

EL TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CERIO (CeO₂NPs) REVIERTE PARCIALMENTE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA VENA PORTA (PVECs) DE RATAS CIRRÓTICAS

Jordi Ribera¹, Juan Rodríguez-Vita¹, Denise Oró¹, Guillermo Fernandez-Varo^{1,2}, Gregori Casals¹, Santi Marfà¹, Blai Morales¹, Tetyana Yudina³, Víctor Puentes³, Wladimiro Jiménez^{1,2}, Manuel Morales-Ruiz¹.

¹Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd. ²Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Universidad de Barcelona. ³Instituto Catalán de Nanotecnología (ICN).

INTRODUCCIÓN

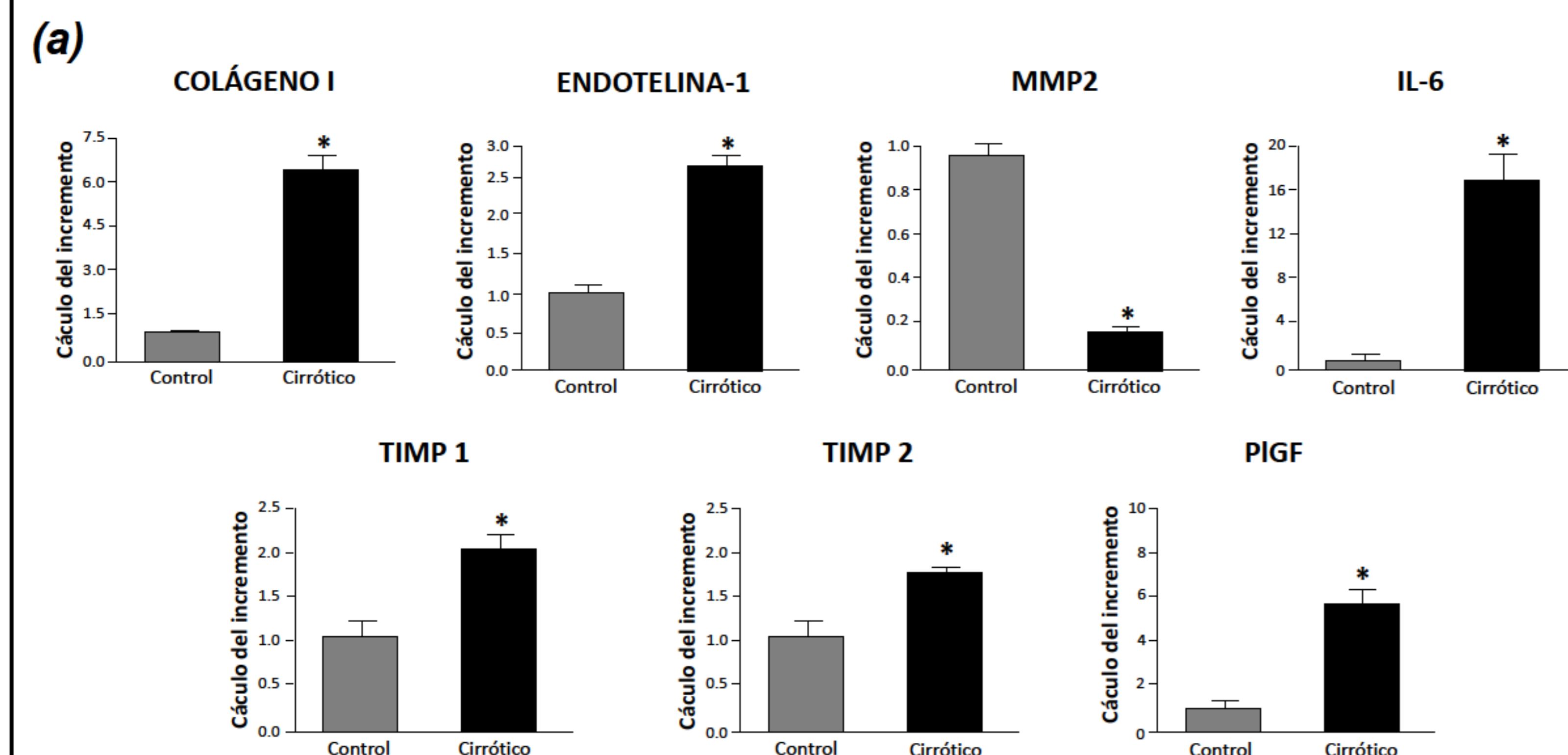
La célula endotelial hepática y esplácnica sufre un proceso de transformación fenotípica durante la progresión de la fibrosis hepática caracterizado por la síntesis de moléculas proinflamatorias. Sin embargo, se desconoce si esta disfunción endotelial ocurre en otros territorios vasculares, como por ejemplo en la vena porta. Esta cuestión es relevante si se toma en consideración la elevada morbilidad asociada a las complicaciones portales que acontecen en los pacientes cirróticos. Actualmente, se están evaluando las posibles aplicaciones terapéuticas de la nanotecnología en diferentes ensayos pre-clínicos y clínicos. Una de estas aplicaciones es el uso de CeO₂NPs, que han demostrado tener efectividad terapéutica en tejidos sometidos a estrés oxidativo e inflamación crónica. Existen evidencias de que las PVEC se pueden activar en diferentes situaciones patológicas y sobreexpresar moléculas proinflamatorias como ICAM-1, IL-6 o TNF- α (Fontaine et al., Ann Clin Lab Sci 2002; 32(4): 352-361). Sin embargo, la ausencia de líneas celulares endoteliales portales limitan la investigación en este campo.

