada en un lateral de la vena cardinal y es esencial para desencadenar el programa de diferenciación linfática (Wigle and Oliver, 1999). Estas células empiezan a proliferar y a migrar formando los primeros sacos linfáticos. Durante este proceso, se empiezan a expresar marcadores clásicos del linaje linfático necesarios para la formación de la red linfática madura. Entre estos genes destacan la podoplanina, efrina B2, neurofilina-2 y FoxC2 (Schacht et al., 2003). Se forman los capilares y los vasos linfáticos colectores, además del sistema de válvulas internas para impedir el retroceso de la linfa. El mantenimiento continuo de las señales inducidas por VEGFC también es importante para llevar a cabo todos estos procesos (Karpanen et al., 2006). Recientemente, se han descubierto

algunas moléculas adicionales que parecen tener una función importante durante este proceso. Por ejemplo, estudios en modelos de ratones knockout han demostrado que la adrenomedulina, conocida por su potente acción vasodilatadora, también tiene una importante función en el desarrollo linfático (Fritz-Six et al., 2008).



**Figura 12.** Desarrollo embrionario del sistema linfático (Figura adaptada de Jurisic and Detmar, 2009)

Aunque el sistema linfático tenga un origen venoso, se trata de un sistema totalmente independiente. Ambos sistemas están situados muy cerca en el espacio, uno al lado del otro, y teniendo en cuenta la activa angiogénesis y linfangiogénesis que hay durante el desarrollo o el remodelado de tejidos, es esencial que las dos vasculaturas permanezcan separadas para mantener su correcto funcionamiento. Existen algunos mecanismos destinados a evitar la conexión entre vasos sanguíneos y linfáticos, aunque es un campo del que todavía se sabe muy poco. Por ejemplo, las células endoteliales progenitoras expresan la proteína tirosina quinasa SYK y su substrato SLP-76, una vía destinada a mantener la integridad de los vasos linfáticos e impedir uniones entre ambas vasculaturas (Abtahian et al., 2003; Sebзда et al., 2006).

En este mecanismo también están implicados la podoplanina y el receptor CLEC-2 de las plaquetas. La podoplanina activa CLEC-2 y provoca la agregación plaquetaria, y este efecto lleva a la activación de SYK y SLP-76 (Christou et al., 2008; Suzuki-Inoue et al., 2007). Otra molécula que parece estar involucrada en la correcta separación de ambas vasculaturas es un factor adiposo llamado Fiaf. Estudios en ratones deficientes para este factor han demostrado que presentan una expresión muy reducida del marcador linfático Prox1 y unos vasos linfáticos llenos de sangre a nivel intestinal después del nacimiento (Backhed et al., 2007). También está demostrado que numerosas glicoproteínas regulan este proceso de separación entre los sistemas sanguíneo y linfático (Bischoff, 1997; Julenius et al., 2005).

#### 4. LA CÉLULA ENDOTELIAL LINFÁTICA

Las células endoteliales linfáticas, a diferencia de las sanguíneas, son células sin fenestraciones y sin membrana basal. Aun así, comparten gran cantidad de marcadores, como por ejemplo el factor VIII o factor de Von Willebrand, la antitrombina 3, MHC 1, el receptor LDL-R, CD31 o la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) (Sleeman et al., 2001). Sin embargo, con el paso de los años, se han ido descubriendo nuevos marcadores de superficie específicos de las células endoteliales linfáticas, los más estudiados son LYVE-1, VEGFR-3, podoplanina y el factor de transcripción Prox-1.

LYVE-1 es un homólogo del receptor de ácido hialurónico CD44 y está involucrado en el metabolismo de este ácido en el sistema linfático (Banerji et al., 1999). Es el primer marcador linfático que aparece durante el desarrollo. Se expresa en los capilares linfáticos y en células endoteliales linfáticas aisladas, sin embargo está ausente en los vasos linfáticos colectores (Banerji et al., 1999). En adultos, LYVE-1 no sólo se expresa en el endotelio linfático, también lo hace en los sinusoides hepáticos, en algunos vasos sanguíneos del pulmón y en tejidos con inflamación (Jackson, 2003).

VEGFR-3, también conocido como Flt4, es un receptor específico de los factores de crecimiento vascular linfático VEGF-C y VEGF-D (Tammela et al., 2005). Las señales de este receptor son esenciales para la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales linfáticas. Aunque su expresión es alta en la vasculatura sanguínea durante el desarrollo embrionario, con el avance de la gestación la expresión se va restringiendo gradualmente a las células endoteliales linfáticas (Kaipainen et al., 1995).

La podoplanina, también conocida como OTS-8, T1-alfa, gp36 o antígeno E11, es una glicoproteína de superficie esencial para establecer la diferenciación entre el sistema linfático y el sanguíneo. Está involucrada en la regulación de la permeabilidad de los vasos linfáticos, en el mantenimiento de su tamaño y también podría controlar la estructura de las válvulas internas. En adultos también se expresa en pulmón y en riñón, donde controla la permeabilidad glomerular (Podgrabinska et al., 2002).

Prox-1, a diferencia de los demás marcadores linfáticos, es un factor de transcripción que desencadena el programa de diferenciación linfática. Estudios en ratones deficientes en este gen han demostrado que la falta de Prox-1 no afecta al desarrollo de la vasculatura sanguínea, pero se inhibe totalmente la formación del sistema linfático. La expresión de este factor en adultos se reduce únicamente a la vasculatura linfática, de manera que comparado con otros marcadores, sería el marcador más específico y exclusivo de las células endoteliales linfáticas (Wigle and Oliver, 1999).

## 5. EL SISTEMA LINFÁTICO EN UN CONTEXTO PATOLÓGICO

La contribución de los vasos linfáticos en diferentes situaciones patológicas es un campo que ha permanecido inexplorado durante muchos años debido a la falta de marcadores específicos que permitieran distinguir el endotelio linfático del sanguíneo. Con el descubrimiento de los marcadores linfáticos, en los últimos años se han hecho gran cantidad de estudios y se han podido desarrollar modelos experimentales que han elucidado la contribución del endotelio linfático en muchas enfermedades. Actualmente se sabe que, en un contexto fisiopatológico, la vasculatura linfática está muy involucrada en enfermedades inflamatorias, en la metástasis de las células tumorales en el cáncer y en el crecimiento tumoral (Cassella et al., 2002; Detmar et al., 2002) y en la formación de edema (linfedema) (Alitalo et al., 2005).

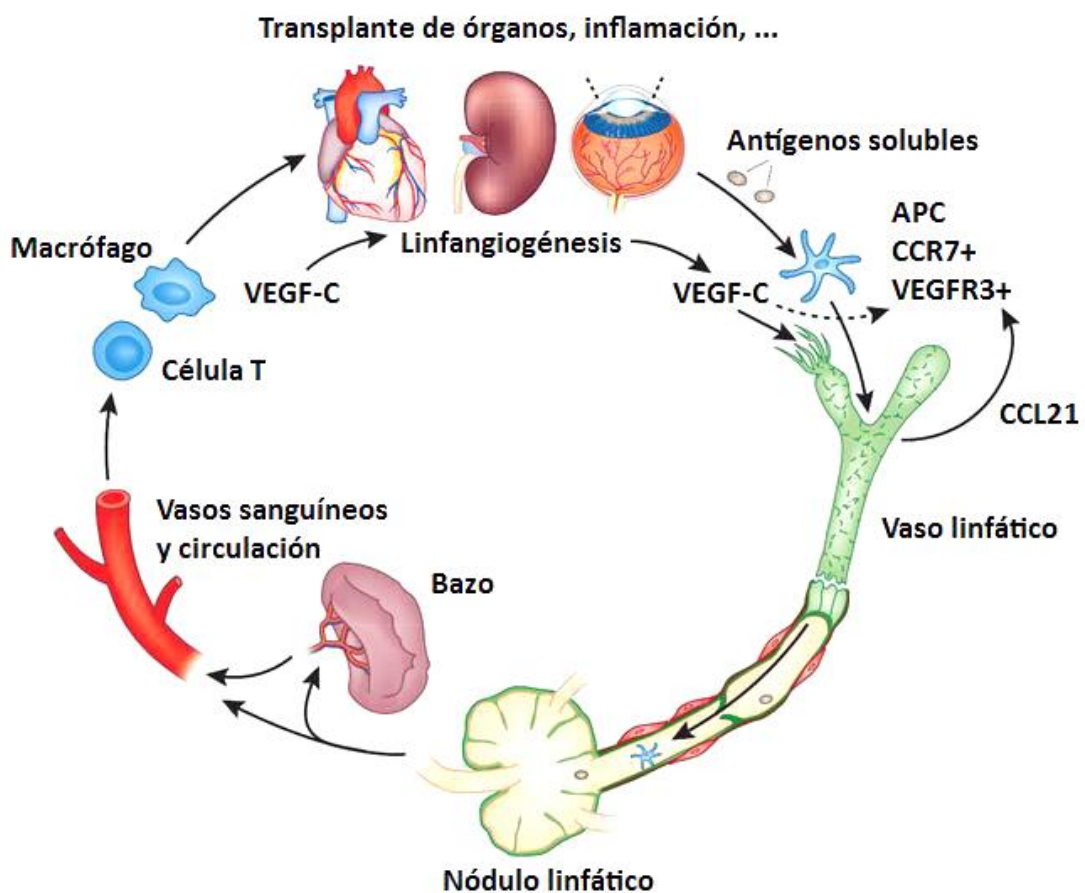
### 5.1 CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN LA INFLAMACIÓN

Los vasos linfáticos son esenciales para la migración de las células inmunitarias hacia los nódulos linfáticos donde se desencadena la respuesta inmune adaptativa (Halin and Detmar, 2006). Las señales inflamatorias activan la expresión de CCR7 en las células dendríticas, a la vez que la vasculatura linfática expresa de forma constitutiva su ligando CCL21, lo que provoca un proceso quimioatrayente de las células hacia los vasos (Bromley et al., 2005; Debes et al., 2005). CCR7 también media la migración de las células T CD4<sup>+</sup> de los tejidos a los vasos linfáticos (Yuan et al., 2002). La inflamación también induce la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en el endotelio linfático, que también facilitan la entrada de linfocitos a los vasos (Johnson et al., 2006). Además, los estímulos inflamatorios hacen aumentar el flujo de linfa, lo que promueve la migración de todas estas células hasta los nódulos linfáticos (Gunn et al., 1998).

Estudios recientes han demostrado que durante los procesos inflamatorios hay una activa linfangiogénesis (formación de nuevos vasos linfáticos) (Baluk et al., 2005). Esto se debe, en parte, a que las células inflamatorias expresan VEGF-C y VEGF-A, dos potentes factores linfangiogénicos (Ristimaki et al., 1998). La presencia de nuevos

vasos posibilita un mayor tráfico de células inflamatorias, estableciéndose así un circuito proinflamatorio. Sin embargo, parece ser que las acciones de VEGF-A y VEGF-C tienen efectos opuestos. Mientras que VEGF-A promueve la inflamación induciendo la formación de vasos linfáticos muy permeables y disfuncionales, VEGF-C activa el flujo linfático y resuelve el proceso inflamatorio (Halin et al., 2007; Kajiya et al., 2006).

Por último, el sistema linfático y la linfangiogénesis podrían contribuir al rechazo de órganos trasplantados, promoviendo la migración de células inflamatorias hacia el tejido (Kerjaschki et al., 2004).

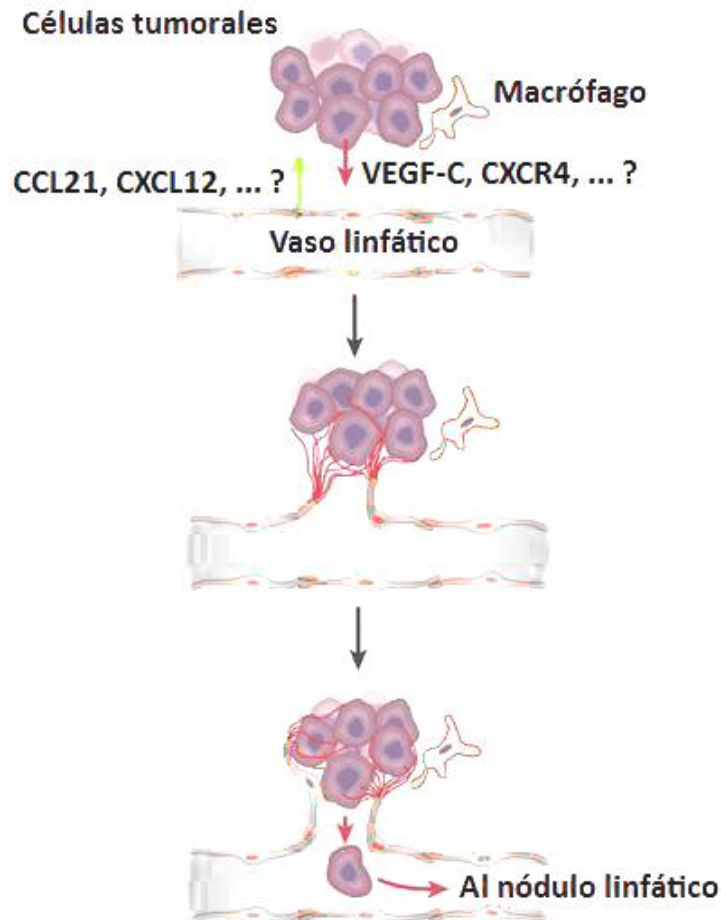


**Figura 13.** Función de los vasos linfáticos en los procesos inflamatorios (Figura adaptada de Alitalo, 2011)

## 5.2 CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL CÁNCER

El papel que tiene el sistema linfático durante los procesos tumorales no está claro. Parece ser que las células cancerosas pueden inducir linfangiogénesis, e incluso entrar pasivamente en los vasos linfáticos junto con el fluido intersticial y proteínas, y usarlos como vías de metástasis (Sleeman et al., 2009; Achen et al., 2008; Mumprecht et al., 2009). La metástasis de la mayoría de cánceres ocurre inicialmente a través de los vasos linfáticos. Existe una compleja relación entre la vasculatura linfática y las células tumorales. Las células endoteliales linfáticas atraen a las tumorales expresando la molécula de laminina-421 (Saito et al., 2009), de igual forma, las células tumorales pueden atraer a las linfáticas a través de la expresión de diferentes factores, como la angiopoyetina-1 (Holopainen et al., 2009). La formación de nuevos vasos linfáticos alrededor del tumor incrementa las probabilidades de que haya metástasis. Existen numerosos estudios en humanos que han demostrado que hay una correlación entre la expresión de VEGF-C en el tumor y la metástasis a los nódulos linfático (Stacker et al., 2002; Pepper et al., 2003).

Aunque un incremento de la densidad de la red linfática puede promover la diseminación tumoral incrementando las posibilidades pasivas de metástasis, los vasos linfáticos también tienen una implicación más activa en la metástasis. Por ejemplo, las células endoteliales linfáticas expresan constitutivamente factores solubles que facilitan la invasión de los vasos por parte de las células tumorales. La activación de las células linfáticas con VEGF-C u otros factores producidos por el tumor puede promover la expresión de quimioquinas, que podrían atraer a las células tumorales al interior de los vasos linfáticos. En este contexto, se ha encontrado que el receptor CXCR4, un receptor de quimioquinas, tiene una importancia crucial en la metástasis del tumor a los nódulos linfáticos. CXCR4 se ha encontrado sobreexpresado en el melanoma maligno y en los tumores cerebrales, mientras que su ligando CXCL12 está altamente expresado en los nódulos linfáticos (Muller et al., 2001).



**Figura 14.** Metástasis linfática del cáncer  
(Figura adaptada de Alitalo et al., 2005)

Los mecanismos por los que las células tumorales atraviesan el endotelio linfático no están claros. La teoría más aceptada es que pasan pasivamente entre las uniones intercelulares. Una nueva hipótesis sería que la entrada de las células tumorales requiere una interacción con las células linfáticas a través de moléculas de adhesión, pero no hay evidencias experimentales que demuestren esto. Se han identificado muy pocas moléculas de adhesión expresadas por el endotelio linfático. El perfil genético de las células endoteliales linfáticas ha demostrado que expresan genes que codifican para algunas moléculas de adhesión como desmoplaquina, placoglobina, placofilina 2 o H-caderina. Existe otra molécula de adhesión que se expresa en las tight junctions de los vasos linfáticos y facilita la trans migración de linfocitos. Se trata de JAM-2, una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. (Aurrand-Lions et al., 2001; Johnson-Leger et al., 2002). En este contexto, las células linfáticas también expresan el receptor de manosa I, que media la adhesión de los



linfocitos a los vasos linfáticos en los nódulos linfáticos (Irjala et al., 2001), y se ha propuesto que esto podría controlar la salida estas células de los vasos a los nódulos o a otros tejidos periféricos (Petrova et al., 2002; Podgrabinska et al., 2002). Recientemente, se ha identificado otra molécula de adhesión implicada en la unión de los linfocitos a las células linfáticas en los nódulos linfáticos, se trata del receptor endotelial vascular 1, CLEVER-1 (Irjala et al., 2003b). Tanto la expresión del receptor de manosa como de CLEVER-1, se ha detectado en los vasos linfáticos intratumorales en diversos carcinomas humanos, y su expresión se ha asociado con un incremento de metástasis a los nódulos linfáticos (Irjala et al., 2003a).

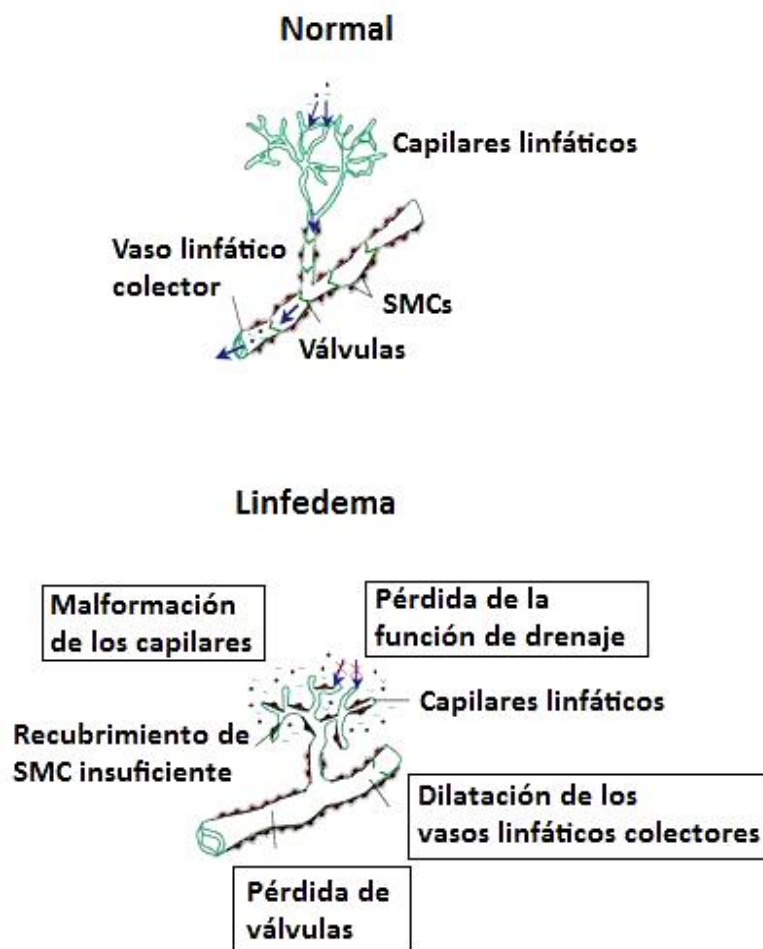
### 5.3 CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN LA FORMACIÓN DE EDEMA

El edema es la acumulación de líquido en el espacio tisular intersticial, que suele suceder cuando hay un proceso inflamatorio. Cuando la acumulación de líquido se debe a un fallo en el drenaje linfático, ya sea por malformación de los vasos, por un transporte linfático deficiente o por una obstrucción del flujo linfático, se denomina linfedema (Szuba and Rockson, 1997; Shin et al., 2008; Radhakrishnan and Rockson, 2008). Los linfedemas primarios son los que provienen de defectos genéticos, mientras que los secundarios están causados principalmente por una patología, como una inflamación crónica. Actualmente no existe ninguna cura para tratar el linfedema.

En cuanto a los linfedemas primarios, se han identificado algunas mutaciones en genes humanos que comprometen el desarrollo y la función de los vasos linfáticos y llevan a la formación de edema. Por ejemplo, la enfermedad de Milroy se caracteriza por la presencia de mutaciones en el gen de VEGFR-3 que inactivan su dominio quinasa e impiden su fosforilación (Brice et al., 2005; Butler et al., 2007; Karkkainen et al., 2000). Las mutaciones de VEGFR-3 se han encontrado en muchos pacientes con historia familiar de linfedema, aunque en los últimos años también se han reportado mutaciones *de novo* (Ghahamkarpour et al., 2006). Mutaciones en el gen FOXC2 son responsables del síndrome de distiquiasis-linfedema (Fang et al., 2000; Mangion et al.,

1999), mientras que mutaciones en SOX18 provocan el síndrome de hipotricosis-linfedema-telangiectasia (Irrthum et al., 2003).

La causa principal de linfedemas secundarios se debe a situaciones patológicas. Por ejemplo, en países en vías de desarrollo se da la filiarisis linfática o elefantiasis, una enfermedad causada por dos parásitos que se transmiten por picadas de mosquito (Melrose, 2002). Se caracteriza por un daño en los vasos linfáticos que los desestabiliza de forma permanente. En los países desarrollados, las causas principales de linfedema secundario se deben a los tratamientos utilizados en pacientes con cáncer, como la radioterapia o la eliminación de los ganglios linfáticos (Clark et al., 2005).



**Figura 15.** Vasculatura linfática en el linfedema (Figura adaptada de Maby-El Hajjami et al., 2008)

El descubrimiento de los factores de crecimiento linfáticos VEGF-C y VEGF-D, capaces de inducir el crecimiento de nuevos vasos linfáticos, abrió un nuevo abanico de posibilidades para tratar el linfedema (Rockson, 2005). La administración de VEGF-C en un modelo de conejo con linfedema en la oreja, consiguió mejorar la enfermedad considerablemente (Szuba et al., 2002). La terapia con VEGF-C y VEGF-D se relaciona con una regeneración de la vasculatura linfática madura y mejora el drenaje linfático, indicando que podría ser una estrategia potencial para tratar en el futuro el linfedema secundario (Tammela et al., 2007).

En la cirrosis también puede aparecer edema debido a la disrupción u obstrucción de la circulación linfática. En este contexto, la linfa intestinal (quilo) se acumula en la cavidad peritoneal y da lugar a la aparición de ascitis quilosa. De hecho, el 60% de los casos de ascitis quilosa en el mundo occidental se deben a una cirrosis hepática. La ascitis quilosa se presenta en el 0.5-1% de los pacientes cirróticos y ascíticos; también se puede manifestar como un síntoma u ocurrir de manera tardía en el curso de un carcinoma hepatocelular. Fisiopatológicamente, este tipo de ascitis se da por la ruptura de los vasos linfáticos al dilatarse debido al aumento de la presión venosa portal, con un flujo excesivo de linfa (alrededor de 20 litros por día) (Rector, 1984; Cheng et al., 1989; Almakdisi et al., 2005).

***OBJETIVOS***



---

A lo largo de la evolución, en los organismos complejos se han desarrollado dos grandes redes vasculares complementarias para poder llevar a cabo todas las funciones de transporte de fluidos, gases, nutrientes, moléculas de señalización, y células a través de los tejidos, y hacer posible así la vida: la vasculatura sanguínea y la vasculatura linfática. La fisiología y la fisiopatología del sistema vascular sanguíneo y la implicación de la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes) en múltiples enfermedades, ha sido muy estudiada en las últimas décadas (Carmeliet, 2003). Sin embargo, hace muy pocos años que se empezó a estudiar el desarrollo y los mecanismos moleculares que controlan el sistema linfático, identificado por primera vez en el siglo XVII (Asellius, 1627). El avance en el conocimiento del sistema linfático se ha producido gracias al reciente descubrimiento de marcadores específicos de las células endoteliales linfáticas. Aunque las células endoteliales sanguíneas y linfáticas comparten algunas de sus características, ambas tienen propiedades bien diferenciadas. Gracias a esta especialización endotelial, estas dos redes vasculares mantienen su diferenciación funcional.

La cirrosis hepática constituye el estadio final de una fibrosis que se produce como respuesta a un daño hepático prolongado y que tiene como consecuencia la acumulación de tejido conectivo en el hígado, debido a un desequilibrio importante entre la producción y la degradación de la matriz extracelular. Esta enfermedad sigue estando vinculada de manera inevitable a una significativa disminución y a un deterioro progresivo de la calidad y la esperanza de vida. Gracias a las investigaciones realizadas durante las últimas dos décadas, se ha podido apreciar la importancia de la vasculatura como regulador multifuncional de la fisiopatología de muchas de las complicaciones de la cirrosis, como los procesos fibróticos e inflamatorios. Hay muchas evidencias que sugieren que el incremento incontrolado y desorganizado de la vasculatura sanguínea (angiogénesis) podría ser la causa y el mantenimiento de algunas de las complicaciones asociadas a la cirrosis hepática. El hígado cirrótico experimenta a lo largo de todo el desarrollo de la enfermedad una serie de cambios estructurales, debidos a la acumulación de matriz extracelular y a la inflamación crónica, que vuelven al tejido hipóxico. La hipoxia tisular provoca la liberación de agentes proangiogénicos, como VEGF-A, que aumentan la irrigación del tejido para

compensar la falta de oxígeno. Además, muchas citoquinas sintetizadas por las células inflamatorias o por las células hepáticas estrelladas activadas, también tienen un alto poder angiogénico. Estos nuevos vasos son una puerta de entrada de más infiltrado inflamatorio, estableciéndose así un circuito que se retroalimenta entre angiogénesis e inflamación que lleva a perpetuar la enfermedad. Además, esta expansión de la red vascular hepática conlleva una serie de cambios morfológicos y funcionales, entre los cuales destaca la capilarización sinusoidal, caracterizada por una membrana basal capilar que cubre el sinusoides hepático y dificulta el intercambio de nutrientes y oxígeno entre los hepatocitos y la sangre. Esto lleva a un incremento de la resistencia intravascular hepática y produce isquemia y apoptosis de los hepatocitos. En este contexto, las terapias antiangiogénicas clásicas dirigidas a bloquear VEGF o las vías de los receptores tirosina quinasa, han demostrado ser eficaces en disminuir el grado de angiogénesis, de fibrosis y de inflamación hepática, además de disminuir también la presión portal (Mejias et al., 2009; Tugues et al., 2007). Sin embargo, este tipo de terapias se han visto relacionadas con multitud de efectos adversos, como trombosis o hipertensión, ya que no sólo inhiben la angiogénesis patológica sino que también afectan a la vasculatura sana (Fischer et al., 2007; Wu et al., 2008). De manera que la necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas más seguras destinadas a modular la angiogénesis en la cirrosis hepática sigue siendo uno de los objetivos de la investigación científica actual.

Cuando la cirrosis es severa, se produce una desestructuración completa del parénquima hepático que da lugar a la aparición de insuficiencia hepática y complicaciones hemodinámicas graves. Estas complicaciones aparecen asociadas a un síndrome de circulación hiperdinámica que se caracteriza por hipotensión arterial, hipertensión portal, un aumento del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias periféricas totales. Cuando la cirrosis pasa a ser descompensada, los pacientes cirróticos desarrollan importantes alteraciones en la homeostasis de los líquidos corporales que dan lugar a la acumulación de ascitis. La formación de ascitis es el trastorno más importante que presentan los pacientes cirróticos y constituye un fenómeno extraordinariamente complejo en el que se han descrito la implicación de diversos sistemas neurohormonales y sustancias endógenas capaces de regular el

metabolismo renal de sodio y agua o la reactividad vascular (Arroyo and Jiménez, 2000). La probabilidad de fallecimiento a los 2 años en pacientes cirróticos, una vez que desarrollan ascitis, es del 40%. A pesar de la enorme relevancia clínica de este suceso, actualmente aun no se conocen con precisión todos los mecanismos moleculares implicados en la formación y mantenimiento de la ascitis en la cirrosis. Se sabe que en diferentes situaciones patológicas existen cuatro trastornos que contribuyen a la formación de edema: un aumento de la presión hidrostática intravascular, un descenso de la presión oncótica en el plasma, una retención renal de sal y agua, y un fallo en el drenaje linfático (Gines et al., 2004; Van Steenkiste et al., 2009; Henriksen et al., 2005). Si bien los tres primeros mecanismos están bien estudiados y caracterizados en la cirrosis, la contribución de la funcionalidad linfática a la acumulación de ascitis sigue siendo un campo poco estudiado.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes descritos, nuestra hipótesis formula que el estudio de las anomalías vasculares, tanto funcionales como estructurales, posibilita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con potencialidad traslacional en el contexto clínico del tratamiento de las enfermedades hepáticas crónicas.

El objetivo global de esta tesis doctoral fue el de investigar la implicación de la vasculatura, tanto sanguínea como linfática, en la patogenidad de la cirrosis hepática. De manera específica, la tesis está dividida en dos estudios dirigidos a:

- I. Investigar el papel fisiopatológico del factor de crecimiento placentario (PIGF) en la angiogénesis, la inflamación y la fibrosis hepática, así como su posible papel profibrogénico, analizando su efecto biológico sobre las células hepáticas estrelladas.
- II. Caracterizar la funcionalidad y la estructura de la vasculatura linfática en la cirrosis e investigar su contribución a la formación de ascitis, así como identificar posibles mecanismos moleculares que puedan ser responsables de una disfunción linfática durante la enfermedad.





***RESULTADOS***



---

**Artículo 1: La inhibición de la actividad del factor de crecimiento placentario reduce la severidad de la fibrosis, la inflamación, y la hipertensión portal en ratones cirróticos.**

Durante la progresión de gran cantidad de enfermedades hepáticas crónicas, tales como las hepatitis B/C, la esteatosis no alcohólica, la cirrosis biliar y la cirrosis alcohólica, tiene lugar un proceso de neoangiogénesis hepática que agrava profundamente dichas patologías. Esta nueva vasculatura se localiza principalmente en las zonas fibróticas y altera toda la angioarquitectura hepática, dando lugar a anastomosis arterio-portal y porto-venosa (Fernández et al., 2009). Además, se ha demostrado que diversos factores angiogénicos también son capaces de activar diferentes subpoblaciones de células hepáticas estrelladas, estableciendo así un vínculo entre inflamación, angiogénesis y fibrosis hepáticas (Thabut et al., 2010; Semela et al., 2008). Son muchos los estudios que han puesto de manifiesto que las terapias dirigidas, tanto a la inhibición de la angiogénesis como a la inhibición múltiple de angiogénesis e inflamación, son capaces de frenar la progresión de la fibrosis a cirrosis. En este contexto, se ha demostrado que la administración de sunitinib y sorafenib a ratas cirróticas, dos inhibidores multidiana de receptores tirosina quinasa que actúan en las vías de señalización de PDGF y VEGF, conseguía disminuir el grado de angiogénesis, de fibrosis y de inflamación hepáticas, además de disminuir también la presión portal (Mejias et al., 2009; Tugues et al., 2007). Sin embargo, este tipo de terapias dirigidas a inhibir VEGF están asociadas a graves efectos adversos, como trombosis, hipertensión o una disminución de la densidad vascular en órganos sanos (Fischer et al., 2007), ya que VEGF también tiene importantes funciones en la angiogénesis fisiológica. Esto limita su uso para el tratamiento de pacientes humanos. Estudios recientes sugieren que las terapias enfocadas a inhibir el PlGF podrían tener un perfil de bioseguridad mucho más óptimo que las terapias antiangiogénicas clásicas (Fischer et al., 2007; Van de Veire et al., 2010). Esto es así porque la acción angiogénica de PlGF se reduce únicamente a situaciones patológicas (Autiero et al., 2003; Van Steenkiste et al., 2009), y se ha demostrado que su bloqueo reduce la angiogénesis en varios modelos de cáncer y en otras enfermedades sin afectar a la vasculatura sana y sin presentar mayores efectos secundarios (Lassen et al., 2009; Riisbro et al., 2009; Van

de Veire et al., 2010). Por ello, en este estudio se investigó el PIGF como potencial candidato de futuras terapias contra la cirrosis, estudiando su función en la angiogénesis, la inflamación y la fibrosis hepáticas. Los resultados más importantes derivados de este estudio se enumeran a continuación:

1. Los niveles de PIGF están aumentados en ratones tratados con CCl<sub>4</sub> y en pacientes cirróticos.

En primer lugar, se analizaron los cambios de expresión de PIGF en modelos experimentales de cirrosis en rata y ratón por ELISA y Western Blot. Después de 4 semanas de tratamiento con CCl<sub>4</sub>, los ratones incrementaron sus niveles hepáticos de PIGF y éstos se mantuvieron elevados durante las 16 semanas que duró el tratamiento. Este aumento también se detectó en el hígado de ratas cirróticas, donde la expresión de PIGF estuvo aumentada del orden de 4 veces respecto a hígados control (Figura 1A y 1B).

Para determinar si había un paralelismo en humanos, se analizaron los niveles de PIGF en pacientes cirróticos, tanto en suero por ELISA como la expresión génica por RT-PCR. Los niveles hepáticos de RNAm estuvieron significativamente elevados en pacientes cirróticos comparados con pacientes control. En concordancia con estos resultados, los niveles de PIGF en suero fueron entre 2 y 3 veces mayores en pacientes cirróticos respecto a sujetos sanos. Además, se encontró una correlación significativa entre los niveles de PIGF y el gradiente de presión portal en pacientes con hepatitis alcohólica. (Figura 1C, 1D y 1E).

2. La deficiencia génica de PIGF y el tratamiento con anticuerpos anti-PIGF mejora la hemodinámica y la hipertensión portal en ratones cirróticos.

El bloqueo de PIGF, tanto genéticamente como con una terapia con anticuerpos, redujo el flujo arterial mesentérico un 36.8% y el gasto cardíaco un 17%. Estos cambios hemodinámicos llevaron a una reducción del 27% de la presión portal (Tabla 1).

---

### 3. El bloqueo de PlGF reduce el grado de inflamación hepática provocada por el tratamiento con CCl<sub>4</sub>.

Estudios anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado que los inhibidores de angiogénesis, como sunitinib, reducían la inflamación de los hígados cirróticos (Tugues et al., 2007). Es por ello que analizamos si el bloqueo de la actividad de PlGF también era capaz de reducir la inflamación hepática, a través de un marcaje de macrófagos (PAS-diestasa). El incremento del infiltrado de macrófagos típico de la cirrosis se vio significativamente reducido en los ratones donde se había bloqueado la actividad de PlGF (Figura 2). Además, también se observó una reducción de la expresión de VCAM-1, una molécula de adhesión proinflamatoria, en la vasculatura de los ratones cirróticos (Supplemental results Figura 2).

### 4. La inhibición de PlGF reduce la neoangiogénesis y la arteriogénesis intrahepáticas y espláncnicas en los animales cirróticos.

Para investigar como PlGF estimulaba la angiogénesis durante la progresión de la cirrosis realizamos tinciones inmuohistoquímicas con el marcador de vasos CD31. Comparados con los ratones cirróticos, los ratones donde se bloqueó la actividad de PlGF mostraron una reducción significativa de vasos en el hígado, en el mesenterio y en el colon (Figura 3).

Para estudiar más el papel de PlGF en la angiogénesis patológica, se obtuvieron moldes vasculares del mesenterio y del hígado de ratones cirróticos utilizando la técnica de corrosión. Tanto el análisis con la lupa estereoscópica como por microscopía electrónica de barrido, mostraron que los ratones cirróticos salvajes tenían una mayor arborización vascular comparados con los ratones tratados contra PlGF. Además, mientras que los ratones cirróticos mostraban un sinusoides hepático irregular, con vasos tortuosos e inmaduros, el bloqueo de la actividad de PlGF conseguía normalizar la estructura del sinusoides (Supplemental results Figura 4).

5. El bloqueo de la actividad de PIGF reduce el grado de fibrosis de los animales cirróticos.

Para evaluar los efectos *in vivo* del bloqueo de la actividad de PIGF, cuantificamos el grado de fibrosis por Sirius Red. Después de la administración crónica de CCl<sub>4</sub> (25 semanas) los ratones mostraron un elevado grado de fibrosis, con la presencia de septos fibrosos centro-portales. Sin embargo, el bloqueo de PIGF redujo el grado de fibrosis en un 36%. Además, la evaluación macroscópica y estereoscópica de los hígados reveló una pérdida de nodularidad después del bloqueo de PIGF comparado con los animales cirróticos salvajes (Figura 4).

6. Las células estrelladas hepáticas son la principal fuente de PIGF en el hígado cirrótico.

Para entender porque una reducción de la actividad de PIGF se asocia con una reducción en el grado de fibrosis, quisimos ver donde se localizaba la expresión de PIGF en el hígado por inmunofluorescencia. En los hígados de los animales control la señal de PIGF fue muy débil, sin embargo aumentó en los animales tratados con CCl<sub>4</sub>, localizándose básicamente alrededor de los septos fibrosos (Figura 5A).

Teniendo en cuenta que el tipo celular que más participa en la formación de fibra son las HSC, pensamos que quizá estas células podrían ser la fuente principal de PIGF en el hígado. Esto lo confirmamos por PCR Real Time, donde se vio que las HSC tienen una gran sobreexpresión de PIGF, mucho mayor que la de los otros tipos celulares hepáticos (Supplemental results Figura 7C).

7. PIGF activa vías de señalización relacionadas con proliferación y migración celular en las HSC.

Las HSC juegan un papel muy importante en la fisiopatología de la fibrosis, así que quisimos estudiar el efecto de PIGF sobre este tipo celular activado, tanto en rata como en humanos. Por RT-PCR detectamos expresión del receptor VEGFR1, el receptor

---

específico de PIGF, tanto en HSC aisladas de ratas cirróticas como en la línea LX-2, una línea humana de HSC. Teniendo esto en cuenta, quisimos determinar que vías de señalización estaban activadas en las HSC en respuesta a un estímulo de PIGF. Por Western Blot vimos que el tratamiento de estas células con PIGF inducía la activación sostenida de la vía de ERK 1/2 durante más de 60 minutos (Figura 5B y 5C).

Ya es conocido que la activación de la vía de ERK 1/2 se relaciona con quimiotaxis y proliferación celular. Para corroborar si existía un paralelismo en las HSC, cuantificamos la quimiotaxis celular en células LX-2 sin tratar o tratadas con PIGF, a través de microfotografías tomadas a diferentes tiempos. Observamos que alrededor de un 35% de las células migraron en respuesta a un tratamiento de PIGF durante 10 minutos. La migración celular se asocia con una reestructuración del citoesqueleto de actina, por ello quisimos estudiar este efecto de PIGF en las HSC usando una tinción con faloidina, que se une específicamente a las fibras de actina. PIGF indujo la formación de filopodios alrededor de toda la células, indicando que sí es capaz de promover la reorganización del citoesqueleto de actina (Figura 6A y 6C).

Para estudiar si aparte de inducir migración, PIGF era capaz de estimular la proliferación de las HSC, hicimos un ensayo de proliferación con BrdU. Vimos que la cantidad de BrdU incorporado en presencia de PIGF era del 21%, significativamente mayor en comparación con el porcentaje de BrdU incorporado en células sin tratar. Este % de incorporación de BrdU representa el % de células que están proliferando, y esto indica que PIGF también es capaz de promover la proliferación de las HSC (Figura 6D).

Para profundizar más en los mecanismos de señalización a través de los cuales PIGF induce una activación sostenida de ERK 1/2 y migración y proliferación celular, analizamos la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de estas señales. Para ello utilizamos unos arrays de anticuerpos que detectan los estados de fosforilación de proteínas de señalización, y este estado de fosforilación es sinónimo de actividad. Encontramos un total de 33 proteínas fosforiladas en Tyr después del tratamiento con PIGF, y de acuerdo con los resultados de proliferación y migración obtenidos anteriormente, el análisis bioinformático de los resultados mostró que las



proteínas fosforiladas se agrupaban principalmente en dos grupos funcionales: 1) Desarrollo celular, desarrollo del sistema hematológico y viabilidad celular, y 2) Cáncer, morfología tumoral y movimiento celular (Supplemental results Figura 9). Además, la exposición de las HSC a PIGF también activó los receptores PDGFRA y EGFR, esto es importante porque podría representar una asociación directa entre estos receptores TK y el receptor de PIGF. Esto lo confirmamos con un ensayo de ligación por proximidad (PLA), donde encontramos una interacción directa entre VEGFR1 y PDGFRA (Supplemental results Figura 10).

### 8. El bloqueo de la actividad de PIGF presenta un perfil de bioseguridad óptimo

Uno de los problemas de los inhibidores clásicos de angiogénesis es que llevan asociados múltiples efectos secundarios adversos, como trombosis, hipertensión o una disminución de la densidad vascular en órganos sanos (Fischer et al., 2007). Por ello, quisimos estudiar como afectaba el bloqueo de PIGF a la vasculatura sana en un órgano sin angiogénesis patológica, como es la glándula tiroidea, por inmunohistoquímica de CD31. En este contexto, ni los ratones tratados con anticuerpos anti-PIGF ni los genéticamente deficientes para PIGF, mostraron cambios significativos en la densidad vascular de este órgano. Otro punto crítico en la aplicación clínica de antiangiogénicos es el desarrollo de resistencia al bloqueo de la angiogénesis a través de la sobreexpresión de otros agentes proangiogénicos, como VEGF. Por esta razón, estudiamos por ELISA si el bloqueo de PIGF estaba asociado a la inducción de VEGF. El tratamiento contra PIGF tampoco produjo cambios significativos en los niveles de expresión de VEGF en el mesenterio de ratones cirróticos (Supplemental results Figura 11).

