

# LAS NANOPARTICULAS DE OXIDO DE CERIO (CeO<sub>2</sub>NPs) REDUCEN LA HIPERTENSIÓN PORTAL Y MUESTRAN CAPACIDAD ANTI INFLAMATORIA EN RATAS CON FIBROSIS EXPERIMENTAL

Denise Oró<sup>1</sup>, Guillermo Fernández-Varo<sup>1,3</sup>, Tetyana Yudina<sup>2</sup>, Vedrana Reichenbach<sup>1</sup>, Eudald Casals<sup>2</sup>, Gregori Casals<sup>1</sup>, Bernardino González de la Presa<sup>1</sup>, S. Carvajal<sup>1</sup>, S. Sandalinas<sup>1</sup>, Victor Puentes<sup>2</sup>, Wladimiro Jiménez<sup>1,3</sup>

1. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERhd), Universidad de Barcelona, 2. Institut Català de Nanotecnologia (ICN), Bellaterra, España, 3. Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

CLÍNICA  
BARCELONA  
Hospital Universitari

IDIBAPS

ICN  
Institut Català de Nanotecnologia

FEDER  
UNIÓN EUROPEA  
"Una manera de hacer Europa"

SAF 2012-35979

Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca  
AGAUR

Fundació La Marató de TV3

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años las nanopartículas (NPs) se han revelado como agentes muy efectivos en tecnologías médicas. Su rango de eficacia abarca desde la administración selectiva de fármacos hasta la ingeniería tisular o la reparación de tejidos. En este sentido, se ha observado que las CeO<sub>2</sub>NPs pueden actuar *in vivo* secuestrando radicales libres o como agentes antiinflamatorios. Se desconoce, sin embargo, si las CeO<sub>2</sub>NPs podrían ser de utilidad en el tratamiento de las enfermedades crónicas del hígado.

## OBJETIVO

Determinar si las CeO<sub>2</sub>NPs poseen propiedades hepatoprotectoras en un modelo experimental de enfermedad hepática.

## MÉTODOS

Los efectos sistémicos y hepáticos de las NPs fueron analizados en ratas tratadas crónicamente con CCl<sub>4</sub> que recibieron CeO<sub>2</sub>NPs (0.1 mg/kg, n=10) o vehículo (n=15) dos veces por semana durante dos semanas. El tratamiento con CCl<sub>4</sub> se mantuvo durante 8 semanas adicionales. Se analizó la distribución tisular y subcelular de las NPs mediante resonancia magnética, espectrometría de masas (ICP-MS) y microscopía electrónica de transmisión. Se midió la presión arterial media (PAM), la presión portal (PP) y se determinaron las transaminasas hepáticas. Se obtuvo tejido hepático en el que se determinó: esteatosis, fibrosis, expresión de  $\alpha$ -SMA, infiltrado inflamatorio, apoptosis y expresión de genes relacionados con actividad vasoactiva o inflamación.

## RESULTADOS

Las biopsias hepáticas obtenidas en las ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> mostraron las alteraciones histológicas características de la esteatohepatitis no alcohólica (Figura 1). Esta esteatosis fue significativamente inferior en las ratas tratadas con CeO<sub>2</sub>NPs en comparación con las no tratadas (3.12 ± 0.15 vs 1.86 ± 0.13 %, p<0.001).

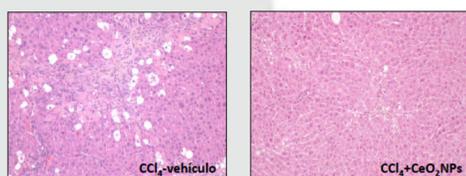


Figura 1. Tinción hematoxilina-eosina de secciones representativas de hígado obtenidas de ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> que recibieron vehículo o CeO<sub>2</sub>NPs. Aumento original, 100x.

La mayoría de las NPs administradas se localizaron en el hígado y en el bazo (≥ 90%) y el resto en los pulmones y en el riñón. No se detectaron CeO<sub>2</sub>NPs en el cerebro (Figura 2).

