



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Disfunció microcirculatoria sinusoïdal hepàtica en la cirrosi i dany per isquèmia/reperfusió: mecanismes involucrats i noves dianes terapèutiques

Sergi Guixé Muntet

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**DISFUNCIÓ MICROCIRCULATORIA SINUSOÏDAL HEPÀTICA EN LA
CIRROSI I DANY PER ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ: MECANISMES
INVOLUCRATS I NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES.**

Tesi Doctoral presentada per

SERGI GUIXÉ MUNTET

Per a optar al grau de Doctor

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Jordi Gracia-Sancho i el Prof. Jaume Bosch Genover, al Laboratori d'Hemodinàmica Hepàtica i Hipertensió Portal, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Departament de Medicina, Hospital Clínic de Barcelona.

Dr. Jordi Gracia-Sancho

Prof. Jaume Bosch Genover

Directors

Programa de Doctorat en Medicina

Maig 2017

A la meva família

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| INFORME DELS DIRECTORS | 3 |
| 1. LLISTA D'ABREVIACIONS..... | 7 |
| 2. INTRODUCCIÓ..... | 11 |
| 2.1. El sinusoides hepàtic..... | 13 |
| 2.2. Regulació del to vascular hepàtic..... | 14 |
| 2.3. KLF2 | 17 |
| 2.3.1. Estatines | 17 |
| 2.4. Cirrosi | 19 |
| 2.4.1. Fisiopatologia de la cirrosi..... | 19 |
| 2.4.2. Aproximacions farmacològiques | 21 |
| 2.4.3. Liraglutida..... | 22 |
| 2.5. Isquèmia i reperfusió..... | 22 |
| 2.5.1. Isquèmia | 23 |
| 2.5.2. Reperfusió | 24 |
| 2.6. Autofàgia | 26 |
| 2.6.1. Iniciació de l'autofàgia | 27 |
| 2.6.2. Elongació de l'autofagosoma | 28 |
| 2.6.3. Fusió i flux autofàgic..... | 28 |
| 2.6.4. Autofàgia hepàtica | 30 |
| 3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS..... | 31 |
| 3.1. Estudi 1..... | 34 |
| 3.2. Estudi 2..... | 34 |
| 4. CÒPIA DELS ARTICLES ORIGINALS | 37 |
| 4.1. Estudi 1..... | 39 |
| 4.2. Estudi 2..... | 57 |
| 5. RESUM DELS RESULTATS | 77 |
| 5.1. Estudi 1..... | 79 |
| 5.2. Estudi 2..... | 79 |
| 6. DISCUSSIÓ | 81 |
| 7. CONCLUSIONS | 89 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 7.1. Estudi 1..... | 91 |
| 7.2. Estudi 2..... | 91 |
| 8. REFERÈNCIES | 93 |
| 9. ALTRES PUBLICACIONS..... | 113 |
| 10. AGRAÏMENTS..... | 117 |

INFORME DELS DIRECTORS

INFORME DELS DIRECTORS

Barcelona, 28 d'abril de 2017

Jordi Gracia Sancho, Cap de Grup de Recerca a l'Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), i Jaume Bosch Genover, Professor en Medicina de la Universitat de Barcelona i Consultor Sènior en Hepatologia a l'Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que la tesi doctoral titulada “DISFUNCIÓ MICROCIRCULATORIA SINUSOÏDAL HEPÀTICA EN LA CIRROSI I DANY PER ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ: MECANISMES INVOLUCRATS I NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES”, presentada per Sergi Guixé Muntet per a l'obtenció del títol de Doctor per la Universitat de Barcelona s'ha fet sota la nostra supervisió i compleix tots els requisits per a ser defensada davant del corresponent comitè avaluador.