OBJETIVOS

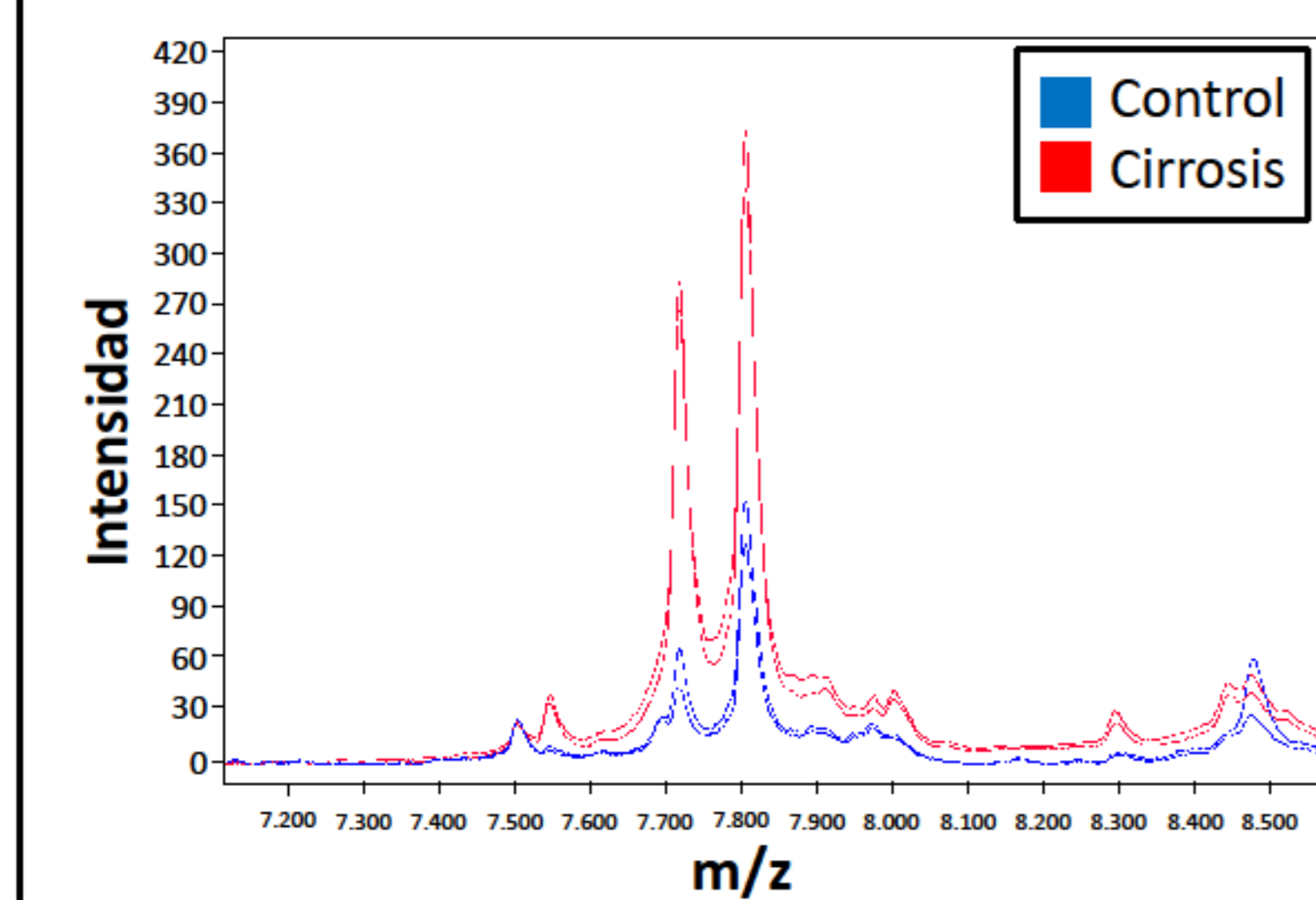
El objetivo fue el de caracterizar el grado de activación de PVECs aisladas de ratas controles (CT) y ratas cirróticas (CH), y evaluar nuevas estrategias terapéuticas para revertir su activación en la condición de cirrosis.

