

## XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

### Papel del estrés oxidativo intrahepático en la fisiopatología de la hipertensión portal en la cirrosis

A. Rodríguez-Villarrupla y J.C. García-Pagán\*

*Laboratorio de Hemodinámica Hepática, Unidad de Hepatología, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Ciberehd, Barcelona, España*

#### Estrés oxidativo y función vascular

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas derivadas del oxígeno con alta reactividad química que incluyen: los radicales libres (especies con 1 o más electrones desapareados), como el superóxido ( $O_2^-$ ) o el hidroxilo ( $OH^-$ ), y especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Múltiples tipos celulares, incluyendo células endoteliales, vasculares del músculo liso, inflamatorias y macrófagos (células de Kupffer), entre otras, pueden ser fuente de un exceso en la producción de ROS. Numerosos sistemas enzimáticos tienen capacidad para producir ROS, aunque los más frecuentemente involucrados son: la NAPDH oxidasa, la xantina oxidasa, la sintasa del óxido nítrico (NO) desacoplada, y los sistemas enzimáticos mitocondriales<sup>1,2</sup>. Fisiológicamente, la generación de ROS se ve contrarrestada por los sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, que disminuyen los valores de ROS, manteniendo un equilibrio redox adecuado<sup>3,4</sup>. La alteración de este equilibrio, debido a una mayor producción de ROS y/o una menor capacidad de los sistemas antioxidantes, conduce al estrés oxidativo.

El potencial de las ROS para unirse a proteínas, romper el ADN y promover daño celular se ha visto involucrado en el desarrollo de necrosis, inflamación y apoptosis en varios trastornos<sup>5-7</sup>.

Además, el estrés oxidativo ha sido implicado en el aumento del tono vascular observado en la hipertensión<sup>8,9</sup>, la aterosclerosis<sup>10</sup> o la diabetes<sup>11</sup>. En estos trastornos, la reducción de la biodisponibilidad del NO endotelial es el principal factor que promueve el aumento del tono<sup>12</sup>.

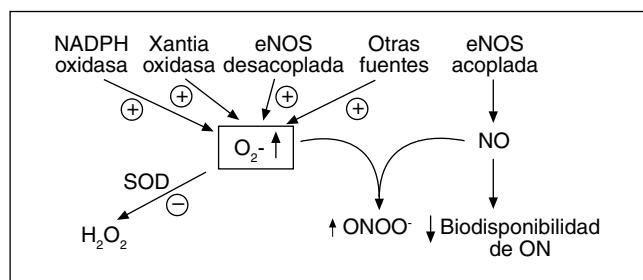
La sintasa endotelial del NO (eNOS) es responsable de la mayor parte del NO vascular producido, en una reacción en la cual la L-arginina es oxidada a L-citrulina y NO<sup>13</sup>. Una de las causas de la disminución en la biodisponibilidad de NO es la disminución en su producción debido a una menor actividad de la eNOS, consecuencia de la existencia de diversas alteraciones postraduccionales en su regulación<sup>14,15</sup>. Además, el aumento del secuestro de NO por ROS también contribuye a disminuir la biodisponibilidad de NO. De hecho, es bien conocido que el NO es capaz de reaccionar con el  $O_2^-$ , dando lugar a la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (fig. 1)<sup>16,17</sup>, con el consiguiente descenso en la biodisponibilidad de NO<sup>18,19</sup>.

Las ROS también pueden afectar la biología del NO a través de su capacidad de oxidar y, por tanto, inactivar el co-factor de la eNOS, la tetrahidrobiopteroquina ( $BH_4$ )<sup>20</sup>. La  $BH_4$  desempeña un papel fundamental en la transferencia de electrones desde el grupo prostético hemo de la eNOS a la L-arginina. En ausencia de  $BH_4$  activa, la eNOS es incapaz de transferir electrones a la L-arginina y comienza a usar el oxígeno como sustrato conduciendo a la formación de  $O_2^-$  en lugar de NO, situación que se ha denominado desacoplamiento de la eNOS<sup>21-23</sup>. El desacoplamiento de la eNOS se ha demostrado en distintas situaciones fisiopatológicas, como la diabetes<sup>11</sup>, la hipercolesterolemia<sup>24</sup> y la hipertensión<sup>20</sup>, habiéndose relacionado con la menor biodisponibilidad de NO que se halla en éstas.