Jordi Gracia Sancho

Jaume Bosch Genover

1. LLISTA D'ABREVIACIONS

1. LLISTA D'ABREVIACIONS

α -SMA: actina de musculatura llisa alfa

ADMA: dimetilarginina asimètrica

Akt: proteïna quinasa B

AMPK: proteïna-quinasa activada per AMP

Atg: *autophagy related protein*

BH₄: tetrahidrobiopterina

CNP: pèptid natriurètic de tipus C

CO: monòxid de carboni

eNOS: sintasa d'òxid nítric endotelial

GGPP: geranil-geranil pirofosfat

GLP-1: glucagon-Like Peptide-1

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzim A

HO-1: hemo-oxigenasa-1

HSC: cèl·lules estrellades hepàtiques

HVPG: gradient de pressió venosa hepàtica

HVR: resistència vascular intrahepàtica

ICAM-1: molècula d'adhesió intercel·lular-1

IL: interleucina

I/R: isquèmia/reperfusió

KC: cèl·lules de Kupffer

KLF2: krüppel-like factor 2

LC3: *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3*

LKB1: quinasa de fetge B1

LSEC: cèl·lules endotelials sinusoïdals

MCP-1: proteïna quimioattractant de monòcits

mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex 1*

NAFLD: malaltia de fetge gras d'origen no alcohòlic

NASH: esteatohepatitis no alcohòlica

NO: òxid nítric

O₂⁻ : anió superòxid

ONOO⁻ : peroxinitrit

PAF: factor d'activació plaquetària

PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes

PGI₂: prostaciclina

Rab7: *ras-related protein 7*

ROS: espècies reactives d'oxigen

TNF-α: factor de necrosi tumoral alfa

ULK1: unc-51-like kinase 1

VCAM: molècula d'adhesió cel·lular vascular

VEGF: factor de creixement endotelial vascular

2. INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ

El fetge és l'òrgan encarregat de metabolitzar gran part de les substàncies absorbides a l'intestí, produir bilis, sintetitzar proteïnes i detoxificar la sang, entre d'altres, essent els hepatòcits les cèl·lules efectores d'aquestes funcions. Tanmateix, la viabilitat i el fenotip dels hepatòcits i, per extensió, el funcionament hepàtic venen determinats pel correcte estat de la microcirculació, essent clau el rol de les cèl·lules sinusoïdals en la prevenció, el desenvolupament i la regressió de la malaltia hepàtica crònica o del dany hepàtic agut (1–3).

2.1. El sinusoide hepàtic

La major part de la sang que arriba al fetge (70%) ho fa a través de la vena porta. Es tracta de sang venosa provinent de l'intestí, a baixa pressió, molt rica en nutrients, mediadors immunològics, hormones i factors de creixement i altament desoxigenada. Només el 30% restant és sang oxigenada que arriba per l'artèria hepàtica (4). El fetge està organitzat en lobulets hepàtics, que són agrupacions de sinusoides amb una distribució radial. A l'inici de cada sinusoide es barreja la sang provinent d'una vènula porta i una arteriola hepàtica, que recorrerà el sinusoide fins l'altre extrem, la vènula central, que desemboca a la vena cava inferior. En sentit contrari, el canalicle biliar transporta la bilis secretada pels hepatòcits fins el conducte biliar (4).

El sinusoide està constituït principalment per tres tipus de cèl·lules no parenquimals. Les cèl·lules endotelials sinusoïdals (LSEC) delimiten el lumen del sinusoide. Es tracta d'un endoteli discontinu molt especialitzat, que permet la difusió dels soluts de la sang fins els hepatòcits i participa en la regulació de l'hemostàsia, l'eliminació de substàncies tòxiques, la inflamació i la regulació del to vascular (5–7). Al seu voltant, a l'espai de Disse (comprès entre l'endoteli i els hepatòcits), les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC) regulen l'obertura dels sinusoides per a acomodar el flux sanguini, de tal manera que una HSC pot modular fins a quatre LSEC a la vegada (7). A més a més, són el major dipòsit de vitamina A de l'organisme i les majors productores de fibra hepàtica (8). Per últim, les cèl·lules de Kupffer (KC) són els macròfags residents hepàtics, i se

situen al lumen sinusoïdal, participant en funcions de defensa, inflamació i remodelació tissular (9) (Figura 1).

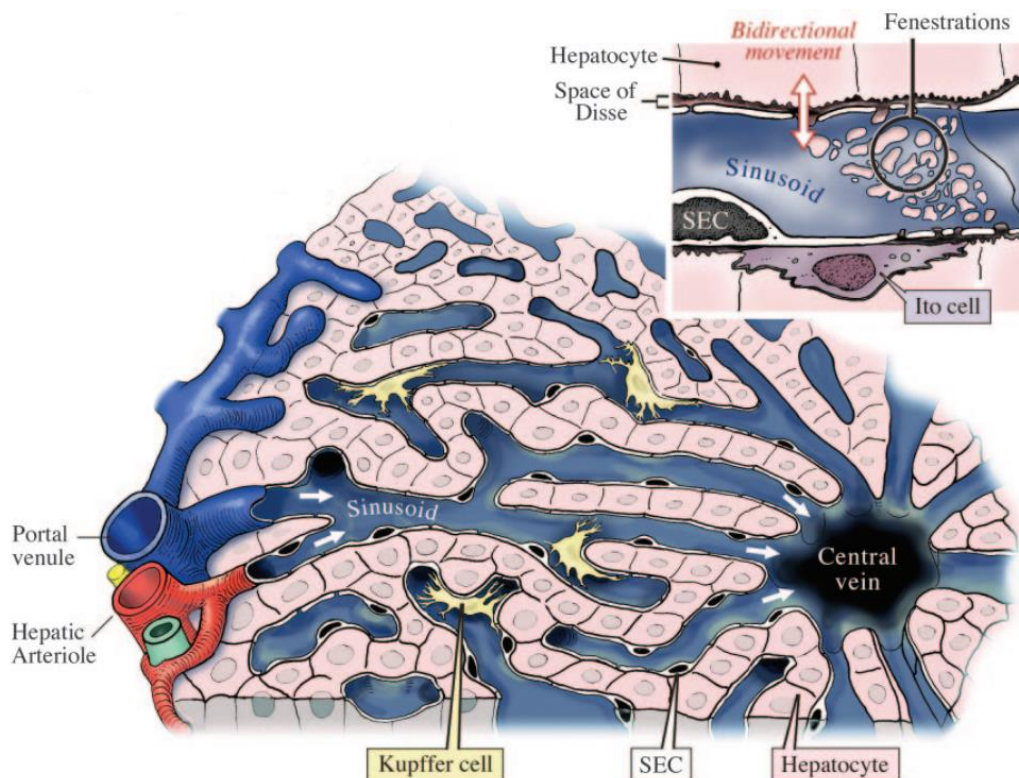


Figura 1. Estructura del sinusoide hepàtic. Adaptat de "Aird WC 2007 *Circ Res*". SEC: Sinusoidal Endothelial Cell.