# Inhibition of Placental Growth Factor Activity Reduces the Severity of Fibrosis, Inflammation, and Portal Hypertension in Cirrhotic Mice

Christophe Van Steenkiste,<sup>1\*</sup> Jordi Ribera,<sup>2\*</sup> Anja Geerts,<sup>1</sup> Montse Pauta,<sup>2</sup> Sònia Tugues,<sup>2,3</sup> Christophe Casteleyn,<sup>4</sup> Louis Libbrecht,<sup>5</sup> Kim Olievier,<sup>1</sup> Ben Schroyen,<sup>6</sup> Hendrik Reynaert,<sup>6</sup> Leo A. van Grunsven,<sup>6</sup> Bram Blomme,<sup>1</sup> Stephanie Coulon,<sup>1</sup> Femke Heindryckx,<sup>1</sup> Martine De Vos,<sup>1</sup> Jean Marie Stassen,<sup>7</sup> Stefan Vinckier,<sup>9</sup> Jose Altamirano,<sup>8</sup> Ramón Bataller,<sup>8</sup> Peter Carmeliet,<sup>9,10</sup> Hans Van Vlierberghe,<sup>1</sup> Isabelle Colle,<sup>1\*</sup> and Manuel Morales-Ruiz<sup>2\*</sup>

**Placental growth factor (PIGF) is associated selectively with pathological angiogenesis, and PIGF blockade does not affect the healthy vasculature. Anti-PIGF is therefore currently being clinically evaluated for the treatment of cancer patients. In cirrhosis, hepatic fibrogenesis is accompanied by extensive angiogenesis. In this paper, we evaluated the pathophysiological role of PIGF and the therapeutic potential of anti-PIGF in liver cirrhosis. PIGF was significantly up-regulated in the CCl<sub>4</sub>-induced rodent model of liver cirrhosis as well as in cirrhotic patients. Compared with wild-type animals, cirrhotic PIGF<sup>-/-</sup> mice showed a significant reduction in angiogenesis, arteriogenesis, inflammation, fibrosis, and portal hypertension. Importantly, pharmacological inhibition with anti-PIGF antibodies yielded similar results as genetic loss of PIGF. Notably, PIGF treatment of activated hepatic stellate cells induced sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation, as well as chemotaxis and proliferation, indicating a previously unrecognized profibrogenic role of PIGF. Conclusion: PIGF is a disease-candidate gene in liver cirrhosis, and inhibition of PIGF offers a therapeutic alternative with an attractive safety profile. (HEPATOLOGY 2011;53:1629-1640)**

**C**hronic liver disease can be defined as a complex pathophysiological process of progressive destruction and regeneration of liver parenchyma, leading to fibrosis, cirrhosis, and increased risk of hepatocellular carcinoma. A profound alteration of the hepatic angioarchitecture due to

*Abbreviations:  $\alpha$ PIGF, anti-PIGF antibody;  $\alpha$ SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin;  $\alpha$ VEGFR, anti-VEGFR antibody; BrdU, bromodeoxyuridine; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HSC, hepatic stellate cell; IgG<sub>1</sub>, immunoglobulin G<sub>1</sub>; mRNA, messenger RNA; PAS, periodic acid-Schiff; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ ; PIGF, placental growth factor; RTK, tyrosine kinase receptor; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.*

*From the Departments of <sup>1</sup>Hepatology and Gastroenterology and <sup>5</sup>Pathology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium; the <sup>2</sup>Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic, and the <sup>8</sup>Liver Unit Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain; the <sup>3</sup>Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden; the <sup>4</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Department of Morphology, Ghent University, Ghent, Belgium; the <sup>6</sup>Liver Cell Biology Laboratory, Free University of Brussels (VUB), Brussels, Belgium; <sup>7</sup>ThromboGenics NV, Leuven, Belgium; the <sup>9</sup>Vesalius Research Center, VIB, Leuven, Belgium; and the <sup>10</sup>Vesalius Research Center, K. U. Leuven, Leuven, Belgium.*

*Received September 16, 2010; accepted January 25, 2011.*

*Supported by grants from the Fund for Scientific Research (Aspirant mandaat-FWO Vlaanderen, 1.1.466.09.N.0 to C. V. S.) and from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2007-63069 and SAF 2010-19025 to M. M. R.) and AGAUR (2009 SGR 1496). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III-Ministerio de Ciencia e Innovación. M. P. was supported by MICINN (contract number BES-2007-16909).*

*\*These authors contributed equally to this work.*

*Address reprint requests to: Isabelle Colle, MD, Ph.D., Department of Hepatology and Gastroenterology, Ghent University Hospital, Building K12, First Floor IE, De Pintelaan 185, 9000 Ghent, Belgium. E-mail: isabelle.colle@ugent.be; Fax: (32)-9-3324984.*

*Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.*

*View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).*

*DOI 10.1002/hep.24238*

*Potential conflict of interest: ThromboGenics NV developed PIGF inhibitors for antiangiogenic treatment under a license from VIB and K. U. Leuven. Jean Marie Stassen is the Senior Director of Research & Development at ThromboGenics NV.*

*Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.*

induction of long-term structural vascular changes is underlying this remodeling process. Hepatic angiogenesis occurs during the progression of several chronic liver diseases, including hepatitis B/C, biliary cirrhosis, alcoholic cirrhosis, and nonalcoholic steatohepatitis. The resulting neovasculature is mainly located in the fibrotic areas of the liver and induces the formation of arterio-portal and porto-venous systemic anastomoses.<sup>1</sup>

Preclinical studies of this phenomenon have demonstrated that angiogenic inhibitors interfere with the progression of fibrosis. In human and experimental liver fibrosis, neovascularization seems to be a process strictly related to progressive fibrogenesis.<sup>2</sup> In this context, studies in experimental models of cirrhosis have shown that treatment with angiogenic inhibitors such as neutralizing monoclonal anti-vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) antibody, TNP-470, and adenovirus expressing the extracellular domain of Tie2 decreased liver fibrosis.<sup>3,4</sup> Other parallels between fibrosis and angiogenesis have been postulated, such as the promotion of different subpopulations of hepatic stellate cells (HSCs; angiogenic versus fibrogenic phenotypes), and of hepatic inflammation as a process linking angiogenesis and fibrogenesis.<sup>2,5</sup> Consequently, multitargeted therapies acting against both angiogenesis and inflammation have been shown to be beneficial in inhibiting the progression of fibrosis to cirrhosis. The validity of the latter approach was demonstrated in cirrhotic rats in which sunitinib and sorafenib, two inhibitors of tyrosine kinase receptors (RTKs) that target the platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathways, produced a reduction in the degree of hepatic angiogenesis, fibrosis, and inflammation, as well as a significant decrease in portal pressure.<sup>6,7</sup> Conversely, inhibition of angiogenesis can worsen fibrogenesis in specific conditions, as was demonstrated by administration of integrin inhibitors.<sup>8</sup>

Moreover, important questions arise not only to the class of angiogenic inhibitors that can be used successfully, but also with respect to the safety, especially considering potential application in patients with critically ill portal hypertension and cirrhosis. Many of the currently available multitargeted therapeutic strategies are associated with toxicities, thereby limiting their use in critically ill patients. Recent preclinical studies suggest that therapies targeting placental growth factor (PlGF) activity may possess such a safety profile.<sup>9,10</sup> PlGF is a member of the VEGF family and a specific ligand for VEGFR1 that was originally discovered and isolated from the human

placenta. The human transcript for PlGF generates four isoforms (PlGF-1 to -4), PlGF-2 being the only one present in mice.<sup>11</sup> Unlike VEGF, PlGF plays a negligible role in physiological angiogenesis and is not required as a survival signal for the maintenance of quiescent vessels in healthy tissues. Furthermore, studies in transgenic mice revealed that the angiogenic activity of PlGF is restricted to pathological conditions.<sup>12,13</sup> In contrast to VEGF inhibitors, a monoclonal anti-PlGF antibody ( $\alpha$ PlGF) has been shown to reduce pathological angiogenesis in various spontaneous cancers and other disease models without affecting healthy blood vessels, resulting in no major side effects in mice and humans.<sup>9,10,14,15</sup>

Based on the aforementioned considerations, PlGF might be an attractive therapeutic target for cirrhosis, but nearly nothing is known about its pathogenetic role in this disorder, nor its therapeutic potential. Here, we demonstrate that anti-PlGF antibody treatment might be considered as a novel potential therapy for cirrhosis due to its multiple mechanisms of action against angiogenesis, inflammation, and hepatic fibrosis. We also provide mechanistic insight into the fibrogenic role of PlGF by demonstrating its biological effect on HSCs. Importantly, all these results were obtained in the absence of the adverse effects that are usually associated with antiangiogenic therapies based on VEGF blockade.

## Materials and Methods

**Experimental Models of Cirrhosis.** All experiments were performed in 8-week-old male PlGF wild-type (PlGF<sup>+/+</sup>) mice (50% Sv129/50% Swiss), matched PlGF-knockout mice (PlGF<sup>-/-</sup>) of the same genetic background (Vesalius Research Center Leuven, Belgium), and male Wistar rats (Charles River, Saint Aubin les Elseuf, France). Cirrhosis was induced by way of CCl<sub>4</sub> application (see Supporting Information Methods).

**Human Samples.** Hepatic expression of PlGF and serum PlGF levels were assessed in liver specimens and blood samples from patients with alcoholic hepatitis, chronic hepatitis C, nonalcoholic steatohepatitis, and normal liver specimens. For PlGF immunohistochemistry, biopsy samples were obtained from patients with hepatitis C. The demographic and clinical characteristics of the patients included in the study are further represented in the Supporting Information Methods and in Supporting Information Tables 2 and 3.

**PlGF Inhibition Studies.** The effect of PlGF deficiency in cirrhosis was first studied in PlGF<sup>-/-</sup> mice.

$\text{CCl}_4$  and saline ( $n = 8$  in each group) were administered to  $\text{PIGF}^{+/+}$  and  $\text{PIGF}^{-/-}$  mice. After 25 weeks of  $\text{CCl}_4$  treatment, animals were sacrificed and experiments were performed. For the therapeutic study, control ( $n = 5$ ) and  $\text{CCl}_4$ -treated mice ( $n = 9$ ) were treated with 25-mg/kg intraperitoneal injections of  $\alpha\text{PIGF}$  (ThromboGenics NV, Leuven, Belgium) that were administered twice weekly on days 0 and 3 from week 12 until week 20 of the  $\text{CCl}_4$  treatment. To eliminate the possibility of passive immunization, a group of matched control ( $n = 5$ ) and a group of  $\text{CCl}_4$ -treated mice ( $n = 7$ ) were injected with mouse immunoglobulin  $\text{G}_1$  ( $\text{IgG}_1$ ) (ThromboGenics NV) at the same dose and times as mice in the  $\alpha\text{PIGF}$  groups. The dosing schedule of  $\alpha\text{PIGF}$  was based on previous published pharmacokinetic studies that were performed in mice.<sup>9,10</sup> To provide therapeutic data for end-stage cirrhotic mice,  $\alpha\text{PIGF}$  was administered at the same dosage as described above, but was given from week 18 to week 25 of the  $\text{CCl}_4$  treatment.

Hemodynamic studies, vascular corrosion casting, histology (Sirius Red, periodic acid-Schiff–diastase), immunohistochemistry (CD31,  $\alpha$ -smooth muscle actin), immunofluorescence (PIGF and vascular cell adhesion molecule 1), cytology (phalloidin), antibody array assay, statistical analysis, and all other methods are described in the Supporting Information Methods.

## Results

**Enhanced PIGF Expression in  $\text{CCl}_4$ -Treated Rodents and Patients with Cirrhosis.** Changes in the expression of PIGF that occur in the setting of cirrhosis were investigated in experimental models of cirrhosis in mice and rats as well as in patients with cirrhosis. After treating mice with  $\text{CCl}_4$ , hepatic PIGF protein levels increased after 4 weeks and remained elevated during 16 weeks of treatment ( $P < 0.05$  versus control mice) (Fig. 1A). Increased hepatic PIGF expression was also detected via western blot analysis of rats with established cirrhosis. As seen in Fig. 1B, there was an approximately four-fold increase in PIGF protein levels in cirrhotic rat livers compared with control livers ( $4.2 \pm 1.4$  versus  $0.7 \pm 1.1$  relative densitometric units, respectively;  $P < 0.05$ ).

To determine whether PIGF was also overexpressed in human liver cirrhosis, we measured PIGF messenger RNA (mRNA) and protein levels in livers of patients with cirrhosis. A prominent up-regulation of hepatic PIGF mRNA levels was observed in patients with and without cirrhosis ( $3.5 \pm 0.9$  versus  $0.9 \pm 0.2$  relative densitometric units, respectively;  $P < 0.05$ ) (Fig. 1C).

In addition, PIGF immunostaining in human hepatitis C virus livers showed a stage-dependent increase in expression, correlating with the progression of fibrosis, with the highest PIGF levels detected in F4 fibrosis grade samples ( $P \leq 0.001$  versus F0 and F1) (see Supporting Information Fig. 1 for fibrosis grading). This increase in PIGF protein expression was observed in hepatocytes and nonparenchymal cells localized in fibrotic areas (Supporting Information Fig. 1). In agreement with this result, serum PIGF levels in patients with cirrhosis were at least two-fold higher than those in healthy subjects, and in some individuals, these levels reached values that were three-fold higher than those of controls (Fig. 1D). Interestingly, a direct significant correlation was found between PIGF serum levels and hepatic venous pressure gradient in patients with biopsy-proven alcoholic hepatitis, a common cause of acute-on-chronic liver failure (Fig. 1E).

**Beneficial Effects of PIGF Deficiency and  $\alpha\text{PIGF}$  Treatment on Portal Hypertension.** In a prevention study protocol (see Materials and Methods), we investigated the protective effect of PIGF gene deficiency against the development of the splanchnic hemodynamic alterations in cirrhotic mice. As demonstrated in Table 1, cirrhotic  $\text{PIGF}^{-/-}$  mice (denoted as  $\text{CCl}_4$   $\text{PIGF}^{-/-}$  in Table 1) exhibited a 36.8% reduction in mesenteric artery blood flow and a 17% decrease in pulse rate, both significantly different from the values observed in wild-type cirrhotic mice (denoted as  $\text{CCl}_4$   $\text{PIGF}^{+/+}$  in Table 1;  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively). These hemodynamic changes resulted in a significantly reduced lower portal pressure in  $\text{CCl}_4$ -treated  $\text{PIGF}^{-/-}$  mice compared with wild-type cirrhotic animals ( $-27\%$ ). No differences were found in mean arterial pressure or spleen weight between the two  $\text{CCl}_4$ -treated experimental groups.

To determine whether or not the beneficial effect of PIGF gene deficiency had therapeutic potential, a therapeutic study was set up (see Materials and Methods) in which the effect of  $\alpha\text{PIGF}$  or  $\text{IgG}_1$  injection was evaluated in control and  $\text{CCl}_4$ -treated mice (application from week 12 to week 18, Table 1). Similar hemodynamic changes as in the prevention study could be observed, showing now that  $\alpha\text{PIGF}$  treatment can partially reverse the portal hypertensive syndrome (Supporting Information Results). When  $\alpha\text{PIGF}$  was administered to mice with end-stage cirrhosis (week 18 to week 25 of  $\text{CCl}_4$  treatment), we did not observe a significant effect on portal pressure, although a non-significant decrease in mesenteric artery flow in these animals was detected (Table 2), likely because the disease had advanced to an irreversible stage.

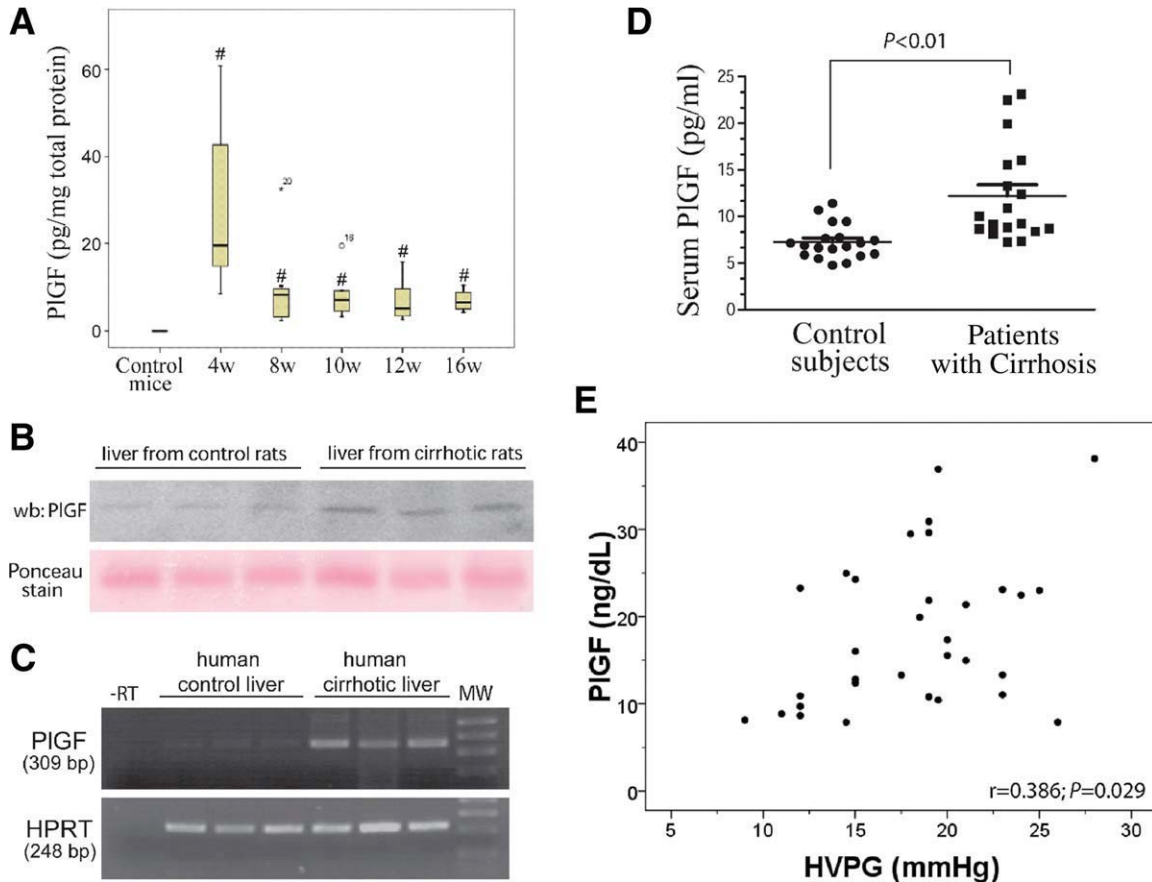


Fig. 1. Enhanced PIGF expression in  $\text{CCl}_4$ -treated rodents and in patients with cirrhosis. (A) The hepatic PIGF protein levels of cirrhotic mice were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. PIGF concentrations were significantly higher in the  $\text{CCl}_4$ -treated samples than in the controls, with a maximum PIGF level occurring after 4 weeks. In contrast, PIGF was undetectable in the livers of the controls. The black horizontal lines in the boxes represent the median value. Outliers are either represented by  $^{\circ}16$  (mild) or  $*20$  (extreme).  $\#P < 0.05$  compared with controls. (B) Western blot analysis of PIGF expression in the livers of control ( $n = 10$ ) and cirrhotic rats ( $n = 10$ ). Total protein extracts ( $30 \mu\text{g}$ ) that were immunoblotted with  $\alpha\text{PIGF}$  showed increased levels of PIGF in cirrhotic animals. Ponceau S staining was used as a normalization control. WB, western blotting. (C) The PIGF mRNA levels (top panel) were evaluated via reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using total RNA isolated from the livers of patients with cirrhosis ( $n = 6$ ) and without cirrhosis ( $n = 6$ ). The expression of the housekeeping gene (HPRT) was used as normalization control. A representative result of three samples for each group is shown. bp, base pairs; -RT, negative RT-PCR control. (D) Dot plot of enzyme-linked immunosorbent assay reactivities with an  $\alpha\text{PIGF}$  monoclonal antibody (clone 37203) in the serum from patients with cirrhosis and healthy controls. Dots represent means of duplicate values. The central horizontal line represents the median value. (E) Correlation of PIGF serum levels and hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. Dots represent the means of duplicate values ( $r = 0.386$ ,  $P < 0.05$ ).

#### Hepatic Inflammation Induced by $\text{CCl}_4$ Treatment Is Significantly Attenuated in $\text{PIGF}^{-/-}$ Mice and After $\alpha\text{PIGF}$ Treatment.

Because studies performed in cirrhotic rats have shown that angiogenic inhibitors such as sunitinib effectively decrease the severity of necroinflammation in cirrhotic livers,<sup>7</sup> we investigated whether suppression of PIGF activity affected chronic hepatic inflammation. Periodic acid-Schiff staining with diastase digestion (PAS-dia-*stase*) was used to visualize macrophage cell accumulation in the livers of  $\text{PIGF}^{+/+}$  and  $\text{PIGF}^{-/-}$  mice. The livers of  $\text{PIGF}^{+/+}$  mice that were chronically treated with  $\text{CCl}_4$  showed a significant increase in PAS-dia-*stase* positivity compared with control  $\text{PIGF}^{+/+}$  mice (data shown in legend

Fig. 2). Notably, the increase in macrophages associated with cirrhosis was significantly reduced in  $\text{CCl}_4$ -treated  $\text{PIGF}^{-/-}$  mice (Fig. 2A,B). Likewise, PIGF-blockage by  $\alpha\text{PIGF}$  reduced macrophage accumulation in  $\text{CCl}_4$ -treated mice compared with  $\text{IgG}_1$ - $\text{CCl}_4$ -treated mice (Fig. 2C,D).

To further understand the link between PIGF blockade and the reduction in inflammatory infiltrate, the expression of proinflammatory adhesion molecules in the vasculature of cirrhotic mice was analyzed in absence or in presence of PIGF activity. We demonstrated that blockade of PIGF activity decreases the neovasculature expressing vascular cell adhesion molecule 1. Also, PIGF contributes to the recruitment of

**Table 1. Splanchnic and Hemodynamic Changes in CCl<sub>4</sub> Mice in the Prevention and in the Therapeutic Study (Week 12 to Week 20)**

Prevention Study	Control PIGF <sup>+/+</sup>	CCl <sub>4</sub> PIGF <sup>+/+</sup>	Control PIGF <sup>-/-</sup>	CCl <sub>4</sub> PIGF <sup>-/-</sup>	% Change CCl <sub>4</sub> PIGF <sup>+/+</sup> Versus CCl <sub>4</sub> PIGF <sup>-/-</sup>
Mean arterial pressure, mm Hg	96.1 ± 2.7	92 ± 6.9	113.1 ± 6.2	84 ± 3.4	NS
Portal pressure, mm Hg	3.8 ± 0.5	11.7 ± 0.8	4.3 ± 1.6	8.5 ± 0.6*	-27
Spleen weight, g/10 g body weight	0.03 ± 0.003	0.04 ± 0.004	0.03 ± 0.004	0.06 ± 0.004	NS
Heart rate, beats/minute	402 ± 18	528 ± 15	543 ± 20	440 ± 12†	-17
Mesenteric artery flow, mL/minute	0.75 ± 0.05	1.44 ± 0.07	0.72 ± 0.06	0.91 ± 0.07‡	-37
Therapeutic Study	Control IgG <sub>1</sub>	CCl <sub>4</sub> IgG <sub>1</sub>	Control αPIGF	CCl <sub>4</sub> αPIGF	% Change CCl <sub>4</sub> IgG <sub>1</sub> Versus CCl <sub>4</sub> αPIGF
Mean arterial pressure, mm Hg	107.1 ± 6.5	99.9 ± 1.6	104.1 ± 4.1	99.0 ± 2.3	NS
Portal pressure, mm Hg	4.7 ± 0.7	12.8 ± 0.38	4.1 ± 0.6	9.5 ± 0.5§	-26
Spleen weight, g/10 g body weight	0.03 ± 0.003	0.04 ± 0.007	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.002	NS
Heart rate, beats/minute	419 ± 17	444 ± 13	448 ± 29	463 ± 13	NS
Mesenteric artery flow, mL/minute	0.75 ± 0.04	1.58 ± 0.1	0.86 ± 0.04	0.95 ± 0.03 <sup>D</sup>	-40

Abbreviations: αPIGF, anti-PIGF antibody; NS, not significant; PIGF, placental growth factor.

Data are expressed as the mean ± SEM.

\* $P < 0.05$  CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>-/-</sup> versus CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>+/+</sup>.

† $P < 0.001$  CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>-/-</sup> versus CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>+/+</sup>.

‡ $P < 0.01$  CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>-/-</sup> versus CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>+/+</sup>.

§ $P < 0.001$  CCl<sub>4</sub> αPIGF versus CCl<sub>4</sub> IgG<sub>1</sub>.

hepatic inflammatory infiltrate by its chemotactic properties on monocytes (Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 2).

**Inhibition of PIGF Diminishes Intrahepatic Splanchnic Neoangiogenesis and Arteriogenesis in Cirrhotic Animals.** To investigate whether PIGF stimulated angiogenesis during cirrhosis, we performed CD31 immunostaining of various tissues (Fig. 3 and Supporting Information Fig. 3). Compared with cirrhotic wild-type mice, CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>-/-</sup> mice exhibited significant reductions in hepatic, mesenteric, and colonic vascular density (44%, 37%, and 64%, respectively,  $P < 0.05$ ) (Supporting Information Fig. 3). In agreement with these results of the prevention study, we found that αPIGF treatment (Fig. 3) also reduced hepatic, mesenteric (data not shown) and colonic neoangiogenesis (with 28%, 34%, and 51%, respectively, with respect to the corresponding IgG<sub>1</sub>-CCl<sub>4</sub> mice,  $P < 0.05$ ).

Similar results were obtained when evaluating the role of PIGF in angiogenesis on vascular corrosion casts from the splanchnic tissues and livers of cirrhotic mice. In addition, we could demonstrate a normaliza-

tion of the sinusoidal vessel course on liver casts following αPIGF treatment (Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 4), resulting in significant reduction of the hypoxic environment in the liver (Supporting Information Fig. 5). The expression of hypoxia-inducible glycolytic genes in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers showed reduced expression upon αPIGF treatment compared with IgG<sub>1</sub>. This is translated into a significant down-regulation of HIF-1α protein level ( $P < 0.05$ ).

Because studies of mice with portal hypertension and solid tumors have demonstrated that PIGF has a pleiotropic action on both angiogenesis and arteriogenesis,<sup>10,13</sup> we subsequently investigated the smooth muscle cell content of vessels by anti-α-smooth muscle actin (αSMA) immunostaining. Both PIGF gene deficiency and αPIGF treatment reduced arteriogenesis in visceral peritoneum, as demonstrated by significantly reduced immunostaining for αSMA in the vasculature of these mice (Supporting Information Fig. 6).

**Fibrosis Is Decreased in Animals with PIGF Gene Deficiency and After αPIGF Treatment.** To assess the

**Table 2. Splanchnic and Hemodynamic Changes in CCl<sub>4</sub> Mice in the Late Therapeutic Setting with αPIGF (Week 18 to Week 25 of CCl<sub>4</sub> Treatment)**

Therapeutic Study	CCl <sub>4</sub> IgG <sub>1</sub>	CCl <sub>4</sub> αPIGF	P Value
Mean arterial pressure, mm Hg	98.8 ± 3.4	96.9 ± 3.1	NS
Portal pressure, mm Hg	11.5 ± 0.4	10.2 ± 0.5	0.08
Spleen weight, g/10 g body weight	0.04 ± 0.006	0.04 ± 0.004	NS
Mesenteric artery flow, mL/minute	1.26 ± 0.18	0.90 ± 0.04	0.09

Abbreviations: αPIGF, anti-PIGF antibody; NS, not significant.

Data are expressed as the mean ± SEM.

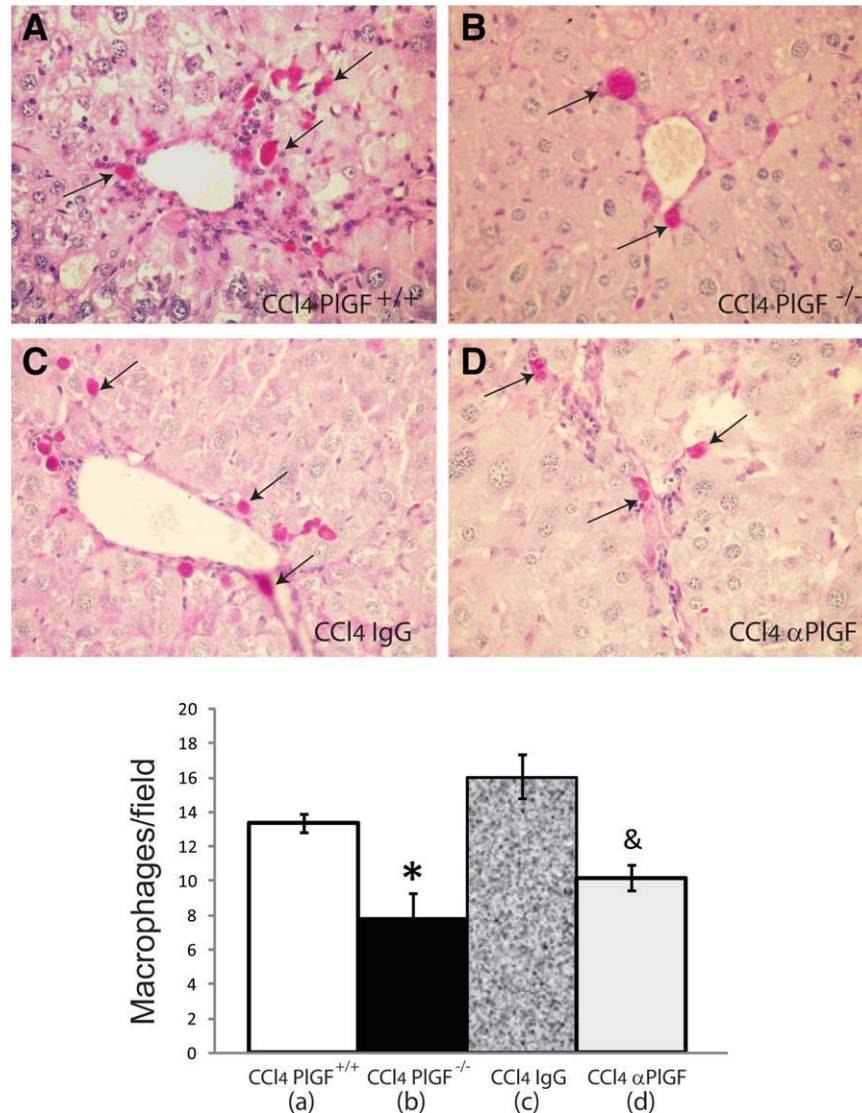


Fig. 2. The severity of the hepatic necroinflammation induced by CCl<sub>4</sub> treatment is significantly attenuated in PIGF<sup>-/-</sup> mice as well as in PIGF<sup>+/+</sup> mice treated with αPIGF. The number of ceroid pigment-containing macrophages in the liver was significantly increased after 25 weeks of CCl<sub>4</sub> treatment. These cells formed clusters and predominated in the centrilobular and portal connective tissues. After PAS-diastase staining, these macrophages stain pink. Arrows indicate PAS-diastase-positive macrophages. Data from the control animals are not displayed in the histograms (control PIGF<sup>+/+</sup>, 5.61 ± 0.47; control PIGF<sup>-/-</sup>, 4.93 ± 0.07; control IgG<sub>1</sub>, 6.3 ± 0.43; control αPIGF, 6.58 ± 0.42). Deficiency of PIGF (B) was associated with a significant reduction in PAS diastase-positive macrophages compared with PIGF<sup>+/+</sup> mice (A) (-41.8%, 7.7 versus 13.3 cells per field; \**P* < 0.05). A similar reduction was seen after αPIGF treatment (D) compared with IgG<sub>1</sub> treatment (C) (10.1 versus 16.0 cells per microscope field; &*P* < 0.05). Original magnification ×100.

*in vivo* effects of PIGF gene deficiency and αPIGF treatment on hepatic fibrogenesis, the extent of liver fibrosis was quantified by Sirius Red staining. After 25 weeks of CCl<sub>4</sub> administration, CCl<sub>4</sub>-PIGF<sup>+/+</sup> mice exhibited centro-portal fibrotic septae and centro-central fibrotic linkages (Fig. 4A,C). Remarkably, the lack of the PIGF gene in cirrhotic PIGF<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4B) substantially decreased the severity and extent of the fibrotic changes, as illustrated by a 36% reduction in fibrosis score compared with wild-type CCl<sub>4</sub>-treated mice (39,316 μm<sup>2</sup> versus 61,034 μm<sup>2</sup> fibrotic area, respectively; *P* <

0.05). In addition, CCl<sub>4</sub>-treated wild-type mice given αPIGF for 8 weeks (from week 12 to week 20) also showed less fibrosis compared with IgG<sub>1</sub>-treated cirrhotic mice (53,676 versus 90,357 μm<sup>2</sup> fibrotic area, respectively; *P* < 0.05) (Fig. 4D). The effect of αPIGF treatment to decrease the extent of fibrosis in cirrhotic mice was further confirmed by macroscopic and stereomicroscopic evaluation, which revealed loss of nodularity after αPIGF treatment (Fig. 4E-H). On the other hand, no changes in the fibrosis score were detected when end-stage cirrhotic mice (week 18 to week 25 of

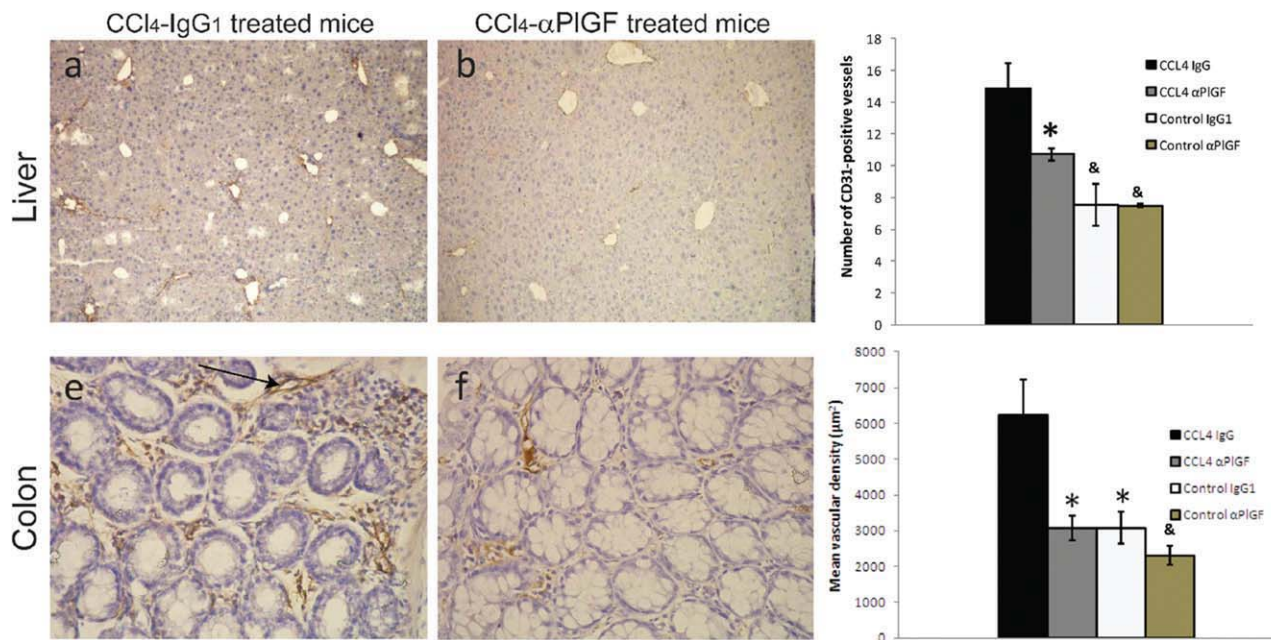


Fig. 3.  $\alpha$ PIGF treatment diminishes intrahepatic and colonic neo-angiogenesis in cirrhotic mice. Representative images of CD31 immunohistochemistry in the liver (top panels, original magnification  $\times 100$ ) and colon (bottom panels, original magnification  $\times 400$ ) of IgG<sub>1</sub>-treated cirrhotic mice (left column) and  $\alpha$ PIGF-treated cirrhotic mice (right column). Arrow indicates the presence of CD31-positive endothelial cells in blood vessels. \* $P < 0.05$  versus CCL<sub>4</sub> IgG<sub>1</sub>. <sup>#</sup> $P < 0.01$  versus CCL<sub>4</sub> IgG<sub>1</sub>.

CCL<sub>4</sub> treatment) were treated with  $\alpha$ PIGF. These results point to a therapeutic window during which the antifibrotic effect of  $\alpha$ PIGF can be successful.

**Localization and Cellular Source of PlGF in Fibrotic and Cirrhotic Rodent Livers.** To understand why a decrease in PlGF activity was associated with a reduction in fibrosis severity, we studied the intrahepatic expression of PlGF by immunofluorescence in livers of control (rats,  $n = 10$ ; mice,  $n = 10$ ) and CCL<sub>4</sub>-treated rats ( $n = 10$ ) and mice ( $n = 10$ ). A PlGF signal was weakly observed in the livers of control animals (Fig. 5A). PlGF-positive cells, however, were quite evident in CCL<sub>4</sub>-treated animals. The livers of PlGF-deficient mice were totally devoid of PlGF immunoreactivity (data not shown). In an attempt to identify the cellular source of PlGF expression, we measured PlGF protein and mRNA levels in mouse HSCs (Supporting Information Fig. 7). Activation of HSCs was associated with increased  $\alpha$ SMA expression, a finding that reached significance from day 8 onward (Supporting Information Fig. 7A), and with a significant PlGF increase in the cell supernatants (Supporting Information Fig. 7B). These data were further confirmed in primary HSCs isolated from control and cirrhotic rats (Supporting Information Fig. 7C). In these cells, an intense up-regulation of PlGF was observed in activated HSCs and, to a lesser extent, in hepatocytes and endothelial cells isolated from cirrhotic rats.

**In Vitro Characterization of PlGF Signaling in Activated HSC Cells.** Considering the major pathophysiological role that HSCs play in fibrogenesis, the effect of PlGF on rat and human activated HSCs was studied. As shown in Fig. 5B, there was a significant overexpression of VEGFR1 receptors in primary HSCs from cirrhotic rats and in the LX-2 human HSC cell line. Expression of VEGFR2, another member of the VEGF family of RTKs, was less prominent, particularly in HSCs isolated from cirrhotic animals, in which no detectable expression was present. To assess whether PlGF may regulate the expression of profibrogenic genes, LX-2 cells were incubated in the presence or absence of 100 ng/mL PlGF for 24 hours. LX-2 cells treated with PlGF did not show significant changes in mRNA levels of genes that play a major role in fibrogenesis (i.e., collagen-1, transforming growth factor  $\beta$ , metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1) compared with untreated cells (data not shown).

We next sought to determine which downstream signaling pathways were up-regulated in activated HSCs in response to PlGF treatment. Fig. 5C shows that treatment of primary HSCs and LX-2 cells with PlGF was associated with a sustained induction of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 phosphorylation lasting for more than 60 minutes, during which the total level of ERK1/2 expression remained constant. The treatment of LX-2 cells with anti-



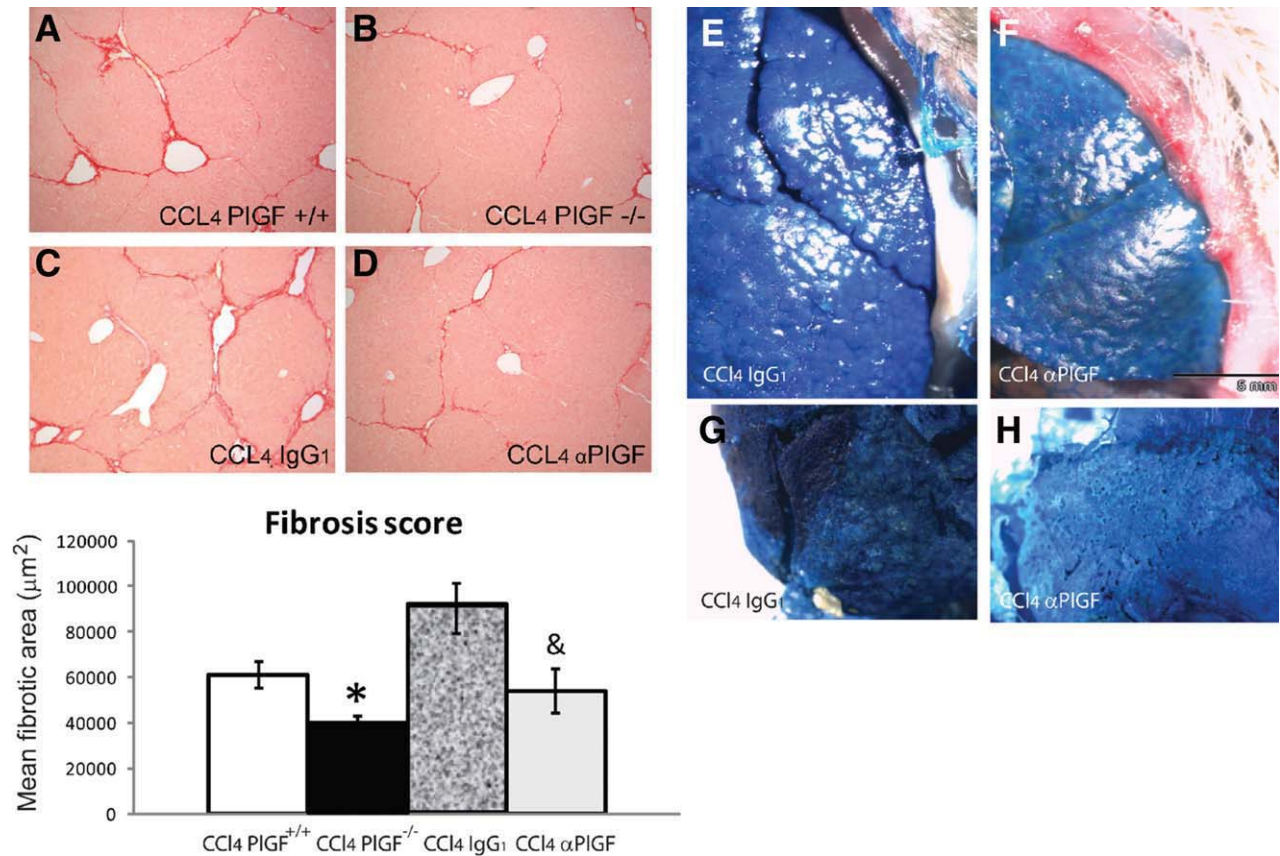


Fig. 4. Targeting PIGF inhibition results in reduced fibrosis scores. Histological images of livers from cirrhotic PIGF<sup>+/+</sup> mice (A), cirrhotic PIGF<sup>-/-</sup> mice (B), cirrhotic IgG<sub>1</sub>-treated mice (C), and cirrhotic αPIGF-treated mice (D) stained with Sirius Red. Original magnification ×100. The histogram represents the computerized quantification of fibrosis scores. \**P* < 0.05 versus PIGF<sup>+/+</sup> and &*P* < 0.05 versus IgG<sub>1</sub>. Fibrosis scores were below 11,000 in all noncirrhotic animals (control PIGF<sup>+/+</sup>, 8,520 ± 309; control PIGF<sup>-/-</sup>, 8,211 ± 795; control IgG<sub>1</sub>, 8,339 ± 184; control αPIGF, 10,172 ± 1,034) (not shown in the histograms). Representative liver (E and F) and stereomicroscopic images (G and H) obtained immediately after Batson injection. Mice treated with αPIGF experienced less explicit macroscopic features of cirrhosis (irregular, nodular liver surface and blunt liver edge) than mice treated with IgG<sub>1</sub>.