Se podría prever, pues, que una reducción en las ROS mediante intervención farmacológica podría mejorar la biodisponibilidad de NO y así mejorar la función endotelial. La reducción en las ROS puede lograrse mediante la preventión/attenuación en su generación, o aumentando su eliminación (tabla 1).

Se ha realizado un número creciente de estudios sobre el efecto de los antioxidantes en la función vascular. A modo de

\*Autor para correspondencia  
Correo electrónico: jcgarci@clinic.ub.es (J.C. García-Pagán).



**Figura 1** Esquema de los posibles mecanismos involucrados en el aumento de la producción de superóxido y sus efectos reduciendo la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) mediante su secuestro. eNOS: sintasa endotelial del NO; NADPH: dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato; ONOO: peroxinitrito; SOD: superoxidodismutasa.

ejemplo, se ha demostrado que la vitamina C mejora la disfunción endotelial, restaurando la vasoconstrictión dependiente del endotelio, en los fumadores crónicos y en pacientes con diabetes, hipercolesterolemia e hipertensión<sup>25-27</sup>, aunque la mayoría de los estudios no ha podido demostrar un beneficio en la reducción de episodios cardiovasculares clínicos<sup>28</sup>.

Varias dificultades en el enfoque utilizado para reducir el estrés oxidativo pueden explicar la falta de eficacia clínica de las terapias antioxidantes. Las intervenciones antioxidantes se han dirigido, principalmente, a cambiar el equilibrio redox general de la célula de manera inespecífica. Es posible que este enfoque pueda no ser suficiente para corregir las alteraciones en los potenciales de oxidación-reducción localizados en compartimientos específicos dentro de la célula<sup>29</sup>. Por ejemplo, el  $O_2^-$  reacciona con NO para formar ONOO<sup>-</sup> a un ritmo significativamente más rápido que con su enzima metabolizante superoxidodismutasa (SOD) o con antioxidantes exógenos como la vitamina C<sup>17</sup>. Por tanto, la competencia para la reacción  $O_2^-/NO$  es limitada. Esto puede ser extremadamente importante en situaciones en las que el  $O_2^-$  y el NO se producen simultáneamente en la misma localización subcelular, como sucede en el desacoplamiento de la eNOS.

Enfoques más selectivos, centrados en las moléculas involucradas en el aumento de liberación de ROS, pueden ser más eficaces en la reducción del estrés oxidativo. Además, la falta de eficacia clínica de las terapias antioxidantes se

ha atribuido a la acción pleiotrópica de las ROS. El  $O_2^-$ , aparte de promover efectos indirectos sobre el tono vascular mediante la inactivación del NO, también puede ejercer efectos directos después de su transformación a  $H_2O_2$  por la acción de la SOD<sup>30</sup> (fig. 1).

De hecho, se ha propuesto que el  $H_2O_2$  es el vasodilatador conocido como factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), liberado por las células endoteliales en respuesta a estímulos como el aumento del flujo sanguíneo<sup>31-33</sup>. Las ROS también pueden modular el crecimiento, la proliferación y la muerte celular<sup>34,35</sup>. Así, la acción final de las ROS puede ser beneficiosa o perjudicial dependiendo de la cantidad de ROS generadas, la fracción específica que se crea, la reacción con radicales de otras enzimas y el territorio vascular analizado<sup>19,30</sup>.

## Estrés oxidativo y enfermedades hepáticas

El hígado sano es rico en sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos<sup>36</sup>. Se ha sugerido que el aumento de estrés oxidativo juega un papel fisiopatológico en la progresión de la enfermedad en pacientes con hepatopatía alcohólica<sup>37,38</sup> esteatohepatitis no alcohólica<sup>39</sup> y hepatitis C crónica<sup>40</sup>, así como en la mayoría de los modelos experimentales de fibrogénesis hepática<sup>36,41</sup>. Muchas de estas evidencias provienen de 2 observaciones: los elevados valores plasmáticos y tisulares de marcadores de peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA), y la demostración en los pacientes y en modelos animales de enfermedad hepática, de valores plasmáticos y hepáticos reducidos de antioxidantes, como el glutatión y las vitaminas A, E y C. Sin embargo, en analogía con las enfermedades vasculares, la relevancia clínica del estrés oxidativo en las enfermedades hepáticas ha sido cuestionada por la falta o el mínimo efecto de las terapias antioxidantes en los ensayos clínicos en humanos. Para una revisión ampliada de estos datos se remite al lector a documentos recientes<sup>37,39,42</sup>.