2.2. Regulació del to vascular hepàtic

El funcionament i la viabilitat dels hepatòcits, per tant, depèn directament de les cèl·lules sinusoïdals, ja que alteracions en la regulació del to vascular poden impedir l'arribada d'oxigen i nutrients, essent la disfunció microvascular el primer factor desencadenant de la majoria de malalties hepàtiques (3,7,10). Per tal d'entendre com es desregulen les cèl·lules sinusoïdals en la malaltia, però, cal entendre primer el rol que desenvolupen en condicions de salut.

Les LSEC representen un 15-20% del total de les cèl·lules hepàtiques. Presenten un fenotip molt especialitzat, diferenciant-se de la resta d'endotelis de l'organisme per l'absència de membrana basal i la presència de fenestres (11). Aquestes són obertures adiafragmàtiques d'entre 50nm i 200nm, agrupades en *sieve plates* (plaques de tamís). Les fenestres poden representar fins el 20% de la superfície cel·lular (12), conferint així una elevada porositat a l'endoteli i

permetent la comunicació directa de la sang amb els hepatòcits (11). En condicions de salut, les LSEC estan exposades contínuament a l'estrès per fricció efectuat pel flux sanguini, el qual els confereix un fenotip vasoprotector que, a més a més de mantenir les fenestres, activa diverses vies de producció d'agents vasodilatadors. La més rellevant és la via de l'òxid nítric (NO), sintetitzat principalment per la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) (13), tot i que el flux també indueix la síntesi d'altres molècules vasodilatadores com el monòxid de carboni (CO) o la prostaciclina (PGI₂), mentre que atenua la síntesi d'endotelines (vasoconstrictors) (14–16). Aquestes molècules mantenen la quiescència de les HSC, mantenint un equilibri entre en la seva resposta a vasodilatadors (NO, CO, PGI₂) i vasoconstrictors (endotelina-1, tromboxà A₂, angiotensina II) i permetent l'acomodació de les variacions de flux sanguini (13). Al seu torn, les HSC i els hepatòcits mantenen el fenotip de les LSEC per mitjà de la secreció, entre d'altres, de VEGF (17,18).

Tanmateix, quan es produeix un dany hepàtic o una alteració del flux sanguini, aquest cicle protector queda alterat. Les LSEC perden el seu fenotip característic (perden l'expressió d'estabilina 1 i 2, CD32b) i expressen el marcador d'endoteli vascular CD31; desapareixen les fenestres i es forma membrana basal, de manera que l'endoteli deixa de ser discontinu i esdevé un endoteli més semblant a l'endoteli vascular (procés anomenat capillarització) (7,19–21). Això dificulta la difusió de les molècules de la sang i l'arribada d'oxigen a la resta de cèl·lules hepàtiques. Les LSEC participen en la resposta inflamatòria i en resposta al dany hepàtic activen la síntesi de molècules d'adhesió cel·lular (CAM), com ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina i la secreció de quimiocines com IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 i interferó, induint l'atracció de leucòcits (3,22). A més a més, les LSEC adopten un fenotip protrombòtic i augmenten la síntesi de fibronectina (23,24). Per altra banda, el canvi de fenotip es tradueix en la davallada de la síntesi de vasodilatadors (25) en favor de la major producció de vasoconstrictors (26).

En resposta a citocines (com PDGF i TGF- β) o per mitjà de vies de senyalització com Hedgehog o Wnt/ β -catenina i a l'augment en la relació vasoconstrictors/vasodilatadors de les LSEC, les HSC s'activen (Figura 2); perden les gotes lipídiques característiques metabolitzant-les com a font d'energia (27,28) i adquireixen un fenotip pro-contràctil i pro-fibròtic (amb α -SMA

i col·lagen-I com a marcadors d'activació), esdevenint altament proliferatives i amb capacitat migratòria. En aquest estat d'activació, les HSC tenen menor sensibilitat als vasodilatadors, mentre que presenten una major resposta a vasoconstrictors (26,29). Quan les HSC s'activen, són les cèl·lules efectores de la contracció dels sinusoides i les principals productores de fibra hepàtica en la fibrosi (8). Aquestes HSC activades deixen de sintetitzar VEGF i contribueixen a la formació d'una membrana basal endotelial a causa de la deposició de fibra, afavorint la capillarització de l'endoteli.