RESULTADOS

1. Las PVECs aisladas de ratas CT y CH mantienen diferencias fenotípicas ocasionadas por la cirrosis experimental



(b) ESPECTROMETRÍA DE MASAS



(a) **Panel de genes de activación endotelial.** Con el objetivo de comprobar el mantenimiento de diferencias fenotípicas entre CT y CH se determinaron los niveles de expresión de un panel de genes de activación endotelial. Se observaron cambios significativos de expresión en los siguientes genes: Colágeno I, Endotelina-1, MMP2, IL-6, TIMP1, TIMP2 y PIGF (n=10) (*p<0.05). El mismo panel se encontró sobreexpresado en venas portales de ratas CH.

(b) **Perfil proteómico del sobrenadante de cultivos de PVECs CT y CH.** Para investigar el perfil del secretoma de las PVEC se analizó el medio de cultivo mediante espectrometría de masas de alta resolución (SELDI-TOF). En comparación con PVEC-CT, las PVEC-CH mostraron un perfil proteómico diferencial.

(c) **Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).** Con el propósito de encontrar un denominador común causante de estos cambios fenotípicos, estudiamos el grado de estrés oxidativo presente en estas líneas celulares mediante un ensayo con diclorofluoresceína (DCF). Las PVEC-CH mostraron un incremento significativo de estrés oxidativo en comparación con las PVEC-CT (n=10) (*p<0.05).

CONCLUSIÓN

Hemos generado líneas celulares de PVEC CT y CH que mantienen sus diferencias fenotípicas. El fenotipo patológico de las PVEC-CH se revierte parcialmente al disminuir el estrés oxidativo con CeO₂NPs. Las nanopartículas presentan una eficacia y una cinética de hormesis *in vitro* que es exclusiva de la condición CH. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la aplicabilidad de la nanomedicina en el tratamiento de la disfunción endotelial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo de cirrosis experimental: El estudio se realizó en ratas Wistar adultas fibróticas, cirróticas (CH) y controles (CT), según los criterios del Comité Ético del Hospital Clínic. La fibrosis/cirrosis fue inducida por inhalación de CCl₄ siguiendo un protocolo establecido en nuestro laboratorio (Tugues et al. Gastroenterology 2005; 129: 1686-1695).

Aislamiento e immortalización de las PVECs: PVECs primarias se aislaron de la vena porta de ratas CT y CH utilizando un anticuerpo rabbit anti-rat CD31 (Abbiotec), como anticuerpo primario, y bolas magnéticas unidas con un anticuerpo secundario goat anti-rabbit (MACS system, Miltenyi Biotec). La immortalización de las células se llevó a cabo utilizando un retrovirus que contenía la secuencia larga del antígeno T del virus SV40.