## ¿Puede el estrés oxidativo desempeñar un papel en la hipertensión portal?

El posible papel del estrés oxidativo y el uso terapéutico de los antioxidantes en pacientes con cirrosis hepática e hiper-

**Tabla 1** Distintos antioxidantes clasificados según su mecanismo de acción

	Acción	Antioxidantes
Prevención de la formación de ROS	Unión a proteínas/inactivación de iones metálicos	Transferrina, ferritina, ceruloplasmina, albúmina
Neutralización enzimática	Transformación de ROS en productos seguros	Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa
Secuestro	Interacción y bloqueo de ROS con sustratos reemplazables	Ácido ascórbico, alfa tocoferol, ácido úrico, bilirrubina, glutatión
Extinción	Absorción de electrones y/o energía	Alfa tocoferol, beta caroteno

ROS: especies reactivas de oxígeno.

tensión portal no ha sido evaluado<sup>43-47</sup>. En la cirrosis, el principal factor que conduce a la hipertensión portal es un aumento en la resistencia al flujo sanguíneo portal. Además, el aumento posterior del flujo sanguíneo portal, como resultado de una marcada vasodilatación arteriolar en los órganos viscerales que drenan en la vena porta, contribuye al empeoramiento de la hipertensión portal<sup>48,49</sup>. Como consecuencia, es posible reducir la hipertensión portal mediante la reducción del aumento de la resistencia o del aumento del flujo sanguíneo portal.

Inicialmente, Moore y sus colegas propusieron que el estrés oxidativo jugaría un papel en el desarrollo de la circulación hiperdinámica asociada a la hipertensión portal<sup>45</sup>. En su estudio, ratas con ligadura parcial de la vena porta (LPVP) tratadas con el antioxidante N-acetilcisteína no desarrollaron circulación hiperdinámica, contrariamente a las ratas LPVP tratadas con vehículo. El tratamiento con N-acetilcisteína se asoció a una reducción de la presión portal y de los marcadores de estrés oxidativo<sup>45</sup>. La reducción de la presión portal se atribuyó a una reducción en el flujo sanguíneo portal. El mismo grupo reportó resultados similares con el antioxidante ácido lipoico, que contiene el grupo tiol<sup>46</sup>. Sin embargo, en estos estudios no se caracterizaron los mecanismos subyacentes de los efectos de los antioxidantes.

Más recientemente, se ha demostrado que la administración aguda del antioxidante vitamina C revierte la hiporreactividad a los vasoconstrictores del territorio arterial del antebrazo de los pacientes con cirrosis<sup>47</sup>, lo que puede explicar, en parte, el efecto de los antioxidantes previniendo el síndrome circulatorio hiperdinámico y reduciendo el flujo sanguíneo portal.

El posible papel del estrés oxidativo modulando el tono del lecho vascular hepático es todavía más interesante. En la cirrosis, el aumento de la resistencia vascular hepática no es sólo la consecuencia de la distorsión de la arquitectura vascular del hígado, sino que también se debe a la contracción activa de las células estrelladas hepáticas y las células vasculares del músculo liso en el hígado. Este incremento dinámico de la resistencia vascular hepática se ha atribuido a una insuficiente biodisponibilidad intrahepática de NO<sup>50</sup> junto con una mayor liberación de vasoconstrictores, como los prostanoides vasoconstrictores derivados de la enzima ciclooxygenasa (COX)<sup>51</sup>.

La posibilidad de manipular farmacológicamente el aumento de la resistencia intrahepática de los hígados cirróticos ha cuestionado el paradigma de que sólo era posible disminuir la presión portal reduciendo el aumento del flujo sanguíneo esplácnico con vasoconstrictores esplácnicos.

Reducir la resistencia vascular hepática representa una nueva estrategia para el tratamiento de la hipertensión portal, con la ventaja, sobre las estrategias dirigidas a disminuir el flujo portal, de que podría mejorar la perfusión hepática<sup>52</sup>. De hecho, se ha demostrado que aumentar el NO en el hígado o reducir o bloquear el efecto de diferentes vasoconstrictores modula el tono vascular hepático en hígados cirróticos<sup>52-54</sup>.