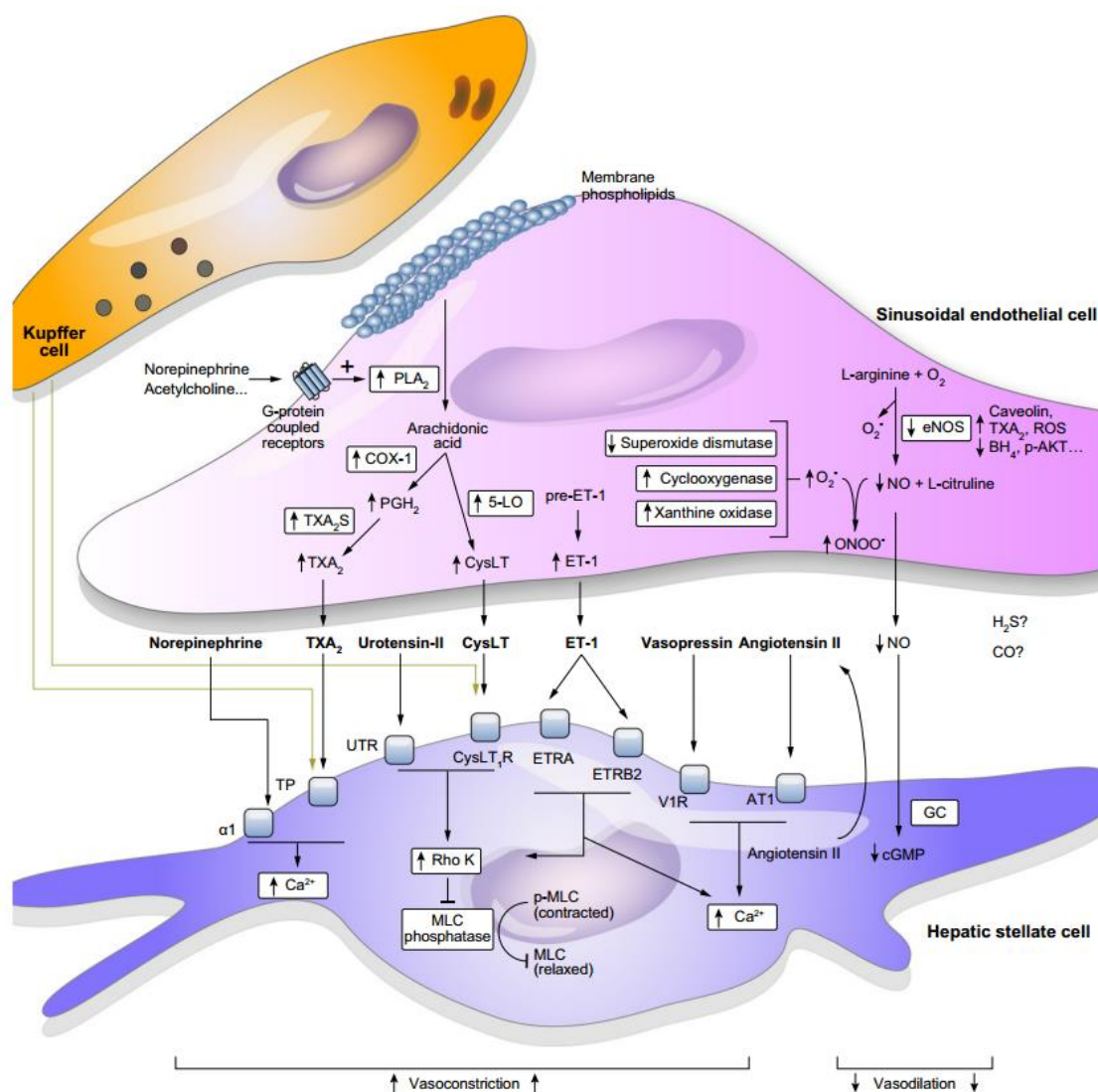


Figura 2. Regulació del to vascular en el dany hepàtic. Adaptat de "García-Pagán, Gracia-Sancho & Bosch. 2012, *Journal of Hepatology*".

2.3. KLF2

Les proteïnes de la família Krüppel-like factor (KLF) són factors de transcripció del tipus *zinc finger* que regulen el desenvolupament tissular i el creixement cel·lular (30). KLF2, a més a més d'expressar-se al pulmó i als limfòcits, té una elevada expressió endotelial (31) i té com a diana gens que confereixen un fenotip vasoprotector a l'endoteli. Entre els més rellevants, s'hi troben gens vasodilatadors (eNOS, pèptid natriurètic de tipus C (CNP)), anti-trombòtics (trombomodulina) i anti-oxidants (Hemo-oxigenasa-1 (HO-1), *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2)), mentre que inhibeix l'expressió de molècules d'adhesió leucocitària (E-selectina i VCAM-1) i l'apoptosi (15,32–35). Un dels activadors més potents de KLF2 és l'estrès per fricció, ocasionat pel fregament continu del flux sanguini sobre l'endoteli (14), el qual n'augmenta la transcripció a través de la via de MEK5-ERK5-MEF2 (36). En canvi, l'alteració del flux sanguini en zones vasculars turbulentes o el cessament del flux provoquen la ràpida davallada de la seva expressió i de la protecció endotelial que confereix (15,35,37).