VEGFR1 antibodies inhibited the phosphorylation of ERK1/2 induced by PIGF (Supporting Information Fig. 8).

It has been shown previously that sustained ERK1/2 activation promotes fibroblast chemotaxis and proliferation.<sup>16</sup> To assess whether a similar mechanism also occurs in HSCs, we quantified cell chemotaxis in untreated LX-2 cells and in LX-2 cells treated with PIGF. Fig. 6A shows time-lapse microphotographs of LX-2 cell migration. Approximately 35% of the cells showed migration in response to 10 minutes of treatment with 100 ng/mL PIGF (34.6 ± 2 versus 1.3 ± 0% of migrating cells in cultures treated with vehicle only; *P* < 0.001). To further characterize the role of PIGF as a chemotactic substance, LX-2 cells were subjected to a cell migration assay in a modified Boyden chamber in the presence of a PIGF gradient (Fig. 6B). Only a few cells migrated in the absence of PIGF, whereas a significant (seven-fold) increase in directional migration was observed at a concentration of 50 ng/

mL PIGF (*P* < 0.01). The chemoattractant response of LX-2 cells to PIGF was inhibited by disrupting PIGF-VEGFR1 interaction with anti-VEGFR1 antibody.

Because cell migration is associated with regulation of the actin cytoskeleton, we next assessed whether PIGF stimulated F-actin reorganization in activated HSCs. In quiescent LX-2 cells, F-actin was found mostly in membrane structures and as unorganized fibers throughout the cell (Fig. 6C, left panel). In contrast, after treatment with PIGF, phalloidin-stained filopodia were present around the cell periphery, indicating that PIGF promotes actin cytoskeleton remodeling (Fig. 6C, middle panel). The treatment of LX-2 cells with anti-VEGFR1 antibodies inhibited cytoskeleton remodeling induced by PIGF (Fig. 6C, right panel). Next, to test whether PIGF could stimulate HSC proliferation, LX-2 cells were cultured in the presence of PIGF, and we assessed the amount of bromodeoxyuridine (BrdU) that was incorporated into the cells using flow cytometry. Medium supplemented with 2% fetal

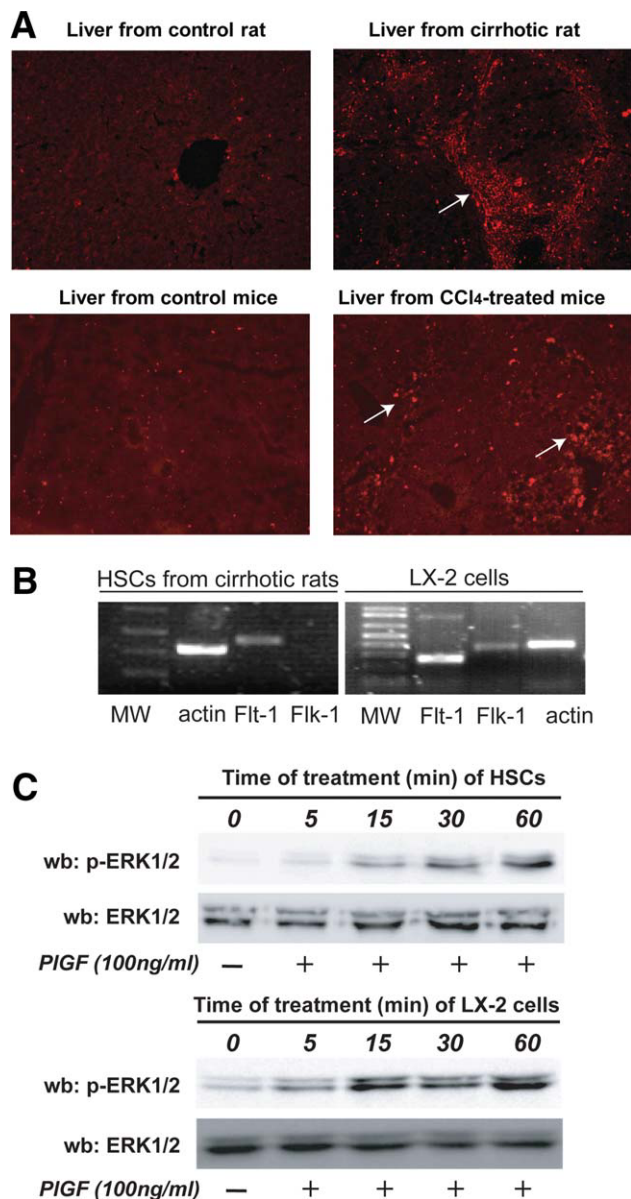


Fig. 5. PIGF is overexpressed in cirrhotic livers and induces sustained activation of ERK1/2 in activated HSCs. (A) PIGF (red) immunofluorescent staining was performed in normal control, fibrotic, and cirrhotic livers of rat and mice using a PIGF-specific monoclonal antibody. There was a significant increase in PIGF reactivity in the cirrhotic livers (arrows). Original magnification  $\times 100$ . (B) Expression of VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1) receptors was evaluated in primary HSCs isolated from cirrhotic livers ( $n = 5$ ) and in LX-2 cells ( $n = 5$ ) by conventional RT-PCR. Amplification of  $\alpha$ -actin (actin) was used as normalization control. MW, molecular weight marker. (C) Primary HSCs from cirrhotic rats and LX-2 cells were stimulated with PIGF (100 ng/mL) for different time durations (+). Lysates (40  $\mu$ g of protein) were analyzed via western blotting analysis with specific antibodies targeted against phosphorylated ERK1/2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> and ERK1/2 ( $n = 5$ ). wb, western blotting.

bovine serum was used as a positive control in the proliferation assay. When LX-2 cells were treated with 100 ng/mL PIGF, BrdU uptake was significantly increased (Fig. 6D), indicating that PIGF promotes proliferation

of these cells. Treatment of LX-2 cells with anti-VEGFR1 antibody totally blocked the PIGF-induced proliferation ( $3.2 \pm 0.9$  versus  $20.7 \pm 1.3\%$  of BrdU incorporation;  $P < 0.01$ ) ( $n = 3$ ).

To gain some initial insight into the signaling mechanisms through which PIGF induces sustained ERK activation, cell migration, and cell proliferation, we analyzed the phosphorylation status of several candidate proteins implicated in the signal transduction. Signal transduction antibody arrays were probed with lysates of LX-2 cells that were treated with or without 100 ng/mL PIGF for 5 minutes and subsequently with anti-phosphotyrosine antibody. Supporting Information Table 1 shows the effect of PIGF on protein tyrosine phosphorylation in HSCs. Bioinformatic analysis of these data is provided in the Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 9. Exposure of HSCs to PIGF resulted in a significant increase in the tyrosine phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFRA) and epidermal growth factor receptor. A direct interaction between VEGFR1 and PDGFRA receptors upon PIGF stimulation was confirmed via proximity ligation assay (see Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 10).

## Discussion

PIGF stimulates endothelial cell growth, migration, and survival, as well as pathological angiogenesis.<sup>9,10,17</sup> These proangiogenic and proinflammatory properties of PIGF together with the synergistic effect between inflammation and angiogenesis, as previously demonstrated for other RTK inhibitors in experimental cirrhosis,<sup>6,7</sup> make the inhibition of PIGF activity an attractive therapeutic strategy for the treatment of chronic liver disease.

However, only a few reports demonstrate a role of PIGF in liver disease.<sup>7,13,18,19</sup> We previously demonstrated that PIGF is up-regulated in the splanchnic microvasculature of portal-hypertensive mice and showed that PIGF deficiency in mice with partial portal vein ligation is associated with a significant decrease in splanchnic angiogenesis, porto-systemic shunting, and mesenteric artery flow.<sup>13</sup> However, the present study is the first to describe a pathological role of PIGF in the context of cirrhosis. We demonstrated in a prevention and therapeutic study that PIGF blockade significantly decreased angiogenesis, arteriogenesis, hepatic inflammation, fibrosis, and portal hypertension in cirrhotic mice. Next, the relevance of these findings in humans was assessed. We showed that the circulating PIGF serum levels and hepatic protein expression were

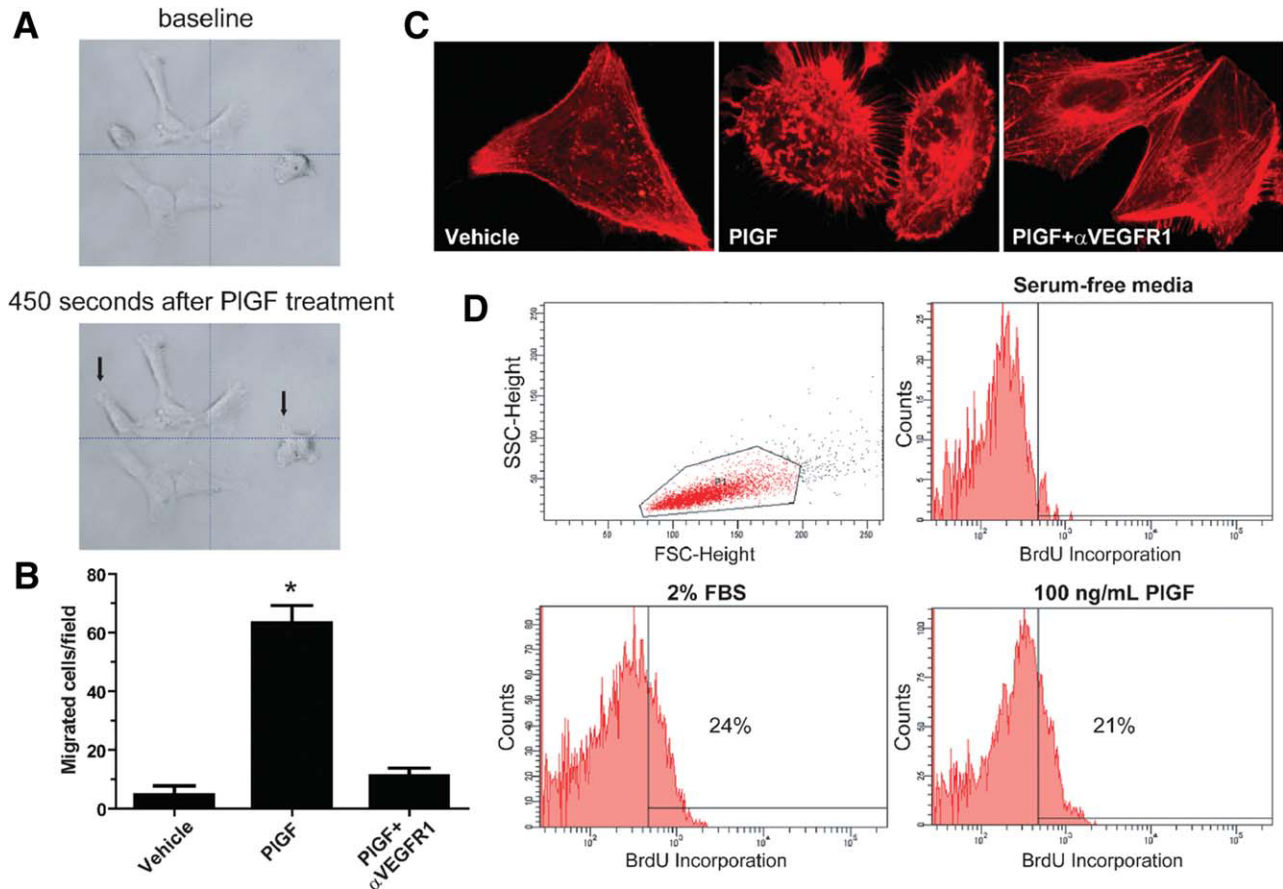


Fig. 6. PIGF stimulates chemotaxis and proliferation in LX-2 cells. (A) Representative time-lapse microphotographs of LX-2 cells treated with 100 ng/mL PIGF. Arrows indicate HSCs that migrated in response to treatment ( $n = 3$ ). Original magnification  $\times 400$ . (B) LX-2 cells were preincubated with or without  $\alpha$ VEGFR1 (5  $\mu$ g/mL) and then trypsinized and resuspended in chemotaxis medium. In total,  $2 \times 10^4$  cells were then added to a polycarbonate membrane (8- $\mu$ m pore size) coated with 1% gelatin in a modified Boyden chamber and exposed to PIGF (50 ng/mL) or PIGF (50 ng/mL) +  $\alpha$ VEGFR1 (5  $\mu$ g/mL) for 4 hours. At the end of the treatment period, cells that had migrated were stained with DiffQuick solution, and the cell number was counted in three random fields. Data points represent the mean  $\pm$  SEM number of migrating cells/field calculated in three different wells. \* $P < 0.01$  compared with vehicle ( $n = 3$ ). (C) LX-2 cells were incubated with vehicle, PIGF (100 ng/mL), or PIGF (100 ng/mL) +  $\alpha$ VEGFR1 (5  $\mu$ g/mL) for 5 minutes. F-actin was detected in fixed and permeabilized cells using fluorescein isothiocyanate-labeled phalloidin. In LX-2 cells, PIGF treatment was associated with filopodia formation.  $\alpha$ VEGFR1 treatment inhibited cytoskeleton remodeling induced by PIGF ( $n = 5$ ). (D) Representative figures of a proliferation assay performed in LX-2 cells that were treated with or without PIGF (100 ng/mL) for 24 hours. BrdU incorporation was quantified via flow cytometry. Cells within the oval scatter gate were analyzed (upper left panel). For each panel, the percentage of cells that stained positively for BrdU is indicated ( $n = 8$ ).

increased in patients with cirrhosis and correlated with the stage of fibrosis. Finally, we explored the cellular effects of PIGF in HSCs, which play a key role in the pathogenesis of fibrosis and portal hypertension.

An important finding of the present study is the association between PIGF blockade and the significant decrease in portal pressure in cirrhotic mice. Although keeping in mind the limitations of translating results in animal models into clinical practice, we found that there was a significant positive correlation between circulating PIGF serum levels and hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. Based on such observations, we could speculate that PIGF may also be involved in the pathogenesis of portal hypertension in humans. There is compelling evidence suggesting

that the increase in portal blood flow seen in portal hypertension is not only due to splanchnic vasodilation, but also to enlargement of the splanchnic vascular tree caused by angiogenesis.<sup>13</sup> Considering this evidence, the significant inhibition of angiogenesis and arteriogenesis in the splanchnic area by  $\alpha$ PIGF may therefore contribute to the decrease in portal inflow following therapy.

Another important finding of this study is the blockade of hepatic fibrosis by targeting PIGF. This finding is in agreement with previous studies demonstrating that several angiogenic inhibitors inhibit the progression of liver fibrosis.<sup>3,6,7</sup> We demonstrated that hepatic PIGF immunoreactivity was strong in cirrhotic rats and mice. Moreover, activated HSCs were the

major source of PlGF production in these rodents, and they exhibited substantial VEGFR1 expression. However, it is intriguing that although the blockade of PlGF *in vivo* is antifibrogenic, we were unable to find significant changes in the expression of profibrogenic genes when human activated HSCs were treated with PlGF. This discrepancy may be explained considering that PlGF promotes an angiogenic phenotype in HSCs characterized by a sustained ERK1/2 phosphorylation as well as chemotaxis and proliferation. The acquisition of an angiogenic phenotype by HSCs has been described by others in response to PlGF and connected to the enhanced HSCs coverage of sinusoid characteristic of cirrhotic livers.<sup>5</sup> All of these changes result in abnormalities in hepatic blood vessels that compromise the regulation of intrahepatic pressure and tissue perfusion. The sacculated and chaotically disorganized appearance of the microvessels in the cirrhotic livers of control mice, as analyzed by the vascular corrosion casts, is consistent with such vessel abnormalization.<sup>20</sup> Interestingly,  $\alpha$ PlGF treatment resulted in a partial normalization of the three-dimensional architecture of the hepatic blood vessel network and induces a significant decrease of proinflammatory vasculature, which is characterized by the expression of vascular cell adhesion molecule 1. A similar mechanism of vessel normalization induced by  $\alpha$ PlGF treatment was recently described in hepatocellular carcinoma nodules.<sup>10</sup> Interestingly, a reduction in fibrosis was only demonstrated when mice were treated with  $\alpha$ PlGF in the early phase of cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub> treatment (from week 12 to week 20). No significant beneficial effect was observed following  $\alpha$ PlGF therapy in mice with end-stage cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub> (week 18 to week 25). This observation supports the idea that the acquisition of an angiogenic phenotype by HSCs, in response to PlGF, causes an increase in the HSC population in early phase of cirrhosis that correlates with the degree of fibrosis. However, when the HSC population reaches a critical mass, the therapeutic efficiency of PlGF blockade is limited, because PlGF does not have any effect on the regulation of profibrogenic genes. In agreement with this hypothesis, it has been shown that the expression of angiogenic factors in fibrotic/cirrhotic livers occurs mainly in areas of active fibrogenesis and not in larger bridging septae or in end-stage cirrhotic tissue.<sup>21</sup> Therefore, this evidence points to a therapeutic window during which  $\alpha$ PlGF treatment is effective at inhibiting and reducing fibrosis.

The sustained ERK activation in response to PlGF in HSCs prompted us to investigate the underlying mechanisms, because VEGFR1 has a relatively weak

tyrosine kinase activity. Some authors also have suggested that VEGFR1 could function as a decoy receptor for VEGF-A, thereby amplifying the activity of VEGF.<sup>12</sup> However, HSCs did not express detectable levels of VEGFR2, suggesting that VEGFR1's role extends beyond a mere decoy activity. Comparison of the protein tyrosine phosphorylation profile of activated HSCs showed that PlGF induced the phosphorylation of other tyrosine kinase receptors, including PDGFRA and epidermal growth factor receptor. These findings raise the intriguing possibility that upon PlGF activation, VEGFR1 may amplify its own signaling by highjacking other RTKs via a molecular association. In our initial analysis, we identified PDGFRA as a candidate of such molecular cross-talk that may further potentiate sustained ERK activation. A similar cross-talk between VEGFR1 and VEGFR2, whereby PlGF amplifies VEGF-driven angiogenesis, has been documented in endothelial cells.<sup>22</sup> VEGFR1 also interacts with low-density lipoprotein receptor, that results in ligand-independent activation of VEGFR1 by LDL.<sup>23</sup> However, a molecular cross-talk between VEGFR1 and other types of RTKs, resulting in sustained signaling, has never been documented yet.

Although antiangiogenic agents are frequently used in the treatment of angiogenesis-related diseases, their clinical use has been associated with adverse effects, such as hypertension, proteinuria, thrombosis, and reduced wound healing capacity. These adverse effects warrant some caution to select angiogenic inhibitors for the treatment of patients with cirrhosis who are critically ill. Studies in transgenic mice have shown that loss of PlGF does not affect development, reproduction, or normal postnatal health, but impairs pathological angiogenesis in implanted and spontaneously arising cancer models.<sup>10</sup> Moreover, administration of  $\alpha$ PlGF is not associated with vascular pruning in healthy organs in mice,<sup>9</sup> and is well tolerated in humans, where phase I trials in healthy volunteers and patients with solid tumors have thus far not revealed any major adverse effects.<sup>14,15</sup> The present study confirms the safety profile of  $\alpha$ PlGF (Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 11). Furthermore,  $\alpha$ PlGF did not compensatorily up-regulate the expression of VEGF; such up-regulation has been suggested to represent a possible cause of resistance to antiangiogenic treatment (Supporting Information Results and Supporting Information Fig. 11).

In conclusion, this experimental study characterized the pathophysiological mechanisms and molecular effects that PlGF exerts on murine and human cirrhotic livers and on HSCs. Blockade of the PlGF

pathway in cirrhotic mice by monoclonal antibodies or by genetic deficiency of PIGF decreased hepatic and mesenteric angiogenesis, mesenteric arterial blood flow, fibrosis, and inflammation, as well as portal pressure. Also because of its safety profile,  $\alpha$ PIGF may be considered as an attractive candidate for treating patients with chronic liver disease.

*Acknowledgment:* We thank Julien Dupont and Huberte Moreau for technical assistance, Kin Jip Cheung for compiling the demographic data of the patients, and Susana Kalko for technical assistance with bioinformatic analysis. LX-2 cells were generously supplied by Scott L. Friedman;  $\alpha$ PIGF was kindly provided by ThromboGenics NV.

## References

- Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-620.
- Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;53:976-980.
- Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;135:1729-1738.
- Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, et al. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *HEPATOLOGY* 2000;32:980-989.
- Semela D, Das A, Langer D, Kang N, Leof E, Shah V. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;135:671-679.
- Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocolateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *HEPATOLOGY* 2009;49:1245-1256.
- Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodes J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *HEPATOLOGY* 2007;46:1919-1926.
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sagesser H, et al. Pharmacological inhibition of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *HEPATOLOGY* 2009;50:1501-1511.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131:463-475.
- Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell* 2010;141:178-190.
- DiPalma T, Tucci M, Russo G, Maglione D, Lago CT, Romano A, et al. The placenta growth factor gene of the mouse. *Mamm Genome* 1996;7:6-12.
- Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 2003;1:1356-1370.
- Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, Van Vlierberghe H, De Vos F, Olievier K, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;137:2112-2124.
- Lassen U, Nielsen D, Sorensen M, Ronnengart E, Eldrup K, Bentzon K, et al. A phase I, dose escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PIGF, in patients with solid tumors [Abstract]. *Mol Cancer Ther* 2009;8:A111.
- Riisbro R, Larsson L, Winsted L, Niskanen T, Pakola S, Stassen JM, et al. A first-in-man phase I dose escalation study of TB403, a monoclonal antibody directed against PIGF in healthy male subjects [Abstract]. *Mol Cancer Ther* 2009;8:A3.
- Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, Cheresh DA. Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;140:1255-1263.
- Khurana R, Moons L, Shafi S, Lutun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation* 2005;111:2828-2836.
- Huang XX, McCaughan GW, Shackel NA, Gorrell MD. Up-regulation of proliferative genes and the ligand/receptor pair placental growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 1 in hepatitis C cirrhosis. *Liver Int* 2007;27:960-968.
- Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martin-Vilchez S, Garcia-Buey L, Borque MJ, et al. Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:699-706.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn D, van Loo L, Van Hoorebeke L, Segers P, et al. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010;90:1558-1572.
- Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, et al. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *HEPATOLOGY* 2005;42:1339-1348.
- Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9:936-943.
- Usui R, Shibuya M, Ishibashi S, Maru Y. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 1 by low-density lipoprotein. *EMBO Rep* 2007;8:1155-1161.

## **Supplemental information**

1. Supplemental methods
2. Supplemental results
3. Supplemental figure legends
4. Supplemental tables

## 1. Supplemental methods

**Experimental models of cirrhosis.** All animals were kept under constant temperature and humidity in a 12-h controlled dark/light cycle. Mice and rats were fed *ad libitum* on a standard pellet diet. Cirrhosis in mice was induced by subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg, twice a week) during the entire period of the study. Additionally, 5% ethanol was added to the animals' drinking water, as previously described (1). After 12 weeks of CCl<sub>4</sub> treatment, mice developed micronodular cirrhosis (METAVIR score F3/F4). Controls received subcutaneous injections of 1 mL/kg body weight of saline (0.9%) over a corresponding period and no ethanol was added to their drinking water. Cirrhosis in rats was induced by CCl<sub>4</sub> inhalation, which was administered twice weekly. Control and cirrhotic rats were supplied with a standard diet and drinking water containing 0.3 g/L phenobarbital (Kern Pharma; Barcelona, Spain) (2). All experiments were approved by the Ethics Committees of the Ghent University and the Hospital Clínic-University of Barcelona

**Human samples.** Hepatic expression of PIGF was assessed in liver specimens that were obtained by a transjugular approach from patients with alcoholic hepatitis (n=3) and by a percutaneous approach in patients with chronic hepatitis C (n=23). Normal liver specimens (n=6) were obtained from tissue fragments obtained following resections of colon cancer metastases from the liver (localized at a considerable distance from the metastases) prior to vascular clamping as previously described (3). Fibrosis (F0=none; F1=mild; F2=moderate; F3=advanced; F4=cirrhosis) and inflammatory activity (A0=none; A1=mild; A2=moderate; A3=severe) were evaluated on liver biopsy according to the METAVIR scoring system (1). Co-infected patients were excluded from the study. For analysis of serum PIGF levels, blood samples were obtained from patients with chronic hepatitis C (n=5), non-alcoholic steatohepatitis (n=5) and alcoholic hepatitis (n=32). Samples were also collected from healthy controls (n=19) who were matched with the patients with respect to age, sex, and body mass index. For PIGF immunohistochemistry (IHC), biopsy samples were obtained from patients with hepatitis C (n = 20). Patients showing signs of decompensation, co-infection or hepatocellular carcinoma (HCC) were excluded from the IHC study group. The study

protocol was conform to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of the Ghent University Hospital and the Hospital Clínic of Barcelona. All patients gave informed consent prior to participation in the study.

***Hemodynamic studies.*** The animals were anaesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight, Ketalar®, Pfizer, Brussels, Belgium) and xylazine (10mg/kg body weight, Rompun®, Bayer, Brussels, Belgium) and prepared for measurement of hemodynamic parameters (arterial blood pressure (mmHg, MAP), portal pressure (mmHg), superior mesenteric artery flow (ml/min)). All studies were performed in overnight-fasted mice. Both the jugular vein and the carotid artery were cannulated for administration of fluid and monitoring of the mean arterial blood pressure (mmHg) (MAP), respectively. To evaluate portal hypertension, the portal pressure (mmHg) was measured via cannulation of the ileocolic vein with a 24-gauge catheter (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgium). All catheters were connected to highly sensitive pressure transducers of a multichannel computer-based recorder (Powerlab, ADInstruments, Spechbach, Germany) and analyzed with Chart5 (ADInstruments). An ultrasonic blood flow probe (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) was placed around the superior mesenteric artery, allowing measurements of the superior mesenteric artery blood flow (ml/min).

***Vascular corrosion casting.*** Each cast was prepared as previously described (4) by the injection of Batson's #17 casting medium (Brunschwig chemie, Amsterdam, The Netherlands) and analyzed with a stereomicroscope (Olympus SZX7, Olympus Belgium, Aartselaar, Belgium) and a Jeol JSM 5600 LV scanning electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).



***Histology (Sirius Red, PAS-diastase), immunohistochemistry (CD31,  $\alpha$ SMA), immunofluorescence (PIGF and VCAM-1), cytology (phalloidin) and (computerized) image analysis.*** For our histology and immunohistochemistry experiments, liver samples were fixed in 10% buffered formaldehyde solution, dehydrated and embedded in paraffin. Immunolabeling was performed using the following antibodies: anti-mouse CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), anti-PIGF (Abcam, Cambridge, UK) and anti-mouse  $\alpha$ SMA (Dako; Hamburg, Germany). Immunolabeled cells were detected with the LSAB2 System HRP (Dako; Hamburg, Germany). Collagen deposition was detected by Sirius Red staining. Visualization of macrophages with active phagocytic activity was achieved with PAS-diastase staining. Sections were pre-digested with or without diastase, incubated with periodic acid for 5 min and stained with Schiff's reagent for 10 min. Quantification of PAS-positive cells was performed in seven randomly selected fields for each mouse, and the mean value of the cell counts in these seven fields was calculated. Immunoreactivity and liver histology were visualized by light microscopy (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan). The vascular density of specimens stained for CD31 was measured quantitatively using light microscopy and computerized image analysis (automatic color detection by Olympus Cell software, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using an adapted international consensus method for quantification of angiogenesis (5). Likewise, the amount of Sirius Red-stained collagen fibers were analyzed and quantified by automatic color detection. The double layer of visceral peritoneum suspending the jejunum and ileum (referred to as "mesenteric tissues") was also analyzed by immunohistochemistry. Because vascular density can vary between different parts of the mesentery, the first six loops proximal to the cecum were chosen for analysis. For the immunofluorescence assays, tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected overnight in a 20% sucrose solution and embedded in optimal cutting temperature medium. Next, 8- $\mu$ m frozen sections were rehydrated, blocked with 5% normal goat serum and incubated with anti-PIGF antibody (sc-1882; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or rat anti-mouse CD31 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) or goat anti-mouse VCAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, USA). Tissues for which immunostaining was performed without primary antibodies was used as the negative control. The binding sites of the primary antibodies were revealed with Alexa Fluor 555-conjugated donkey anti-goat

IgG (Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, USA) and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rat IgG (Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, USA). Samples were visualized with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan). For assessment of filopodia and cytoskeleton remodeling, LX-2 cells were stimulated with 100 ng/mL PIGF and then fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 10 min. Cells were then permeabilized with Triton 0.1% for 4 min at 4°C and incubated with phalloidin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 40 min at room temperature. The cytoskeleton was visualized by confocal microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). More than 25 cells per well were evaluated under the microscope.

***AntibodyArray assay and identification of the protein phosphorylation.*** To profile the protein phosphorylation under different conditions, LX-2 cells that were grown to subconfluence were serum-starved overnight and incubated with or without 100ng/mL PIGF (Acris Antibodies, Herford, Germany) for 5 min. Cell extracts were incubated for 2h at room temperature with the Signal Transduction AntibodyArray™ filter (Hypermatrix, Worcester, USA). Further procedures were carried out according to the manufacturer's instructions. The reactions were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Post-scanning raw signal intensity data for the antibody arrays were obtained, background corrections were processed with the gel analysis function of Image J software, and the spot intensities were log<sub>2</sub>-transformed. The between-array variation was normalized using the phosphotyrosine signals of proteins not affected by PIGF. For each protein, the average expression across the arrayed samples (n=3 for vehicle and n=3 for PIGF treatment) was calculated. Results are expressed as the n-fold change in the difference in the mean normalized expression after PIGF treatment and the mean normalized expression of basal tyrosine phosphorylation. Only changes that were larger than 2-fold were considered for inclusion in the final analysis. Intracellular signaling pathways activated by PIGF treatment were modeled using Ingenuity Pathway Software (Ingenuity®Systems, Inc., Redwood City, USA). The resulting P-values obtained by the Ingenuity Pathways Knowledge Base were adjusted for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg's method.

**Proximity ligation assay (PLA).** LX-2 cells that were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well were seeded into 8-well chamber slides. After incubation for 24 h, cells were serum-starved overnight in 0.1% bovine serum albumin. The following day, they were stimulated with 100 ng/mL PIGF for 5 min at 37°C. Cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and subjected to PLA (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden). Briefly, slides were blocked and incubated with primary antibodies [goat anti-human VEGFR1 (AF321; R&D Systems, Minneapolis, USA) and rabbit anti-PDGFR $\alpha$  (sc-338; Santa Cruz)]. Secondary antibodies (anti-goat and anti-rabbit) that were conjugated to unique DNA probes (Olink bioscience, Uppsala, Sweden) were then added. Ligation and circularization of the DNA was followed by a rolling circle amplification step. These reactions were detected by a complementary Cy3-labeled DNA linker. The cells were counterstained with Alexa Fluor 488 conjugated to phalloidin (Molecular Probes-Invitrogen; San Diego, CA, USA). Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and examined using an LSM 510 META confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

**Quantitative RT-PCR (qPCR).** Total RNA was extracted from frozen rat livers with Trizol reagent (Life Technologies, Rockville, USA). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). Then, cDNA samples were amplified for 30–35 cycles (94°C for 30 s, 55–60 °C for 30 s and 72 °C for 1 min.) The specific primers used for cDNA amplification were:

1) PIGF-2 (human): 5'-GGGGGCCCTGCTACCTGTTCTTG-3' (forward) and 5'-CCCGGGCCCACTCTGTATGT-3' (reverse);

2) PIGF (mouse): 5'-ATGACATTTTCTCAGGATGTGCT-3' (forward) and 5'-GGTTCCTCAGTCTGTGAGTTTC-3' (reverse);

3) PFKM (mouse): 5'-GCCGGCTCAGTGAGACAAG-3' (forward) and 5'-TGGCACCTTCAGCAACAATG-3' (reverse)

- 4) GLUT1 (mouse): 5'-GCTTATGGGCTTCTCCAAACT-3' (forward) and 5'-GGTGACACCTCTCCCACATAC-3' (reverse)
- 5) VEGFR1 (rat): 5'-CCCAAGGCCTCAATGAAAATAGAC-3' (forward) and 5'-GAGCCGAGCCGTTGGGACTTAGAA-3' (reverse);
- 6) VEGFR1 (human): 5'-CACGCTGAGCTGGAAAGGAAAATC-3' (forward) and 5'-CGGGGGTTGGAGCAGGGAAGTCAT-3' (reverse);
- 7) VEGFR2 (rat): 5'-TCCCGTCCTCAAAGCATCAGCATA-3' (forward) and 5'-GCAGGGGAGGGTTGGCATAGA-3' (reverse primer);
- 8) VEGFR2 (human): 5'-AGAGCCGGCCTGTGAGTGTA AAAA-3' (forward) and 5'-TCAGTGTGGTCCCCGAGTCAGG-3' (reverse);
- 9)  $\beta$ -actin (rat): 5'-TAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC-3' (forward) and 5'-ATTGCCGATATGGATGACCTG-3' (reverse);
- 10)  $\beta$ -actin (human): 5'-GTGACGTGGACATCCGCAAAGAC-3' (forward) and 5'-AAGAAAGGGTGTAACGCAACTAAG-3' (reverse);
- 11)  $\alpha$ -SMA (mouse): 5'-CCAGCACCATGAAGATCAAG-3' (forward) and 5'-TGGAAGGTAGACAGCGAAGC-3' (reverse) and
- 12) HPRT (human): 5'-GGGGGCTATAAGTTCTTTGCTGAC-3' (forward) and 5'-CCTCCCATCTCCTTCATCACATCT-3' (reverse)

For qPCR analysis, changes in mouse  $\alpha$ SMA and rat PIGF mRNA expression were examined in a 96-well plate using an Opticon real-time PCR machine (MJ Research, Waltham, USA). Changes in human CollagenA1, MMP2, TGF- $\beta$  and TIMP1 expression after LX-2 treatment with PIGF (100 ng/mL) for 24 h, were examined in a 384-well

plate using a LightCycler®480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). All qPCR reactions were performed in the presence of specific primers and oligonucleotide probes (TaqMan probe, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The number of PCR cycles required for the fluorescence intensity to exceed a pre-determined threshold was measured during qPCR. Quantification of the initial amount of template molecules relied on this number of PCR cycles, which is termed the cycle of threshold (Ct). For each sample, the amount of the target gene that was present was determined using the appropriate standard curve. The n-fold changes in the amount of the target gene were calculated by dividing target values from cirrhotic samples by those from the averaged control samples. The expression of the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) or 18s was used as an internal control for normalization of RNA quantity. For PIGF, GLUT1 and PFKM real-time detection and qPCR quantification, we used SYBR Green (Roche, Mannheim, Germany) using the stably expressed reference gene hydroxymethylbilane synthase (HMBS). For relative quantification, the  $\Delta\Delta C_t$  method was used. Transcript abundance was estimated taking into account the amplification efficiency of each primer set. Primer efficiencies were determined by subjecting a dilution series of mouse reference cDNA to qPCR analysis and using the formula  $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$ .

**Cell culture.** Hepatic stellate cells (HSC), hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells from control and cirrhotic rats were isolated and cultured as previously described (6, 7). The LX-2 cell line, which is derived from normal primary human HSCs that have been immortalized and that are able to grow under reduced serum conditions, was maintained as described previously (8). LX-2 cells express markers of activated HSCs and have a similar phenotype to that of activated HSCs *in vivo*. The THP-1 cells, a human acute monocytic leukemia cell line, were cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) (Invitrogen, Grand Island, USA), supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of PIGF, VEGF and  $\beta$ PIGF.** Protein lysates from liver tissues were obtained as previously described (9). Quantification of PIGF and

VEGF levels in serum and hepatic tissue was performed using specific ELISAs (R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. To determine the concentration of  $\alpha$ PIGF in serum samples, ELISA plates (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) were coated with PIGF (0.5  $\mu$ g/mL, R&D Systems), blocked with bovine serum albumin (BSA), and incubated with serial dilutions of serum. Bound  $\alpha$ PIGF was detected using goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich).

**Western blot experiments.** Cell and tissue lysates were prepared in lysis buffer, and western blot analysis was performed as previously described (6) using anti-Erk1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK), anti-phospho-Erk1/2-Thr202/Tyr204 MAPK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-PIGF (sc-1882; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) antibodies and anti-HIF-1 $\alpha$  (Calbiochem, Nottingham, United Kingdom). LX-2 cells were preincubated for 1h with anti-human VEGFR1 (R&D Systems, Minneapolis, USA) (25  $\mu$ g/mL) in order to block PIGF signal, and stimulated with PIGF (100 ng/mL) or PIGF (100 ng/mL) plus anti-human VEGFR1 (25  $\mu$ g/mL) prior to the lysis.

**Cell proliferation assay.** The BrdU cell proliferation assay kit (BrdU Flow kit; BD Pharmigen, San Jose, USA) was used to measure the incorporation of BrdU during DNA synthesis following the manufacturer's protocols. Briefly, LX-2 cells were fasted in serum-free medium for 24 h. Following treatment with PIGF (100 ng/mL) for 24 h, BrdU (10  $\mu$ M) was added to the culture medium for 5 h. The BrdU-labeled cells were then fixed and the DNA was denatured in fixative solution for 1 h at 37 °C. The cells were then incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-BrdU antibody for 20 minutes at room temperature. Immunofluorescence was detected by flow cytometry (FACSCanto II; BD Bioscience, Bedford, MA, USA).

**Cell migration assays.** Cell migration was assessed by time-lapse recording of activated HSC cell behaviour in response to PIGF treatment (100 ng/mL) at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and 21% O<sub>2</sub>. The time-lapse recording was done using a digital camera (Leica TCS SL, Wetzlar, Germany) and an inverted Leica DMIRE2 microscope (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany). In addition, directional migration was also evaluated by Boyden chamber assay (NeuroProbe, Gaithersburg, USA). Briefly, LX-2 cells were fasted in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Grand Island, USA) and THP-1 cells in RPMI-1640 (Invitrogen, Grand Island, USA) for 24 h prior to the migration experiment. LX-2 cells were preincubated for 1h with anti-human VEGFR1 (5 µg/mL). Cells were suspended and counted, subsequently 50 µl of cell suspension ( $4 \times 10^5$  cells/mL for LX-2 or  $1 \times 10^5$  cells/ml for THP-1) was placed in the upper compartment with a gelatin-coated polycarbonate membrane separating the two chambers. PIGF (50 ng/mL), PIGF (50 ng/mL) plus anti-VEGFR1 (5 µg/mL) or the chemotactic tripeptide fMet-Leu-Phe ( $10^{-7}$  M) were placed in the lower compartment of the chamber. After 4 h of incubation at 37 °C, cells that were on the upper side of the membrane were scraped off using a cotton swab and cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed with methanol. After staining with DiffQuick® solution (Dade Behring Inc., Newark, USA), cells that had migrated into the lower side were counted manually. The cells' migration ability was expressed as the average cell number in four random microscopic fields (Olympus BX45, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

**Statistical analysis:** Data analysis was performed using SPSS version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). See Supplemental Methods. In the case of normally distributed data, groups were compared using Student's t-test or ANOVA (analysis of variance) for independent samples. For other types of data, the Mann–Whitney U test or the Kruskal–Wallis test was used. Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEMs) or as medians  $\pm$  ranges when indicated. Differences were considered to be statistically significant when the *P*-value < 0.05 (two-tailed). The statistical significance of the correlation between circulating levels of PIGF and the hepatic vein pressure gradient (HVPG) was calculated using the Pearson Correlation Coefficient.

## 2. Supplemental results

***Beneficial effects of anti-PIGF antibody ( $\alpha$ PIGF) treatment on splanchnic hyperemia and portal hypertension in cirrhotic mice.*** The serum concentration of  $\alpha$ PIGF (trough level) was in the therapeutic range ( $774 \pm 94 \mu\text{g/ml}$ ). Compared with IgG<sub>1</sub> treatment (CCl<sub>4</sub> IgG<sub>1</sub>), 8 weeks of  $\alpha$ PIGF treatment (CCl<sub>4</sub>  $\alpha$ PIGF) resulted in a 26% decrease in portal pressure ( $P < 0.001$ ) and a 40% reduction in mesenteric artery blood flow ( $P < 0.001$ ) (Table 1). Treatment with  $\alpha$ PIGF did not affect MAP, splenic weight or heart rate. These results demonstrate that  $\alpha$ PIGF treatment can partially reverse the portal hypertensive syndrome.

***Linking PIGF to inflammation.*** To further understand the link between PIGF blockade and the reduction in inflammatory infiltrate, two different experimental approaches were used. First, the expression of pro-inflammatory adhesion molecules in the vasculature of cirrhotic mice was analyzed in absence or in presence of PIGF activity. It has been reported previously that VCAM-1 is overexpressed in areas of neovascularization and inflammatory infiltrate and, in addition, plays a major role in leukocyte recruitment and vascular transmigration. As shown in Supplemental Figure 2A, VCAM-1 (red) was weakly expressed in the sinusoidal lining cells of control livers and did not colocalize with blood vessels (green). In contrast, VCAM-1 immunostaining in cirrhotic livers was stronger and colocalized well with the neovasculature (yellow color in the merge panels). CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>-/-</sup> mice exhibited a significant reduction in hepatic VCAM-1 expression, compared with CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>+/+</sup> mice ( $4.9 \pm 2.5$  % of VCAM-1 positive area vs  $13.1 \pm 1.9$  %, respectively;  $P < 0.05$ ). Interestingly, a significant number of hepatic blood vessels did not express VCAM-1 (10) in CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>-/-</sup> mice ( $67 \pm 5.1$ %), compared with CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>+/+</sup> mice ( $19 \pm 3.4$ %;  $P < 0.05$ ). In the second approach, we investigate the chemoattractant response of monocytes to PIGF. Few THP-1 cells, a human monocytic cell line, migrate in the absence of PIGF. However, a significant 7-fold increase in directional migration of THP-1 cells was observed when PIGF was added to the modified Boyden chamber (supplemental Figure 2B). The degree of chemotaxis in response to PIGF was similar to the chemotaxis induced by



formylated chemotactic tripeptide fMet-Leu-Phe (fMLP), which was used as a positive control.