La insuficiente biodisponibilidad hepática de NO en la cirrosis se da a pesar de encontrar valores de expresión génica y proteica de eNOS normales, de modo que ha sido atribuida, en parte, a una disminución de la actividad de la

eNOS causada por alteraciones en la regulación postraduccional de la actividad de la enzima. Dichas alteraciones pueden ser una combinación de los siguientes eventos: un aumento de la interacción de eNOS con la proteína inhibidora caveolina<sup>15,55</sup>, una disminución de la fosforilación de la eNOS dependiente de AKT<sup>56</sup>, un desacoplamiento de la eNOS debido a la deficiencia en cofactores de la enzima, como la BH<sub>4</sub><sup>44</sup>, e incluso valores aumentados de dimetilarginina asimétrica. De acuerdo con estas anomalías fisiopatológicas, se han intentado distintos esfuerzos para mejorar la biodisponibilidad de NO en el hígado.

Una primera aproximación fue la administración de donadores de NO selectivos de hígado<sup>52</sup>. En este sentido, en humanos se ha visto que la administración de dosis bajas de nitratos, como el mononitrito de isosorbide, reduce la presión portal<sup>57</sup>.

Otras estrategias para corregir la deficiencia intrahepática de NO en la cirrosis experimental se han basado en la sobreexpresión de NOS mediante la transferencia con adenovirus que codifican eNOS, nNOS o AKT constitutivamente activa<sup>56,58-60</sup> en la mejora de la actividad de eNOS mediante su regulación postraduccional con simvastatina<sup>61</sup>, administrando el cofactor BH<sub>4</sub> o disminuyendo el secuestro de NO mediante antioxidantes.

En este sentido, datos recientes de nuestro grupo apoyan la idea de que la suplementación con BH<sub>4</sub> puede representar una estrategia terapéutica nueva y eficaz para la hipertensión portal. Este estudio consolida, a la vez, el papel del estrés oxidativo modulando la biodisponibilidad de NO en la circulación intrahepática en la cirrosis. Este estudio experimental, que investiga el desacoplamiento de la eNOS, demuestra que los hígados cirróticos tienen valores de BH<sub>4</sub> marcadamente disminuidos, debido a una disminución de la actividad y de la expresión de la enzima clave en la síntesis, la GTP ciclohidrolasa. Además, la BH<sub>4</sub> se encontraba en gran parte oxidada (y por lo tanto inactiva), un hecho que podría deteriorar aún más la actividad de la eNOS. En este estudio, el desacoplamiento de la eNOS fue corregido mediante suplementación con BH<sub>4</sub><sup>44</sup>, sugiriendo que la prevención de la oxidación de BH<sub>4</sub> puede ser otra manera de mejorar el desacoplamiento de la eNOS. Posteriormente, en otro estudio, la administración de BH<sub>4</sub> durante 3 días en ratas cirróticas aumentó la actividad de eNOS y los valores de GMPc intrahepáticos y redujo significativamente la presión portal. Esta mejoría de la hipertensión portal se asoció a una normalización de la presión arterial<sup>62</sup>.

Estos datos sugieren fuertemente que, análogamente a lo que se observa en otros trastornos vasculares, en la cirrosis el estrés oxidativo contribuye a la deficiencia intrahepática de NO a través de su secuestro.

Recientemente, hemos demostrado, mediante microscopía confocal, que secciones de tejido hepático de ratas con cirrosis muestran un marcado incremento en la fluorescencia del dihidroetidio, un colorante fluorescente que reacciona específicamente con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular, reflejando un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>63</sup>. En este estudio pudimos demostrar que la actividad de la SOD estaba disminuida y, por lo tanto, podría ser un posible mecanismo responsable del incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los hígados cirróticos. Además, este estudio aclaró que la disminución en la actividad de SOD era, al menos en parte, debida a una disminución de la

expresión proteica de las isoformas citoplasmática y mitocondrial, pero no de la isoforma extracelular de la SOD. Interesantemente, este estudio también mostró que la inhibición de las enzimas COX o la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir los valores intrahepáticos de  $O_2^-$ , lo que indica que estos sistemas enzimáticos son fuentes potenciales de  $O_2^-$  en la cirrosis<sup>63</sup>.