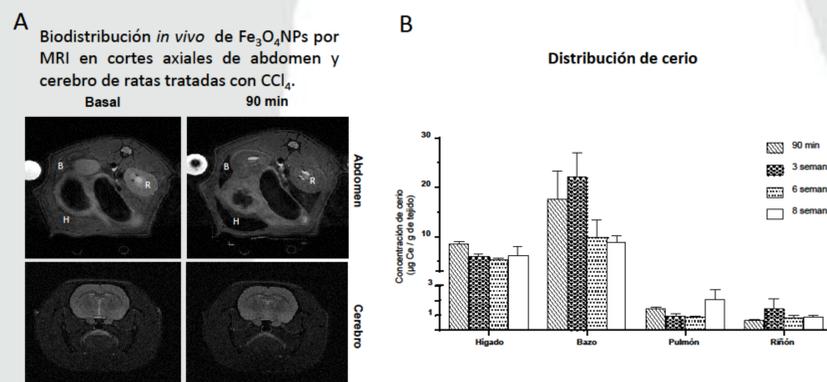


Figura 2: A. Las imágenes de la izquierda fueron tomadas en una ratita tratada con CCl<sub>4</sub>. Las imágenes de la derecha corresponden a la misma ratita 90 min después de administrar las NPs. El hígado (H), bazo (B) y, con mucha menos intensidad, el riñón (R) se oscurecen después de administrar las NPs, indicando los sitios donde hay acumulación de NPs. B. Concentración de cerio en tejidos de ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> 90 min, 3, 6 and 8 semanas después de administrar las CeO<sub>2</sub>NPs.

Las CeO<sub>2</sub>NPs fueron internalizadas por las células del parénquima hepático y se encontraron tanto en el citoplasma como en los lisosomas (Figura 3).

Micrografía electrónica de transmisión de tejido hepático de ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> que recibieron vehículo (A-C) o CeO<sub>2</sub>NPs (D).

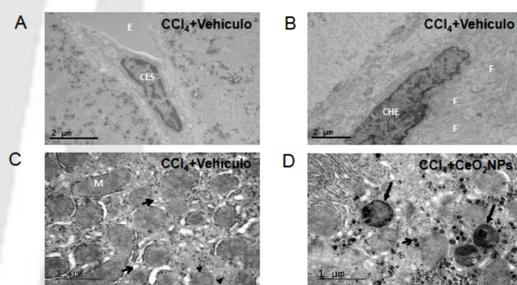


Figura 3: A. Célula endotelial sinusoidal (CES) y eritrocito (E) en sinusoides hepáticos. B. Célula hepática estrellada activada (CHE) rodeada de abundantes fibrillas (F). C. Mitocondrias (M), orgánulos, gotas de grasa (flecha) y gránulos de glucógeno (cabeza de flecha) en el espacio intracelular de un hepatocito. D. Mitocondrias, gránulos de glucógeno y agregados de CeO<sub>2</sub>NPs (flechas) en el espacio intracelular de un hepatocito. También se pueden observar algunos agregados de CeO<sub>2</sub>NPs captados por lisosomas (flecha grande).

En el grupo de ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> que recibieron vehículo se observaron las alteraciones características de animales fibróticos tanto en los tests de función hepática (Tabla 1) como en la hemodinámica portal (Figura 4). Los biomarcadores séricos asociados a daño hepático (ALT y AST) y la presión portal se encontraron significativamente reducidos en las ratas fibróticas que recibieron las CeO<sub>2</sub>NPs.

Tabla 1. Peso corporal y resultados de los tests de función hepática en ratas controles y tratadas con CCl<sub>4</sub>.

	Ratas tratadas con CCl <sub>4</sub>					
	Control (n=6)		Vehículo (n=15)		CeO <sub>2</sub> NPs (n=10)	
Peso (g)	425	14	418	13	423	16
ALT (U/L)	81.5	7.2	1008	244 *	304	40 †
AST (U/L)	273	22	566	82 **	356	48 †
Albúmina (g/L)	38.7	1	31.5	0.8 **	31.2	0.6 ***
Na <sup>+</sup> sérico (mEq/L)	142.7	0.7	140.8	0.7	140.2	0.9
K <sup>+</sup> sérico (mEq/L)	5.99	0.14	5.16	0.26 *	4.58	0.21 **

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparado con el grupo control; †p<0.05 comparado con el grupo vehículo.