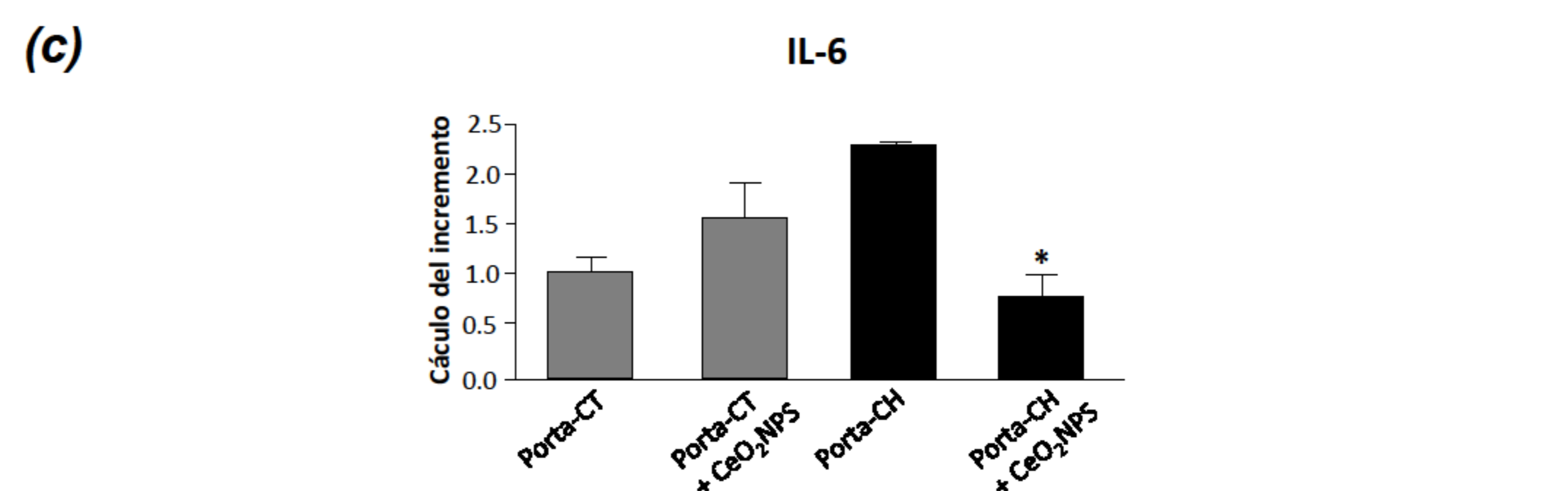
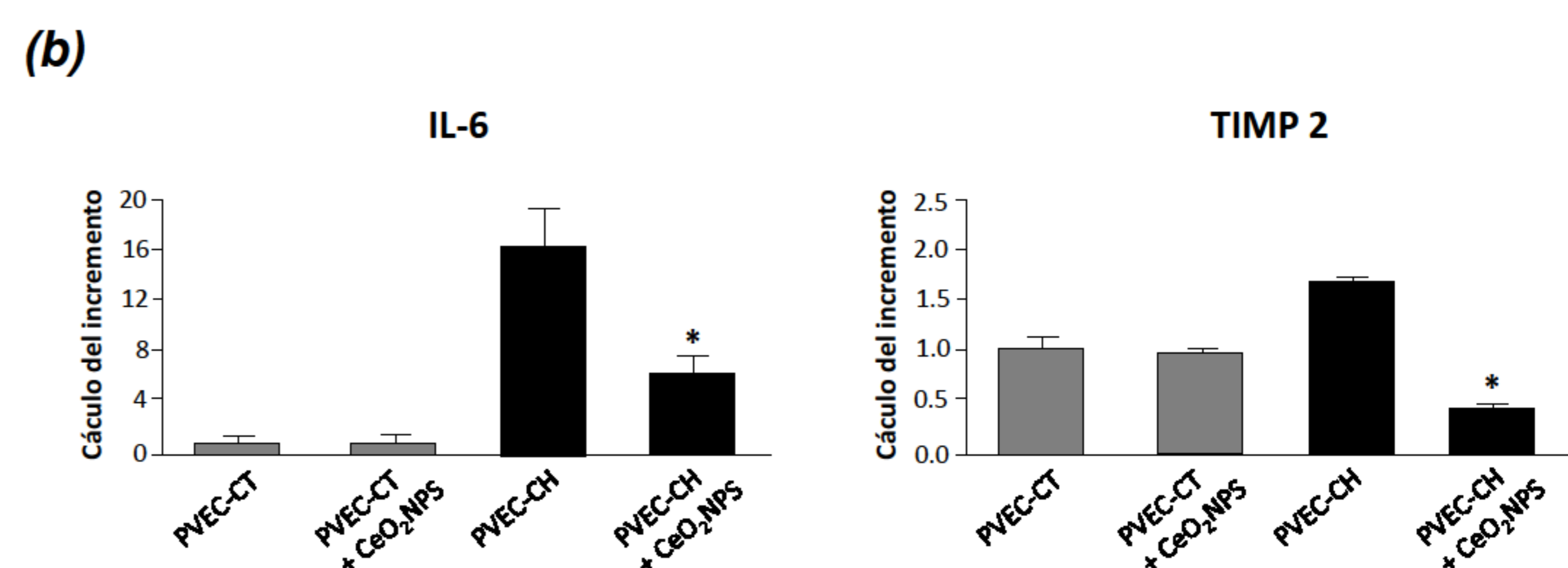
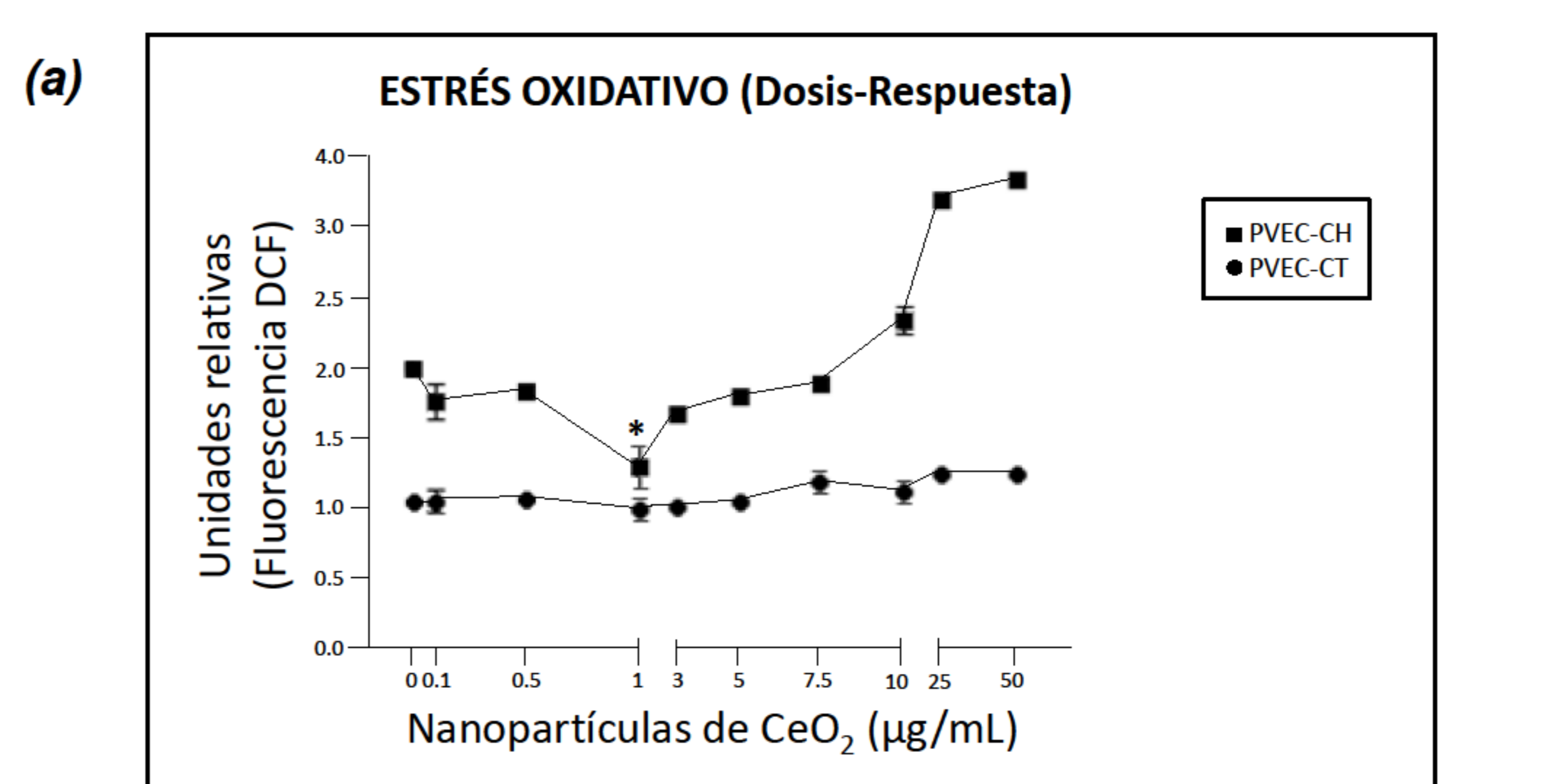
Tratamiento in vitro e in vivo con CeO₂NPs: Para el tratamiento *in vitro*, cultivos de PVECs CH y CT fueron tratados con 1 μ g/mL CeO₂NPs durante 24h. Para el tratamiento *in vivo*, ratas fibróticas se trataron de forma intravenosa (vena de la cola) con vehículo o con 0.1mg/kg CeO₂NPs 2 veces por semana durante 2 semanas.