Al fetge, l'expressió de KLF2 és medidora dels efectes vasoprotectors del flux sanguini en el manteniment del fenotip especialitzat de l'endoteli sinusoidal i és responsable, per tant, de la protecció paracrina de les HSC (38) i de gran part dels mecanismes moleculars que regulen el to vascular hepàtic (39), esmentats anteriorment en aquesta tesi. Tot això i el fet que actualment està acceptat que el dany endotelial és una causa inicial del desenvolupament de les malalties hepàtiques més importants (1–3,7) fa que KLF2 sigui un actor principal en la prevenció i el tractament d'aquestes malalties. En aquest sentit, estudis recents del nostre grup han estat dirigits a modular farmacològicament l'expressió d'aquest factor de transcripció emprant estatines (38,40–46).

2.3.1. Estatines

Les estatines són fàrmacs aprovats per les agències americana i europea de medicaments, dissenyades per a reduir els nivells de colesterol a causa de la seva activitat inhibidora de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzim A (HMG-CoA) reductasa, bloquejant així la síntesi de mevalonat (precursor del colesterol).

Tanmateix, les estatines han demostrat tenir importants efectes vasoprotectors independents de la reducció dels nivells de colesterol, derivats de la davallada dels nivells de geranyl-geranyl pirofosfat (GGPP) (47–49). S’ha demostrat que aquests efectes són mediatos principalment per la potent inducció que causen en l’expressió de KLF2 (50,51); al fetge, el tractament amb simvastatina manté l’expressió de KLF2 i el fenotip endotelial de manera similar a l’estímul d’estrès per fricció i protegeix la resta de cèl·lules hepàtiques davant del dany hepàtic agut i crònic (3,38,40–42,44–46). Tanmateix, els mecanismes moleculars que vinculen directament la reducció del GGPP derivada del tractament amb estatines amb l’increment de l’expressió de KLF2 encara són desconeguts, tot i que la inhibició de la isoprenilació de les GTPases RhoA, Rac1 i Cdc42 per acció de les estatines hi podria estar involucrada (48,52) (Figura 3).