***Evaluating the role of PlGF in angiogenesis on vascular corrosion casting.***

Stereomicroscopy and scanning electron-microscopic evaluation showed that control IgG<sub>1</sub>-CCl<sub>4</sub> mice displayed increased splanchnic angiogenesis, which was reflected by increased vascular arborization forming honeycomb-like vascular networks (Supplemental Figure 4, panels a, c and e). Although only sporadically present, intussusceptive angiogenesis was noticed in IgG<sub>1</sub>-CCl<sub>4</sub> mice (detail from panel e). In contrast, vascular pruning and reduced vascular density were seen in αPlGF-treated CCl<sub>4</sub> mice (panels b, d and f; see also detail from panel f). Blood vessels were organized in a nodular pattern in the livers of both IgG<sub>1</sub>- and αPlGF-treated CCl<sub>4</sub> mice. However, a striking difference was observed in the three-dimensional organization of the sinusoids. Whereas the sinusoids of IgG<sub>1</sub> cirrhotic mice had an irregular, disrupted, bulging and saccular appearance (panels g and i), those of CCl<sub>4</sub> mice treated with αPlGF had evidence of more quiescent, highly organized trabecular sinusoidal perfusion in which the course of the vessels was less disrupted (panels h and j). This hepatic angioarchitecture was comparable to the “Christmas-tree” appearance that has been described in livers of control mice (4). However, this sinusoidal vessel normalization following αPlGF treatment was not uniformly distributed throughout the entire liver, as scattered areas with disordered architecture were still present in other areas.

***Analysis of Hypoxia-Inducible Genes and HIF-1α levels in IgG<sub>1</sub> and αPlGF-treated CCl<sub>4</sub>-exposed livers.***

Quantitative PCR of the expression of hypoxia-inducible glycolytic genes in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers showed reduced expression upon αPlGF treatment compared to IgG<sub>1</sub> (Supplemental Figure 5). These findings suggest that αPlGF-treated livers may be less glycolytic because of improved oxygenation. In agreement with this metabolic reprogramming, PlGF-blockage lowered GLUT-1 expression (P=0.05) and phosphofructokinase-1 expression (P<0.05), the most important regulatory enzyme of the glycolysis, suggesting that PlGF-blocked cirrhotic livers have a more oxidative metabolism due to higher oxygenation. This is translated into a significant

downregulation of HIF-1 $\alpha$  protein level ( $p < 0.05$ ) (Supplemental Figure 5). The balance between oxygen supply and demand in the liver seems to be restored.

**Further characterization of PlGF signaling pathways.** In accordance to our findings in the proliferation and cell migration experiments (shown in Figure 6), bioinformatic analysis of these data showed clustering of the phosphorylated proteins into two functional networks: 1) cellular development, hematological system development and cell viability; and 2) cancer, tumor morphology and cellular movement (Supplemental Figure 9). Interestingly, we also found that exposure of HSCs to PlGF resulted in a significant increase in the tyrosine phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFRA) and epidermal growth factor receptor (EGFR). Supplemental Figure 10A shows representative areas of the arrays that show reactivity for PDGFRA and p-EGFR, but not for PDGFRB or for the unphosphorylated form of EGFR. Increased tyrosine phosphorylation of EGFR and PDGFRA might result from a direct association between these RTKs and VEGFR1. To further explore this possibility and to validate the array results, the interaction of VEGFR1 and PDGFRA receptors was examined by proximity ligation assay (PLA). As shown in Supplemental Figure 10B, at time zero of VEGFR1 activation, VEGFR1 and PDGFRA were not close enough to produce a significant PLA signal in LX-2 cells. However, after 5 min of PlGF treatment, a substantial increase in the PLA signal was present. These results demonstrate that PlGF induced an interaction between VEGFR1 and PDGFRA, enabling proximity ligation and subsequent detection by hybridization of labeled oligonucleotide probes.

**Safety profile and adaptive resistance to PlGF inhibition.** Treatment with classical angiogenesis inhibitors can be associated with hematological side effects characterized by thrombosis, hypertension and microvascular pruning in healthy organs (11). In this context, neither cirrhotic mice treated with  $\alpha$ PlGF nor cirrhotic PlGF<sup>-/-</sup> mice exhibited significant changes in the vascular density of quiescent vessels in organs in which pathological angiogenesis was not present, such as the thyroid gland (Supplemental Figure 11A). Another critical point in the clinical application of anti-angiogenic medication is the potential development of resistance through compensatory overexpression of other pro-angiogenic factors. To evaluate whether or not  $\alpha$ PlGF

therapy was associated with the induction of alternative pro-angiogenic mechanisms, mesenteric VEGF expression was evaluated in the context of PlGF blockade. As seen in Supplemental Figure 11B,  $\alpha$ PlGF treatment did not produce significant changes in the expression of this key regulator of angiogenesis.

### 3. Supplemental figure legends

**Supplemental Fig. 1. Immunohistochemistry of PIGF in human liver samples according to the METAVIR fibrosis grades.** Representative images of biopsy samples of various fibrosis-grades (F0–F4). Control samples that were incubated with normal goat IgG<sub>1</sub> stained negative (left panels). PIGF was expressed in hepatocytes and in cells located in fibrotic areas. The histogram shows the computerized image analysis of PIGF staining intensity. Expression of PIGF was significantly higher in samples with cirrhosis (F4) than in samples without fibrosis (F0) or with only mild fibrosis (F1). Interestingly, increased PIGF staining intensity was associated with increasing fibrosis grades. \* denotes  $P \leq 0.001$  vs. cirrhosis (F4). Original magnification: 100x.

**Supplemental Fig. 2. Effect of PIGF on vascular expression of VCAM-1 and monocyte migration.** (A) VCAM-1 (red) and CD31 (green) immunofluorescent staining was performed using specific antibodies. In the liver of CCl<sub>4</sub> treated animals, the extent of VCAM-1 staining was greater than in control animals and was mainly expressed in the vasculature as visualized by colocalization with the CD31 marker in the merge panels (yellow). Deficiency of PIGF (PIGF<sup>-/-</sup>) was associated with a significant reduction in VCAM-1 staining as compared to CCl<sub>4</sub>-treated PIGF<sup>+/+</sup> mice. Arrows indicate colocalization (yellow) between CD31 and VCAM-1 in blood vessels. Arrowheads indicate absence of colocalization between CD31 and VCAM-1 in blood vessels. Original magnification X100 (n=6). (B) THP-1 cells were trypsinized and resuspended in chemotaxis medium. In total,  $1 \times 10^5$  cells were then added to a polycarbonate membrane (8- $\mu$ m pore size) coated with 1% gelatin in a modified Boyden chamber and exposed to PIGF (50 ng/mL) or fMLP ( $1 \times 10^{-7}$  M) for 4 h. At the end of the treatment period, cells that had migrated were stained with DiffQuick solution and counted in 3 random fields. Data points represent the mean  $\pm$  SEM number of migrating cells/field calculated in three different wells. \* denotes  $P < 0.01$  compared to vehicle (n=3).

**Supplemental Fig. 3. *PlGF genetic deficiency diminishes intrahepatic and splanchnic neo-angiogenesis in cirrhotic mice.*** Representative images of CD31 immunohistochemistry of the liver (top panels a and b, original magnification: 100x), visceral peritoneum (middle panels c and d, original magnification: 200x), and colon (bottom panels, original magnification e and f: 400x) of CCl<sub>4</sub>-treated PlGF<sup>+/+</sup> mice (left column) and CCl<sub>4</sub>-treated PlGF<sup>-/-</sup> mice (right column). Arrows indicate CD31-positive endothelial cells in blood vessels. \* denotes  $P < 0.05$  vs. CCl<sub>4</sub> PlGF<sup>+/+</sup>, & denotes  $P < 0.01$  vs. CCl<sub>4</sub> PlGF<sup>+/+</sup>

**Supplemental Fig. 4. *Vascular corrosion casting images of mouse splanchnic and liver tissue.*** Representative stereomicroscopic photographs and scanning electron microscopic images of the mesenteric tissues and livers of IgG<sub>1</sub>-treated cirrhotic mice and  $\alpha$ PlGF-treated cirrhotic mice. Casts from IgG<sub>1</sub>-treated animals showed an increased degree of vascular arborization in the mesentery [i.e., honeycomb-like vascular networks were present (a, b and c)], compared to  $\alpha$ PlGF-treated animals (b, e and f).  $\alpha$ PlGF treatment induced vascular pruning, with vessels appearing as thread-like appendices (f detail, arrows), and a disappearance of the capillary network (dotted arrow). In addition, intussusceptive angiogenesis was observed sporadically in IgG<sub>1</sub>-treated animals (detail in c, arrowhead) but not in  $\alpha$ PlGF-treated mice. With regard to the hepatic angioarchitecture, blood vessels were organized in a nodular pattern in both IgG<sub>1</sub>- and  $\alpha$ PlGF-treated CCl<sub>4</sub>-exposed mice (panels j and l). Remarkably, while the sinusoids of IgG<sub>1</sub>-cirrhotic mice appeared irregular, disrupted, bulging, and saccular (panel k), treatment with  $\alpha$ PlGF induced more quiescent, organized trabecular sinusoidal perfusion and led to vessels that had a straighter/less disrupted course. This resulted in a “Christmas-tree” appearance of the sinusoids (panel m, arrow).

**Supplemental Fig. 5: analysis of Hypoxia-Inducible Genes and HIF-1 $\alpha$  levels in IgG<sub>1</sub> and  $\alpha$ PlGF-treated CCl<sub>4</sub>-exposed livers.** (A) Quantitative PCR of the expression of hypoxia-inducible glycolytic genes in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic livers showed reduced expression upon  $\alpha$ PlGF treatment compared to IgG<sub>1</sub>. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and normalized to HMBS. These findings suggest that  $\alpha$ PlGF-treated livers may be less glycolytic because of improved oxygenation. In agreement with this metabolic

reprogramming, PIGF-blockage lowered GLUT-1 expression ( $P=0.05$ ) and phosphofruktokinase-1 expression ( $P<0.05$ ), the most important regulatory enzyme of the glycolysis, suggesting that PIGF-blocked cirrhotic livers have a more oxidative metabolism due to higher oxygenation. (B) Western blot analysis of HIF-1 $\alpha$  in liver tissue of  $\alpha$ PIGF or IgG<sub>1</sub> treated CCl<sub>4</sub> exposed mice. Compared to IgG<sub>1</sub>-treated CCl<sub>4</sub> animals, administration of  $\alpha$ PIGF significantly reduced the HIF-1 $\alpha$  protein levels ( $P<0.05$ ).

**Supplemental Fig. 6. PIGF blockage decreases arteriogenesis in mesenteric tissues.** (A) Histological images of  $\alpha$ -SMA immunostaining of mesenteric tissues (original magnification: 200x). Arrows represent smooth muscle cells in blood vessels. (B) Counts of  $\alpha$ -SMA positive vessels. \* denotes  $P<0.05$  vs. CCl<sub>4</sub> PIGF<sup>+/+</sup> and & denotes  $P<0.05$  vs. CCl<sub>4</sub> IgG<sub>1</sub>. Data from the control animals are not displayed (control PIGF<sup>+/+</sup>:  $7.0 \pm 1.0$ , control PIGF<sup>-/-</sup>:  $5.1 \pm 0.8$ , control IgG<sub>1</sub>:  $4.9 \pm 0.7$ , control  $\alpha$ PIGF  $4.7 \pm 0.5$ ).

**Supplemental Fig. 7. Expression of PIGF in HSCs.** (A) HSCs from normal livers ( $n=4$ ) were isolated and their subsequently spontaneous activation into myofibroblast-like cells was identified by culture on a plastic substrate. Quiescent HSCs were characterized by the presence of vitamin A-rich droplets within their cytoplasm (top left image in A). HSC activation was associated with loss of these perinuclear retinoid droplets and the acquisition of myofibroblastic extensions (bottom left image in A). Activation of HSCs was associated with increased levels of  $\alpha$ -SMA RNA, as measured by qPCR (right image in A). Data are indicated as  $\alpha$ -SMA expression normalized to HMBS and expressed per 1,000 HSCs. \* denotes  $P<0.05$  vs. day 2, 4 and 6; & denotes  $P<0.05$  vs. day 2. (B) PIGF expression was analyzed by performing ELISA on cell supernatants. Two days after cell isolation, PIGF protein levels were still below the lower limit of detection of the assay. Activated HSCs (on day 10) secreted significantly higher levels of PIGF protein ( $*P<0.05$ ) compared with day 2 and day 4. On day 6, a transient drop in secretion was noticed due to cell trypsinization. DL, detection limit. \*denotes  $P<0.05$  vs. D2 and D4. (C) Analysis of PIGF expression in hepatic cells. Hepatocytes, endothelial cells and HSCs were isolated from the livers of control and/or cirrhotic rats ( $n=4$ ), and their total RNA was purified, reverse-transcribed, and amplified by qPCR. HPRT was

used as an internal control for normalization. \* denotes  $P < 0.001$  vs. hepatocytes and endothelial cells from control and cirrhotic rats. & denotes  $P < 0.05$  vs. endothelial cells from control and cirrhotic rats and hepatocytes from control rats.

**Supplemental Fig. 8. *PIGF-induced sustained activation of ERK1/2 in activated HSCs is blocked by anti-VEGFR1 antibody treatment.*** LX-2 cells were preincubated with or without anti-VEGFR1 antibody (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and then stimulated with PIGF (100 ng/mL) for different time durations (+). Lysates (40  $\mu\text{g}$  of protein) were analyzed by western blotting analysis with specific antibodies targeted against phospho-ERK1/2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> and ERK1/2 (n=3). Wb, western blotting.  $\mu\text{VEGFR1}$ , anti-VEGFR1 antibody.

**Supplemental Fig. 9. *Pathway analysis of the tyrosine phosphorylation of various proteins induced by PIGF in activated HSCs.*** In total, 33 proteins from LX-2 cells that were tyrosine-phosphorylated after PIGF treatment were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis software. These proteins were compared with those in global molecular networks developed from information contained in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. Networks of these focus genes were then algorithmically generated based on their connectivity. Two high-scoring networks are shown. Proteins are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). A red-colored node indicates a protein that was tyrosine-phosphorylated after PIGF treatment. In addition, the same proteins are indicated in blue in the textbox displayed at the bottom of each graph. Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product. Edges with dashed lines indicate an indirect interaction. A continuous line represents a direct interaction.

**Supplemental Fig. 10. *PIGF stimulates RTK phosphorylation in LX-2 cells.*** (A) LX-2 cells were serum-starved and incubated with (n=3) or without (n=3) 100ng/mL PIGF for 5 min. Lysates were then incubated for 2h at room temperature on top of a Signal Transduction AntibodyArray™ filter (Hypromatrix). The filters were later blotted with an HRP-conjugated anti-phosphotyrosine antibody. Representative areas of the arrays showing

significantly increased intensity of the phosphotyrosine signals in the spots containing antibodies against PDGFRA (these antibodies recognize both the unphosphorylated and phosphorylated forms) and phospho-EGFR. The phosphotyrosine signal of cyclin D3 was used to normalize the results because PIGF does not affect its level of phosphorylation. (B) *In situ* detection of VEGFR1/PDGFR complexes by PLA (red spots) in LX-2 cells before and after stimulation with PIGF for varying time periods. The cells were counterstained with Alexa Fluor 488 conjugated to phalloidin (green) to visualize the cell borders and with Hoechst 33258 (blue) to visualize the nuclei. Similar results were obtained in 4 different experiments.

**Supplemental Fig. 11. Deficiency of PIGF and  $\alpha$ PIGF does not affect healthy blood vessels in the thyroid gland.** (A) Immunohistological images (CD31 staining) of mouse thyroid glands (panel a and b). Vascular density quantification is shown in the histogram. Deficiency of PIGF or treatment with  $\alpha$ PIGF was not associated with vessel regression when compared to vessel density in PIGF<sup>+/+</sup> cirrhotic mice or CCl<sub>4</sub> mice treated with IgG<sub>1</sub>. (B) Levels of VEGF in the mesenteric tissues of  $\alpha$ PIGF- or IgG<sub>1</sub>-treated CCl<sub>4</sub> mice, measured by ELISA



#### 4. Supplemental tables

**Supplemental table 1:** PIGF-induced changes in the protein tyrosine phosphorylation profile of activated HSCs.

<b>ID</b>	<b>Description</b>	<b>Fold Change<math>\pm</math>S.D. over basal phosphorylation levels</b>
Q90Y25	Thyroid R $\alpha$ 1: Thyroid hormone receptor alpha large isoform	2.06 $\pm$ 0.69
P17948	VEGFR1: Vascular endothelial growth factor receptor 1	2.08 $\pm$ 0.13
Q13393	Phospholipase D: Phospholipase D1	2.14 $\pm$ 0.15
Q9UEJ3	Met: Proto-oncogenic met protein	2.22 $\pm$ 0.10
P27986	PI3kinase P85: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	2.28 $\pm$ 0.26
P40189	Gp130: Interleukin-6 receptor subunit beta	2.31 $\pm$ 0.19

O00273	DFF45/ICA D: DNA fragmentation factor subunit alpha	2.33±0.20
P08254	MMp-3: Matrix metalloproteinase-3	2.36±0.13
P19793	RXR $\alpha$ : Retinoic acid receptor RXR-alpha	2.37±0.20
Q9UH60	p27: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27	2.39±0.37
P04435	TCR $\beta$ : T-cell receptor beta chain V region CTL-L17	2.41±0.17
P07947	Yes: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes	2.42±0.14
Q08999	Rb2 (130): Retinoblastoma-like protein 2	2.43±0.11
P12931	c-Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	2.47±0.93
P12235	ANT: ADP/ATP translocase 1	2.51±0.20
P22681	c-Cbl: E3 ubiquitin-protein ligase CBL	2.51±0.39
Q15078	P35: Cyclin-dependent kinase 5 activator 1	2.53±0.16

P15498	Vav: Proto-oncogene vav	2.55±0.21
O00463	TRAF5: TNF receptor-associated factor 5	2.57±0.96
P08648	Integrin- $\alpha$ 5: Integrin alpha-5	2.63±0.21
P00533	EGFR: Epidermal growth factor receptor	2.66±0.21
P28749	Rb (p107): Retinoblastoma-like protein 1	2.66±0.98
P15172	MyoD: Myoblast determination protein 1	2.70±0.34
P50591	TRAIL: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	2.72±0.15
P10114	Rap2: Ras-related protein Rap-2a	2.72±0.40
P29353	SHC: SHC-transforming protein 1	2.76±0.12
P16234	PDGF Receptor $\alpha$ : Alpha-type platelet-derived growth factor receptor	2.77±0.32
O14920	Ikappa B kinase $\beta$ : Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	2.99±0.23

O15524	SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1	2.99±0.20
P10276	RARr: Retinoic acid receptor alpha	3.01±0.17
P07948	Lyn: Tyrosine-protein kinase Lyn	3.19±0.54
Q9Y4K3	TRAF6: TNF receptor-associated factor 6	3.19±0.12
P11473	VDR: Vitamin D3 receptor	3.50±0.36

Protein tyrosine phosphorylation profile of LX-2 cells treated with 100 ng/ml of Plgf for five minutes. Proteins with a fold change greater than two are listed. For each of these proteins, the Fold Change results are given as a mean±s.d. calculated from three independent experiments.

**Supplementary Table 2: Clinical information of all HCV patients included in the PIGF immunohistochemistry study (n=20)**

		Valid cases <sup>A</sup>	Metavir fibrosis score				
			F0 (n=3)	F1 (n=4)	F2 (n=4)	F3 (n=5)	F4 (n=4)
<b>Gender</b>	Male	100%	2	2	3	1	3
	Female		1	2	1	4	1
<b>Age at biopsy (years)</b>		100%	27 (±10)	38 (±17)	56 (±6)	54 (±20)	45 (±13)
<b>BMI<sup>B</sup> (kg/m<sup>2</sup>)</b>		90%	24.6 (±2.3)	23.8 (±3.7)	24.8 (±4.2)	28.2 (±6.7)	26.3 (±3.9)
<b>Genotype<sup>C</sup></b>	1 – 4	95%	2	4	3	5	3
	3		0	0	0	0	1

	5		0	0	1	0	0
<b>Activity</b>	A0		2	0	0	0	0
<b>(METAVIR)<sup>D</sup></b>	A1	100%	1	4	2	1	2
	A2		0	0	2	4	2
<b>Steatosis</b>	Absent		3	4	2	3	0
	Present	100%	0	0	2	2	4

(A) Valid cases represent the percentage of patients with complete data. (B) Body mass index. (C) Genotype 2 was not represented in both study groups and therefore excluded from the table. (D) Inflammatory activity-grade A3 was not represented in the immunohistochemistry-group and therefore excluded from the table. Numerical data are represented as mean±s.d. and categorical/nominal data in counts.

**Supplementary Table 3: Clinical information of all patients in whom the hepatic mRNA and the blood levels of PIGF were measured (n = 42)**

		<b>HCV</b>	<b>Alcoholic Hepatitis</b>	<b>NASH</b>	<b>Controls<sup>A</sup></b>
<b>Gender (%)</b>	Male	3 (60)	21 (66)	1 (20)	3 (50)
	Female	2 (40)	11 (34)	4 (80)	3 (50)
<b>Age (years)</b>		51 (40-53)	52 (47-57)	51 (48-55)	51 (43-68)
<b>AST (U/L)</b>		108 (73-165)	101 (54-164)	30 (16-52)	33 (27-63)
<b>ALT (U/L)</b>		260 (155-339)	53 (27-84)	24 (19-65)	35 (22-71)
<b>Bilirubin (mg/dL)</b>		1.1 (0.85-1.4)	7.1 (1.5-16)	0.6 (0.5-1.2)	0.6 (0.4-0.8)
<b><math>\gamma</math>GT (U/L)</b>		107 (65-187)	175 (62-386)	19 (12-40)	47 (13-130)
<b>Albumin (mg/dl)</b>		44 (35-46)	27 (22-32)	41 (38-43)	37 (32-42)
<b>Creatinine (mg/dl)</b>		1.1 (0.95-1.15)	0.8 (0.7-1.0)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.7-1.7)

<b>MELD</b>		6 (5-11)	20 (11-25)	7 (5-13)	5 (2-10)
<b>HVPG (mmHg)</b>			19 (15-21)		
<b>Genotype (%)</b>	1	2 (40)			
	1a	1 (20)		44 (40-64)	
	1b	2 (40)			
<b>Viral Load (IU/ml)</b>		1160000  (94700-2700000)			

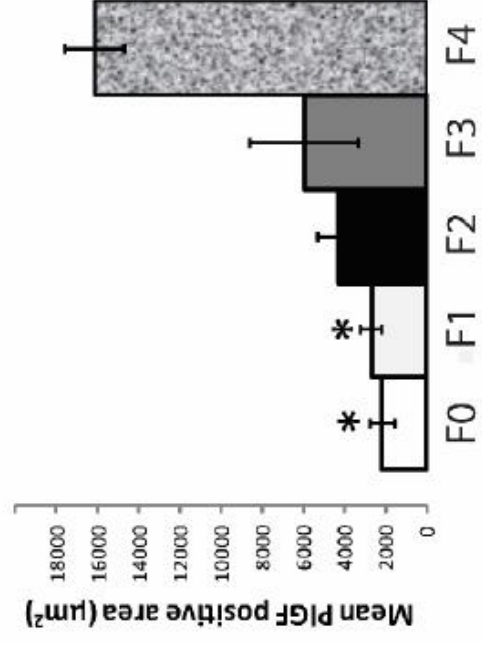
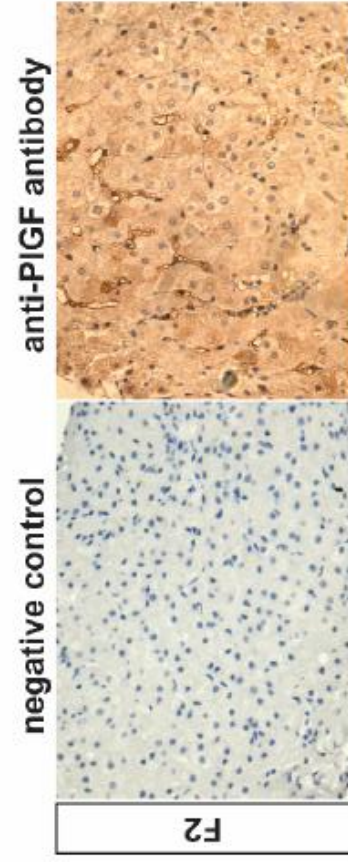
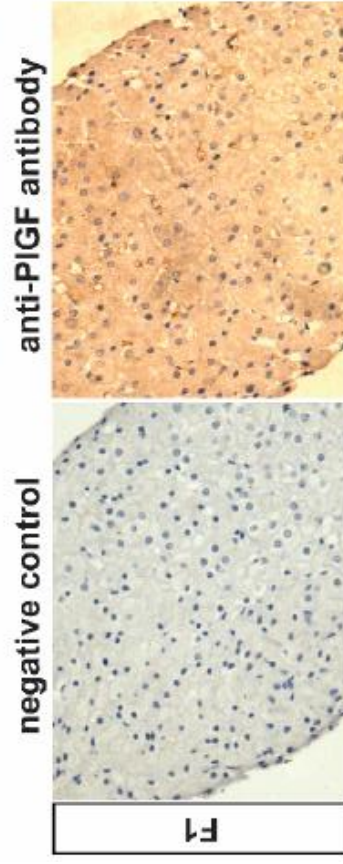
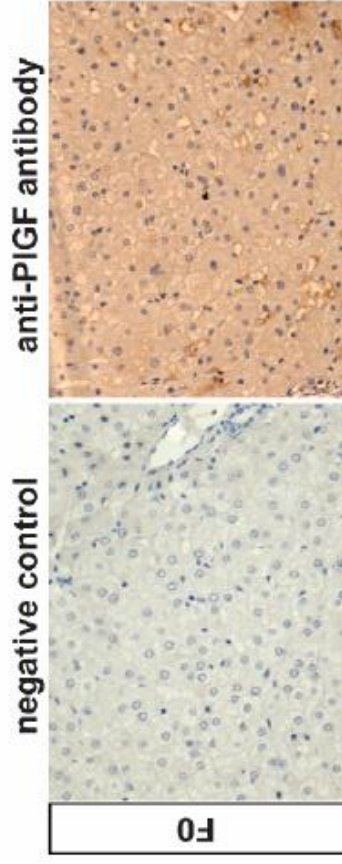
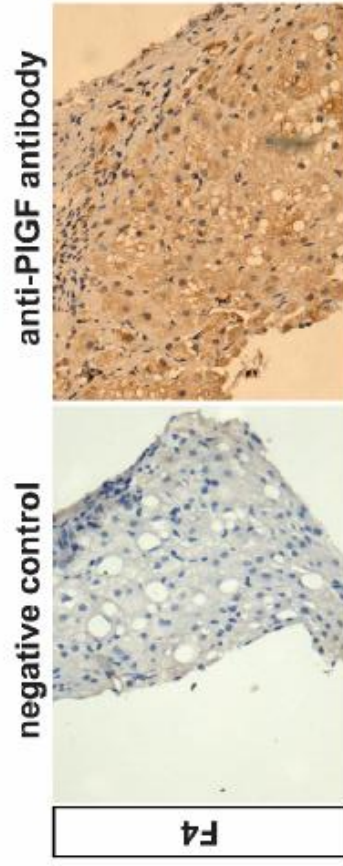
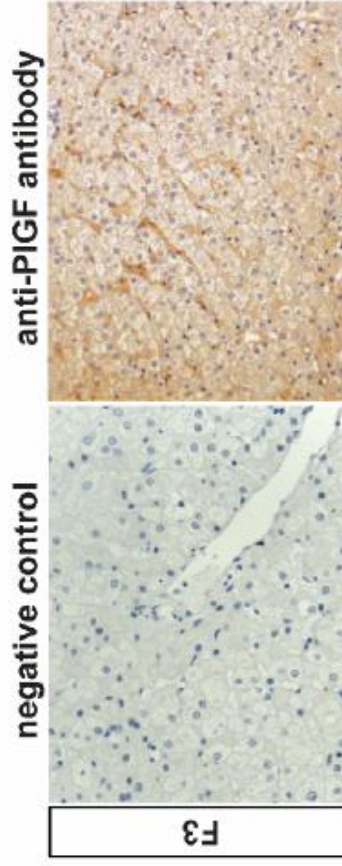


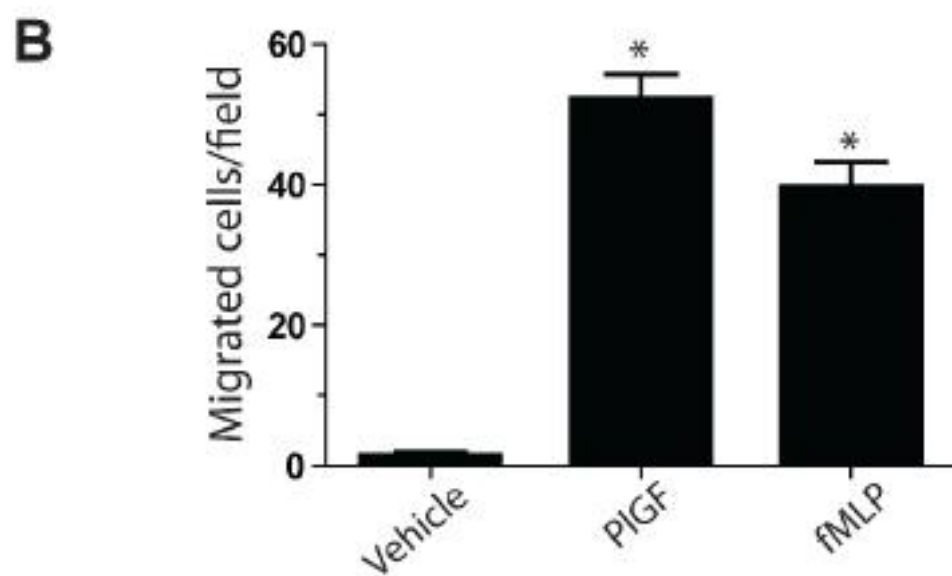
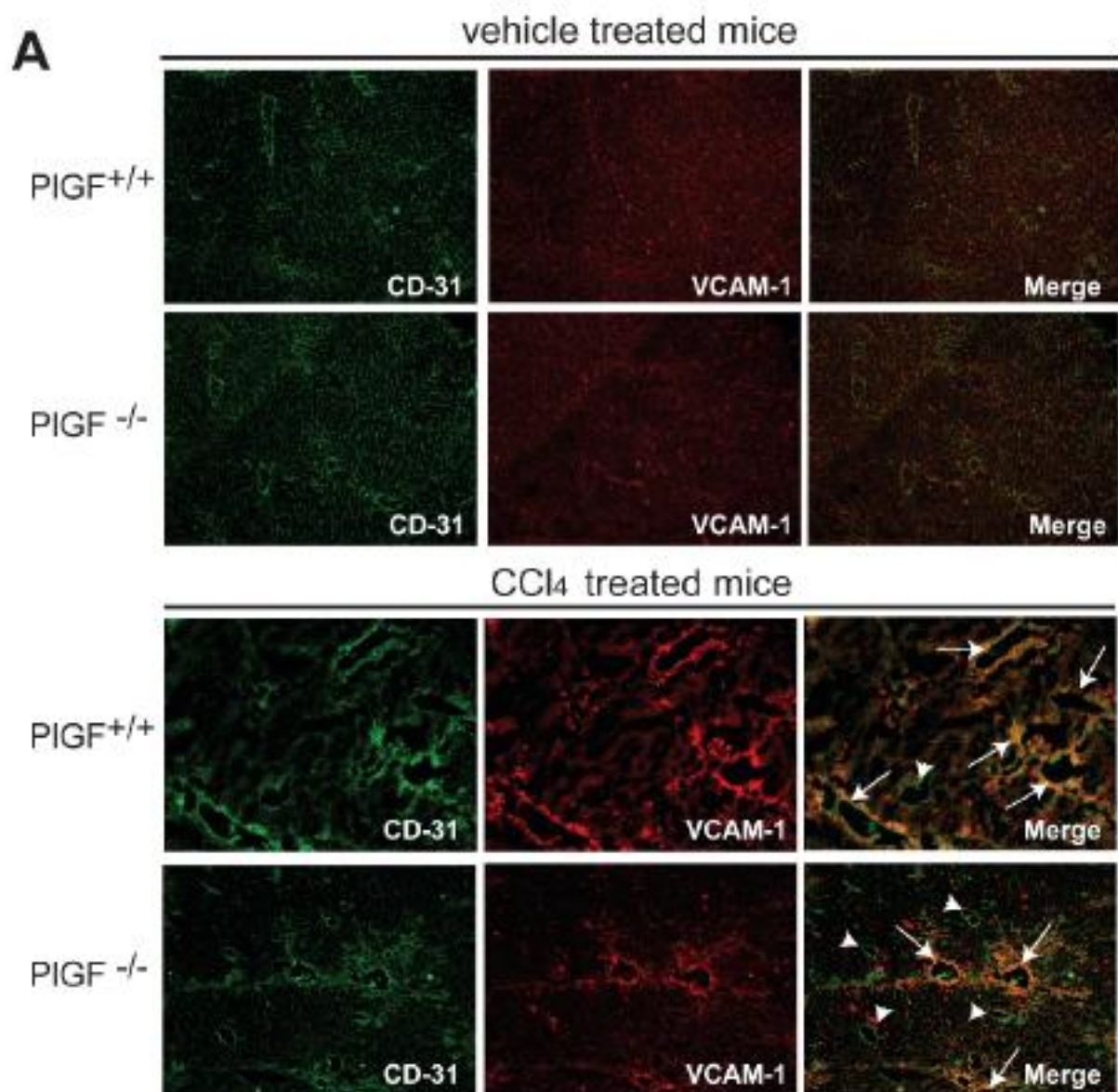
Numerical data are represented as median values (interquartile range [IQR] 25-75) and categorical / nominal data in counts. MELD: Model for End Stage Liver Disease; AST: Aspartate- Aminotransferase; ALT: Alanin-Aminotransferase. <sup>A</sup>Liver samples of patients with liver metastases from colorectal carcinoma except 1 who was affected by primary hyperoxaluria.

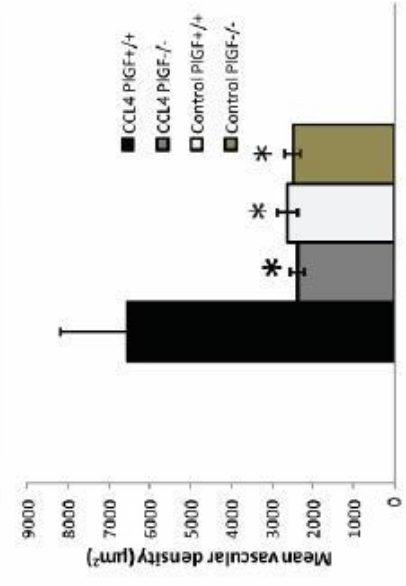
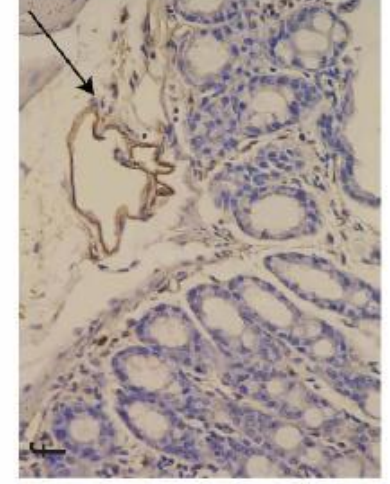
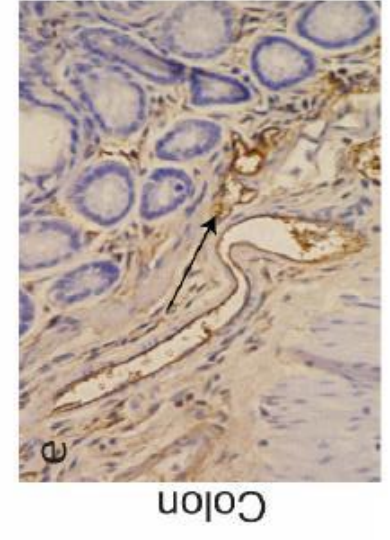
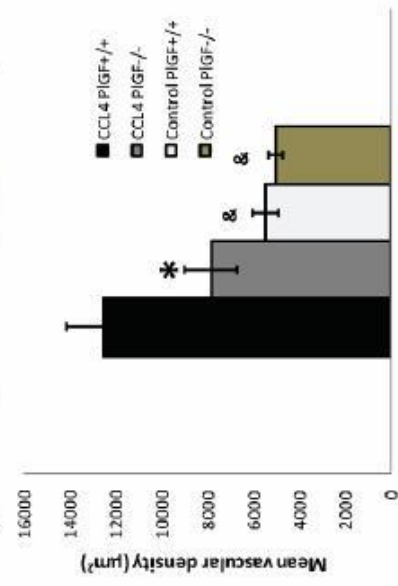
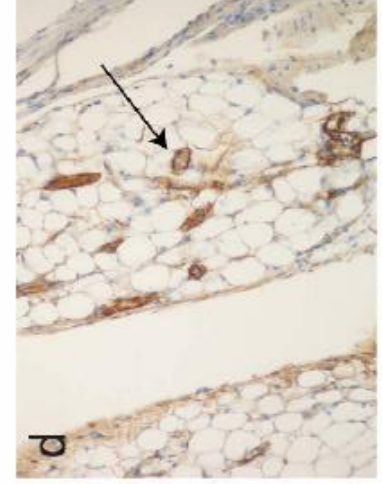
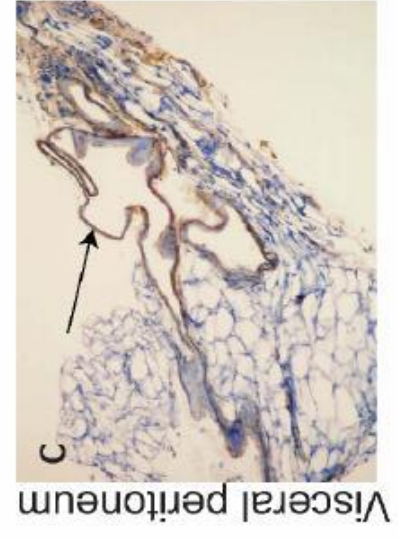
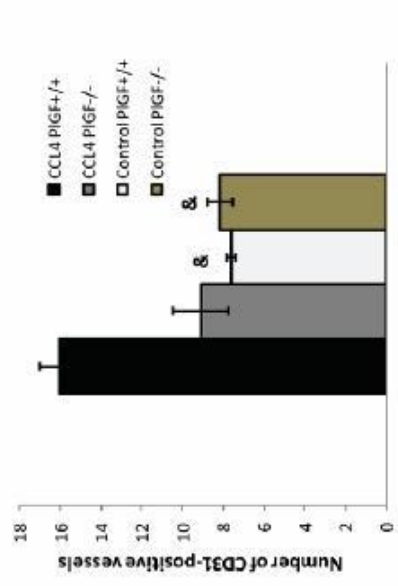
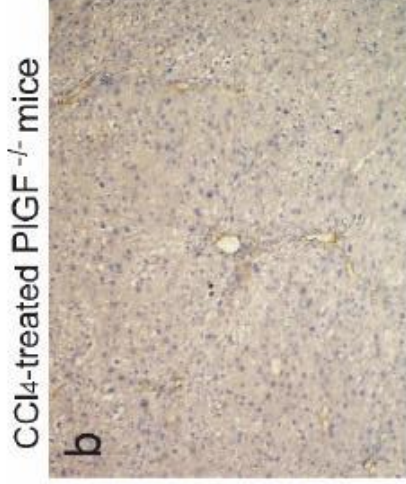
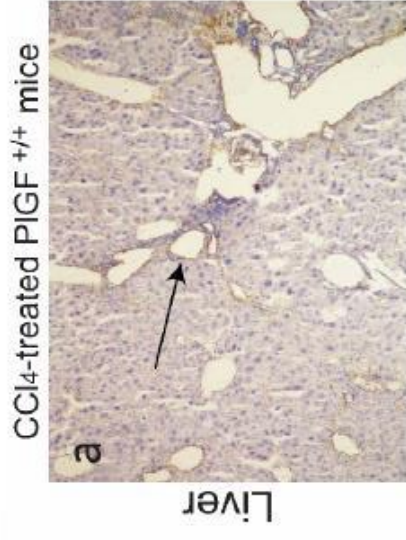
## Reference List

1. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H., De Vos M., Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008 Aug;89(4):251-263.
2. Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodes J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007 Dec;46(6):1919-1926.
3. Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007 Feb;132(2):687-697.
4. Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn D, van Loo L, Van Hoorebeke L, Segers P, et al. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Liver Int.* In press 2010.
5. Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut* 2007 Jun;56(6):855-862.
6. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):522-531.

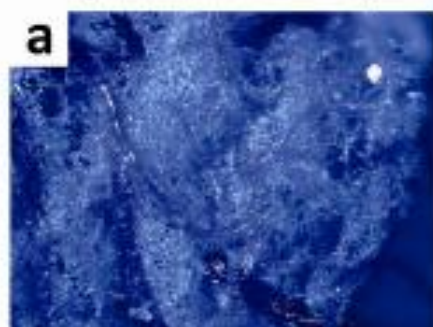
7. Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, Ros J, Arteta D, Munoz-Luque J, et al. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2005 Nov;129(5):1686-1695.
8. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005 Jan;54(1):142-151.
9. Van Steenkiste C., Geerts A, Vanheule E, Van Vlierberghe H., De Vos F., Olievier K, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009 Dec;137(6):2112-2124.
10. Nakao S, Kuwano T, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. Synergistic effect of TNF-alpha in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha 4 integrins. *J Immunol* 2003 Jun 1;170(11):5704-5711.
11. Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 2009 Aug;6(8):465-477.