Así, en los hígados cirróticos, tanto el aumento en la producción de  $O_2^-$  como la disminución en su degradación son causas de los valores elevados de  $O_2^-$ .

El aumento en los valores de  $O_2^-$  se asoció a un aumento significativo de las proteínas nitrotirosinadas, un marcador de la formación de  $ONOO^-$ , lo que apoya el concepto que el NO es secuestrado por el  $O_2^-$  (fig. 1). Asimismo, la relación entre la biodisponibilidad de NO y el contenido de  $O_2^-$  en el hígado se ve respaldada por nuestros experimentos en células endoteliales sinusoidales (CES), demostrando que la biodisponibilidad de NO es modulada por  $O_2^-$ . De hecho, el aumento del contenido de  $O_2^-$  en las CES después de incubar con el inhibidor de la SOD, DDC, se asoció con una reducción importante en la biodisponibilidad de NO. Además, la supresión de este incremento de  $O_2^-$  mediante la suplementación de SOD fue acompañada por una restauración parcial de la biodisponibilidad del NO<sup>63</sup>.

Todos estos datos sugieren que el estrés oxidativo puede contribuir a reducir la biodisponibilidad de NO en los hígados cirróticos, y hacen hincapié en que las terapias antioxidantes, mediante la eliminación de  $O_2^-$ , podrían ser una nueva estrategia terapéutica para mejorar la biodisponibilidad de NO intrahepática y para mejorar el tono vascular hepático en la cirrosis.

Como consecuencia, una manera de disminuir el estrés oxidativo en el hígado cirrótico podría ser incrementar la actividad de SOD. En este sentido, en un estudio realizado en nuestra unidad, la transfección en ratas cirróticas con hipertensión portal con adenovirus que codifican para SOD extracelular dio lugar a una marcada reducción del  $O_2^-$  intrahepático, que se acompañó de una mayor biodisponibilidad de NO (valorado por los valores hepáticos de GMPC) y de una disminución de las proteínas nitrotirosinadas en el hígado. Estos efectos moleculares se asociaron con una mejoría significativa en la vasodilatación dependiente del endotelio a acetilcolina y, más importante, promovió una reducción significativa de la presión portal *in vivo* sin cambios significativos en la presión arterial media<sup>64</sup>. La reducción de la presión portal fue en promedio del 13,3%. Estos valores se asemejan a los observados en otros estudios dirigidos a reducir la presión portal en ratas con cirrosis a través de otras estrategias, como la administración de los bloqueadores beta no selectivos<sup>65</sup>.

Este estudio proporciona, por primera vez *in vivo*, evidencias de que disminuir los valores de  $O_2^-$  puede representar una estrategia efectiva para mejorar la biodisponibilidad de NO en el hígado. Un estudio reciente, realizado en nuestra unidad, en el que se administró ácido ascórbico a pacientes con cirrosis refuerza este concepto. El ácido ascórbico (vitamina C) es un potente antioxidante que mejora la vasodilatación dependiente de NO en los lechos vasculares de pacientes con enfermedades que se asocian a disfunción endotelial, como la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia y las enfermedades coronarias. En estas condiciones, el efecto beneficioso de la administración agu-

da de ácido ascórbico se ha atribuido a su capacidad para neutralizar las ROS, principalmente  $O_2^-$ <sup>43</sup>. En nuestro estudio, pudimos confirmar que los pacientes con cirrosis tienen unos valores reducidos de vitamina C y aumentados de MDA (un marcador de estrés oxidativo en suero) y que experimentan un marcado aumento pospandrial de la presión portal (reflejando la existencia de una alteración de la respuesta vasodilatadora del lecho vascular hepático a los aumentos en el flujo de sangre promovido por la comida; disfunción endotelial). La administración aguda de altas dosis de vitamina C redujo los valores de MDA, lo que sugiere un potente efecto antioxidante. Esto se asoció a una atenuación significativa en el aumento pospandrial de la presión portal, lo que apoyaría una mejoría en la disfunción endotelial intrahepática<sup>43</sup>.