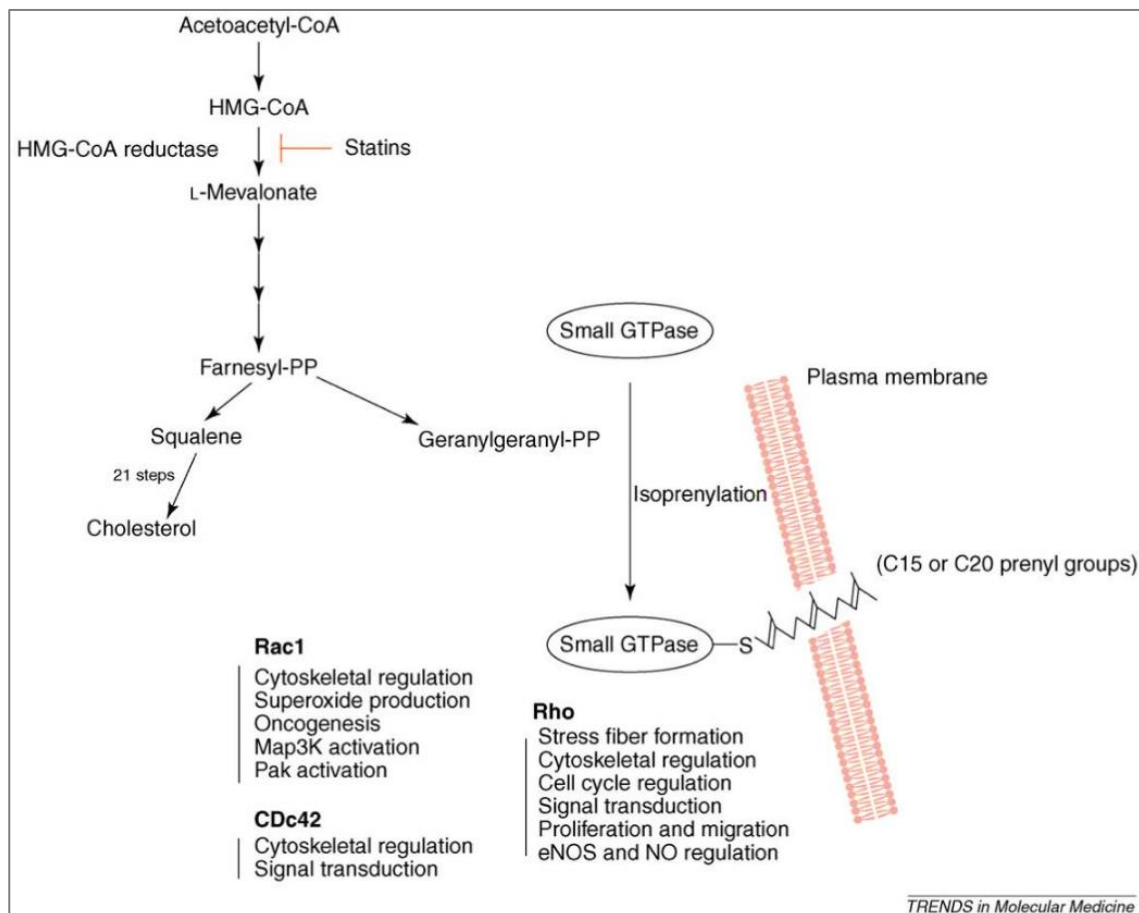


Figura 3. Esquema de la via d’acció de les estatines independent de la síntesi de colesterol. Adaptat de “Wang CY *et al.* 2008, *Trends in Molecular Medicine*”

2.4. Cirrosi

2.4.1. Fisiopatologia de la cirrosi

La cirrosi és la quarta causa de mortalitat en adults a Europa (53). Es produeix per diferents etiologies, com el consum abusiu d'alcohol, la infecció per virus de l'hepatitis o malalties no alcohòliques d'incidència creixent com l'obesitat. Aquests insults crònics alteren el fenotip i la funció sinusoïdal pels mecanismes descrits anteriorment en aquesta tesi, provocant disfunció microvascular i la deposició excessiva de fibra (7,10,24). Les alteracions en la microvasculatura i l'arquitectura hepàtiques causen un increment de la resistència vascular intrahepàtica (HVR) al pas de la sang, provocant l'augment de la pressió portal, la complicació més comuna de la cirrosi que desencadenarà les complicacions clíniques més rellevants (2,54).

El territori esplàncnic, immediatament previ al fetge, detecta aquest augment significatiu de pressió portosinusoïdal i incrementa la síntesi de vasodilatadors (10) per tal de mitigar la hipertensió portal, però la baixa resposta del fetge fibròtic als vasodilatadors acaba provocant una vasodilatació sistèmica, que sumada a l'increment de la despesa cardíaca associada provoca l'increment del flux sanguini, agreujant encara més la hipertensió portal (55). Per altra banda, l'increment significatiu de pressió portosinusoïdal activa mecanismes d'angiogènesi a nivell esplàncnic i la formació de vasos col·laterals extrahepàtics (56) que alliberen pressió derivant part de la sang portal a la vena cava o cap a l'aparell digestiu, de manera que en alguns casos fins a un 90% del flux portal és desviat a través de les col·laterals (57). Aquesta "solució" fisiològica, però, limita encara més l'oxigen que arriba al fetge i també és causa de l'aparició de varius gastro-esofàgiques. Altres complicacions associades a la desviació porto-sistèmica de la sang i a l'anomenat síndrome hiperdinàmic són l'encefalopatia (produïda pels tòxics que es desvien per les col·laterals i no s'eliminen al fetge) i l'aparició d'ascites (conseqüència de la retenció de líquids causada per la hipovolèmia efectiva) (53,58) (Figura 4).