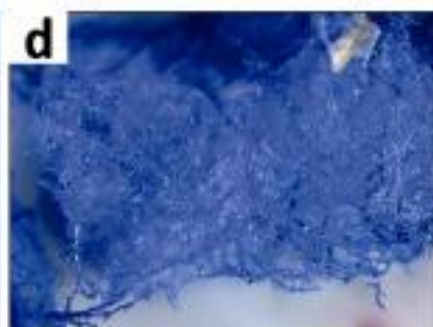




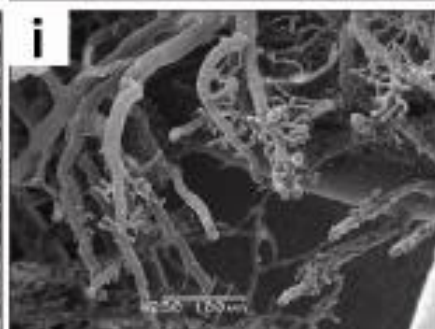
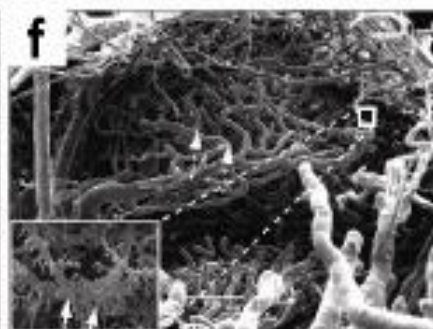
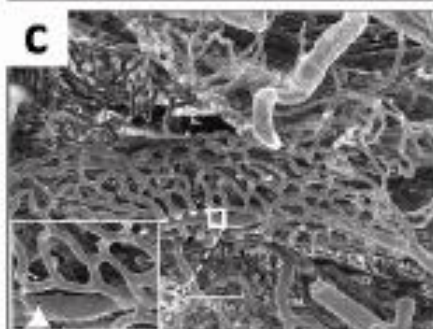
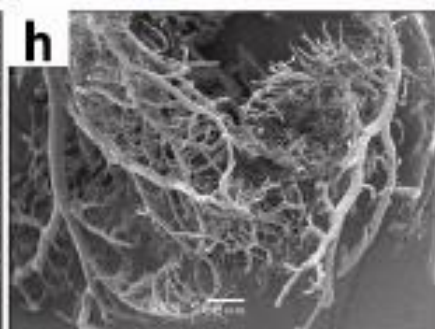
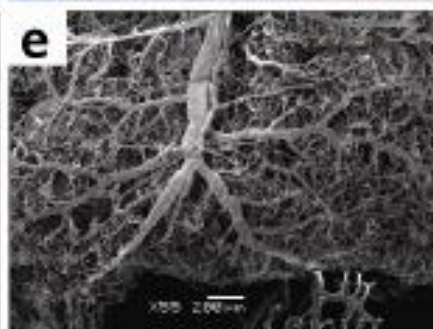
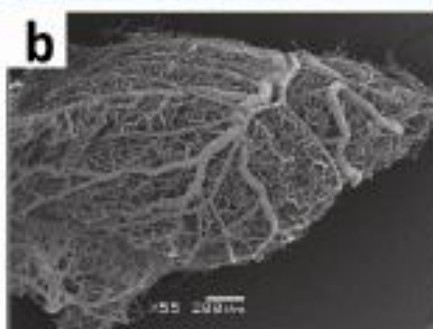
CCl4-IgG1 treated mice  
(mesenteric tissue)



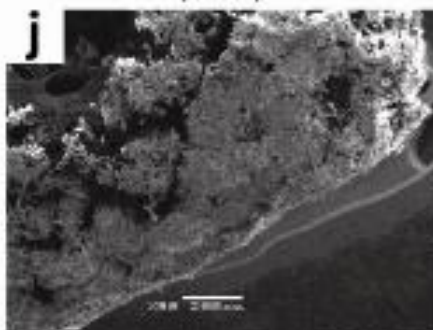
CCl4- $\alpha$ PIGF treated mice  
(mesenteric tissue)



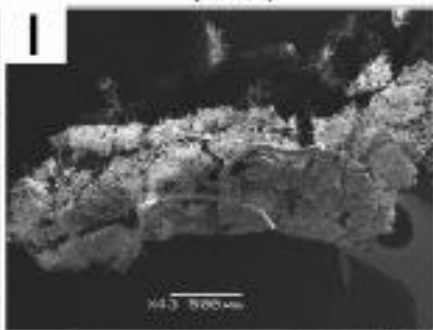
Control-IgG1 treated mice  
(mesenteric tissue)



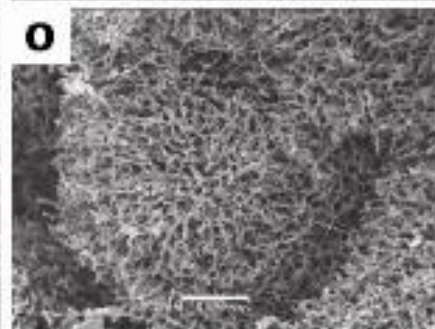
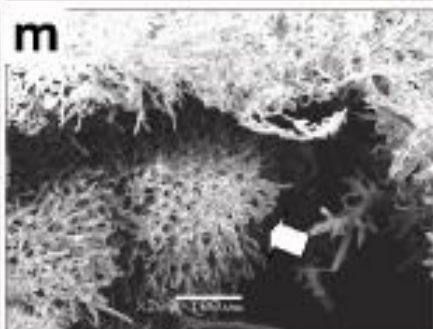
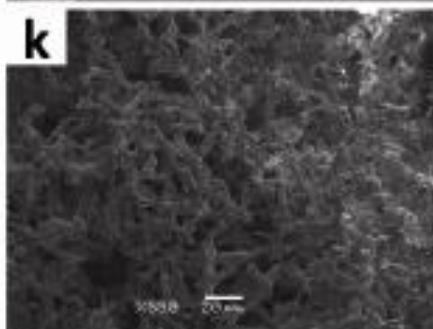
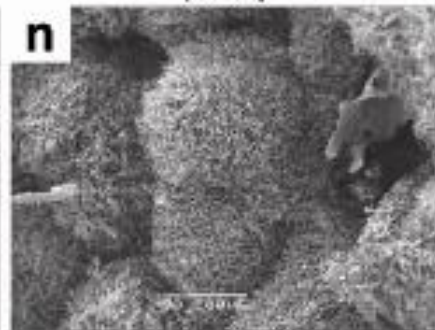
CCl4-IgG1 treated mice  
(liver)



CCl4- $\alpha$ PIGF treated mice  
(liver)

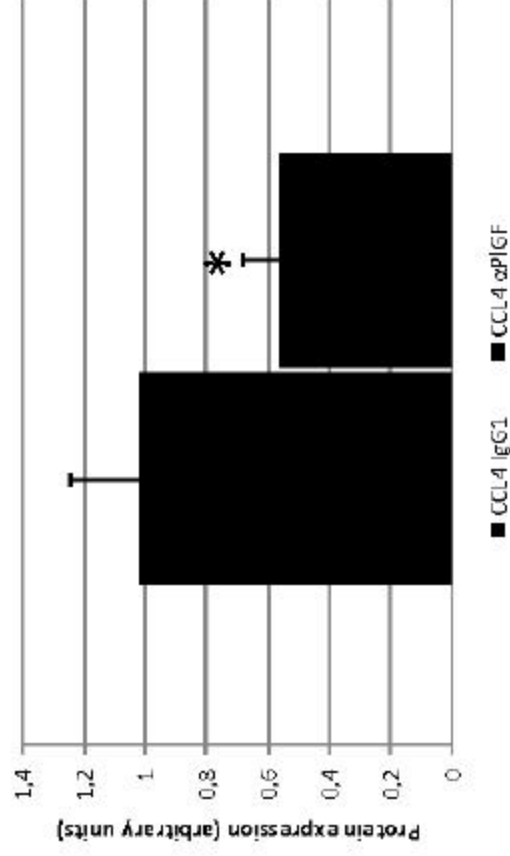
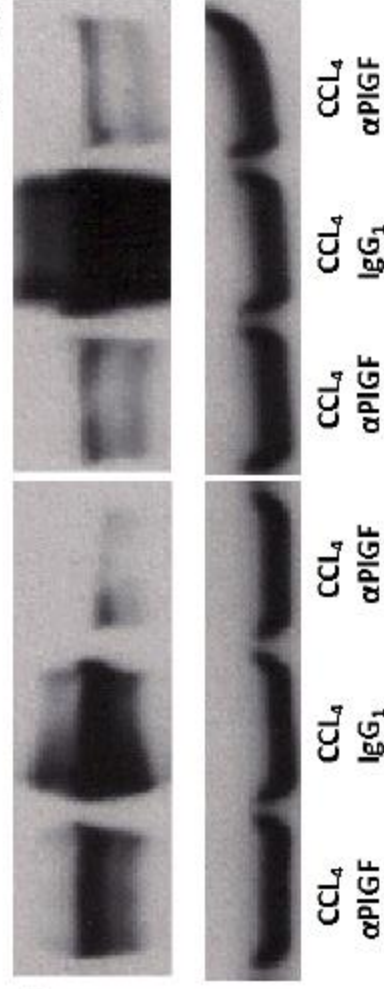


Control-IgG1 treated mice  
(liver)



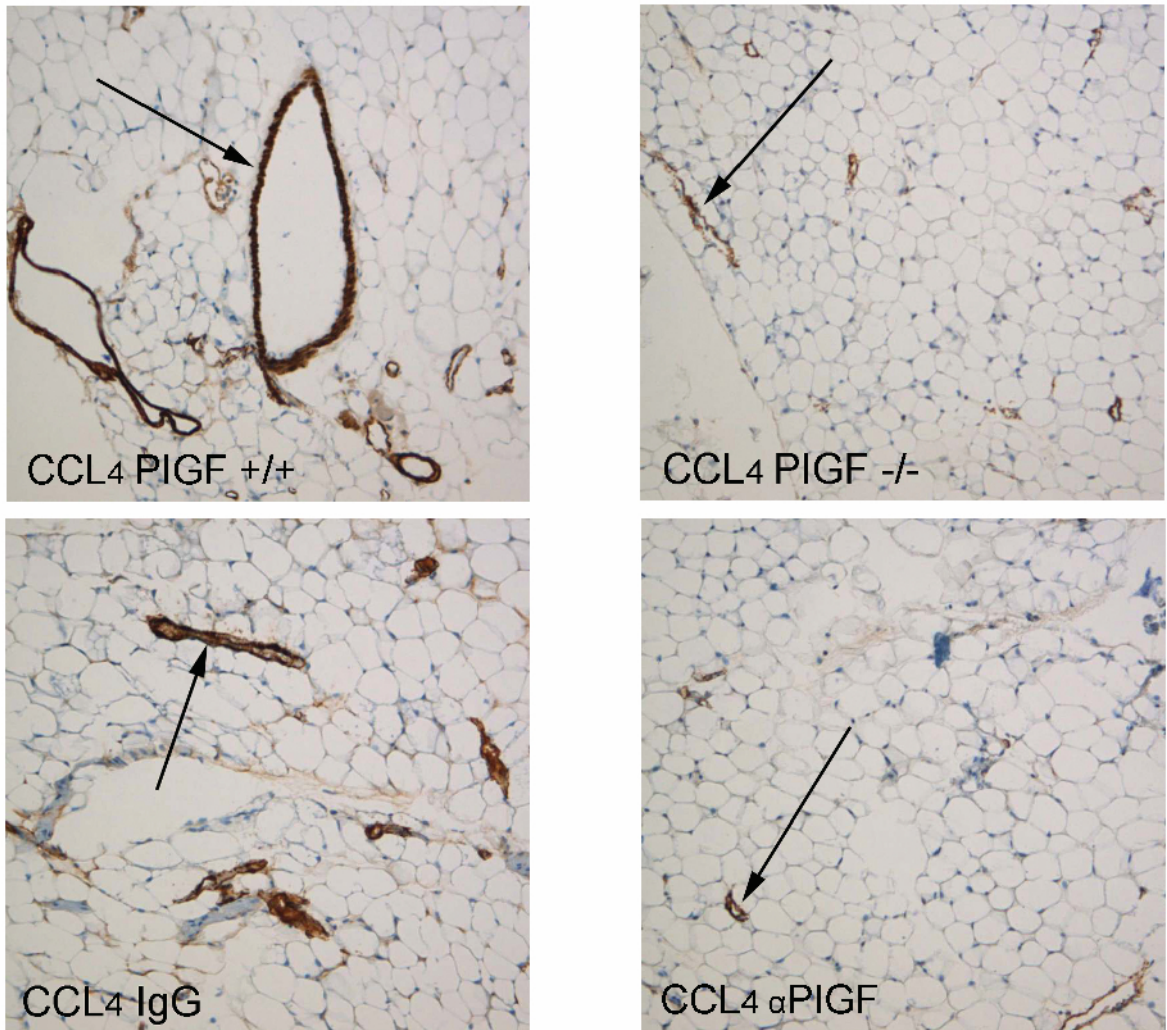
**A**

Target gene	IgG <sub>1</sub> treated CCL <sub>4</sub> livers	αPIGF treated CCL <sub>4</sub> livers
Phosphofruktokinase-1	135.7 ± 27.2	59.6 ± 5.5
Glucose receptor-1 (GLUT-1)	542.2 ± 185.5	89.3 ± 11.1
		P < 0.05
		P = 0.05

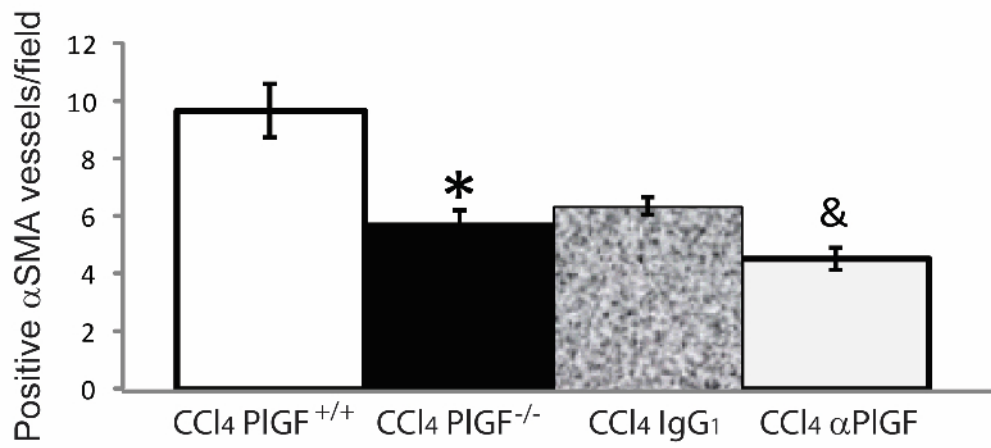
**B****HIF-1α**

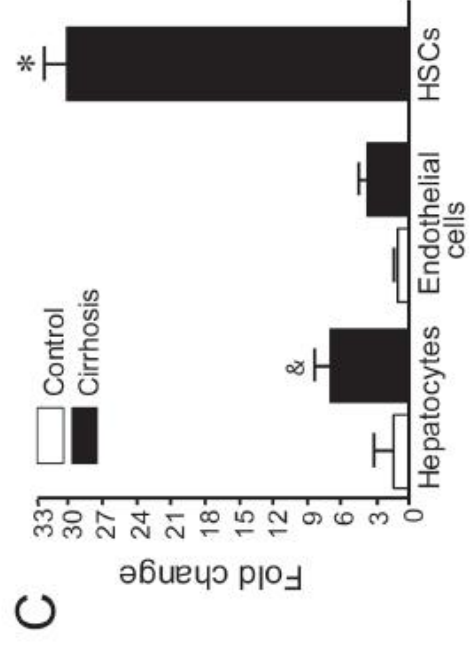
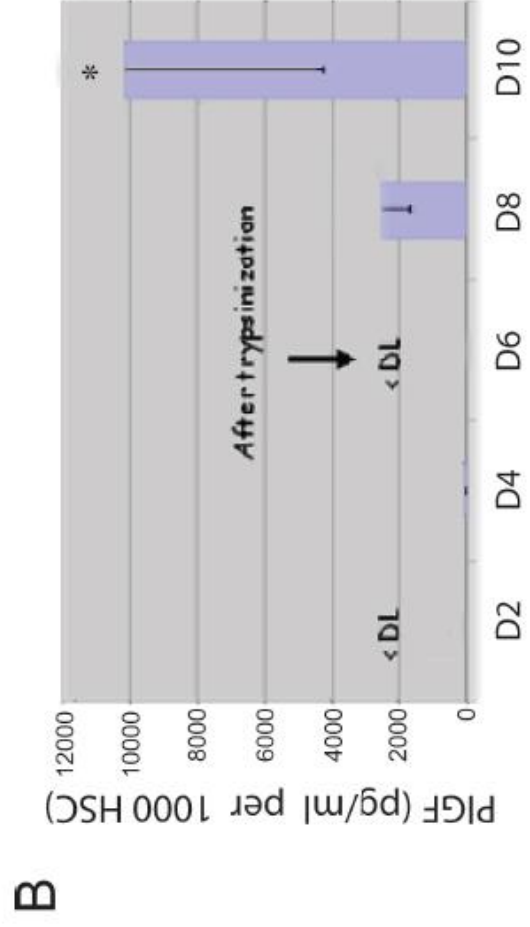
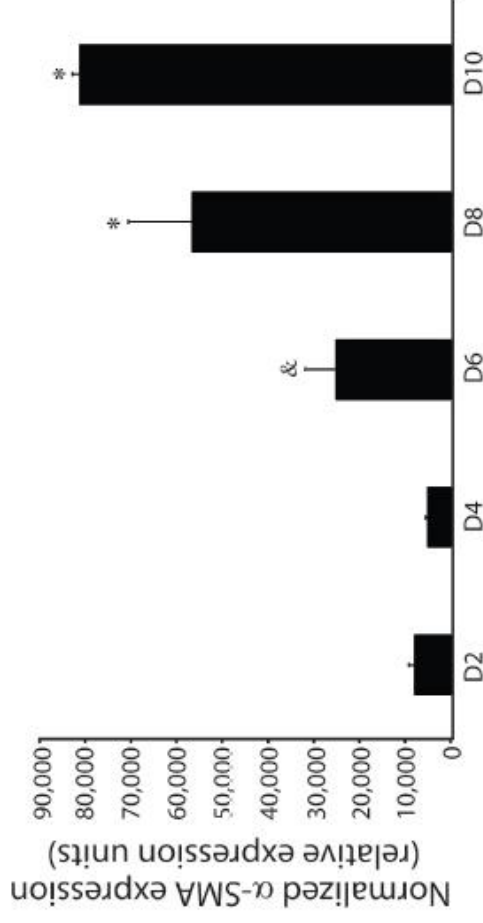
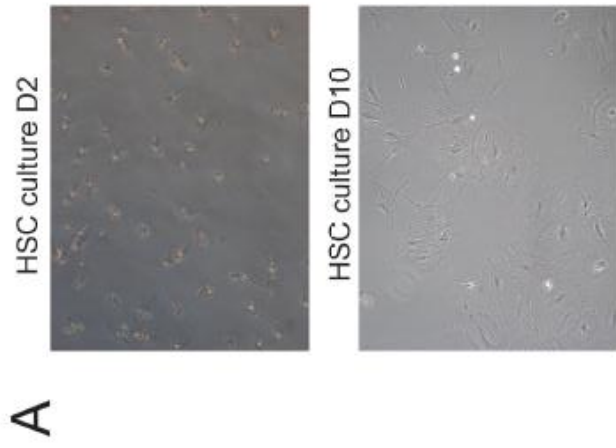


**A**



**B**





**Time of treatment (min) of LX-2 cells**

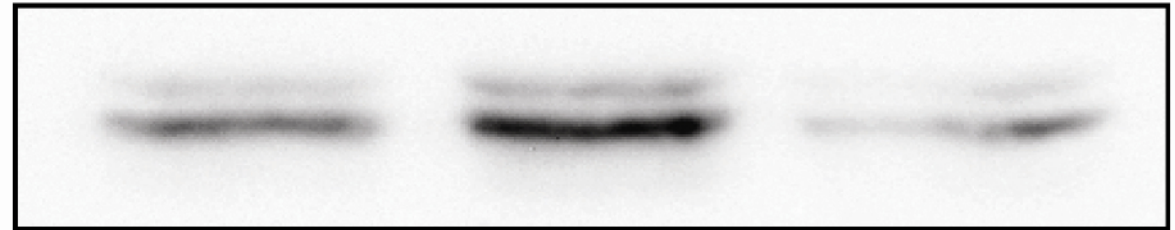
---

**0**

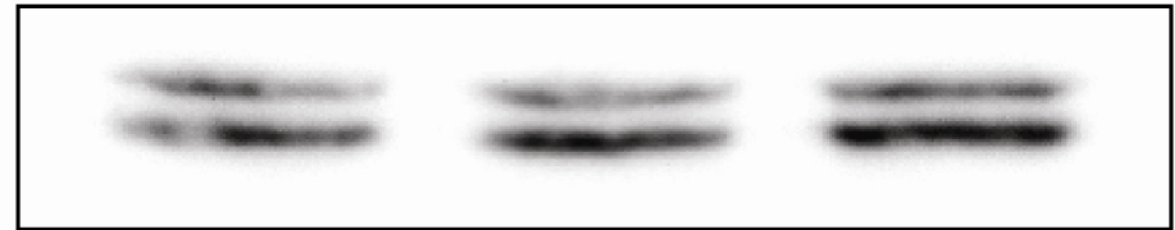
**15**

**15**

**wb: p-ERK1/2**



**wb: ERK1/2**



***PIGF (100 ng/mL)***

—

+

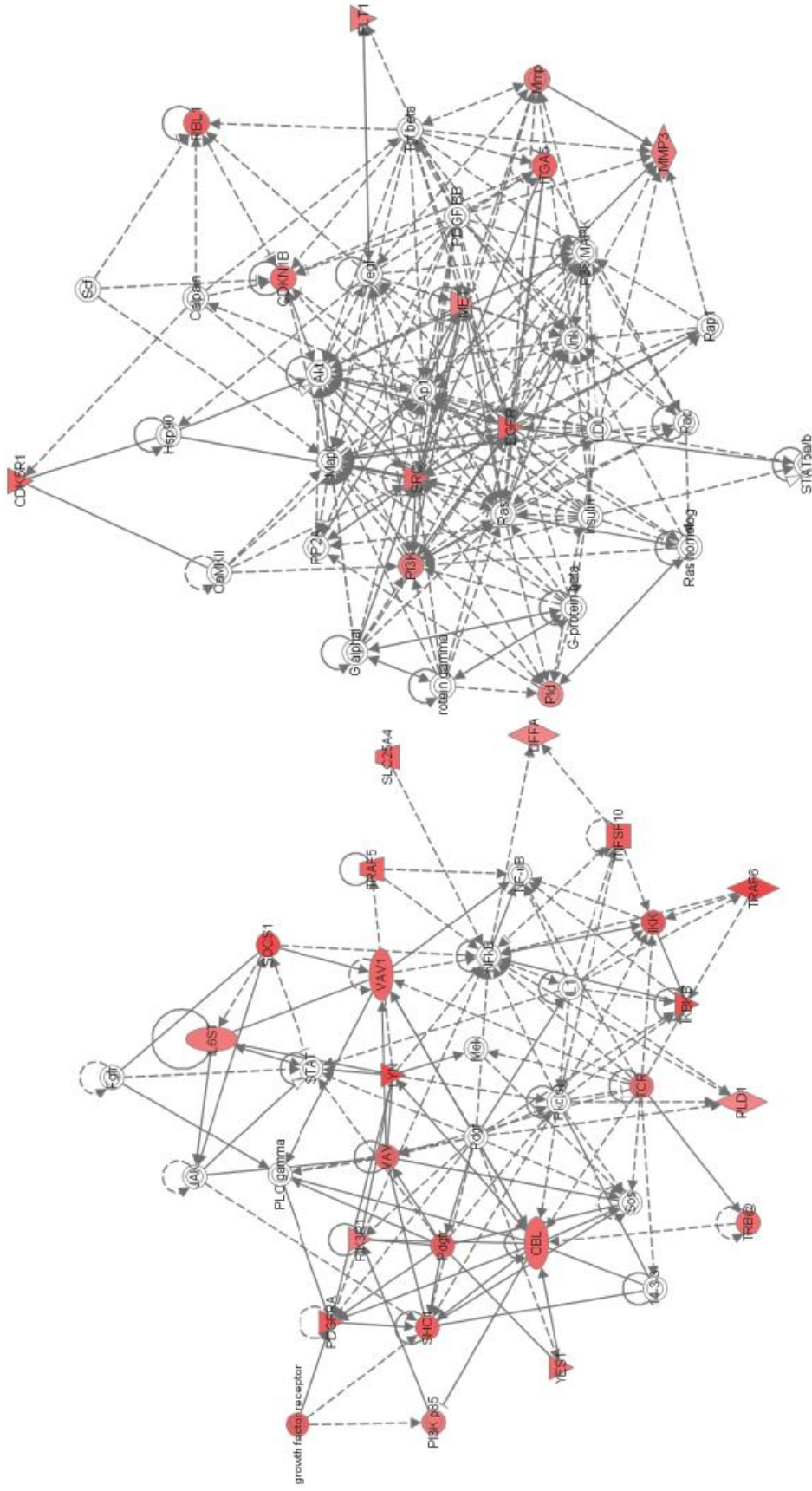
+

***αVEGFR1 (25 μg/mL)***

—

—

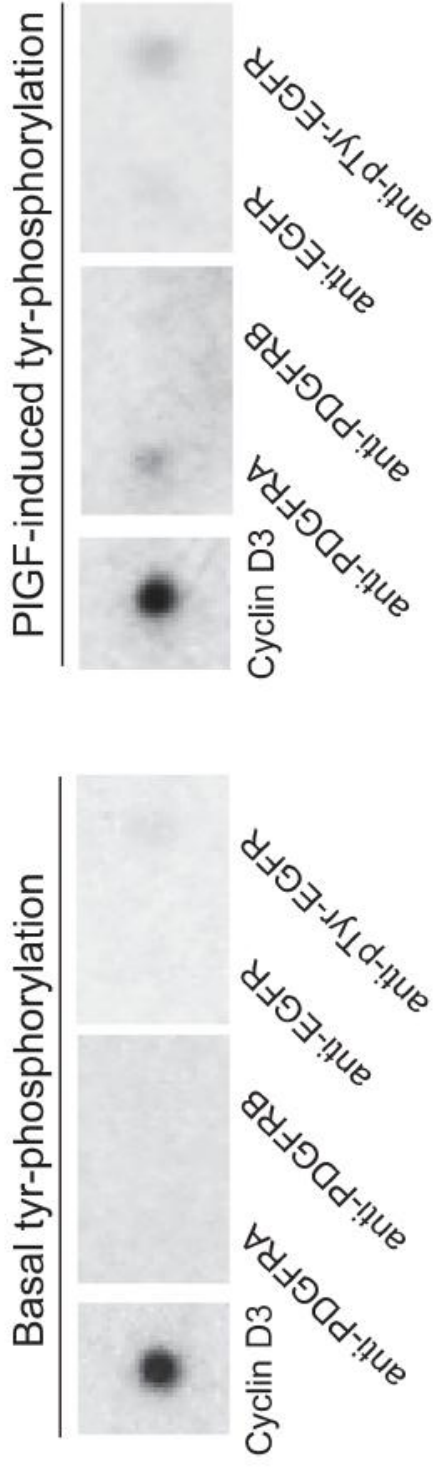
+



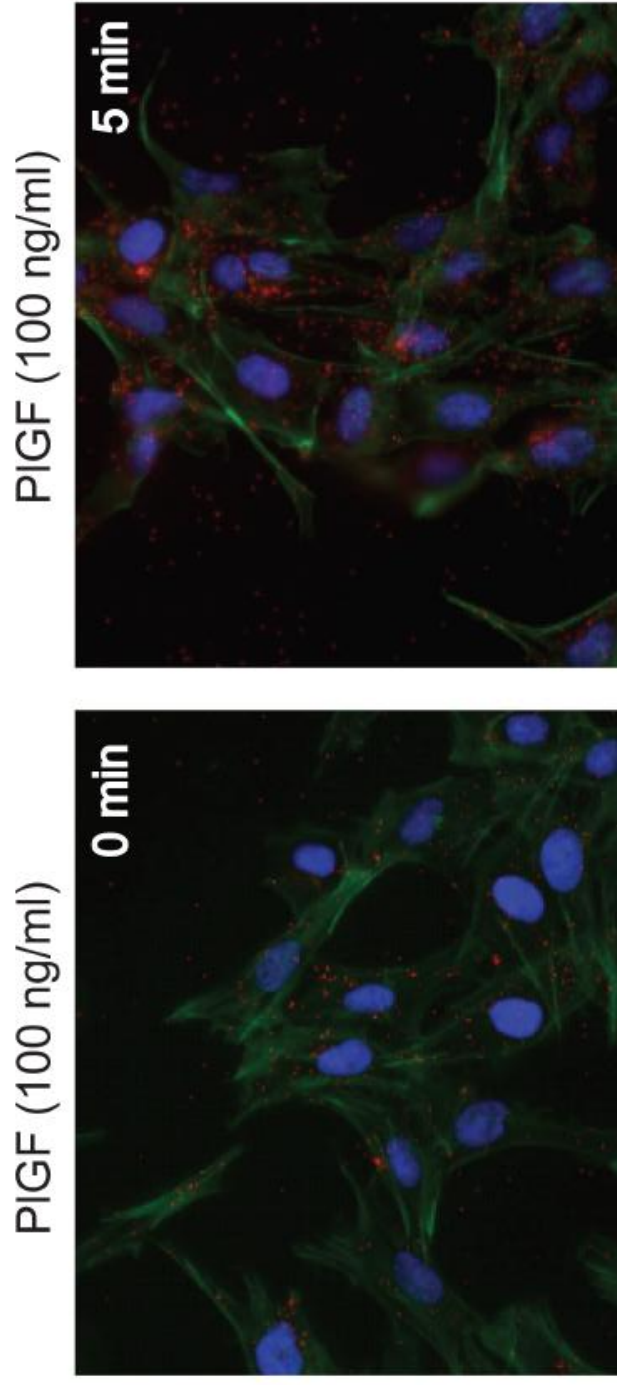
**Network 1:** Cellular development, Hematological System Development and Function, Cell viability. *Score: 37*  
 14-3-3, CBL, DFFA, Fgf, IKKKB, IKK, IL1, IL6ST, JAK, LYN, Mek, NF-kB, Pdgfr, Pdgfr, PDGFRA, PI3Kp85, PIK3R1, Pkc(s), PLC γ, PLD1, SHC1, SLC25A4, SOCS1, Sos, STAT, TCR, TNFSF10, TRAF5, TRAF6, TRB, VAV, VAV1, YES1

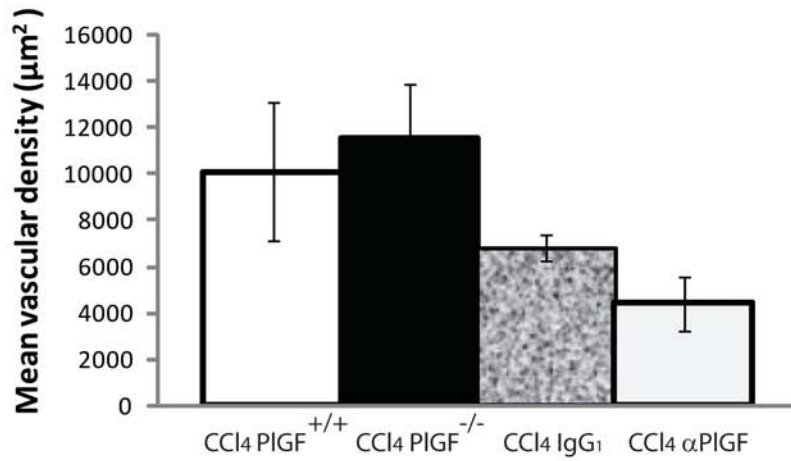
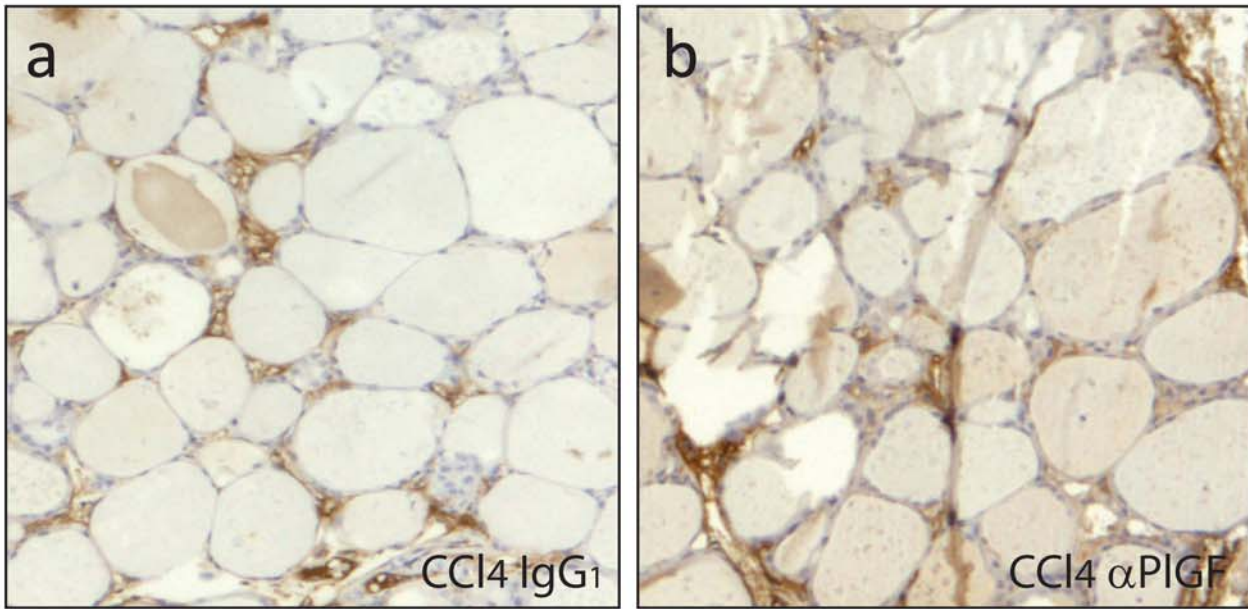
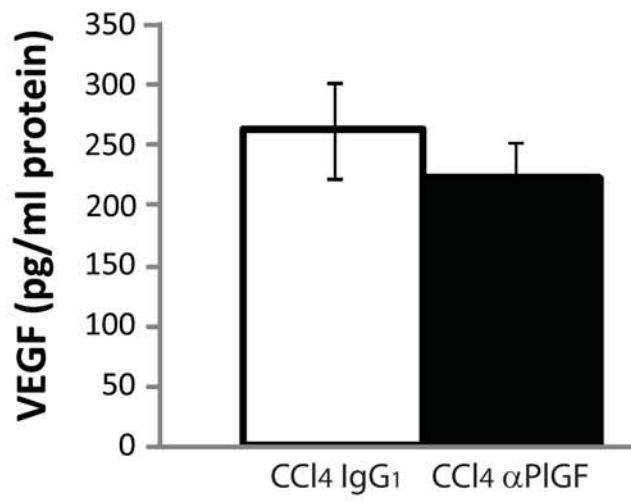
**Network 2:** Cancer, Tumor Morphology, Cellular Movement. *Score: 16*  
 Akt, Ap1, Calpain, CaMKII, CDK5R1, CDKN1B, EGFR, FLT1, G alpha, G-protein β, G-protein γ, Hsp90, Insulin, ITGA5, Jnk, LDL, Mapk, MET, Mmp, MMP3, P38 MAPK, PDGF BB, PI3K, Pld, PP2A, Rac, Rap1, Ras homolog, RBL1, Scf, SRC, STAT5a/b, Tgf β, Vegf

**A**



**B**



**A****B**



---

**Artículo 2: La sobreproducción de óxido nítrico en células endoteliales linfáticas provoca una disfunción en el drenaje linfático en ratas cirróticas.**

Una de las complicaciones más severas durante la progresión de la cirrosis es la formación de ascitis, que está asociada con un incremento de la morbilidad y la mortalidad (Moore et al., 2003). Algunos de los mecanismos que contribuyen a la aparición y al mantenimiento de la ascitis son: 1) el incremento de la presión hidrostática intravascular, 2) el descenso de la presión oncótica en el plasma, 3) un aumento de la angiogénesis en el territorio esplácnico y 4) la retención renal de sal y agua (Gines et al., 2004; Van Steenkiste et al., 2009; Henriksen et al., 2005). Sin embargo, la función del sistema linfático en la patogénesis de la ascitis no está bien estudiada. Los primeros estudios en este campo demostraron que los pacientes cirróticos presentaban una vasculatura linfática alterada y un incremento del flujo de linfa en el conducto torácico (Dumont et al., 1960). A raíz de estos descubrimientos se propuso la teoría del desequilibrio de linfa para explicar la formación de ascitis (Witte et al., 1980). Según esta teoría, existiría un desequilibrio entre el fluido que se filtra a las regiones intravasculares y el fluido que regresa a la circulación sanguínea, dando lugar a una mala distribución de los fluidos corporales y como consecuencia la formación de ascitis. En los pacientes cirróticos compensados, el sistema linfático ayuda a prevenir la aparición de ascitis reabsorbiendo el exceso de fluido, tanto en el hígado, como en las demás regiones de la zona esplácnica. Como consecuencia de esto aumenta el flujo linfático (Witte et al., 1969), lo que estimula la aparición de linfangiogénesis hepática (Tugues et al., 2005). A pesar de ello, este mecanismo compensatorio no es capaz de evitar la formación de ascitis en pacientes con cirrosis descompensada y esto hace hipotetizar que existe una disfunción del sistema linfático en los estadios más avanzados de la enfermedad. Por ello, en este estudio se investigó si una incapacidad del sistema linfático para drenar el exudado tisular podría contribuir a la formación de edema y ascitis características de la cirrosis. Además, y teniendo en cuenta que ya se había demostrado que existía una sobreexpresión de la actividad de eNOS en la vasculatura de ratas cirróticas (Ros et al., 1995; Fernández-Varo et al., 2003), quisimos estudiar si una sobreproducción de NO en el endotelio linfático podría



ser responsable de esta disfunción linfática en la cirrosis. Los resultados más importantes derivados de este estudio se enumeran a continuación:

### 1. Existe una disfunción del sistema linfático durante el progreso de la cirrosis.

En primer lugar, se analizó la funcionalidad del sistema linfático en cirrosis utilizando la técnica de la linfangiografía con FITC-dextrano para las regiones periféricas, o con la ingesta del lípido fluorescente BODIPY para la zona esplácnica. Las ratas cirróticas presentaron una disfunción en el drenaje linfático comparadas con las ratas control, tanto a nivel periférico como a nivel esplácnico. Para excluir una disminución en el número total de vasos linfáticos en cirrosis como explicación a la disfunción observada, comparamos los vasos teñidos en oreja entre ratas controles y ratas cirróticas por la técnica de inmunofluorescencia whole-mount, usando la podoplanina como marcador específico de vasos linfáticos. Esta tinción demostró que la densidad de la red linfática estaba preservada en cirrosis, sin cambios significativos en el número de vasos entre control y cirrosis (Figura 1).

### 2. La expresión proteica de eNOS y la producción de NO están incrementadas en LyECs de ratas cirróticas.

Estudios previos ya habían demostrado que eNOS estaba sobreexpresada en la vasculatura sanguínea de las ratas cirróticas (Ros et al., 1995; Fernández-Varo et al., 2003). Con el objetivo de investigar si había un paralelismo en la vasculatura linfática evaluamos por Western Blot los niveles de eNOS en LyECs aisladas del mesenterio, en ratas controles y en ratas cirróticas. La expresión de eNOS estuvo aumentada del orden del doble en LyECs de ratas cirróticas, además este aumento se correlacionó con un incremento significativo en la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  a 24 horas en el medio de cultivo (Figura 2B y 2C).

---

### 3. La inhibición de eNOS mejora el drenaje linfático y reduce la acumulación de ascitis en ratas cirróticas.

A continuación, evaluamos el efecto terapéutico que podría tener bloquear la actividad de eNOS sobre la funcionalidad del sistema linfático con un tratamiento con L-NMMA. Paralelamente, los animales también se trataron con Midodrina, una droga hipertensiva que no afecta a la actividad de eNOS, para excluir el efecto hipertensivo asociado al tratamiento con L-NMMA. Las mismas ratas cirróticas en las que se había detectado un empeoramiento del drenaje linfático mostraron una mejora significativa en la captación linfática después del tratamiento con L-NMMA, comparadas con el grupo cirrótico tratado con Midodrina, tanto a nivel periférico como a nivel esplácnico. El efecto beneficioso del tratamiento con L-NMMA no se debió a cambios en la presión arterial media, ya que no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de presión entre los tratamientos de L-NMMA y Midodrina (Figura 3).

Para estudiar si podía haber una relación entre la mejora en el drenaje linfático y la reducción del volumen de ascitis, visualizamos el líquido acumulado en la cavidad peritoneal de las ratas por resonancia magnética de imagen. Todas las ratas cirróticas tratadas con L-NMMA mostraron una disminución significativa del volumen ascítico después de 7 días de tratamiento. Por el contrario, el tratamiento con Midodrina no afectó de una manera significativa al volumen total de ascitis. Esta reabsorción del líquido ascítico se corroboró midiendo el volumen plasmático de ratas cirróticas con ascitis, con o sin tratamiento de L-NMMA. En las ratas tratadas se observó que había un incremento del volumen plasmático, comparadas con las ratas sin tratar (Figura 4).

### 4. La sobreexpresión de eNOS en LyECs de ratas cirróticas provoca un remodelado de los vasos linfáticos caracterizado por la pérdida de recubrimiento de SMC.