En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés oxidativo puede contribuir a la disfunción endotelial y al aumento del tono vascular en la cirrosis hepática, y que una terapia antioxidante puede contribuir a corregir esta anomalía. Por otro lado, el estrés oxidativo es otra de las causas multifactoriales que pueden promover la vasodilatación esplácnica y el empeoramiento de la hipertensión portal en la cirrosis. Todos estos hallazgos apoyan a nuevos estudios con antioxidantes como terapia adyuvante en el tratamiento médico de la hipertensión portal.

## Bibliografía

1. Cave AC, Brewer AC, Narayananicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:691-728.
2. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:471-8.
3. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*. 1999;31:261-72.
4. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:1-31.
5. Li PF, Dietz R, Von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett*. 1997;404: 249-52.
6. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2004;337:1-13.
7. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*. 1999;85:753-66.
8. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44:248-52.
9. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006;71:247-58.
10. Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2005;7:242-8.
11. Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, et al. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens*. 2005;18:839-43.
12. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113:1708-14.
13. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.

14. Miller DR, Collier JM, Billings RE. Protein tyrosine kinase activity regulates nitric oxide synthase induction in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1997;272:G207-14.
15. Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.* 1999;117:1222-8.
16. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18:195-9.
17. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:239-57.
18. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4.
19. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29-38.
20. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111:1201-9.
21. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9220-5.
22. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278:22546-54.
23. Stroes E, Hijmering M, Van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1998;438:161-4.
24. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993;91:2546-51.
25. Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmaier G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2001;276:40-7.
26. Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:8254-60.
27. May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radical Biology and Medicine.* 2000;28:1421-9.
28. Jialal I, Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation.* 2003;107:926-8.
29. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today.* 2006;11:524-33.
30. Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:689-95.
31. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:1013-28.
32. Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res.* 2004;49:543-9.
33. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:909-13.
34. Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, et al. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:845-54.
35. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488-95.
36. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001;35:297-306.
37. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006;43 2 Suppl 1:S63-74.
38. Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29 11 Suppl:110S-5S.
39. Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22 Suppl 2:71-3.
40. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:G847-51.
41. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1383-94.
42. Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs.* 2005;65:2445-61.
43. Hernández-Guerra M, García-Pagán JC, Turnes J, Bellot P, Deulofeu R, Abraldes JG, et al. Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology.* 2006;43:485-91.
44. Matei V, Rodríguez-Villarrupla A, Deulofeu R, Colomer D, Fernández M, Bosch J, et al. The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis. *Hepatology.* 2006;44:44-52.
45. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology.* 1998;28:689-94.
46. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, et al. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1999;29:1358-63.
47. Ferlitsch A, Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, Homoncik M, Peck-Radosavljevic M, et al. Vasoconstrictor hyporeactivity can be reversed by antioxidants in patients with advanced alcoholic cirrhosis of the liver and ascites. *Crit Care Med.* 2005;33:2028-33.
48. Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol.* 2000;32 1 Suppl:141-56.
49. Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39 4 Suppl 2:S125-30.
50. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology.* 2002;35:478-91.
51. Graupera M, García-Pagán JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology.* 2003;37:172-81.
52. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol.* 2003;39:940-6.
53. Graupera M, García-Pagán JC, Parés M, Abraldes JG, Roselló J, Bosch J, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol.* 2003;39:515-21.
54. Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, García-Pagán JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanooids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G763-70.
55. Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G1209-16.

56. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernández-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;125:522-31.
57. Bellis L, Berzigotti A, Abraldes JG, Moitinho E, García-Pagán JC, Bosch J, et al. Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2003;37:378-84.
58. Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, et al. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver *in vivo* and *in vitro*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279:G1023-30.
59. Van de CM, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, et al. *In vivo* gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut*. 2002;51:440-5.
60. Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest*. 2000;105:741-8.
61. Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernández M, García-Pagán JC, et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2004;126:749-55.
62. Matei V, Rodríguez-Villarrupla A, Deulofeu R, García-Caldero H, Fernández M, Bosch J, et al. Three-day tetrahydrobiopterin therapy increases *in vivo* hepatic NOS activity and reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2008;49:192-7.
63. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodríguez-Villarrupla A, García-Caldero H, Fernández M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008;47:1248-56.
64. Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Villarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut*. 2009;58:118-25.
65. Pizcueta MP, De Lacy AM, Kravetz D, Bosch J, Rodes J. Propranolol decreases portal pressure without changing portocollateral resistance in cirrhotic rats. *Hepatology*. 1989;10:953-7.