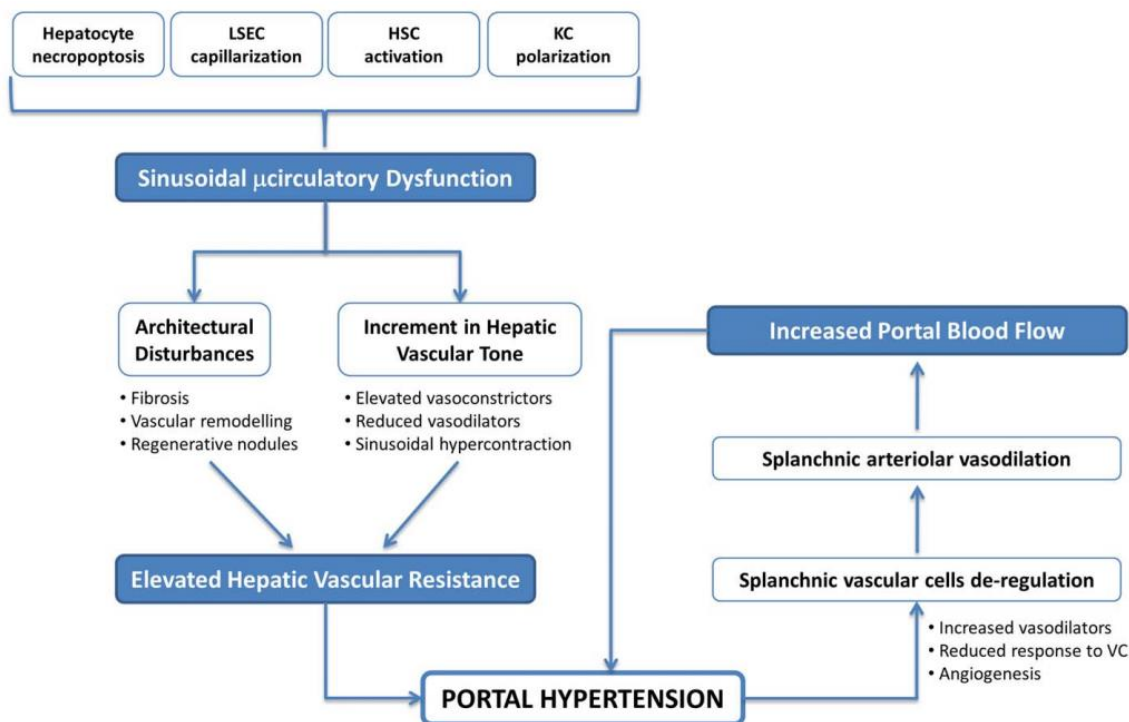


Figura 4. Patofisiologia de la hipertensió portal. Adaptat de “Gracia-Sancho & Laleman. 2016, *Clinical Liver Disease*”.

El mètode més precís per a determinar el pronòstic i l'estat de la malaltia és la mesura del gradient de pressió venosa hepàtica (HVPG), que és la diferència entre les pressions pre-hepàtica i post-hepàtica (59). Valors més alts de 5mmHg indiquen hipertensió portal, mentre que valors d'HVPG per sobre de 10mmHg indiquen pressió portal clínicament significativa, quan hi ha risc d'aparició de varius i ascites. A partir de 12mmHg es pot produir sagnat variceal i augmenta el risc de mortalitat. Està descrit que un tractament farmacològic que disminueixi el HVPG per sota de 12mmHg o en provoqui una reducció del 20% redueix el risc de sagnat de varius i de mortalitat (53,59,60).

La regulació de la pressió portal la descriu la llei d'Ohm:

$$PP = Flux * HVR$$

Per tant, d'aquesta equació es pot deduir que la millora de la pressió portal es pot aconseguir tant per la reducció del flux sanguini com per la millora de la HVR (60). Al seu torn, s'estima que al voltant d'un 60-70% de l'augment de la HVR és causat per alteracions del component estructural (increment de la deposició de fibra, formació de nòduls de regeneració i distorsió de l'arquitectura sinusoïdal),

mentre que el 30-40% és causat pel component dinàmic de la HVR (disfunció de les cèl·lules sinusoidals, alteració del to vascular) (10,60,61). Per tant, la millora d'un d'aquests components (o idealment d'ambdós) reduiria la hipertensió portal i, alhora, la seva causa.

2.4.2. Aproximacions farmacològiques

Els únics tractaments actuals per a reduir la hipertensió portal consisteixen en l'administració de vasoconstrictors sistèmics (β -bloquejadors, somatostatina, vasopresina) (1,62). Aquests intenten contrarestar el síndrome hiperdinàmic, reduint el flux sanguini, ja que aquest és directament proporcional a les variacions de la pressió portal. Per altra banda, la millora de la hipertensió portal es podria aconseguir també reduint la HVR, que des del punt de vista etiològic seria l'aproximació farmacològica òptima, ja que estaria dirigida a l'origen de la malaltia. Per tant, els estudis moleculars focalitzats a reduir la resistència vascular intrahepàtica, corregint l'arquitectura hepàtica i/o el to vascular, tenen com objectiu la millora en el fenotip de les cèl·lules sinusoidals per tal de reduir la fibrosi i normalitzar la microcirculació, en contraposició als tractaments actuals, dirigits a corregir les conseqüències de la malaltia.

Com s'ha descrit anteriorment en aquesta tesi, el to vascular es troba alterat en la cirrosi, decantat cap a una major producció de vasoconstrictors i una menor disponibilitat d'NO, a conseqüència d'una menor activació d'eNOS (fosforilació, increment del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) i interacció amb caveolina i dimetilarginina asimètrica (ADMA)) (63–68) i per la depleció d'NO a causa de l'elevat estrès oxidatiu i la formació de peroxinitrit (ONOO⁻) (69). Alguns dels tractaments proposats fins ara per a la correcció de la disfunció microvascular han estat, per tant, inhibidors de la via del tromboxà A₂ (terutroban) (70) i antioxidants (resveratrol, superòxid dismutasa recombinant) (71,72), així com l'activador de KLF2 simvastatina (46,73,74), els efectes de la qual s'han comentat anteriorment en aquesta tesi. És important destacar que aquesta última estratègia ha demostrat reduir la pressió portal en pacients amb cirrosi i hipertensió portal (73) i més recentment s'ha descrit com la simvastatina reduiria la mortalitat en pacients amb cirrosi que havien sobreviscut a un episodi d'hemorràgia variceal en un estudi clínic aleatoritzat amb placebo com a control

(74). Malgrat aquests avenços en l'estudi de la cirrosi i la hipertensió portal, encara no hi ha cap tractament aplicat a la pràctica clínica per als pacients cirròtics dirigit a millorar la microcirculació hepàtica.