Teniendo en cuenta que ya estaba demostrado que la expresión de eNOS está relacionada con la permeabilidad vascular (Thibeault et al., 2010), quisimos investigar si existía un incremento de la permeabilidad de los vasos linfáticos como consecuencia de la sobreproducción de NO. Esto lo miramos usando la técnica de la linfangiografía

con un FITC-dextrano de 20 kDa. Este tamaño de partícula es lo suficientemente grande como para no atravesar los vasos en condiciones normales, pero también es lo suficientemente pequeño como para detectar si hay un aumento de permeabilidad (Ono et al., 2005; Porter et al., 2001). No encontramos ningún tipo de escape en los vasos linfáticos en ninguno de los grupos experimentales (Figura 5A).

Estudios previos de nuestro grupo ya habían demostrado que los cambios crónicos en la producción vascular de NO están asociados a remodelado vascular (Fernández-Varo et al., 2003). Por este motivo, y teniendo en cuenta la sobreproducción de NO encontrada en el endotelio linfático en cirrosis, evaluamos si un mecanismo similar podría ser responsable de la disfunción linfática observada en las ratas cirróticas. El remodelado vascular linfático se evaluó en tejido mesentérico por inmunohistoquímica usando la podoplanina como marcador específico. En el mesenterio, los vasos teñidos con podoplanina tenían un mayor recubrimiento de SMC en condiciones controles que en cirrosis. Este remodelado también se analizó en ratas cirróticas tratadas con L-NMMA, donde encontramos que había un incremento del porcentaje de vasos linfáticos recubiertos por SMC después del tratamiento, comparado con el grupo cirrótico sin tratar (Figura 5B).

### 5. El NO inhibe la proliferación de las SMCs primarias.

Para profundizar más en el efecto que tiene el NO sobre las SMCs, estudiamos el efecto que tenía un dador de NO (DETANONOate) en la proliferación de estas células. Para ello, aislamos células musculares lisas de aorta de ratas controles e hicimos un ensayo de proliferación con BrdU. Pudimos observar una disminución significativa de la incorporación de BrdU cuando las células se incubaron con el dador de NO, en comparación con la condición control, indicando que el NO tiene un efecto antiproliferativo sobre estas células (Supplemental results Figura 2).

## ORIGINAL ARTICLE

# Increased nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats

Jordi Ribera,<sup>1</sup> Montse Pauta,<sup>1</sup> Pedro Melgar-Lesmes,<sup>1</sup> Sònia Tugues,<sup>1,2</sup> Guillermo Fernández-Varo,<sup>1</sup> Kara F Held,<sup>3</sup> Guadalupe Soria,<sup>4</sup> Raúl Tudela,<sup>4,5</sup> Anna M Planas,<sup>4,6</sup> Carlos Fernández-Hernando,<sup>7</sup> Vicente Arroyo,<sup>8</sup> Wladimiro Jiménez,<sup>1,9</sup> Manuel Morales-Ruiz<sup>1</sup>

► Additional materials are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://gut.bmj.com/content/early/recent>).

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**

Dr Manuel Morales-Ruiz, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic Universitari, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; [morales@clinic.ub.es](mailto:morales@clinic.ub.es)

Revised 3 December 2011  
Accepted 21 December 2011

**ABSTRACT**

**Background and aim** The lymphatic network plays a major role in maintaining tissue fluid homeostasis. Therefore several pathological conditions associated with oedema formation result in deficient lymphatic function. However, the role of the lymphatic system in the pathogenesis of ascites and oedema formation in cirrhosis has not been fully clarified. The aim of this study was to investigate whether the inability of the lymphatic system to drain tissue exudate contributes to the oedema observed in cirrhosis.

**Methods** Cirrhosis was induced in rats by CCl<sub>4</sub> inhalation. Lymphatic drainage was evaluated using fluorescent lymphangiography. Expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was measured in primary lymphatic endothelial cells (LyECs). Inhibition of eNOS activity in cirrhotic rats with ascites (CH) was carried out by L-N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine (L-NMMA) treatment (0.5 mg/kg/day).

**Results** The (CH) rats had impaired lymphatic drainage in the splanchnic and peripheral regions compared with the control (CT) rats. LyECs isolated from the CH rats showed a significant increase in eNOS and nitric oxide (NO) production. In addition, the lymphatic vessels of the CH rats showed a significant reduction in smooth muscle cell (SMC) coverage compared with the CT rats. CH rats treated with L-NMMA for 7 days showed a significant improvement in lymphatic drainage and a significant reduction in ascites volume, which were associated with increased plasma volume. This beneficial effect of L-NMMA inhibition was also associated with a significant increase in lymphatic SMC coverage.

**Conclusions** The upregulation of eNOS in the LyECs of CH rats causes long-term lymphatic remodelling, which is characterised by a loss of SMC lymphatic coverage. The amelioration of this lymphatic abnormality by chronic eNOS inhibition results in improved lymphatic drainage and reduced ascites.

The prognostic expectations for cirrhotic patients are poor because of the severe complications these patients experience. One of the most common complications is ascites, which is associated with increased morbidity and mortality.<sup>1</sup> Some of the mechanisms that contribute to the pathogenesis of ascites include increased intravascular hydrostatic pressure, enlarged splanchnic arterial vasculature

**Significance of this study****What is already known about this subject?**

- Under pathological conditions, four derangements contribute to the formation of oedema: (1) an increase in intravascular hydrostatic pressure; (2) a decrease in plasma oncotic pressure; (3) renal retention of salt and water; and (4) impairment of lymphatic drainage.
- There is abundant literature establishing the presence of most of these mechanisms in cirrhosis and their role in the consequent oedema and ascites. However, few studies have investigated whether there is impaired lymphatic functionality in cirrhosis.
- Lymphatic transport is promoted by extrinsic and intrinsic forces. The intrinsic forces are derived from the contractility of the smooth muscle cells (SMCs) of the collecting lymphatic vessels. Regarding the molecular mechanisms governing the intrinsic contractility of the collecting lymphatic vessels, there is evidence that the lymphatic endothelial cells control lymph flow by regulating the contractility of SMCs via the production of nitric oxide (NO).
- Increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity in the blood vessels of cirrhotic rats, along with its effect on vascular remodelling, has already been demonstrated. However, the changes in lymphatic NO production and its effect on lymphatic remodelling have not previously been investigated in cirrhosis.

and decreased plasma oncotic pressure.<sup>2–4</sup> These changes result in excessive fluid filtration, which is exacerbated by the concomitant transformation of the hepatic microvasculature into a capillarised and defenestrated endothelium.<sup>5,6</sup> In this scenario, the increase in intrahepatic pressure is transmitted upstream by the blood to the splanchnic organs, resulting in further oedema.<sup>7</sup> As the liver disease progresses, the antidiuretic and antinatriuretic properties of certain neuroendocrine systems, which are activated secondary to the arterial vasodilation, worsen the oedematous condition and

## Significance of this study

**What are the new findings?**

- ▶ Cirrhosis is accompanied by impairment of lymphatic drainage of the splanchnic and peripheral regions.
- ▶ The cirrhotic lymphatic endothelial cells overexpress eNOS and overproduce NO.
- ▶ NO overproduction causes lymphatic remodelling. The remodelling process is characterised by a decrease in coverage of the lymphatic vessels by pericytes or SMCs.
- ▶ Long-term inhibition of eNOS activity with L-NMMA corrected lymphatic abnormalities, resulting in an increase in coverage of the lymphatic vessels by pericytes, an improvement in lymphatic drainage, and a significant decrease in ascites volume.

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

- ▶ Our observations have implications for the pathophysiology of ascites and oedema formation in cirrhosis. We demonstrate that cirrhosis is accompanied by impairment of the lymphatic drainage. In addition, we show that NO overproduction causes lymphatic remodelling. Both lymphatic abnormalities are reversed by L-NMMA treatment, resulting in improved lymphatic drainage from the peritoneal cavity and reduced ascites. Therefore eNOS inhibition is a new target for correcting lymphatic dysfunction in cirrhosis.

cause ascites.<sup>8</sup> All of these mechanisms contribute to the onset and maintenance of oedema and ascites. However, the role of the lymphatic system in the pathogenesis of ascites formation has not been fully clarified.

The lymphatic capillaries are formed by a thin layer of non-fenestrated lymphatic endothelial cells (LyECs) without basement membranes that form closed-ended structures. Perivascular smooth muscle cells (SMCs) and pericytes are absent in lymphatic capillaries but are present in the collecting lymphatic vessels that conduct lymph within the lymphatic system.<sup>9</sup> In the absence of a muscular pumping organ, such as the heart in the cardiovascular system, lymphatic transport is promoted by extrinsic and intrinsic forces. The intrinsic forces are derived from the contractility of the SMCs of the collecting lymphatic vessels, which has been proposed as one of the major driving forces of lymph circulation.<sup>10</sup> Regarding the molecular mechanisms governing the intrinsic contractility of the collecting lymphatic vessels, there is evidence that the LyECs control lymph flow by regulating the contractility of SMCs via the production of nitric oxide (NO).<sup>11</sup>

In cirrhotic patients, the lymphatic system helps to prevent ascites accumulation by reabsorbing excess fluid in the liver and splanchnic regions. Lymph flow is increased as a consequence,<sup>12</sup> which stimulates hepatic lymphangiogenesis.<sup>13</sup> However, this compensatory mechanism is not sufficient to prevent ascites formation in decompensated cirrhotic patients. This lymphatic deficiency supports the hypothesis that advanced liver disease is associated with impaired lymphatic function. Therefore our study aimed to investigate whether the inability of the lymphatic system to drain tissue exudate contributes to the oedema observed in cirrhosis. In addition, increased eNOS activity in the blood vessels of cirrhotic rats, along with its effect on vascular remodelling, has already been demonstrated.<sup>14 15</sup> Therefore we

also investigated whether NO overproduction by the LyECs may be responsible for lymphatic impairment in cirrhosis.

**MATERIALS AND METHODS****The experimental cirrhosis model**

The study was performed in cirrhotic (CH) and control (CT) male adult Wistar rats (Charles–River, Saint Aubin les Elseuf, France), following the guidelines of the investigation and ethics committees of the Hospital Clinic. Cirrhosis was induced by inhalation of CCL<sub>4</sub>, as described previously.<sup>13</sup>

**Isolation of LyECs**

Freshly isolated primary LyECs were obtained from the mesentery of the CT and CH rats. Briefly, the atrium was cannulated and the vascular system perfused with normal saline solution. Mesenteric lymphatic tissue mucosa was harvested, placed on 35 mm plates containing ice-cold phosphate-buffered saline, and cut into small (1 mm) fragments. The fragments were incubated in 0.25% collagenase A (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) at 37°C. The suspension was passed through 100 µm nylon mesh and centrifuged at 1800 rpm for 4 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in Hank's balanced salt solution. The LyECs were isolated using rabbit antibody to rat podoplanin (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) in a 1:100 dilution as the primary antibody and microbeads coupled with a secondary goat anti-rabbit antibody (MACS system, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium that was supplemented with 20% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

**Lymphangiography**

To evaluate lymphatic drainage in peripheral areas, 0.3 ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran 2000 kDa or 20 kDa (Sigma Chemical) was subcutaneously injected into the ears, tails and footpads of the CT and CH rats. Immediately after the injection, fluorescent images of the subcutaneous lymphatic drainage were visualised using a fluorescence stereomicroscope system (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). For the splanchnic areas, a long-chain fatty acid (BODIPY FL C16; Invitrogen, San Diego, California, USA) was administered intragastrically. After 2 h, fluorescent images of the mesenteric lymphatic drainage were obtained.

**L-N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine (L-NMMA) and midodrine treatments**

The CH rats were treated intragastrically with L-NMMA (Calbiochem, Gibbstown, New Jersey, USA) at a dose of 0.5 mg/kg/day for 1 week, or midodrine (Sigma Chemical) at a dose of 5 mg/kg/day for 1 week. The untreated CH rats were given the dosing vehicle intragastrically as a treatment control.

**Immunohistochemistry, immunocytofluorescence and whole-mount immunofluorescence staining**

For immunohistochemistry, mesentery samples were fixed in 10% buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin. Immunolabelling was performed using a rabbit antibody to rat podoplanin (Sigma Chemical). Immunolabelled cells were detected with the Dako LSAB2 System, HRP (Dako, Glostrup, Denmark). Immunoreactivity was visualised using a light microscope (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Kanagawa, Japan).

For the immunocytofluorescence analyses, LyECs were fixed with 4% paraformaldehyde. The cells were incubated with one of the following primary antibodies for 1 h: rabbit anti-rat podoplanin, mouse anti-rat CD31 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA) or goat anti-rat CD34 (LifeSpan Biosciences, Seattle, Washington, USA). The respective secondary

antibodies were Cy3-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat (Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, California, USA). Immunofluorescence was visualised with an immunofluorescence microscope system (Nikon Eclipse E600).

For whole-mount immunofluorescence staining, ear tissue was fixed overnight in a solution containing 80% methanol and 20% dimethyl sulphoxide at  $-20^{\circ}\text{C}$  and permeabilized in Tris-buffered saline (TBS) containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Triton for 5 h. The tissue was incubated with rabbit antibody to rat podoplanin at a 1:200 dilution overnight, washed four times with TBS, and blocked again with TBS containing 2% BSA and 0.1% Triton for 3 h. Finally, the tissue was incubated with anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch) at a 1:300 dilution overnight and washed eight times with TBS. Immunofluorescence was visualised using an immunofluorescence microscope system (Nikon Eclipse E600).

#### Other measurements

Mean arterial and portal pressures were measured as previously described.<sup>16</sup> Sodium concentrations were measured using flame

photometry (IL 943; Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts, USA). Aldosterone was measured in rat plasma samples with a radioimmunoassay using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Coat-A-Count; DPC, Los Angeles, California, USA).

#### Statistical analysis

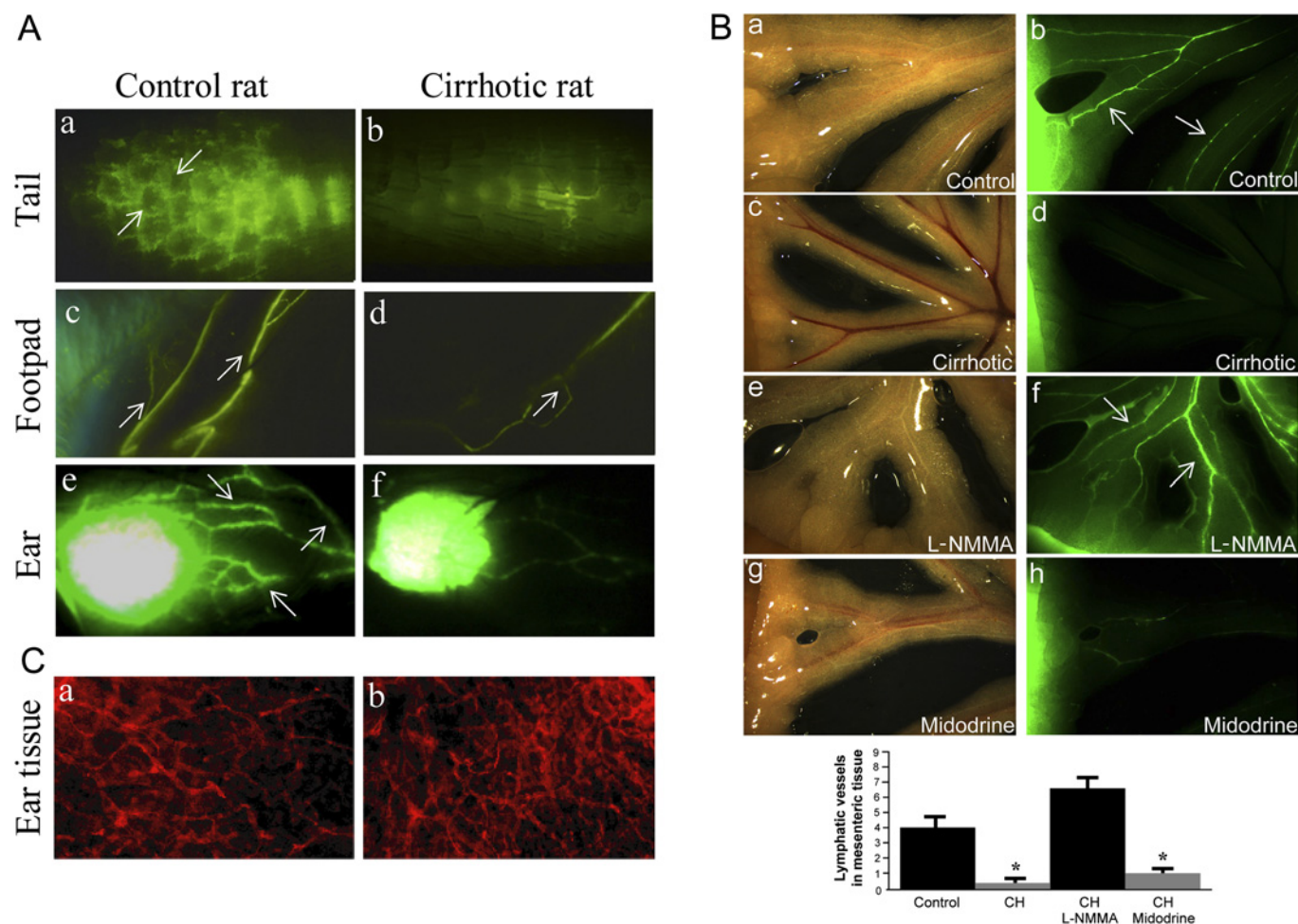
Statistical differences were analysed using unpaired or paired Student *t* tests and analysis of variance models (with Tukey's post hoc test) when appropriate. Differences were considered to be significant at a *p* value  $<0.05$ . The data are presented as mean  $\pm$  SEM.

Other methods are shown in the online supplemental methods section.

## RESULTS

### Quantification of lymphatic functionality and lymphatic density in CT and CH rats

To evaluate the function of the lymphatic system in cirrhosis, fluorescent lymphangiography was performed in the peripheral and splanchnic regions using FITC-dextran and the fluorescent lipid tracer, BODIPY FL-C16, respectively. CH rats showed



**Figure 1** Impaired lymphatic drainage in cirrhotic (CH) rats. In (A), the lymphatic drainage of 2000 kDa FITC-dextran was analysed by lymphangiography. Fluorescent dye was injected for lymphatic uptake into the interstitium of the tail tip (a and b), the intradermal tissue in the footpad (c and d), and the ear (e and f). The white arrows denote the presence of honeycomb structures (a) and functional lymphatic vessels (c–f) ( $n=10$ ). In (B), a, c, e and g are representative visible fields of mesenteric tissue. In b, d, f and h, the mesenteric lymphatic drainage was analysed by lymphangiography using Bodipy dye. Fluorescent fatty acid was administered intragastrically, and lymphatic uptake was observed after 2 h ( $n=5$ ). The white arrows denote functional lymphatic vessels. CH-L-NMMA and CH-midodrine denote CH rats treated with L-NMMA and midodrine, respectively;  $*p<0.01$  versus control and CH-L-NMMA. In (C), the lymphatic vessels in the ears of the control rats (a) and CH rats (b) were visualised by whole-mount staining with an antibody to podoplanin (red) ( $n=5$ ).

## Cirrhosis

impaired peripheral lymphatic drainage compared with CT animals ( $2.7 \pm 0.3$  vs.  $9.5 \pm 1.8$ , respectively, honeycomb lymphatic structures in the tail ( $p < 0.05$ ) and  $3.0 \pm 0.4$  vs.  $6.5 \pm 1.7$ , respectively, functional lymphatic vessels in the ear ( $p < 0.001$ )) (figure 1A). The CH rats also displayed impaired splanchnic drainage ( $0.3 \pm 0.3$  vs.  $4.7 \pm 1.2$ , respectively, functional lymphatic vessels/field in the mesenteric tissue,  $p < 0.001$ ) (figure 1B, panels a–d). To assess whether there were differences in the density of the peripheral lymphatic network between CT and CH rats, we immunostained whole-mount preparations of ear tissue with antibody to podoplanin (figure 1C). We observed no significant difference in the number of lymphatic branching points between CT and CH rats ( $79.6 \pm 3.0$  vs  $75.0 \pm 4.7$  lymphatic branching points per field, respectively;  $p > 0.05$ ).

### Quantification of eNOS protein and NO production in LyECs from CT and CH rats

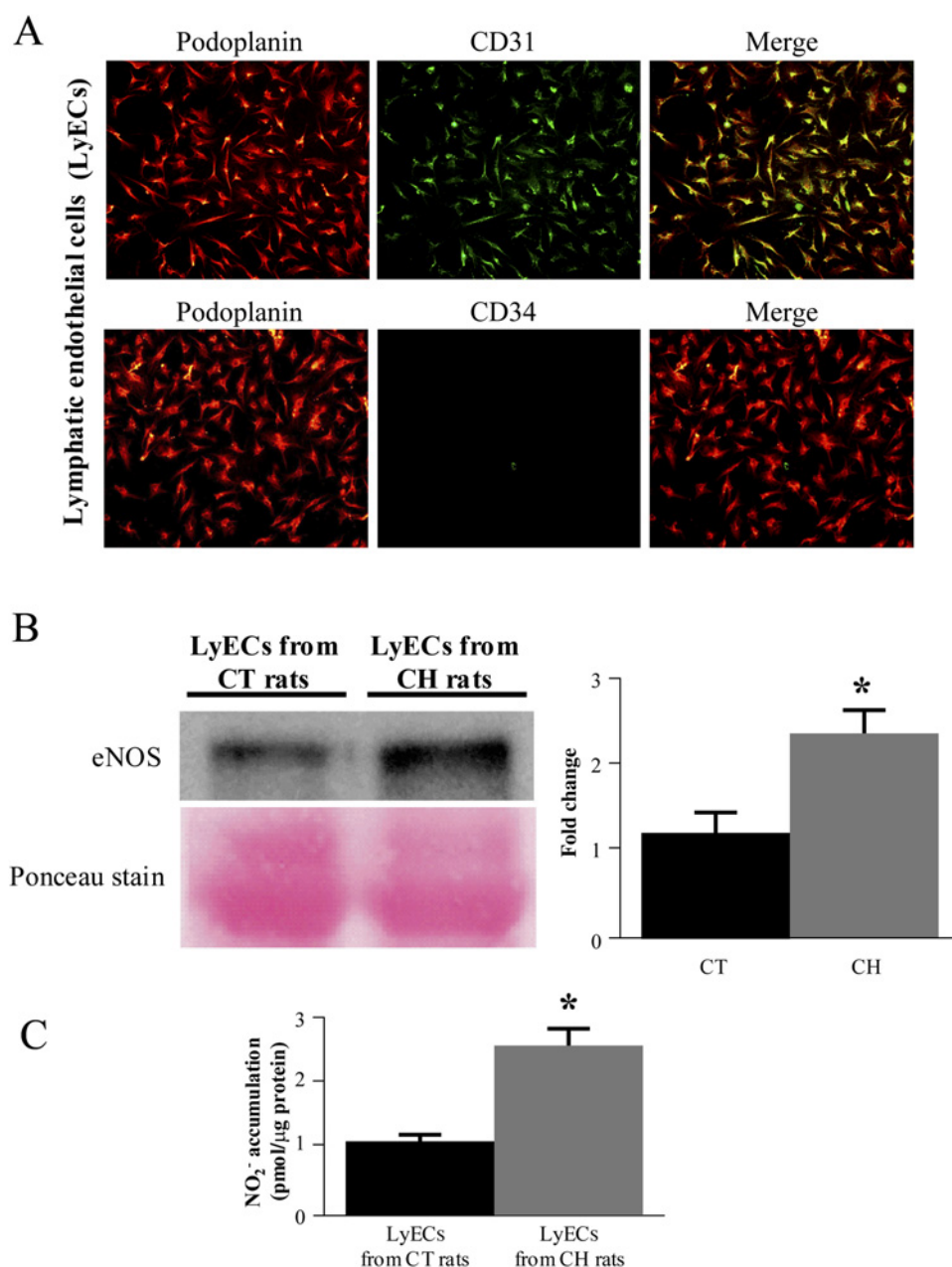
Primary LyECs from mesenteric tissue were isolated. The purity of the cells was evaluated by immunocytofluorescence against

CD31 and podoplanin, which is a specific marker of LyECs. Figure 2A indicates that podoplanin immunoreactivity colocalised with CD31 immunoreactivity in nearly 95% of the isolated LyECs. Of the remaining 5% (the contaminating population), fewer than 2% of the isolated cells exhibited immunoreactivity for CD34, which is a vascular endothelial marker not expressed by LyECs. eNOS expression in primary LyECs isolated from mesenteric tissue was evaluated by western blot. Expression of eNOS protein was significantly higher in the LyECs from CH rats than in those from CT rats (figure 2B). The increased expression of eNOS in the LyECs from the CH rats correlated with a significant increase in the 24 h accumulation of  $\text{NO}_2^-$  in the cell culture medium, compared with the accumulation of  $\text{NO}_2^-$  produced by LyECs isolated from CT rats (figure 2C).

### Effect of NOS inhibition on lymphatic drainage in CH rats

To determine the therapeutic effect of eNOS blockade on lymphatic drainage, a group of CH rats were treated with

**Figure 2** Quantification of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein and NO production in lymphatic endothelial cells (LyECs) from cirrhotic (CH) and control (CT) rats. In (A), representative immunostaining for podoplanin (red, left panels), CD31 and CD34 (green, middle panels) are shown for primary LyECs isolated from mesenteric tissue. The merged panels (yellow) indicate podoplanin–CD31 or podoplanin–CD34 colocalisation. Original magnification:  $100\times$ . In (B), eNOS protein expression was evaluated by western blot using cell lysates from LyECs isolated from the CT and CH rats. A Ponceau stain was used as a loading control ( $n=3$ ). Densitometric analysis of the protein expression is shown on the right graph;  $*p < 0.01$  versus CT. In (C), production of NO (assayed as  $\text{NO}_2^-$ ) was quantified in the medium of primary LyECs that were serum-starved for 16 h. The results are normalised by protein concentration.  $*p < 0.01$  compared with LyECs from CT rats ( $n=3$ ).



L-NMMA (0.5 mg/kg/day) for one week. In addition, another group of CH rats was treated with midodrine (a vasopressor that does not affect eNOS activity) at 5 mg/kg/day for 1 week. The rationale for comparing these two treatments was to assess whether the change in blood pressure alone, independently of the mechanism of action of these compounds, modifies lymphatic activity in CH rats.

To perform these experiments, we randomly distributed the CH animals into L-NMMA and midodrine groups, and, after the treatment, we performed a second round of lymphangiographies in the same animals. The fluorescent uptake of FITC-dextran by lymphatics had significantly increased in CH rats after 7 days of L-NMMA treatment (figure 3A, panels b and d) compared with the CH group treated with midodrine (figure 3A, panels f and h). We also observed an improvement in splanchnic lymphatic drainage after L-NMMA treatment (figure 1B, panels e, f) compared with the CH group treated with midodrine (figure 1B, panels g and h). Although the two treatments (L-NMMA and midodrine) were equally effective at increasing the mean arterial pressure (MAP) compared with untreated CH rats (figure 3B), only L-NMMA improved lymphatic functionality.

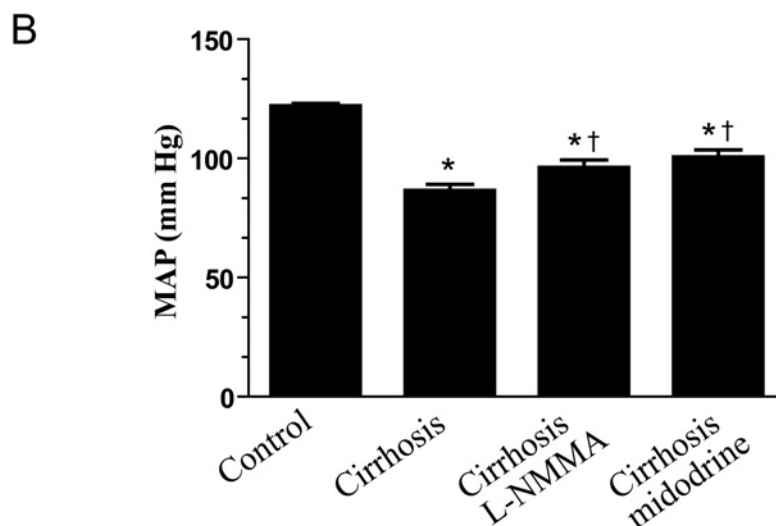
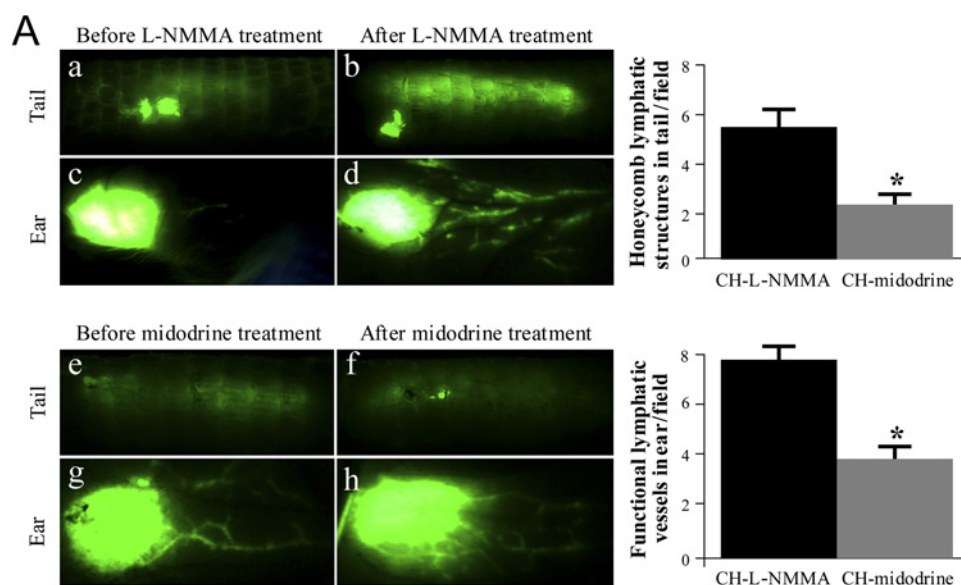
No significant changes in portal pressure due to L-NMMA were observed in the CH rats (online supplemental figure 1A).

### Reduction in ascites accumulation after L-NMMA treatment

We examined whether an improvement in lymphatic function was associated with a reduction in ascites volume. For this purpose, we performed MRI in all of the CH rats with ascites before and after the L-NMMA and midodrine treatments. All the CH rats treated with L-NMMA showed a significant decrease in ascites volume at day 7 of treatment ( $6.2 \pm 1.5$  ml of ascites at day 0 vs  $2.0 \pm 0.1$  ml of ascites at day 7 of the L-NMMA treatment,  $p < 0.05$ ). In contrast, the midodrine treatment had not significantly affected total ascites volume after 7 days of treatment ( $4.0 \pm 1.7$  ml of ascites at day 0 vs  $4.3 \pm 2.2$  ml of ascites at day 7 of the midodrine treatment,  $p > 0.05$ ) (figure 4A).

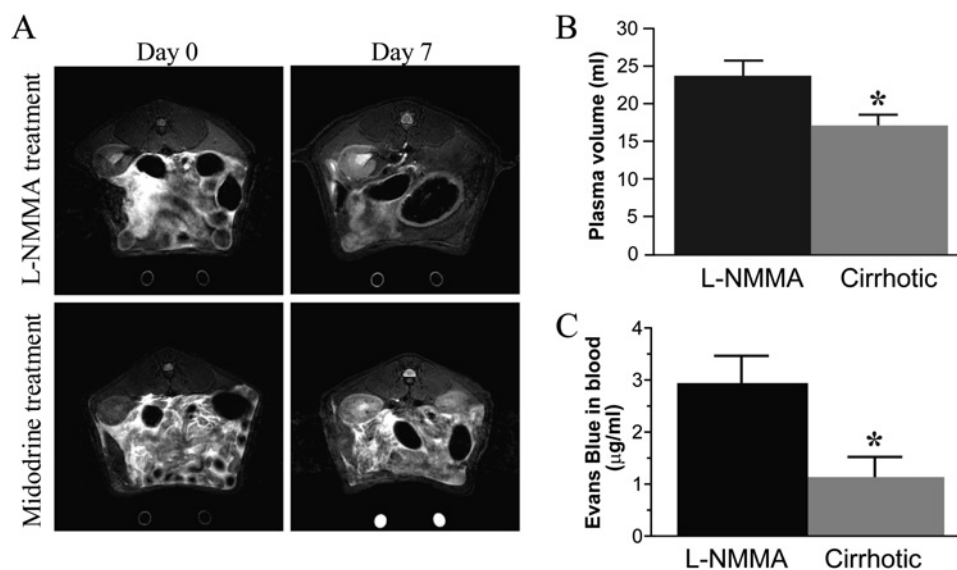
To test whether L-NMMA treatment promotes ascites loss by improving renal excretion, we performed balance studies. As shown in online supplemental table 1, administering L-NMMA to the CH rats for 7 days was not associated with significant changes in renal sodium or water excretion. In contrast, a significant increase in plasma volume was observed in CH rats

**Figure 3** Assessment of lymphatic drainage in cirrhotic (CH) rats after endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibition. In (A), the lymphatic drainage of the CH rats was assessed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran lymphangiography after L-NMMA (CH-L-NMMA) or midodrine (CH-midodrine) administration. FITC-dextran was injected into the interstitium of the tail tip (a, b, e and f) and in the ear (c, d, g and h). \* $p < 0.001$  for CH-midodrine versus CH-L-NMMA ( $n=10$ ). In (B), the mean arterial pressure (MAP) was measured in anaesthetised control (CT) rats, untreated CH rats, cirrhotic rats treated with L-NMMA (cirrhotic-L-NMMA) and cirrhotic rats treated with midodrine (cirrhotic-midodrine): \* $p < 0.001$  versus control and † $p < 0.05$  versus cirrhosis ( $n=10$ ).





**Figure 4** Quantification of ascites accumulation after L-NMMA and midodrine treatments. In (A), MRI slices of a rat peritoneal cavity show anatomical data. The regions of interest are drawn in bright white and correspond to the zones with accumulation of liquid. In the left panels, the images were taken from representative cirrhotic (CH) rats with ascites. In the right panels, the images were acquired from the same CH rats after 1 week of L-NMMA (upper panel) or midodrine (lower panel) treatments (n=5). In (B), the plasma volume was measured in treated (L-NMMA) and untreated (cirrhotic) cirrhotic rats with ascites using the Evans Blue dye dilution technique (p<0.05; n=5). In (C), the reabsorption of ascites into the circulatory system was examined by measuring the blood concentration of Evans Blue dye that was previously injected into the peritoneal cavity of treated (L-NMMA) or untreated cirrhotic rats (\*p<0.05; n=4).



treated with L-NMMA compared with untreated CH animals (figure 4B). To investigate whether the increase in plasma volume associated with L-NMMA treatment was due to reabsorption of ascites into the circulating blood, lymphatic drainage of the peritoneal cavity was assessed by injecting Evans Blue dye into the abdominal cavity of untreated or L-NMMA-treated CH rats. The results shown in figure 4C demonstrate that L-NMMA treatment was associated with an increase in movement of Evans Blue from the peritoneal cavity into the circulating blood.

In the clinical setting, increased plasma volume may be associated with worsening of the liver disease and further activation of the rennin–angiotensin II–aldosterone axis. To further explore this possibility, we measured serum concentration of aldosterone in CT, CH and L-NMMA-treated CH rats. As shown in online supplemental figure 1B, serum aldosterone concentrations observed in both L-NMMA-treated and untreated CH rats were significantly higher than in CT rats. Nevertheless, L-NMMA treatment was associated with a significant reduction in circulating aldosterone levels compared with that in untreated CH rats.

#### Study of lymphatic vessel leakage and lymphatic vascular remodelling in CH rats

Previous studies have shown that eNOS plays a major role in vascular permeability.<sup>17</sup> We therefore determined whether the overproduction of lymphatic NO is associated with increased lymphatic vessel leakage, which may compromise lymphatic functionality. To address this question, we performed lymph-angiographies using 20 kDa-FITC-dextran in the ears (data not shown) and footpads of CT, CH and L-NMMA-treated cirrhotic rats. No lymphatic leakage was observed in any of these experimental groups (figure 5A).

The effect of NO on vascular remodelling has been previously described for the blood vessels of CH animals.<sup>15</sup> We investigated whether a similar mechanism was responsible for the impaired lymphatic function observed in the CH rats. The lymphatic vascular remodelling was investigated by immunolabelling of the lymphatic vessels with antibody to podoplanin. In the mesenteric tissue, podoplanin-positive vessels coated with SMCs were more prevalent in the CT than the CH rats ( $55.2 \pm 6.8\%$  vs  $2.7 \pm 1.1\%$  of lymphatic vessels with SMC coverage,  $p < 0.05$ ) (figure 5B, panels a and d vs panels b and e, respectively).

Vascular remodelling was also analysed in the CH rats treated with L-NMMA. Podoplanin immunolabelling showed a significant increase in the percentage of lymphatic SMC coverage in the CH rats after L-NMMA treatment compared with the untreated CH group ( $16.0 \pm 1.2\%$  vs  $2.7 \pm 1.1\%$  of lymphatic vessels with SMC coverage,  $p < 0.05$ ) (figure 5B, panels c and f vs panels b and e, respectively).

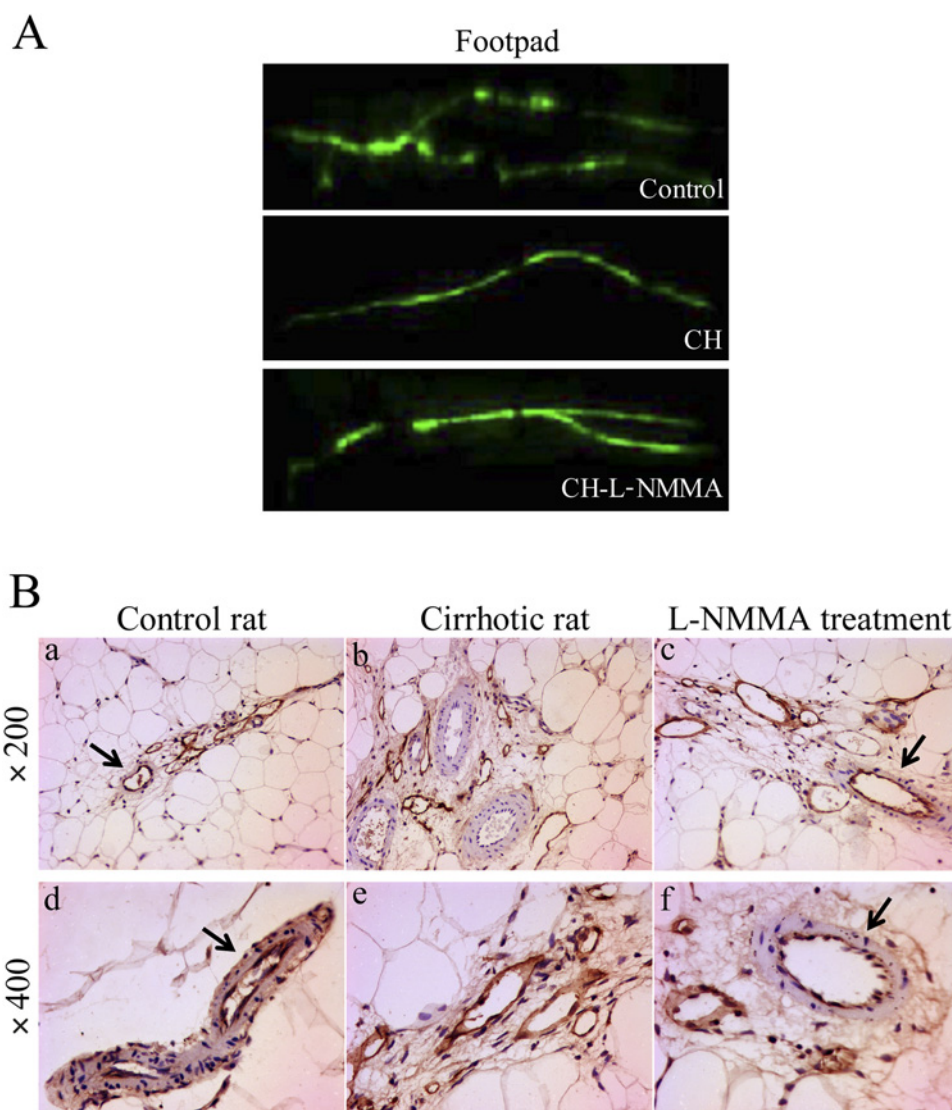
#### NO inhibits proliferation of primary SMCs

To obtain more evidence for the interaction between NO and SMCs, the effect of an NO donor (DETANONOate) on SMC proliferation was studied. Primary SMCs were isolated from the aortas of CT rats. We next assessed cell proliferation in these cells by measuring the amount of bromodeoxyuridine (BrdU) uptake using flow cytometry. Culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum was used as a positive control in the proliferation assay. When SMC cells were treated with 1 mM DETANONOate, BrdU uptake decreased significantly. To assess whether the antiproliferative effect of NO on SMCs is cGMP-dependent, we treated SMCs with the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor, 1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ). Inhibition of sGC did not modify BrdU uptake in response to DETANONOate treatment (online supplemental figure 2).

#### DISCUSSION

In pathological conditions, four derangements contribute to the formation of oedema: (1) an increase in intravascular hydrostatic pressure; (2) a decrease in plasma oncotic pressure; (3) renal retention of salt and water; and (4) impairment of lymphatic drainage.<sup>10</sup> There is abundant literature establishing the presence of most of these mechanisms in cirrhosis and their role in the consequent oedema and ascites. However, few studies have investigated whether there is impaired lymphatic functionality in cirrhosis. In one of the first studies addressing this issue, Dumont and Mulholland showed that CH patients have major abnormalities in their lymphatic vasculature, such as a large thoracic duct diameter and an increased rate of lymphatic flow.<sup>18</sup> In light of these findings, a lymph imbalance theory of ascites formation was formulated in 1980 by Witte *et al.*<sup>19</sup> According to this theory, an imbalance between fluid filtration in the intravascular region and its return to the circulation is responsible for an inefficient distribution of blood and results in the

**Figure 5** Effect of L-NMMA treatment on lymphatic vessel leakage and lymphatic vessel remodelling in the cirrhotic (CH) rats. In (A), representative lymphangiographies (using 20 kDa FITC-dextran) of functional lymphatic vessels in the footpads of control rats, cirrhotic rats with ascites (CH), and cirrhotic rats with ascites treated with L-NMMA (CH-L-NMMA) (n=3). In (B), the mesenteric lymphatic vasculature was analysed by immunostaining of antibody to podoplanin. The control rats (a and d) exhibited an increased number of lymphatic vessels covered by smooth muscle cells (SMCs) compared with the untreated CH rats (b and e). L-NMMA treatment in the CH rats (c and f) was associated with an increase in the number of lymphatic vessels with SMC coverage compared with the untreated CH rats (n=10). The arrows denote SMC coverage of the lymphatic vessels.



formation of ascites. This disturbance in fluid balance is sensed by baroreceptors located in the vascular circulatory tree, which activate antidiuretic and antinatriuretic neurohormonal mechanisms and aggravate the lymph imbalance.