Estrés oxidativo: El grado de estrés oxidativo presente en las líneas celulares se determinó mediante un ensayo con diclorofluoresceína (DCF, Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito en el kit.

PCR en Tiempo Real: El RNA total se extrajo de PVEC en cultivo utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Un microgramo de RNA total se retrotranscribió mediante First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). Posteriormente, las muestras de DNA complementario se amplificaron unos 30-35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55-60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto) con LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Para normalizar los resultados, se usó HPRT como gen de referencia. Los cebadores específicos para la amplificación del DNA complementario fueron:

Colágeno I, 5'-AGACCTGGCGAGAGAGAGT-3' (forward primer) y 5'-ATCCAGACCGTTGTGTCCTC-3' (reverse primer); TIMP1, 5'-CATGGAGAGCCTCTGTGGAT-3' (forward primer) y 5'-TGTGCAATTTCCGTTCCCTT-3' (reverse primer); TIMP2, 5'-GACAAGGACATCGAATTTATCTACAC-3' (forward primer) y 5'-CCATCTCCTTCCGCTTC-3' (reverse primer); PIGF, 5'-GTTGGCTGTGCACTCCCAG-3' (forward primer) y 5'-GTTGGCTGTGCACTCCCAG-3' (reverse primer); Endotelina-1, 5'-CTCCTCCTTGATGGACAAGG-3' (forward primer) y 5'-CTTGATGCTGTTGCTGATGG-3' (reverse primer); IL-6, 5'-GCCCTTCAGGAACAGCTATGA-3' (forward primer) y 5'-TGTCACAACATCAGTCCCAAGA-3' (reverse primer); MMP2, 5'-GCGCTTTTCTCGAATCCAT-3' (forward primer) y 5'-GGGTATCCATCCATGCTC-3' (reverse primer); MMP9, 5'-CCTGAAACCTCCAACCTCA-3' (forward primer) y 5'-GAGTGTAACCATAGCGGTACAGG-3' (reverse primer); MMP13, 5'-TCTGCACCTCAGCAGGTTG-3' (forward primer) y 5'-CATGAGGTCTCGGGATGGATG-3' (reverse primer); HPRT, 5'-GACCGTTCTGTCATGTCG-3' (forward primer) y 5'-ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC-3' (reverse primer).

2. El tratamiento de las PVECs con CeO₂NPs revierte parcialmente la activación de las PVEC-CH



(a) **Las CeO₂NPs modifican el estrés oxidativo de las PVEC-CH de manera dosis-dependiente.** Con el propósito de evaluar la efectividad terapéutica de las CeO₂NPs en las PVECs, se evaluó el grado de estrés oxidativo presente en estas células a diferentes concentraciones de nanopartículas. El tratamiento de las PVEC-CH con 1 μ g/mL de CeO₂NPs durante 24h redujo significativamente los niveles de estrés oxidativo (n=10) (*p<0.05).

(b) **El tratamiento in vitro con CeO₂NPs revierte parcialmente la activación de las PVEC-CH.** El tratamiento de las PVEC-CH con 1 μ g/mL de CeO₂NPs durante 24h redujo significativamente la expresión de los genes TIMP2 e IL-6 (n=10) (*p<0.05).

(c) **El tratamiento in vivo con CeO₂NPs reduce la inflamación de la vena porta en ratas fibróticas.** Con el objetivo de estudiar la potencialidad terapéutica de las CeO₂NPs *in vivo*, ratas fibróticas fueron tratadas i.v. con vehículo (n=5) o con 0.1mg/kg de CeO₂NPs (n=5). Las venas portales de las ratas tratadas con CeO₂NPs mostraron una disminución significativa de la expresión de IL-6, en comparación con el grupo vehículo (*p<0.05).