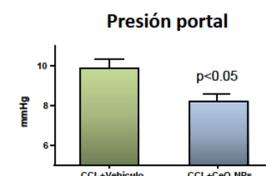


Figura 4: La presión portal fue medida al cabo de 8 semanas de haber administrado las nanopartículas. Los datos corresponden a la media SEM. CCl<sub>4</sub>+Vehículo, n=15; CCl<sub>4</sub>+CeO<sub>2</sub>NPs, n=10.

El porcentaje de tejido hepático con tinción positiva para  $\alpha$ -SMA (CHEs activadas) fue también menor en las ratas fibróticas tratadas con CeO<sub>2</sub>NPs (Figura 5).

Efecto del tratamiento con CeO<sub>2</sub>NPs en la activación de CHEs.

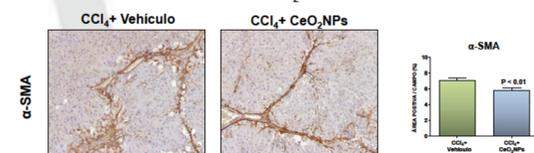


Figura 5: Tinción  $\alpha$ -SMA en tejido hepático de ratas tratadas con vehículo o CeO<sub>2</sub>NPs. Las barras de la derecha muestran la medida cuantitativa. Aumento original, 100x.

El tratamiento con CeO<sub>2</sub>NPs redujo significativamente el infiltrado de macrófagos en el hígado de las ratas fibróticas (Figura 6).

Efecto del tratamiento con CeO<sub>2</sub>NPs en el infiltrado celular.

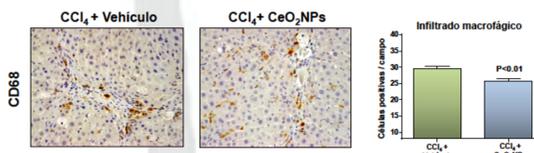


Figura 6: Tinción CD68 en secciones de hígado de ratas tratadas con vehículo o con CeO<sub>2</sub>NPs. Las barras de la derecha corresponden a la cuantificación del infiltrado celular en todos los animales. Aumento original, 200x.

Los hígados de las ratas fibróticas tratadas con CeO<sub>2</sub>NPs mostraron menor abundancia proteica de caspasa-3 en relación a las ratas tratadas con vehículo (Figura 7).

Western blot de caspasa-3 activa en tejido hepático de ratas control (CT) y ratas fibróticas tratadas con vehículo o CeO<sub>2</sub>NPs.

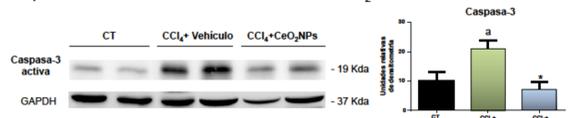


Figura 7: Las barras de la derecha muestran el análisis densitométrico de las muestras normalizadas con GAPDH. a, p<0.05 versus control; \*, p<0.05 versus CCl<sub>4</sub>+Vehículo.

En el hígado de las ratas que recibieron CeO<sub>2</sub>NPs se observó una marcada reducción de la expresión de endotelina y de genes relacionados con la inflamación: TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , iNOS y COX-2 (Tabla 2).

Tabla 2: Expresión de mRNA de Endotelina 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS y COX-2 en el hígado de ratas control y fibróticas tratadas con vehículo o CeO<sub>2</sub>NPs.

	Ratas tratadas con CCl <sub>4</sub>					
	Control (n=10)		Vehículo (n=15)		CeO <sub>2</sub> NPs (n=10)	
Endotelina 1	1.05	0.11	14.8	2.85 ***	6.91	1.98 †
TNF- $\alpha$	1.06	0.12	60.4	11.4 ***	19.7	5.1 ††
IL-1 $\beta$	1.02	0.08	61.6	10.52 ***	33.71	4.7 *†
IL-6	1.29	0.32	1174	246 ***	647	133 *
iNOS	1.04	0.12	1139	287 **	141	56 ††
COX-2	1.14	0.17	121.2	28.3 ***	31.1	5.1 ††

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparado con el grupo control; †p<0.05, ††p<0.01 comparado con el grupo vehículo.

## CONCLUSIONES

La administración de CeO<sub>2</sub>NPs a ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> atenúa la esteatosis hepática y la hipertensión portal, disminuye la intensidad de la respuesta inflamatoria y reduce la activación de la endotelina. Estos resultados sugieren que las CeO<sub>2</sub>NPs podrían ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad hepática crónica.