The origin of the impaired lymphatic drainage in cirrhosis has classically been explained by the passive saturation of the lymphatic system due to overproduction of lymph and the anatomical limitations of the connectivity between the lymphatic and venous systems. However, this conclusion has been balanced by studies suggesting the presence of additional mechanisms that decrease lymphatic conductivity in CH patients with tense ascites compared with CH patients without ascites.<sup>20</sup> Our results also support the contribution of active mechanisms in the pathophysiology of lymphatic dysfunction. For example, we demonstrated that LyECs overexpress eNOS and overproduce NO. All of the CH rats treated with an inhibitor of eNOS activity (L-NMMA) showed an improvement in lymphatic drainage, a significant decrease in ascites volume, and a significant increase in MAP. It is theoretically possible that the L-NMMA-dependent increase in MAP resulted in an improvement in lymphatic drainage because of increased renal perfusion. However, the beneficial effect of L-NMMA treatment on lymphatic drainage was probably not due to changes in blood pressure because treating CH rats with midodrine also resulted in a significant increase in MAP without significantly affecting lymphatic drainage.

Consistent with earlier studies assessing the effect of eNOS inhibition in ascites formation,<sup>21</sup> we found a significant correlation between inhibition of eNOS activity and loss of ascites in the CH rats. Martin *et al* explained the reduction in ascites volume by an increase in renal sodium and water excretion due to NO inhibition. In contrast, the anti-ascitogenic mechanism of the L-NMMA treatment described in our study occurred via increased lymphatic drainage without a significant improvement in renal excretion. The effect of eNOS inhibition on renal function has also been addressed by other groups. Graebe *et al* showed that chronic L-NAME treatment decreases sodium retention in CH rats.<sup>22</sup> In addition, treatment with a continuous infusion of methylene blue<sup>23</sup> or an acute dose of L-NMMA<sup>24</sup> in decompensated CH patients did not confirm the beneficial effect of eNOS inhibition on renal function that was previously reported by Martin *et al*.

In this study, we establish a novel mechanism that may explain why eNOS inhibition improves lymphatic functionality and ascites reabsorption in CH animals. Lymphatic transport is promoted by both intrinsic and extrinsic forces. The intrinsic forces are derived from the contractility of the SMCs of the lymphatic collecting vessels. In the control animals, 50% of lymphatic vessels are coated with SMCs and are therefore potentially responsive to vasoconstrictors. In contrast, in CH rats, only 2.7% of lymphatic vessels are coated with SMCs. This

percentage represents a significant loss of contractile capacity of the lymphatic system in cirrhosis. Regarding the pathological role of lymphatic NO overproduction in lymphatic dysfunction, we demonstrated that NO inhibits SMC proliferation in primary rat SMCs. In addition, the coating of lymphatic vessels by SMCs was partially restored in CH rats by chronic administration of L-NMMA, and this treatment was associated with (1) restoration of the lymphatic circulation in the mesenteric region (figure 1B) and (2) increased ascites drainage from the peritoneal cavity into the circulating blood (figure 4C). Importantly, a significant increase in plasma volume with lower levels of circulating aldosterone was noted in the L-NMMA-treated animals compared with untreated CH rats, supporting the idea that the increase in plasma volume is not associated with a worsening of the cirrhosis but with the redistribution of body fluids into the circulation. eNOS inhibition in CH rats may also restore the contractility of the smooth muscle layer of the collecting lymphatic vessels by suppressing lymphatic vasodilation via NO overproduction. This conclusion is supported by a previous study that found that eNOS inhibitors or the genetic deletion of eNOS modify lymph flow in mice via NO-dependent regulation of the contractile driving force of collecting lymphatic vessels.<sup>11</sup>

Several studies have demonstrated increased NOS activity in the blood vessels of systemic and splanchnic areas of both cirrhotic patients and rats with experimental cirrhosis and/or portal hypertension. Our study leads us to further postulate that this overproduction is not limited to blood vessels but also occurs in lymphatic vessels. These previous publications suggest that eNOS inhibitors may be a useful therapeutic strategy for the treatment of the hyperdynamic abnormalities and oedema formation characteristic of cirrhosis. However, this situation substantially differs from the defective eNOS activation described in cirrhotic livers, where tissue-specific restoration of intrahepatic eNOS activity is associated with reduced portal pressure in experimental models.<sup>25–26</sup> Thus attempts to inhibit NOS activity must be undertaken carefully, and further research should be performed to improve both tissue-specific delivery strategies for NO supplementation in cirrhotic livers and the inhibition of eNOS activity in extrahepatic blood and lymphatic vessels.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Immunology, Genetics and Pathology, Rudbecklaboratoriet, Uppsala, Sweden

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Vascular Biology and Therapeutics Program, Yale University, New Haven, Connecticut, USA

<sup>4</sup>Experimental 7T-MRI Unit, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>CIBER-BBN, Group of Biomedical Imaging of the University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Departments of Medicine and Cell Biology, Leon H. Charney Division of Cardiology and the Marc and Ruti Bell Vascular Biology and Disease Program, New York University School of Medicine, New York, NY, USA

<sup>8</sup>Liver Unit-Institut de Malalties Digestives, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>10</sup>Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Funding** This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación-Plan Nacional de I+D+I (SAF2007-63069 and SAF2010-19025 to MM-R and SAF2009-08039 to WJ) and AGAUR (2009 SGR 1496 to WJ). MP was supported by MICINN (contract number BES-2007-16909). CIBERehd and CIBER-BBN are financed by the Instituto de Salud Carlos III.

**Competing interests** None.

**Contributors** JR, MP, PM-L, ST and GF-V contributed to the acquisition and interpretation of data for cirrhosis induction, lymphatic drainage and vascular biology. VA and WJ helped draft the article and revised it critically for its scientific content. GS, RT and AMP contributed to the acquisition and interpretation of MRI data. MM-R contributed to the conception and design of the study as well as to the analysis and interpretation of the data. KF, CF-H, MP and JR were involved in the isolation of smooth muscle cells, the proliferation experiments, the aldosterone measurements and the experiments on lymphatic drainage in the peritoneal cavity. GF-V carried out the measurements of portal pressure.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

#### REFERENCES

1. Moore KP, Wong F, Gines P, *et al*. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;**38**:258–66.
2. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, *et al*. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004;**350**:1646–54.
3. Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, *et al*. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;**137**:2112–24.
4. Henriksen JH, Moller S. Alterations of hepatic and splanchnic microvascular exchange in cirrhosis: local factors in the formation of ascites. In: Gines P, Arroyo V, Rodes J, *et al*, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2005:174–85.
5. Bhunchet E, Fujieda K. Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: a mechanism to maintain liver blood flow. *Hepatology* 1993;**18**:1450–8.
6. Mori T, Okanoue T, Sawa Y, *et al*. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1993;**17**:891–7.
7. Melgar-Lesmes P, Tugues S, Ros J, *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiotensin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut* 2009;**58**:285–92.
8. Cardenas A, Bataller R, Arroyo V. Mechanisms of ascites formation. *Clin Liver Dis* 2000;**4**:447–65.
9. Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990;**70**:987–1028.
10. Aukland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 1993;**73**:1–78.
11. Hagendoorn J, Padera TP, Kashiwagi S, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase regulates microlymphatic flow via collecting lymphatics. *Circ Res* 2004;**95**:204–9.
12. Witte MH, Dumont AE, Cole WR, *et al*. Lymph circulation in hepatic cirrhosis: effect of portacaval shunt. *Ann Intern Med* 1969;**70**:303–10.
13. Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, *et al*. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2005;**129**:1686–95.
14. Ros J, Jimenez W, Lamas S, *et al*. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995;**21**:554–60.
15. Fernandez-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, *et al*. Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol* 2003;**162**:1985–93.
16. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, *et al*. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;**125**:522–31.
17. Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, *et al*. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell* 2010;**39**:468–76.
18. Dumont AE, Mulholland JH. Flow rate and composition of thoracic-duct lymph in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1960;**263**:471–4.
19. Witte CL, Witte MH, Dumont AE. Lymph imbalance in the genesis and perpetuation of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* 1980;**78**:1059–68.
20. Henriksen JH. Estimation of lymphatic conductance. A model based on protein-kinetic studies and haemodynamic measurements in patients with cirrhosis of the liver and in pigs. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;**45**:123–30.
21. Martin PY, Ohara M, Gines P, *et al*. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 1998;**101**:235–42.
22. Graebe M, Brond L, Christensen S, *et al*. Chronic nitric oxide synthase inhibition exacerbates renal dysfunction in cirrhotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**286**:288–97.
23. Cardenas A, Curry M, Afdhal NH. The not so good effects of nitric oxide inhibition with methylene blue in cirrhosis and ascites. *Dig Dis Sci* 2007;**52**:939–40.
24. Thiesson HC, Skott O, Jespersen B, *et al*. Nitric oxide synthase inhibition does not improve renal function in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:180–6.
25. Morales-Ruiz M, Jimenez W. Pathophysiological role of nitric oxide in cirrhosis. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, *et al*, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment*. Malden, Massachusetts: Blackwell Science Inc, 2005:105–14.
26. Langer DA, Shah VH. Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 2006;**44**:209–16.



## Increased nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats

Jordi Ribera, Montse Pauta, Pedro Melgar-Lesmes, et al.

*Gut* published online January 20, 2012

doi: 10.1136/gutjnl-2011-300703

---

Updated information and services can be found at:

<http://gut.bmj.com/content/early/2012/01/20/gutjnl-2011-300703.full.html>

---

*These include:*

**Data Supplement**

"Supplementary Data"

<http://gut.bmj.com/content/suppl/2012/01/20/gutjnl-2011-300703.DC1.html>

**References**

This article cites 24 articles, 5 of which can be accessed free at:

<http://gut.bmj.com/content/early/2012/01/20/gutjnl-2011-300703.full.html#ref-list-1>

**P<P**

Published online January 20, 2012 in advance of the print journal.

**Email alerting service**

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

**Notes**

---

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

---

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

**SUPPLEMENTAL INFORMATION**

- 1. Supplemental methods**
- 2. References**
- 3. Figure legends**
- 4. Supplemental Table 1**

## 1.- SUPPLEMENTAL METHODS

### **Western blot for endothelial nitric oxide (eNOS) detection and nitric oxide**

**(NO) quantification.** The cell lysates were prepared in lysis buffer (Tris–HCl 20 mM pH 7.4 containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM Pefabloc and Complete® from Roche). The cell lysates were separated on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel (Mini Protean III, BioRad, Richmond, Ca) and transferred for 2 hours at 4°C to nitrocellulose membranes (Transblot Transfer Medium, BioRad, Richmond, CA) that were stained with Ponceau-S red as a control for protein loading. The membranes were incubated at 4°C with mouse monoclonal anti-rat eNOS or anti-rat iNOS (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ) overnight in a 1:1000 dilution. They were then incubated with goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody at a 1:2000 dilution (Cell Signaling, Beverly, MA) for 1 hour at room temperature. The bands were visualized by chemiluminescence (ECL western blotting analysis system; Amersham Biosciences). To measure the NO concentration, the basal accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the cell culture medium was quantified using a chemiluminescence detector in a NO analyzer (Sievers, Buckinghamshire, UK).

**Magnetic resonance imaging (MRI).** The MRI experiments were conducted on a 7.0 T BioSpec 70/30 horizontal animal scanner (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) that was equipped with a 12-cm inner diameter actively shielded gradient system (400 mT/m). The receiver coil was a phased-array surface coil for the rat brain. The animals were placed in a supine position in a Plexiglas holder with a nose cone to administer anesthetic gases (isoflurane in a mixture of 30% O<sub>2</sub> and 70% CO<sub>2</sub>) and were held in position using a tooth bar, ear bars

and adhesive tape. Tripilot scans were used for accurate positioning of the animal's head in the isocenter of the magnet. T2-weighted images were acquired using a TurboRARE (rapid acquisition with rapid enhancement) sequence using the following parameters: repetition time = 3236 ms, echo time = 9 ms, RARE factor = 8, 4 averages, slice thickness = 1 mm with 1 mm gap between slices, number of slices = 28, field of view = 60 x 60 mm<sup>3</sup>, matrix size = 256 x 256 pixels and a spatial resolution of 0.234 x 0.234 mm in a 1 mm slice thickness. To acquire the total volume of the abdomen, the acquisition was immediately repeated with the field of view shifted 1 mm in the z direction. The total scan time was 30 minutes. Images were processed and analyzed using the software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

**Plasma volume quantification.** Plasma volume was measured using Evans Blue dye, as previously described.[1] Briefly, 0.2 mL of Evans Blue (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) solution (3 mg) was injected through a jugular vein catheter followed by physiological saline to clear the dye from the catheter. Five minutes later, 1 mL of blood was withdrawn from a femoral artery catheter. A 0.2-mL plasma aliquot was diluted in distilled water to 2 mL, and the absorbance of the solution was read by a spectrophotometer at a 600-nm wavelength. The plasma volume was calculated by the following formula:

$$\text{plasma volume (mL)} = A_{\text{standard}}/A_{\text{sample}} \times 10,$$

where the standard was 3 mg of Evans Blue dye in 10 mL of plasma diluted by a factor of 10.

**Evans Blue intraperitoneal drainage.** The Evans Blue dye technique was used to measure lymphatic drainage in the peritoneum. Thirty milligrams of Evans Blue per kilogram (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) diluted in

physiological saline was injected in the peritoneal cavity. Thirty minutes later, an aliquot of blood was extracted from heart and centrifuged 5 minutes at 3000 rpm. Next, 100  $\mu$ l of serum was mixed with 900  $\mu$ l of 15% trichloroacetic acid to precipitate the dye. The mixture was then centrifuged, washed twice with 98% ethanol, and resuspended in 1 mL of formamide. The dye was quantified by spectrophotometry at 620 nm the results were calculated from a Evans Blue standard curve (0.9–30  $\mu$ g/mL) and expressed as  $\mu$ g of EB/mL of blood.

**Isolation of smooth muscle cells (SMCs) from the thoracic aorta.** Freshly isolated primary SMCs were obtained from the thoracic aorta of CT rats. Briefly, the atrium was cannulated, and the vascular system was perfused with normal saline solution. Following removal of the adhering adventitia, thoracic aortas were harvested and placed in a 1 mg/mL collagenase A (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) solution at 37°C for 10 minutes. Next, the vessels were rinsed with fresh HBSS and the remaining adventitia was removed under a dissecting microscope. The vessels were cut into small (1 mm) fragments and placed in a solution of 2 mg/mL collagenase A (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and 0.5 mg/mL elastase (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) at 37°C for 1 hour. Finally, the cell suspension was centrifuged at 1800 rpm for four minutes and resuspended in culture medium. The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) that was supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin.

**Balance studies of renal excretion.** After developing ascites, rats were placed in individual metabolic cages for one week before the balance study began. Then, rats were treated with L-NMMA, Midodrine or vehicle for 7 days. Each rat received the same diet and a sample of 24-hour urine was collected every day.



The diet consisted of 0.1% sodium and 0.6% potassium (Global Diet 2014, Harlan, Indianapolis, Indiana, USA).

**Cell proliferation assay.** A BrdU cell proliferation assay kit (BrdU Flow kit; BD Pharmigen, San Jose, CA, USA) was used to measure the incorporation of BrdU during DNA synthesis following the manufacturer's protocol. To assess NO-dependent responses, the NO donor diethylenetriamine NONOate (DETA NONOate) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) was used at a final concentration of 1mM. In some experimental conditions, a dose of 50  $\mu$ M 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) was used to inhibit soluble guanylate cyclase activity. Briefly, primary rat SMCs isolated from thoracic aortas were cultivated in serum-free medium for 24 hours. The cells were subsequently treated with 10% FBS, 10% FBS+1mM DETANONOate or 10% FBS+1mM DETANONOate+50 $\mu$ M ODQ for an additional 24 hours. BrdU (10  $\mu$ M) was added to the culture medium for 5 h. The cells were fixed, and the DNA was denatured in a fixative solution for 1 hour at 37°C. The cells were then incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-BrdU antibody for 30 minutes at room temperature. BrdU uptake was quantified using flow cytometry (FACSCanto II, BD Bioscience).

## 2.- REFERENCES

1. Li Y, Liu H, Gaskari SA, et al. Hepatic venous dysregulation contributes to blood volume pooling in cirrhotic rats. *Gut* 2006;**55**:1030-1035.

### 3.- FIGURE LEGENDS

**Supplemental\_Figure\_1:** *Quantification of portal pressure and aldosterone in untreated and L-NMMA-treated cirrhotic ascitic rats.* In (A), portal pressure was measured in untreated and L-NMMA-treated CH rats as described in the supplemental methods section. The data are presented as the mean±standard error of the mean (n=5). In (B), the serum concentration of aldosterone was measured in control, cirrhotic and L-NMMA-treated CH rats (L-NMMA) using a radioimmune assay with a commercial kit as described in the Material and Methods section. The data are presented as the mean±standard error of the mean. \*P<0.05 vs. control and L-NMMA and #P<0.05 vs. control (n=5)

**Supplemental\_Figure\_2:** *Effect of an NO donors on SMC proliferation.* Representative figures are shown of a proliferation assay performed with primary SMCs isolated from the aorta of CT rats treated with DETANONOate or with DETANONOate+ODQ for 24 hours. The degree of BrdU incorporation was quantified using flow cytometry. For each panel, the percentage of cells that stained positively for BrdU is indicated. Similar results were obtained in five independent experiments.

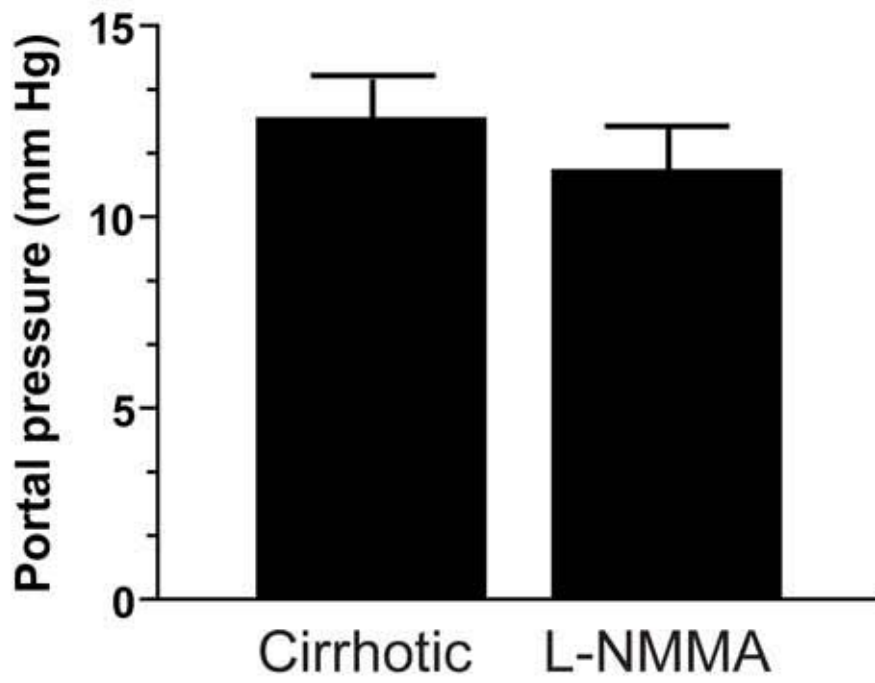
**4.- Supplemental Table 1:** Balance study of renal excretion in cirrhotic rats at Day 0 and Day 7 of vehicle (cirrhosis) or L-NMMA administration (cirrhosis+L-NMMA).

	Cirrhosis		Cirrhosis+L-NMMA	
	Day 0 (n=8)	Day 7 (n=8)	Day 0 (n=8)	Day 7 (n=8)
Weight (g)	409.2 (364.4-454.5)	404.4 (356.4-463.0)	378.0 (359.5-415.0)	385.0 (367.3-418.8)
Food intake (g per day)	27.1 (20.5-34.2)	26.3 (20.0-30.9)	28.5(20.7-47.3)	28.2(26.4-31.1)
Sodium intake (mmol per day)	1.2 (0.9-1.5)	1.1 (0.9-1.3)	1.4 (0.9-2.1)	1.2 (1.1-1.4)
Sodium excretion (mmol per day)	0.4 (0.1-1.0)	0.5 (0.2-0.7)	0.7 (0.4-1.1)	0.4 (0.2-0.7)
Sodium balance (mmol per day)	0.7 (0.1-1.2)	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.2-1.5)	0.8 (0.7-0.9)
Water intake (mL per day)	31.9 (26.0-39.5)	16.2 (10.2-25.0)	33.7 (19.2-44.7)	19.9 (16.1-24.0)
Urine output (mL per day)	27.7 (11.2-29.5)	7.2 (4.5-11.4)	17.9 (9.2-34.1)	9 (7.9-11.5)
Water balance (mL per day)	10.2 (3.9-17.0)	9.5 (5.4-13.6)	13.4 (4.3-18.1)	11 (8.1-12.2)

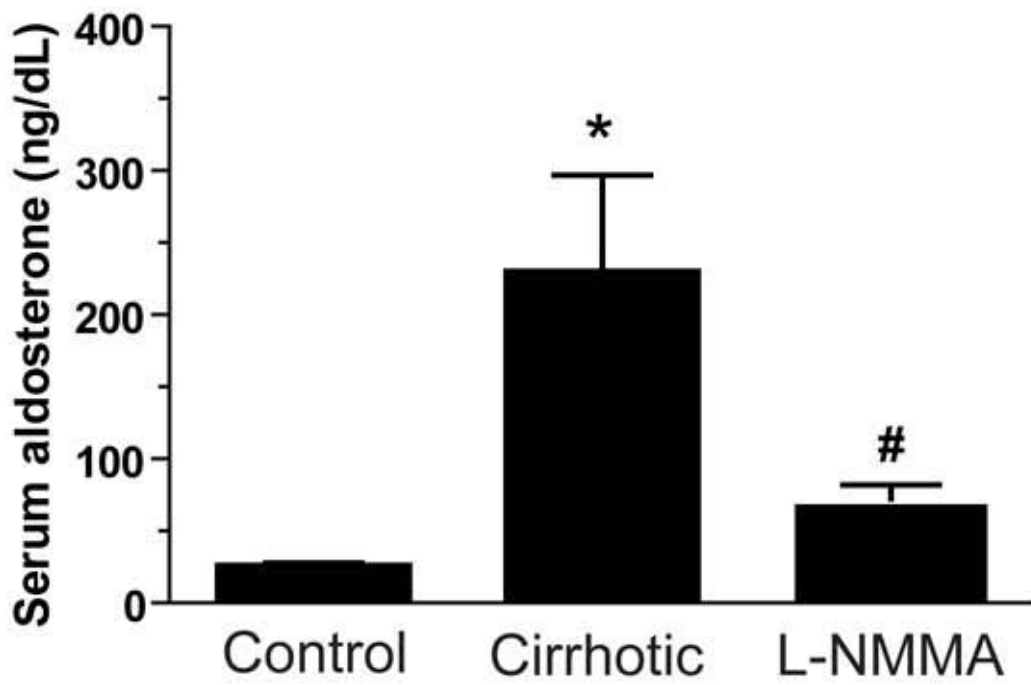
Numerical data are represented as median values (interquartile range [IQR] 25-75). None of these differences were statistically significant.



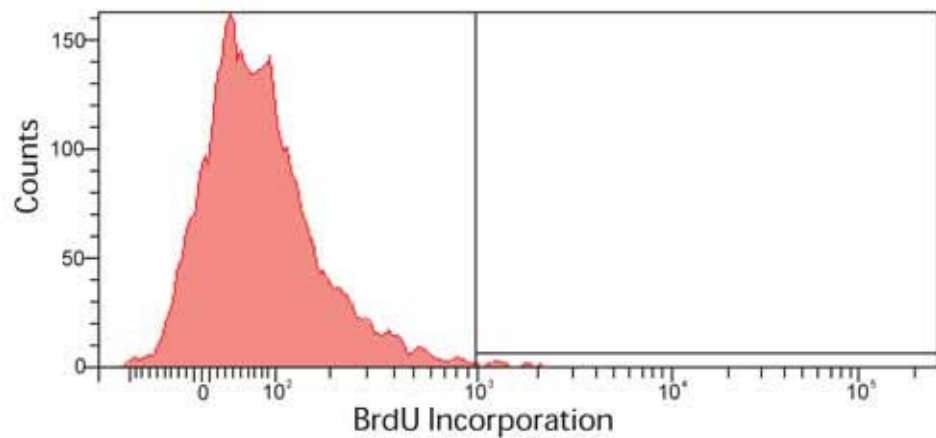
A



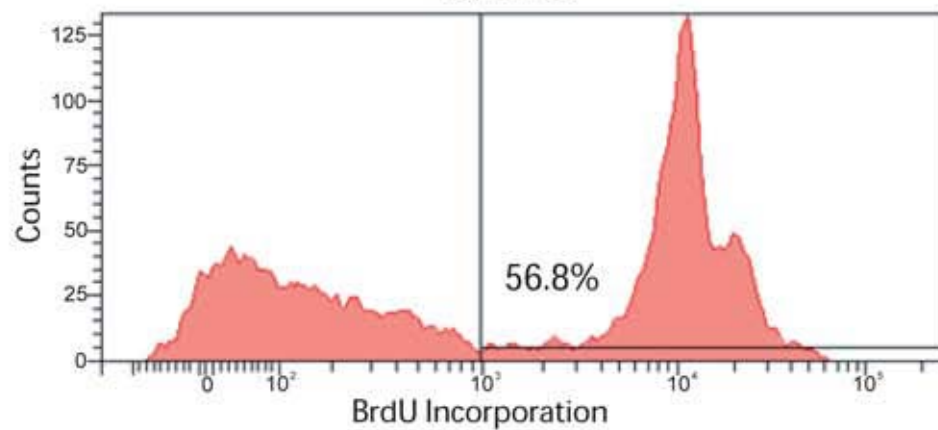
B



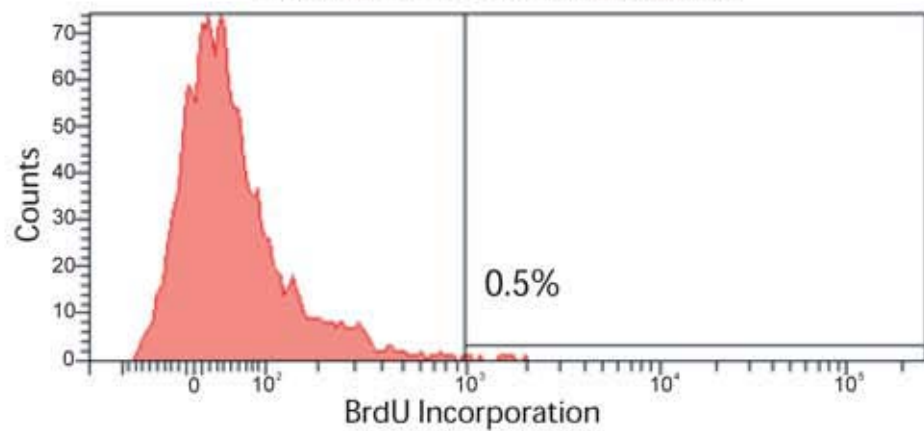
**Serum-free media**



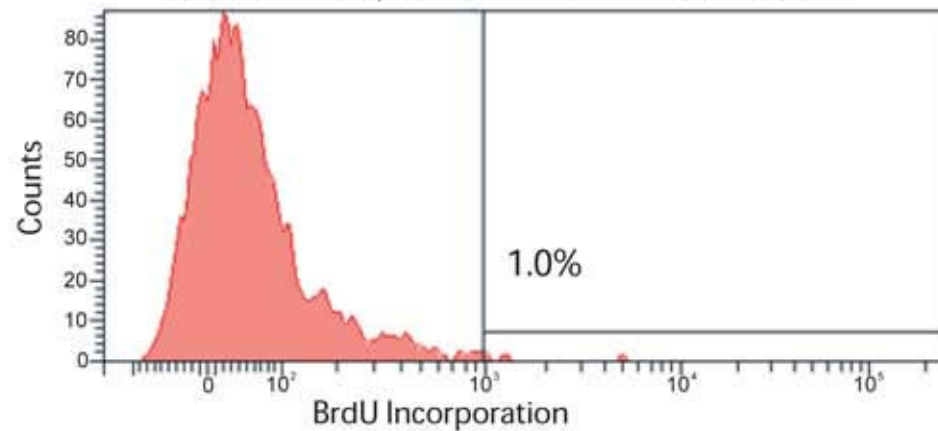
**10% FBS**



**10% FBS + 1mM DETANONOate**



**10% FBS + 50 $\mu$ M ODQ + 1mM DETANONOate**



***DISCUSIÓN***





Las vasculaturas, tanto sanguínea como linfática, desempeñan funciones claves para la viabilidad de los organismos complejos. La fisiología y la fisiopatología del sistema vascular sanguíneo y la implicación de la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes) en múltiples enfermedades, ha sido muy estudiada en las últimas décadas (Carmeliet, 2003). Hay muchas evidencias que sugieren que el incremento incontrolado y desorganizado de la vasculatura sanguínea podría ser la causa y el mantenimiento de algunas de las complicaciones asociadas a la cirrosis hepática. En este contexto, las terapias antiangiogénicas clásicas dirigidas a bloquear VEGF o las vías de los receptores tirosina quinasa, han demostrado ser eficaces en disminuir el grado de angiogénesis, de fibrosis y de inflamación hepática, además de disminuir también la presión portal (Mejias et al., 2009; Tugues et al., 2007). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, este tipo de terapias se han visto relacionadas con multitud de efectos adversos (Fischer et al., 2007; Wu et al., 2008). En contraposición con los inhibidores clásicos de VEGF, los anticuerpos monoclonales contra PlGF han demostrado que reducen la angiogénesis patológica en varios tipos de cáncer sin afectar a la vasculatura sana y sin mayores efectos adversos (Lassen et al., 2009; Riisbro et al., 2009; Van de Veire et al., 2010). Esto es así porque PlGF no tiene ninguna función durante el desarrollo de angiogénesis fisiológica y no es necesario para el mantenimiento de la quiescencia vascular en órganos sanos (Fischer et al., 2007; Van de Veire et al., 2010). Sin embargo, estudios recientes en ratones transgénicos demostraron que PlGF tiene actividad angiogénica sólo en condiciones patológicas (Autiero et al., 2003; Van Steenkiste et al., 2009).

En el momento de empezar esta tesis doctoral se sabía que PlGF estimulaba el crecimiento de las células endoteliales, su migración y supervivencia, así como la angiogénesis patológica (Fischer et al., 2007; Van de Veire et al., 2010; Khurana et al., 2005). Varias evidencias apuntaban hacia el posible uso terapéutico de la inhibición de PlGF en la cirrosis: 1) las propiedades proangiogénicas y proinflamatorias de PlGF, y 2) el efecto sinérgico que existe entre inflamación y angiogénesis, previamente demostrado con el uso de otros inhibidores de RTKs en la cirrosis (Tugues et al., 2007; Mejias et al., 2009). A pesar de esta información, en el periodo previo al diseño de nuestro estudio existían pocas publicaciones científicas que avalasen esta hipótesis

(Van Steenkiste et al., 2009; Huang et al., 2007; Salcedo Mora et al., 2005). En estudios previos se había demostrado que PIGF estaba sobreexpresado en la microvasculatura esplácnica de ratones con hipertensión portal y que la deficiencia de PIGF en ratones con ligadura parcial de la vena porta disminuía significativamente la angiogénesis esplácnica, la formación de vasos porto-sistémicos, y el flujo arterial mesentérico (Van Steenkiste et al., 2009). El primer estudio de esta tesis doctoral ha sido el primero en describir la función de PIGF en el contexto de la cirrosis, caracterizando los efectos fisiopatológicos y los mecanismos moleculares que tiene PIGF en hígados cirróticos y, específicamente, en las HSCs. Tanto en un estudio de prevención como en un estudio terapéutico, se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de PIGF disminuye significativamente la angiogénesis hepática y mesentérica, la arteriogénesis, la inflamación hepática, el flujo arterial mesentérico, la fibrosis, y la hipertensión portal en ratones cirróticos; todo ello en un perfil óptimo de bioseguridad. Seguidamente, se ha corroborado la relevancia de estos resultados en humanos, demostrando que los niveles de PIGF circulante en suero y su expresión proteica a nivel hepático están incrementados en pacientes cirróticos y además su valor se correlaciona con el grado de fibrosis. Finalmente, se han estudiado los efectos de PIGF en HSCs, que tienen una importante función fisiopatológica en la fibrosis y la hipertensión portal.

Un hallazgo importante de este estudio ha sido la asociación que existe entre el bloqueo de PIGF y la reducción significativa de la presión portal en ratones cirróticos. También se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de PIGF circulante en suero y el gradiente de presión venoso hepático en pacientes con cirrosis. Basándonos en estas observaciones, podemos especular que el PIGF podría estar involucrado también en la patogénesis de la presión portal en humanos. Hay bastantes evidencias que sugieren que el incremento de presión portal no sólo se debe al aumento del flujo sanguíneo y a la vasodilatación esplácnica, sino también a la expansión de la red vascular esplácnica provocada por la angiogénesis (Van Steenkiste et al., 2009). Teniendo esto en cuenta, la reducción de la angiogénesis y la arteriogénesis en el área esplácnica debido al bloqueo de PIGF contribuiría a disminuir el flujo venoso portal.

Otro punto importante del estudio ha sido la reducción de la fibrosis hepática al bloquear PIGF. Esto está en concordancia con otros estudios que demuestran que la inhibición de la angiogénesis frena la progresión de la fibrosis hepática (Taura et al., 2008; Mejias et al., 2009; Tugues et al., 2007). Se ha demostrado que la inmunoreactividad de PIGF en el hígado está muy acentuada en ratas y ratones cirróticos. Además, las HCSs activadas son el tipo celular que más contribuye a la producción de PIGF en roedores, y estas células expresan VEGFR1. Sin embargo, a pesar de que el bloqueo de PIGF *in vivo* es antifibrogénico, no se han encontrado cambios significativos en la expresión de genes profibrogénicos cuando las HCSs humanas se han tratado con PIGF. Esta discrepancia se podría explicar considerando que PIGF promueve un fenotipo angiogénico en HCSs caracterizado por una fosforilación sostenida de ERK1/2 así como de un aumento en su migración y proliferación. La adquisición de un fenotipo angiogénico por parte de las HSCs en respuesta a PIGF ya había sido demostrado en otros estudios y conecta con el aumento de recubrimiento de los sinusoides por HSCs característico de los hígados cirróticos (Semela et al., 2008). Todos estos cambios llevan a una desorganización en la vasculatura sanguínea hepática que compromete la regulación de la presión y la perfusión intrahepáticas. Esta desorganización de la vasculatura hepática se analizó obteniendo moldes vasculares utilizando la técnica de corrosión, y se vio que el tratamiento con anticuerpos contra PIGF normaliza parcialmente la estructura tridimensional de la red vascular hepática y reduce significativamente la presencia de vasos proinflamatorios, caracterizados por la expresión de VCAM-1. Un mecanismo similar de normalización de la vasculatura con el tratamiento contra PIGF se describió recientemente en los nódulos del hepatocarcinoma (Semela et al., 2008). Es interesante destacar que la reducción de la fibrosis sólo fue significativa cuando los ratones se trataron con anticuerpos contra PIGF en fases tempranas de la enfermedad (semanas de la 12 a la 20). En estadíos más avanzados (semanas de la 18 a la 25) no se han encontrado efectos beneficiosos después de la terapia contra PIGF. Esto apoya la idea de que en estadíos iniciales de la enfermedad, la adquisición de un fenotipo angiogénico por parte de las HSCs en respuesta a PIGF, provoca un incremento en la población de HSCs que se correlaciona con el grado de fibrosis. Sin embargo, cuando la población de HSCs alcanza un punto crítico, la eficacia terapéutica del bloqueo de PIGF

queda limitada, ya que PlGF no tiene ningún efecto en la regulación de genes profibrogénicos. Por lo tanto, esto limita la ventana de tiempo durante la que el tratamiento contra PlGF es efectivo.

La activación sostenida de ERK en las HSCs en respuesta a PlGF nos llevó a querer investigar los posibles mecanismos por los que esto podía estar pasando, ya que VEGFR1 tiene una actividad tirosina quinasa relativamente débil. Fijándonos en el perfil de proteínas fosforiladas en las HSCs estimuladas con PlGF, vimos que además de VEGFR1 también se fosforilaban otros receptores tirosina quinasa, incluyendo PDGFRA o EGFR. Esto podría sugerir que VEGFR1 amplía su señal a través de la asociación molecular con otros receptores tirosina quinasa. En células endoteliales se describió un mecanismo similar de asociación entre VEGFR1 y VEGFR2, a través del cual PlGF aumentaba su potencial angiogénico (Autiero et al., 2003). VEGFR1 también puede interactuar con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad y activarse independientemente de su ligando por las LDL (Usui et al., 2007). Sin embargo, esta ha sido la primera vez que se ha probado la existencia de una asociación molecular entre VEGFR1 y otras familias de RTKs, que podría dar como resultado una ampliación de las señales en respuesta a PlGF.

Aunque la terapia con drogas antiangiogénicas se ha usado clásicamente en enfermedades con exceso de angiogénesis, su uso clínico no está del todo implementado debido a que son terapias asociadas a efectos adversos, como hipertensión, proteinuria, trombosis, o reducción de la vasculatura en órganos sanos. Estudios en ratones transgénicos demostraron que la falta de PlGF no afectaba a su desarrollo ni a su reproducción, pero sí que frenaba la angiogénesis patológica en diferentes modelos de cáncer (Van de Veire et al., 2010). Además, la administración de anticuerpos contra PlGF no se asoció con un deterioro vascular en órganos sanos (Fischer et al., 2007) y es una terapia bien tolerada por pacientes humanos. En estos momentos hay estudios en fase 2 con voluntarios sanos y pacientes con tumores sólidos, y no se han encontrado mayores efectos secundarios (Lassen et al., 2009; Riisbro et al., 2009). El presente estudio de esta tesis doctoral ha confirmado el perfil de bioseguridad óptimo de la terapia contra PlGF y ha demostrado que no hay

---

resistencia al tratamiento por sobreexpresión de otros agentes angiogénicos como VEGF.

El hecho de que el bloqueo de la actividad de PIGF consiga reducir la presión portal es el dato más relevante del primer estudio, puesto que la hipertensión portal es una de las manifestaciones clínicas más graves de la cirrosis, y lleva asociada un incremento de la morbilidad y la mortalidad. El aumento patológico de la presión hidrostática en el territorio venoso portal da lugar a la formación de una extensa red de vasos colaterales que derivan parte del flujo sanguíneo portal hacia la circulación sistémica y desvían su paso a través del hígado. Como consecuencia de este síndrome pueden aparecer algunas de las complicaciones más importantes de la cirrosis, como las varices gastroesofágicas o la formación de edema y ascitis (Abralde and Bosch, 2002), que incrementan drásticamente la gravedad de la enfermedad. A pesar de ello, actualmente no se conocen con precisión todos los mecanismos moleculares implicados en la formación y mantenimiento de la ascitis en la cirrosis.

Los pacientes cirróticos desarrollan importantes alteraciones en la homeostasis de los líquidos corporales, que dan lugar a la acumulación de ascitis y edema. Se sabe que en condiciones patológicas existen cuatro desequilibrios que contribuyen a la formación de edema: 1) un incremento de la presión hidrostática intravascular, 2) un descenso de la presión oncótica del plasma, 3) una retención renal de sal y agua, y 4) una disfunción en el drenaje linfático (Aukland et al., 1993). En el momento de empezar a diseñar el segundo estudio la mayoría de artículos publicados abordaban la implicación de los tres primeros mecanismos en la formación de edema y ascitis. Sin embargo, pocos estudios estudiaban la existencia de una disfunción linfática en cirrosis. En uno de ellos, Dumont y Mulholland demostraron que los pacientes CH tenían una vasculatura linfática alterada, con el diámetro del conducto torácico aumentado y un incremento del flujo linfático (Dumont et al., 1960). A raíz de estos hallazgos, en el año 1980 se desarrolló una teoría que consideraba la existencia de un desequilibrio linfático para explicar la formación de ascitis (Witte et al., 1980). Según esta teoría, existiría un desequilibrio entre el fluido acumulado en las regiones intravasculares y su retorno a la circulación sanguínea, lo que provocaría la formación de ascitis.

Clásicamente, se había creído que la disfunción en el drenaje linfático durante la cirrosis se daba por una saturación pasiva del sistema linfático. Esta hipótesis se sustentaba en dos hechos: 1) la sobreproducción de linfa durante la evolución de la enfermedad y 2) las limitaciones anatómicas de la conectividad entre los sistemas linfático y venoso. Sin embargo, diversos estudios demostraron que existían otros mecanismos que reducían la conductividad linfática en pacientes CH con ascitis en comparación con pacientes CH sin ascitis (Henriksen et al., 1985). En el segundo estudio de esta tesis doctoral demostramos que existen mecanismos activos que contribuyen a la fisiopatología de la disfunción linfática. Por ejemplo, se ha demostrado que las LyECs de ratas cirróticas sobreexpresan eNOS e incrementan la producción de NO. Todas las ratas CH tratadas con un inhibidor de la actividad de eNOS (L-NMMA) mejoraron su drenaje linfático y redujeron significativamente el volumen de ascitis. Teóricamente, podría haber sido posible que el efecto beneficioso de L-NMMA se debiera a un aumento en la MAP, ya que dicho incremento podría mejorar el drenaje linfático mediante una mejora de la perfusión renal. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio excluyen esta posibilidad ya que ratas CH tratadas con midodrina también aumentan significativamente su MAP sin tener ningún efecto en el drenaje linfático.

De acuerdo con estudios recientes que habían evaluado el efecto de eNOS en la formación de ascitis (Martin et al., 1998), se ha encontrado una correlación significativa entre la inhibición de la actividad de eNOS y la pérdida de ascitis en ratas CH. Martin *et al* explicaban la reducción de ascitis por un incremento de la excreción renal de sodio y agua debido a la inhibición de NO. En el presente estudio, demostramos que el mecanismo anti-ascitogénico desencadenado por el tratamiento con L-NMMA se debió a una mejora del drenaje linfático en ausencia de cambios en la excreción renal. Otros grupos habían descrito el efecto de la inhibición de eNOS en la función renal. Graebe *et al* demostraron que el tratamiento crónico con L-NAME reducía la retención de sodio en ratas CH (Graebe et al., 2004). Sin embargo, el tratamiento con una infusión continua de azul de metileno (Cardenas et al., 2007) o una dosis aguda de L-NMMA (Thiesson et al., 2003) en pacientes con CH

---

descompensada no confirmó los efectos beneficiosos de la inhibición de eNOS sobre la función renal previamente descritos por Martin *et al.*

En este estudio, se ha establecido un nuevo mecanismo que podría explicar porqué la inhibición de eNOS mejora la funcionalidad linfática y la reabsorción de ascitis en animales CH. El transporte linfático está promovido por fuerzas extrínsecas e intrínsecas. Las fuerzas intrínsecas vienen definidas por la capacidad contráctil de la capa de SMCs que rodea los vasos linfáticos colectores. En los animales control, un 50% de los vasos linfáticos están recubiertos por SMC y, por lo tanto, son potenciales respondedores a vasoconstrictores. Sin embargo, en las ratas CH sólo el 2.7% de los vasos linfáticos están recubiertos por SMCs. Esto representa una pérdida significativa de la capacidad contráctil del sistema linfático en cirrosis. Teniendo en cuenta la función fisiopatológica de la sobreproducción linfática de NO en la disfunción linfática, se ha demostrado que el NO inhibe la proliferación de las SMC primarias de rata. Es más, la administración crónica de L-NMMA en ratas CH ha conseguido recuperar parcialmente el recubrimiento de vasos linfáticos por SMC. Estos cambios se han asociado a una restauración de la circulación linfática en la región mesentérica y a un incremento del drenaje de ascitis desde la cavidad peritoneal hasta la circulación sanguínea, observándose un incremento del volumen plasmático con niveles bajos de aldosterona circulante. Esto indicaría que el aumento de volumen plasmático no se asociaría con un empeoramiento de la condición de cirrosis sino con una redistribución de los fluidos corporales. La inhibición de eNOS en ratas CH también restauraría la capacidad contráctil de la capa de células musculares lisas de los vasos linfáticos colectores, ya que se revertiría la vasodilatación producida por la sobreproducción de NO. Esta conclusión se apoya en estudios previos, donde se demostró que los inhibidores de eNOS modificaban el flujo linfático en ratones a través de la regulación de las fuerzas contráctiles NO-dependientes de los vasos linfáticos colectores (Hagendoorn *et al.*, 2004).

Múltiples estudios habían demostrado que en cirrosis existía un incremento de la actividad NOS en vasos sanguíneos, tanto sistémicos como esplácnicos. El presente estudio ha demostrado que esta sobreproducción de NO no se limita sólo a los vasos sanguíneos sino que afecta también a los vasos linfáticos. Sin embargo, esta situación



diferiría de la que ocurre en el hígado cirrótico, donde la actividad eNOS está muy disminuida y su restauración en modelos experimentales se asocia con una reducción de la presión portal (Morales-Ruiz et al., 2005; Langer et al., 2006). Por ello, la inhibición de la actividad de NOS en la cirrosis es una terapia que requiere una especificidad tisular. Por ejemplo, sería necesario desarrollar mecanismos que fueran capaces de activar eNOS en el hígado cirrótico e inhibir su actividad en los vasos sanguíneos y linfáticos extrahepáticos.

***CONCLUSIONES***



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

1. Durante la progresión de la cirrosis se produce un aumento de la expresión de PIGF, tanto a nivel génico como proteico. Además, esta sobreexpresión se correlaciona con un aumento de la presión portal en pacientes con hepatitis alcohólica.

2. El bloqueo de la actividad de PIGF mejora la hemodinámica de los ratones cirróticos, disminuyendo la presión portal alrededor de un 27%.

3. El tratamiento contra PIGF consigue disminuir la angiogénesis, el infiltrado inflamatorio y el grado de fibrosis de los hígados cirróticos. Además, normaliza la angioarquitectura tanto hepática como esplácnica.

4. En el hígado cirrótico la expresión de PIGF se localiza alrededor de los septos fibrosos, siendo las HSC el tipo celular que más contribuye a su producción.

5. Las HCSs expresan el receptor específico de PIGF, VEGFR1, y PIGF tiene un efecto autocrino sobre estas células activando diferentes vías de señalización relacionadas con proliferación y migración celular, entre ellas la vía de ERK 1/2.

6. En las HSCs tratadas con PIGF se fosforilan en Tyr proteínas claves en señalización celular, entre las que se encuentran otros receptores además de VEGFR1, incluyendo PDGFRA o EGFR. Esto puede sugerir que VEGFR1 amplía su señal a través de la asociación molecular con otros receptores tirosina quinasa.

## CONCLUSIONES

---

7. A diferencia de las terapias antiangiogénicas clásicas, el bloqueo de PlGF no está asociado a efectos secundarios adversos, ya que no afecta a la vasculatura de tejidos sanos ni induce sobreexpresión de otros agentes proangiogénicos.

8. La cirrosis está asociada a una disfunción en el drenaje linfático tanto en las zonas periféricas como en la zona esplácnica.

9. Las células endoteliales linfáticas presentan una sobreexpresión de eNOS y una sobreproducción de NO.

10. La disfunción del sistema linfático no está provocada por un aumento de la permeabilidad de los vasos, ya que la sobreproducción de NO en cirrosis no incrementa la permeabilidad linfática.

11. La sobreproducción de NO en LyECs de ratas cirróticas provoca un remodelado vascular a nivel linfático. Este remodelado se caracteriza por un descenso del recubrimiento de los vasos linfáticos por pericitos o SMC.

12. La inhibición crónica de la actividad de eNOS con un tratamiento de L-NMMA revierte las alteraciones funcionales y estructurales de la vasculatura linfática. Hay un aumento del recubrimiento de los vasos por pericitos, mejorando el drenaje linfático y disminuyendo el volumen de ascitis.

Globalmente, y según los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se puede concluir que las vasculaturas, tanto la sanguínea como la linfática, contribuyen a la fisiopatología de la cirrosis y sus complicaciones. Por un lado, PIGF contribuye de manera significativa al intenso proceso de angiogénesis y fibrosis en la cirrosis hepática, y por tanto debería tenerse en cuenta como diana terapéutica. El tratamiento destinado a bloquear su actividad con anticuerpos anti-PIGF podría ser una nueva estrategia para tratar en el futuro las enfermedades hepáticas crónicas. Por otra parte, la cirrosis se asocia con una disfunción del sistema linfático provocada por la sobreexpresión de eNOS en el endotelio linfático. Esta sobreproducción de NO provoca una serie de alteraciones estructurales en la vasculatura linfática que condicionan su funcionalidad. Estos datos apoyan la hipótesis de que modular la funcionalidad del sistema linfático podría ser una nueva estrategia terapéutica para evitar el acúmulo de líquido intersticial característico de las enfermedades hepáticas crónicas. Futuros estudios permitirán valorar el impacto clínico de esta estrategia en el tratamiento de la ascitis.



## ***BIBLIOGRAFÍA***





---

Abraldes JG and Bosch J. Novel approaches to treat portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;**17**:232-241.

Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA and Kahn ML. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003;**299**:247-251.

Achen MG and Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1131**:225-234.

Ahmad A and Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol* 2004;**76**:743-759.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Editorial 2004.

Alcolado R, Arthur MJ, and Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997;**92**:103-112.

Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;**357**:593-615.

Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K et al. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;**42**:1339-1348.

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;**438**:946-953.

Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011;**17**:1371-1380.

Almakdisi T, Massoud S, and Makdisi G. Lymphomas and chylous ascites: review of the literature. *Oncologist* 2005;**10**:632-635.

Anderson RN and Smith BL. Deaths: leading causes for 2001. *Natl Vital Stat Rep* 2003;**52**:1-85.

Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, and Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization *J Clin Pathol* 1978;**31**:395-414.

Arroyo V and Jimenez W. Complications of cirrhosis II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000;**32**:157-170.

Aukland K and Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 1993;**73**:1-78.

Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, and Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 2001;**276**:2733-2741.

Autiero M, Luttun A, Tjwa M, and Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb. Haemost* 2003;**1**:1356-1370.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, KRanz A, Moons L, Lambrechts D et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;**9**:936-943.

Backhed F, Crawford PA, O'Donnell D and Gordon JI. Postnatal lymphatic partitioning from the blood vasculature in the small intestine requires fasting-induced adipose factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:606-611.

Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Yla-Herttuala S, Jackson DG, Alitalo K, and McDonald DM. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005;**115**:247-257.

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M and Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;**144**:789-801.

Bataller R and Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;**115**:209-218.

Bellik L, Vinci MC, Filippi S, Ledda F, and Parenti A. Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:568-575.

Benyon RC and Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;**21**:373-384.

Bhunchet E and Fujieda K. Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: a mechanism to maintain liver blood flow. *Hepatology* 1993;**18**:1450-1458.

Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;**196**:713-718.

Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol* 1998;**33**:295-302.

---

Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, and Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992;**46**:155-168.

Brice G, Child AH, Evans A, Bell R, Mansour S, Burnand K, Sarfarazi M, Jeffery S, and Mortimer P. Milroy disease and the VEGFR-3 mutation phenotype. *J Med Genet* 2005;**42**:98-102.

Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2005;**6**:895-901.

Bruyere F and Noel A. Lymphangiogenesis: in vitro and in vivo models. *FASEB J* 2010;**24**:8-21.

Busconi L and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993;**268**:8410-8413.

Butler MG, Dagenais SL, Rockson SG, and Glover TW. A novel VEGFR3 mutation causes Milroy disease. *Am J Med Genet A* 2007;**143**:1212-1217.

Callewaert BL, Loeys BL, Casteleyn C, Willaert A, Dewint P, De BJ, Sedlmeier R, Simoens P, De Paepe AM, and Coucke PJ. Absence of arterial phenotype in mice with homozygous slc2A10 missense substitutions. *Genesis* 2008;**46**:385-389.

Cao S, Yaqoob U, Das A, Shergill U, Jagavelu K, Huebert RC, Routray C, Abdelmoneim S, Vasdev M, Leof E, Charlton M, Watts RJ, Mukhopadhyay D, and Shah VH. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF- $\beta$  signaling in hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2010;**120**:2379–2394.

Cardenas A, Bataller R, Arroyo V. Mechanisms of ascites formation. *Clin Liver Dis* 2000;**4**:447-465.

Cardenas A, Curry M, Afdhal NH. The not so good effects of nitric oxide inhibition with methylene blue in cirrhosis and ascites. *Dig Dis Sci* 2007;**52**:939-940.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefety S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;**380**:435-439.

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviaro F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, and Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999;**98**:147-157.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De MM, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;**7**:575-583.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;**438**:932-936.

Cassella M and Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**979**:120-130.

Chen HX and Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;**6**:465-477.

Cheng WS, Gough IR, Ward M et al. Chylous ascites in cirrhosis: A case report and review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 1989;**4**:95-99.

Cheng SL, Wang HC, Yu CJ, Tsao PN, Carmeliet P, Cheng SJ, and Yang PC. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. *Respir Res* 2009;**10**:115-125.

Christou CM, Pearce AC, Watson AA, Mistry AR, Pollitt AY, Fenton-May AE, Johnson LA, Jackson DG, Watson SP and O'Callaghan CA. Renal cells activate the platelet receptor CLEC-2 through podoplanin. *Biochem J* 2008;**411**:133-140.

Claria J, Jimenez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, and Rodes J. Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 1992;**15**:343-349.

Claria J and Titos E. Kupffer cell. *Gastroenterol Hepatol* 2004;**27**:264-273.

Clark B, Sitzia J, and Harlow W. Incidence and risk of arm oedema following treatment for breast cancer: a three-year follow-up study. *QJM* 2005;**98**:343-348.

Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, Jares P, Bosch J, Arroyo V, Caballeria J et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007;**132**:687-697.

Costa C, Inicio J, and Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007;**10**:149-166.

Conn HO and Atterbury CE. *Cirrhosis*. In: Schiff L and Schiff ER, eds. Diseases of the liver. JB Lippincott, Philadelphia, 725-864.

Cueni LN and Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006;**126**:2167-2177.

---

Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, De la MC, Redline R, Shaw DE, Levine AD et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut* 2007;**56**:855-862.

Dasarathy S. Inflammation and liver. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008;**32**:660-666.

De FS, Gigante B, and Persico MG. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 2002;**12**:241-246.

Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB and Butcher EC. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol* 2005;**6**:889-894.

Detmar M and Hirakawa S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med* 2002;**196**:713-8.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;**399**:601-605.

DiPalma T, Tucci M, Russo G, Maglione D, Lago CT, Romano A, Saccone S, Della Valle G, De Gregorio L, Dragani TA, Viglietto G, and Persico MG. The placenta growth factor gene of the mouse. *Mamm Genome* 1996;**7**:6-12.

Dumont AE, Mulholland JH. Flow rate and composition of thoracic-duct lymph in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1960;**263**:471-474.

Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, and Cheresh DA. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;**140**:1255-1263.

Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, and Vajkoczy P. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericytes-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 2004;**18**:338-340.

Erlinger S and Benhamou JP. Cirrhosis clinical aspects. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, and Rodes J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford University Press, chapter 6.2, 629-641 (1999).

Ezaki T, Baluk P, Thurston G, La Barbara A, Woo C, and McDonald DM. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. *Am J Pathol* 2001;**158**:2043-2055.

Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt MF, Glynn MW, Gorski JL, Seaver LH, and Glover TW. Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;**67**:1382-1388.

Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, and Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;**112**:463-472.

Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, and Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;**50**:604-620.

Fernandez-Varo G, Ros J, Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Arroyo V, Sole M, et al. Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am J Pathol* 2003;**162**:1985-1993.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;**380**:439-442.

Ferrara N and Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999;**5**:1359-1364.

Ferrara, N, Gerber, HP, and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**:669-676.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;**131**:463-475.

Flisiak R. Role of Ito cells in the liver function. *Pol J Pathol* 1997;**48**:139-45.

Friedman SL and Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of PDGF receptors. *J Clin Invest* 1989;**84**:1780-1767.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;**275**:2247-2250.

Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;**38**:S38-S53.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;**1**:98-105.

---

Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M and Caron KM. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest* 2008;**118**:40-50.

Fu YX and Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:399.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;**399**:597-601.

Ghalamkarpour A, Morlot S, Raas-Rothschild A, Utkus A, Mulliken JB, Boon LM, and Vikkula M. Hereditary lymphedema type I associated with VEGFR3 mutation: the first de novo case and atypical presentations. *Clin Genet* 2006;**70**:330-335.

Gashev AA and Zawieja DC. Physiology of human lymphatic contractility: a historical perspective. *Lymphology* 2001;**34**:124-134.

Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van VH, De VM, and Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008;**89**:251-263.

Gerli R, Solito R, Weber E, Aglianó M. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. *Lymphology* 2000;**33**:148-157.

Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004;**350**:1646-1654.

González D, Herrera B, Beltrán A, Otero K, Quintero G, and Rojas A. Nitric oxide disrupts VE-cadherin complex in murine microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**304**:113-118.

Graebe M, Brond L, Christensen S, Nielsen S, Olsen NV, Jonassen TE. Chronic nitric oxide synthase inhibition exacerbates renal dysfunction in cirrhotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**286**:288-297.

Gupta TK, Toruner M, Chung MK, and Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepática microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;**28**:926-931.

Gutierrez-Ruiz MC and Gomez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int* 2007;**27**:434-439.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD and Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:258-263.



Hagendoorn J, Padera TP, Kashiwagi S, Isaka N, Noda F, Lin MI, et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates microlymphatic flow via collecting lymphatics. *Circ Res* 2004;**95**:204-209.

Halin C and Detmar M. An unexpected connection: lymph node lymphangiogenesis and dendritic cell migration. *Immunity* 2006;**24**:129-131.

Halin C, Tobler NE, Vigl B, Brown LF, and Detmar M. VEGF-A produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes. *Blood* 2007;**110**:3158–3167.

Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, and Lipp HP. Tyrosine Kinase Inhibitors - A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Curr Drug Metab* 2009.

Heidaran MA, Pierce JH, Yu JC, Lombardi D, Artrip JE, Fleming TP, Thomason A, and Aaronson SA. Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol Chem* 1991;**266**:20232-20237.

Hendrickson H, Chatterjee S, Caos S, Morales-Ruiz M, Sessa WC, and Shah V. Influence of caveolin on constitutively activated recombinant eNOS: insights into eNOS dysfunction in BDL rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;**285**:652-660.

Henriksen JH. Estimation of lymphatic conductance. A model based on protein-kinetic studies and haemodynamic measurements in patients with cirrhosis of the liver and in pigs. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;**45**:123-130.

Henriksen JH, Moller S. *Alterations of Hepatic and Splanchnic microvascular exchange in cirrhosis: Local factors in the formation of ascites*. In: Gines P, Arroyo V, Rodes J, Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA: Blackwell Publishing 2005:174-185.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, and De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;**56**:549-580.

Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007;**19**:2003-12.

Holopainen T, Huang H, Chen C, Kim KE, Zhang L, Zhou F, Han W, Li C, Yu J, Wu J, Koh GY, Alitalo K, and He Y. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Res* 2009;**69**:4656-64.

---

Huang XX, McCaughan GW, Shackel NA, and Gorrell MD. Upregulation of proliferative genes and the ligand/receptor pair placental growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 1 in hepatitis C cirrhosis. *Liver Int* 2007;**27**:960-968.

Ikomi F and Schmid-Schönbein GW. Lymph pump mechanics in the rabbit hind leg. *Am J Physiol* 1996;**271**:173-183.

Iredale, JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003;**327**:143-147.

Iredale, JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;**117**:539-548.

Irjala H, Johansson EL, Grenman R, Alanen K, Salmi M, and Jalkanen S. Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med* 2001;**194**:1033-1042.

Irjala H, Alanen K, Grénman R, Heikkilä P, Joensuu H, and Jalkanen S. Mannose receptor (MR) and common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor (CLEVER)-1 direct the binding of cancer cells to the lymph vessel endothelium. *Cancer Res* 2003;**63**:4671-4676.

Irrthum A, Devriendt K, Chitayat D, Matthijs G, Glade C, Steijlen PM, Fryns JP, Van Steensel MA, and Vikkula M. Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:1470-1478.

Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* 2003;**13**:1-7.

Jackson JR, Bolognese B, Kircher CH, Marshall LA, and Winkler JD. Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation. *Inflamm Res* 1997;**46**:129-130.

Johnson LA, Clasper S, Holt AP, Lalor PF, Baban D and Jackson DG. An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. *J Exp Med* 2006;**203**:2763-2777.

Johnson-Leger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, and Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* 2002;**100**:2479-2486.

Julenius K, Molgaard A, Gupta R, and Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 2005;**15**:153-164.

Juriscic G and Detmar M. Lymphatic endothelium in health and disease. *Cell Tissue Res* 2009;**335**:97-108.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M and Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:3566-3570.

Kajiya K, Hirakawa S, and Detmar M. Vascular endothelial growth factor-A mediates ultraviolet B-induced impairment of lymphatic vessel function. *Am J Pathol* 2006;**169**:1496–1503.

Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, Alitalo K, and Finegold DN. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 2000;**25**:153-159.

Karpanen T, Wirzenius M, Mäkinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, Stacker SA, Pytowski B, Ylä-Herttua S and Alitalo K. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol* 2006;**169**:708-718.

Karpanen T and Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008;**3**:367-397.

Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, and Raab I. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**:603–612.

Kershenobich SD and Bonder WA. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003;**2**:159-163.

Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, Carmeliet P, and Zachary IC. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation* 2005;**111**:2828-2836.

Klabunde RE. *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins Publisher 2008.

Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;**161**:1-151.

Knowles RG and Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994;**298**:249-258.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoforma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:6348-6352.

---

Langer DA and Shah VH. Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 2006; **44**: 209-16.

Lassen U, Nielsen D, Sorensen M, Ronnengart E, Eldrup K, Bentzon K et al. A phase I, dose escalation study of TB-403, a monoclonal antibody directed against PlGF, in patients with solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**:111.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, and Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997; **277**:242-245.

Liu H, Honmou O, Harada K, Nakamura K, Houkin K, Hamada H, and Kocsis JD. Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain* 2006; **129**:2734–2745.

Luckey SW and Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001; **71**:226-240.

Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, and Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002; **8**:831-840.

Maby-El Hajjami H, and Petrova TV. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* 2008; **130**:1063-1078.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Li-Bovi P, and Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:9267-9271.

Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; **21**:417-426.

Mangion J, Rahman N, Mansour S, Brice G, Rosbotham J, Child AH, Murday VA, Mortimer PS, Barfoot R, Sigurdsson A, Edkins S, Sarfarazi M, Burnand K, Evans AL, Nunan TO, Stratton MR, and Jeffery S. A gene for lymphedema-distichiasis maps to 16q24.3. *Am J Hum Genet* 1999; **65**:427-432.

Martin PY, Ohara M, Gines P, Xu DL, St John J, Niederberger M, et al. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 1998; **101**:235-242.

Matsumoto T and Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; **112**:re21.

Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Miquel R, Bosch J, and Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocolateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;**49**:1245-1256.

Melgar-Lesmes P, Tugues S, Ros J, Fernandez-Varo G, Morales-Ruiz M, Rodes J, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhotic rats. *Gut* 2009;**58**:285-292.

Melgert BN, Olinga P, Van Der Laan JM, Weert B, Cho J, Schuppan D et al. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology* 2001;**34**:719-728.

Melrose WD. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. *Int J Parasitol* 2002;**32**:947-960.

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;**43**:109-142.

Monshouwer M and Hoebe KH. Hepatic dysfunction during inflammation. *Toxicol In Vitro* 2003;**17**:681-686.

Mor F, Quintana FJ, and Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* 2004;**172**:4618-4623.

Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, and Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003;**125**:522-531.

Morales-Ruiz M and Jimenez W. *Neovascularization, angiogenesis, and vascular remodeling in portal hypertension*. In Portal Hypertension: Pathobiology, evaluation, and treatment. Sanyal AJ, and Shah VH, eds. Humana Press. Totowa, New Jersey. 2005:99-112.

Morales-Ruiz M and Jimenez W. *Pathophysiological role of Nitric Oxide in cirrhosis*. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, Schrier RW, eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis Diagnosis and Treatment. Malden, Massachusetts: Blackwell Science Inc 2005:105-114.

Morales-Ruiz M, Tugues S, Cejudo-Martin P, Ros J, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Llama P, Arroyo V, Rodes J, and Jimenez W. Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Hepatol* 2005;**43**:85-91.

---

Mori T, Okanoue T, Sawa Y, Hori N, Ohta M, and Kagawa K. Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1993;**17**:891-897.

Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;**38**:258-266.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, and Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;**410**:50-56.

Mumprecht V and Detmar M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:1405-16.

Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006;**355**:2003-2011.

Olszewski WL. The innate reaction of the human skin lymphatic system to foreign and self-antigens. *Lymphat Res Biol* 2005;**3**:50-57.

Ono N, Mizuno R, and Ohhashi T. Effective permeability of hydrophilic substances through walls of lymph vessels: roles of endothelial barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:1676-1682.

Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sagesser H et al. Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009;**50**:1501-1511.

Pepper MS and Skobe M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* 2003;**163**:209-213.

Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, and Alitalo K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002;**21**:4593-4599.

Pinzani M, Rombouts K, and Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005;**42**:22-36.

Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:16069-16074.

Porter CJ, Edwards GA, and Charman SA. Lymphatic transport of proteins after s.c. injection: implications of animal model selection. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;**50**:157-171.

Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, and Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1999;**59**:5209–5218.

Radhakrishnan K and Rockson SG. Gorham's disease: an osseous disease of lymphangiogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1131**:203-205.

Ramadori G, Moriconi F, Malik I, and Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 2008;**59**:S107-S117.

Randolph GJ, Angeli V and Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:617-628.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;**101**:746-752.

Rector WG. Spontaneous chylous ascites of cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 1984;**6**:369-372.

Riisbro R, Larsson L, Winsted L, Niskanen T, Pakola S, Stassen JM et al. A first-in-man phase I dose escalation study of TB403, a monoclonal antibody directed against PlGF in healthy male subjects. *Mol Cancer Ther* 2009;**8**:3.

Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, and Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998;**273**:8413–8418.

Rockey DC and Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;**114**:344-351.

Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003;**37**:4-12.

Rockson SG. Therapeutics for lymphatic disease: the role of the pharmaceutical and biotechnology sector. *Lymphat Res Biol* 2005;**3**:103-104.

Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 2011;**19**:31–44.

Roncal C, Buyschaert I, Chorianopoulos E, Georgiadou M, Meilhac O, Demol M, Michel JB, Vinckier S, Moons L, and Carmeliet P. Beneficial effects of prolonged systemic administration of PlGF on late outcome of post-ischaemic myocardial performance. *J Pathol* 2008;**216**:236-244.

---

Roovers K, Davey G, Zhu X, Bottazzi ME, and Assoian RK. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell* 1999;**10**:3197-3204.

Ros J, Jimenez W, Lamas S, Claria J, Arroyo V, Rivera F, et al. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995;**21**:554-560.

Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1902;**1**:367-389.

Saito N, Hamada J, Furukawa H, Tsutsumida A, Oyama A, Funayama E, Saito A, Tsuji T, Tada M, Moriuchi T, Yamamoto Y. Laminin-421 produced by lymphatic endothelial cells induces chemotaxis for human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;**22**:601-610.

Salcedo MX, Sanz-Cameno P, Medina J, Martin-Vilchez S, Garcia-Buey L, Borque MJ, and Moreno-Otero R. Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;**97**:699-706.

Sarem M, Znaidak R, Macias M, and Rey M. Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol* 2006;**29**:93-101.

Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G and Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003;**22**:3546-3556.

Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990;**70**:987-1028.

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

Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990;**10**:1-10.

Sebzda E, Hibbard C, Sweeney S, Abtahian F, Bezman N, Clemens G, Maltzman JS, Cheng L, Liu F, Turner M, Tybulewicz V, Koretzky GA and Kahn ML. Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev Cell* 2006;**11**:349-361.

Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, and Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* 2003;**102**:1515-1524.



Semela D, Das A, Langer D, Kang N, Leof E, and Shah V. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function. *Gastroenterology* 2008;**135**:671-679.

Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, and Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;**117**:1222-1228.

Shin WS and Rockson SG. Animal models for the molecular and mechanistic study of lymphatic biology and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1131**:50-74.

Sieber CC, Lopez-Talavera JC, and Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993;**104**:1750-1754.

Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, and Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 2001;**55**:61-69.

Sleeman JP and Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer* 2009;**125**:2747-2756.

Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, and Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 2000;**5**:512-518.

Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, and Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:573-583.

Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H and Ozaki Y. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 2007;**282**:25993-256001.

Szuba A and Rockson SG. Lymphedema: anatomy, physiology and pathogenesis. *Vasc Med* 1997;**2**:321-326.

Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quertermous T, Alitalo K, and Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002;**16**:1985-1987.

Tammela T, Petrova TV and Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol* 2005;**15**:434-441.

Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikä J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Ylä-Herttua S, Petrova TV, and Alitalo K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 2007;**13**:1458-1466.

Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ikai I, Uemoto S et al. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;**135**:1729-1738.

Thabut D and Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;**53**:976-980.

Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, Faubert D, Wilkes BC, Delisle C, et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell* 2010;**39**:468-476.

Thiesson HC, Skott O, Jespersen B, Schaffalitzky de Muckadell OB. Nitric oxide synthase inhibition does not improve renal function in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:180-186.

Titos E, Claria J, Planaguma A, Lopez-Parra M, Villamor N, Parrizas M et al. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J* 2003;**17**:1745-1747.

Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, Ros J, Arteta D, Munoz-Luque J, et al. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2005;**129**:1686-1695.

Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodes J, Friedman SL, Carmeliet P, Jimenez W, and Morales-Ruiz M. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;**46**:1919-1926.

Usui R, Shibuya M, Ishibashi S, and Maru Y. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 1 by low-density lipoprotein. *EMBO Rep* 2007;**8**:1155-1161.

Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, Loges S, Albrecht I, Jonckx B, Vinckier S et al. Further Pharmacological and Genetic Evidence for the Efficacy of PlGF Inhibition in Cancer and Eye Disease. *Cell* 2010;**141**:178-190.

Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, Van Vlierberghe H, De Vos F, Olievier K, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;**137**:2112-2124.

Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, Pauta M, Tugues S, Casteleyn C, Libbrecht L, Olievier K, Schroyen B, Reynaert H, van Grunsven LA, Blomme B, Coulon S, Heindryckx F, De Vos M, Stassen JM, Vinckier S, Altamirano J, Bataller R, Carmeliet P, Van Vlierberghe H, Colle I, and Morales-Ruiz M. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* 2011;**53**:1629-1640.

Vinay K, Ramzi SC, and Stanley LR. Robbins Patología Humana. 2005. Elsevier.

Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, and Kaneda K. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000;**32**:980-989.

Wei W, Chen ZW, Yang Q, Jin H, Furnary A, Yao XQ, Yim AP, and He GW. Vasorelaxation induced by vascular endothelial growth factor in the human internal mammary artery and radial artery. *Vascul Pharmacol* 2007;**46**:253-259.

Wigle JT and Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;**98**:769-78.

Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbé E, and Vermoesen A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* 1996;**24**:100-111.

Witte CL, Witte MH, Dumont AE. Lymph imbalance in the genesis and perpetuation of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* 1980;**78**:1059-1068.

Witte MH, Dumont AE, Cole WR, Witte CL, Kintner K. Lymph circulation in hepatic cirrhosis: effect of portacaval shunt. *Ann Intern Med* 1969;**70**:303-310.

Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, and Friedman SL. Induction of PDGF receptor in hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest* 1994;**94**:1563-1569.

Wu HC, Huang CT, and Chang DK. Anti-angiogenic therapeutic drugs for treatment of human cancer. *J Cancer Mol* 2008;**4**:37-45.

Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, and Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:1015-1026.

Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y, and Yamamoto H. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1999;**274**:35172-35178.

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;**52**:1347-1354.

Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, and Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;**129**:4797-4806.

Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, and Persico MG. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997;**76**:517-31.



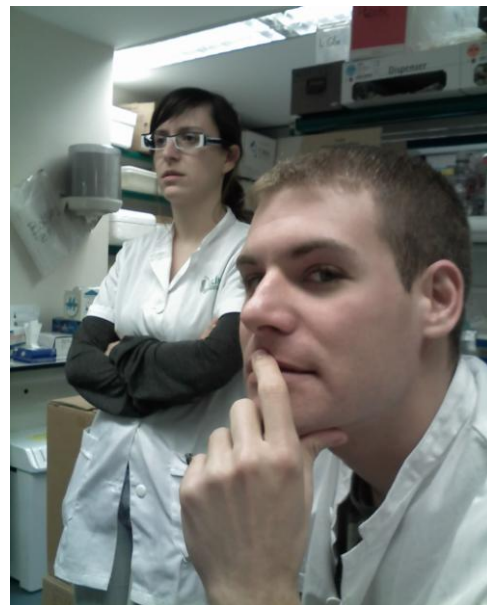
## ***AGRADECIMIENTOS***





**2007**

*(Manuel, Sonia, Jordi i Montse)*



**2008**

*(Laura i Jordi)*



**2009**

*(Jordi i Montse)*



**2010**



*(Montse, Jordi i Cristina)*



**2011**

*(Montse, Jordi, Bibi i Ana)*

**2012**



*(Jordi, Vedrana, Cristina, Santi i Eva)*

---

## AGRAÏMENTS

Tot i que en el seu moment vaig decidir escriure la tesi en castellà, aquest últim apartat no em sortiria igual si no l'escrigués en la meua llengua, el català. La veritat és que aquests 5 anys de tesi m'han passat volant, malgrat que alguns dies i setmanes es fessin eternes!!! Els que heu estat a prop meu durant tot aquests temps sabíeu les ganes que tenia de tancar aquest capítol, i ara que per fi arriba el dia m'agradaria donar-vos les gràcies d'una manera no gaire extensa (sempre vaig dir que intentaria fer uns agraïments curts!!!) i lo més sincera possible (així que disculpeu-me si amb alguns em poso una mica sentimental o dramàtic!!! :-D). Intentaré en recordar-me de tothom, però si no fos així perdoneu-me!!!

En primer lloc voldria donar-li les gràcies al meu director de tesi, el Dr. Manuel Morales Ruiz, el Manuel, especialista del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, per haver-me donat aquesta oportunitat i per haver confiat sempre en mi. *Aún me acuerdo de la entrevista que me hiciste en Junio de 2007 y la alegría que sentí cuando me llamaste para decirme que contabas conmigo, gracias por tu apoyo y ayuda durante todos estos años.* Aquest agraïment el voldria fer extensible al Dr. Wladimiro Jiménez, cap del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, pels seus consells i la seva aportació a la meua feina durant tota la tesi.

El grup dels "Manuels", del que he format part, és un grup molt petit i potser per això m'hi he sentit tan bé. Als meus companys de grup són als qui vull agrair primer que res la companyia dia a dia durant tot aquest temps: per sobre de tot a la Montse, recentment al Jon (el nostre post-doc!!!) i també al Pedro durant el temps que vam compartir. *Pedrín, creo que tenías la capacidad tanto de divertirme mucho como de sacarme de mis casillas, pero tú sabes que lo pasamos muy bien, gracias por toda tu ayuda, consejos y todas las veces que me hiciste reír, algunas contigo, otras de ti ☺. Espero que tengas mucha suerte en la vida.*

Tot va començar al Juliol de 2007 amb la Sònia, la Dra. Sònia Tugues!!! A qui voldria agrair el haver sigut la meua mestra durant els primers mesos de tesi. *Gràcies per haver-me ensenyat gran part del que sé avui, per haver-me guiat durant els primers temps, la teua paciència front les meves desgràcies, però sobretot per haver-me fet*

## AGRADECIMIENTOS

---

*sentir entre amics i com a casa des de el primer dia, i per tots aquells riures i bons moments que vam passar junts. Amb la Sònia em vaig incorporar al mític laboratori 502 d'IDIBAPS. En aquest laboratori és on vaig passar més de la meitat d'aquest temps de tesi, els 3 primers anys, i en guardo molt bons records. El "lab patera", compartit amb el grup dels Clària, un grup amb el que sempre dic que estic agermanat i que ha continuat sent així malgrat la nostra separació al traslladar-nos al CEK: des de les últimes que van arribar com la Vero, la Bibi o la Cris (*Cris no oblidaré mai un juliol a punt d'agafar vacances cantant i ballant per sobre les taules, vaig riure moltíssim!!! Espero que tot et vagi molt bé!*) a la gent més veterana com l'Eva, l'Ana o l'Esther (*Esther ets una gran persona, sempre m'has escoltat i aconsellat quan m'has vist preocupat, i m'has transmès molta tranquil·litat, gràcies per tot!!!*), o els que ja van marxar com el Marcos i la Rachel.*

Voldria en recordar-me també d'altres grups i gent que he tingut molt a la vora, sobretot el grup dels "Wladis", amb el que també estem agermanats: el Guillermo, el Santi, la Denise (*me ha encantado conocerte en esta última etapa, espero que la tesis te vaya genial Denisssssss*), la Vedrana i les noies de pràctiques, que només van estar una temporada però també els hi agafes afecte, com la Silvia o la Teresa. El grup dels Bataller, sobretot amb els que he tingut més contacte, com la Silvia, l'Uri, la Cristina o el Jose. El Javi (Javier), que sempre sembla que va per lliure però que ha estat present des del primer dia (*siempre poniendo la oreja xD*), o la Pepa, sempre disposada a donar un cop de mà, tot i algunes petites enganxades ☺ (*a les 09:00 en punt baixa la guillotina!!!*).

I abans d'acabar amb la gent del clínic / CEK m'agradaria escriure unes paraules especials a les meves noies!!!

\_ A l'Eva (Evis), recordo perfectament el dia que vas entrar, bàsicament perquè jo feia res que havia començat. Recordo estar sol al lab 502 esperant la Sònia i va entrar la Marta per presentar-me l'última incorporació Clària, i eres tu!!! Sempre t'he vist com un torbellino, d'aquí cap allà, desbordant energia. Per mi ha sigut un plaer compartir gran part dels meus dies aquí amb tu, sempre seràs la meva companya als genials concerts d'Amaral!!! Ànims!!!

\_ A la Vedrana (Vedri), gràcies per tot, pels bons moments, els riures, les converses i l'ajuda, m'ha agradat molt poder passar més temps amb tu des de que vam venir al CEK i haver pogut compartir l'últim congrés espanyol, per mi van ser els millors dies a Madrid de tots els cops que he anat, vas ser una excel·lent companya d'habitació xD!!!

\_ A la Bibi, tot i haver-nos conegut en la meva última etapa (bueno, els últims dos anys i mig, que tampoc son quatre dies...) vam connectar molt ràpid. Què t'he de dir? Ja saps que ets una de les persones que més m'ha alegrat els dies durant aquests últims anys, no oblidaré mai les nostres converses impossibles sobre compensacions i les nostres ganes infinites de retrobar-nos amb la nostra "amiga" dels caps de setmana... Tot i ser molt diferents en alguns aspectes crec que som molt iguals en d'altres, sobretot en la nostra petita ment perversa, els nostres pensaments totalment censurables, mira que n'hem arribat a dir de grosses!!! Però apart d'això, lo més important és que sé que ets dels "meus"... Gràcies per haver-me fet riure tantes i tantes vegades, i sobretot per haver estat sempre amb mi.

\_ A la Montse, tu has sigut gairebé la meva única companya en tot aquest camí, ens n'han passat de tots colors... Com l'hem liat!!! Si em poso a pensar en totes les "chapuces" que hem fet no acabaria mai, la PCR que va córrer al revés, el mític celo porós, el Western que va perdre una banda, transferir proteïnes al paper enlloc de la membrana (d'això no fa gaire xD)... Però sobretot ens hem fet costat en els bons i els mals moments, i crec que malgrat tot ens ho hem passat molt bé. Part d'aquesta aventura que hem viscut junts ha quedat gravada en les nostres grans frases cèlebres i filosòfiques, i m'agradaria que sabessis que més que un company de grup t'endús un amic. Gràcies per haver-me creat records que em duraran per sempre, i passi el que passi en el futur espero que no oblidis mai aquests anys i que tinguis clar que si algun dia em necessites sempre podràs comptar amb mi.

\_ A l'Ana (Anitín). T'he deixat pel final per què no tinc paraules, ets la persona a la que tindria més coses que dir-li i no sé ni com començar. Recordo un dels meus primers dies aquí, era l'hora de dinar i la Sònia em va dir: *nosaltres dinarem a les 14:00, que esperarem a l'Anitita*. Jo en aquell moment no sabia qui eres i em va fer molt de pal haver-me d'esperar per dinar amb algú que no coneixia. Ja havia conegut prou gent en pocs temps, no en volia conèixer més (mai m'ha entusiasmat tenir que conèixer gent nova!!!). Qui m'havia de dir aleshores que acabaries sent lo més important que m'emporto de tots aquests anys. Un dia em vas dir que tot passa per alguna cosa i que si l'univers ens havia fet viure aquest camí potser havia sigut perquè ens trobéssim. Si ho penso en aquests termes llavors no tinc cap dubte de que tot això ha valgut la pena. Tu saps perfectament tot el que hem compartit i tot el que ens ha unit, com ens sentim, comensem, la manera de veure la vida i de sentir-la. Les nostres converses infinites sobre el sentit de tot, sense les quals molts dies haguessin sigut una mica més foscos... M'has fet volar molt lluny d'aquí quan més ho he necessitat i en aquests moments he sigut molt feliç. A vegades, l'únic que un necessita per sentir-se una mica menys perdut només és algú que sigui capaç d'entendre'l, i tu m'has entès tant... Veure't sempre era com una sensació de refugi, de "tornar a casa", potser per això ets l'única persona que he sentit realment part del meu aquí. M'agradaria dir-te de tot cor que sense tu res d'això hagués estat igual, i vull que sàpigues que durant aquests anys, sense cap mena de dubte, has format part de la meva "manada", i això si que no ho oblidaré mai. Gràcies per tot.

Per acabar, voldria fer una petita menció al meu món real, al que he tingut i tinc fora de les parets de la ciència. Sempre he criticat que als agraïments de les tesis es comenci agraint als companys de grup i la cosa vagi marxant fins acabar nombrant a persones que res tenen a veure amb la teva feina aquí. Però si que és cert que la gent que no té res a veure amb aquest món a vegades t'ajuden molt, i arribats a aquest punt no m'agradaria acabar sense fer una petita menció a la meua gent, de la que tant heu sentit a parlar alguns. Com no als meus pares, amb els que em retrobo cada divendres amb un bon sopar, i al Teo, el meu estimadíssim gos!!! I ara sí, a la meua petita manada (tant els que hi van ser com els que encara hi són): Edu, Gonzalo, Isaac,

Jordi (*ya sabes que somos muy iguales! Gracias por las confiancias, por la compañía y por tenderme siempre una mano, en mis momentos altos, pero sobre todo en mis momentos más bajos. Y por haberme escuchado y aconsejado tantas veces, tanto en temas laborales como en temas sentimentales y de vida, aunque luego ni me acuerde de lo que te he contado xD. Espero que siga así!!!*) y sobre todo Álvaro (*porque como dice una "amiga": al principio, en medio o al final... pero siempre nos acabamos encontrando. Sobran las palabras, tú eres el que más presente está en mi vida real, aunque no somos nada iguales, al menos en teoría! Aun así sabes la gran conexión que tenemos, contigo más que con nadie he vivido mis mejores días, y los que quedan!!!*). Entre todos me habéis ayudado mucho sin saberlo, con vosotros me he sentido realmente feliz, y saber que pase lo que pase siempre se tiene un sitio al que poder volver, porque encajas, no tiene precio...

I finalment, vull acabar aquests agraïments donant-me les gràcies a MI per haver-ho fet xD!!!

Quan recordi tots aquests anys de tesi sempre aniran lligats als vostres noms, així que a tots/es els que heu estat amb mi durant aquests 5 anys,

moltíssimes gràcieeeesssss!!!