2.4.3. Liraglutida

La liraglutida és un fàrmac antidiabètic amb un 97% d'homologia a l'hormona incretina Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) (75). Aquestes hormones se sintetitzen en resposta a la ingesta de glucosa, estimulant la secreció d'insulina des de les cèl·lules β pancreàtiques i inhibint la secreció de glucagó de les cèl·lules α (76). Les hormones incretines tenen una vida mitja curta (fet que els permet regular correctament l'homeòstasi de glucosa). Tanmateix, l'estructura de la liraglutida és gairebé idèntica a la del GLP-1 humà, però aquesta és capaç d'associar-se a la albúmina, la qual cosa li confereix una vida mitja més llarga que la converteix en un fàrmac d'injecció única diària per al tractament de la diabetis del tipus II (77). A banda dels efectes directes sobre la regulació de la glicèmia, recentment s'ha observat que la liraglutida presenta propietats antiinflamatòries i antioxidants en malalties hepàtiques com la esteatohepatitis no alcohòlica (NASH) o fins i tot en cèl·lules endotelials (78–80). Tenint en compte aquestes propietats i que es tracta d'un fàrmac aprovat per a l'ús humà, els resultats derivats de l'estudi de la liraglutida en la cirrosi podrien tenir una ràpida aplicabilitat translacional.

2.5. Isquèmia i reperfusió

El dany per isquèmia i reperfusió (I/R) es produeix per una aturada del flux sanguini i la seva posterior restauració. Aquests processos estan associats a cirurgia hepàtica, com la resecció i el transplantament, que es duen a terme com a última opció possible davant d'etapes terminals de la malaltia hepàtica crònica (81). Se sap que el dany per I/R és en sí mateix el principal condicionant de la disfunció i la viabilitat del fetge després de la intervenció. En cas del transplantament hepàtic, per exemple, està descrit que fins a un 20% dels transplantaments estan associats a complicacions clíniques greus (82). A més a més, la baixa disponibilitat d'empelts per al transplantament obliga a estendre els

critèris d'acceptació d'òrgans, emprant fetges esteatòsics, de donants a cor aturat o d'edat avançada, els quals tenen un índex de fallida encara més elevat (83). Tanmateix, els mecanismes de dany hepàtic per I/R encara no es coneixen del tot bé. Una bona comprensió dels mecanismes moleculars involucrats en aquests processos és essencial per a desenvolupar nous tractaments i millorar els sistemes de preservació actuals.

2.5.1. Isquèmia

El procés d'isquèmia (aturada del flux sanguini) difereix segons el tipus d'intervenció. En la resecció d'una part del teixit hepàtic, fins a un 70% del fetge pateix isquèmia calenta, anomenada així en contraposició a la isquèmia freda, que té lloc quan l'empelt es submergeix en una solució de preservació a 4°C fins que l'òrgan és trasplantat. En la isquèmia calenta, la normotèrmia i la presència de sang provoquen el ràpid deteriorament hepàtic, de manera que a partir de 90 minuts d'isquèmia la viabilitat hepatocitària es veu greument compromesa. En canvi, la viabilitat cel·lular i la funció microvascular decauen significativament a partir de les 6h d'isquèmia freda (41,84).

Malgrat les diferències en el tipus d'isquèmia i, en el cas de la isquèmia freda, en la solució de preservació emprada, existeixen mecanismes comuns pels quals es produeixen els danys. Durant el temps d'isquèmia, les cèl·lules consumeixen els nutrients i l'oxigen, trobant-se ràpidament en un ambient hipòxic. La manca de substrats glicolítics i d'oxigen provoquen l'aturada de la cadena respiratòria, de manera que predomina el metabolisme anaeròbic i es produeix una depleció d'ATP. Com a conseqüència, la bomba ATPasa de Na^+/K^+ perd activitat, perdent-se també el potencial de membrana i provocant un increment de Ca^{2+} intracel·lular que modifica l'activitat d'enzims pro-inflamatoris com les fosfolipases (85,86). Aquestes elevades concentracions de Ca^{2+} fins i tot modifiquen l'estructura d'enzims com la xantina deshidrogenasa, convertint-la en xantina oxidasa, productora d'anió superòxid (O_2^-) (87–89), o provoca també vaquolització cel·lular i la iniciació de la mort cel·lular per la via mitocondrial (90). L'inici del procés de mort cel·lular en conjunció amb la depleció d'ATP impedeix la culminació de la via apoptòtica, de manera que la necrosi és un dels mecanismes de mort cel·lular més rellevant en aquest tipus de dany (91), (Figura

5). D'altra banda, la pèrdua d'estrès per fricció inherent a la isquèmia fa disminuir ràpidament els nivells de KLF2 endotelial que, com hem descrit anteriorment, és un factor de transcripció vasoprotector que regula l'expressió de gens relacionats amb la protecció vascular, com eNOS (vasodilatadora), trombosmodulina (antitrombòtica) i Nrf2 (antioxidant) (15,32–35). Així doncs, les LSEC esdevenen pro-inflamatòries, pro-trombòtiques i vasoconstrictores. Tots aquests efectes de la isquèmia condicionen la protecció de les cèl·lules hepàtiques davant la posterior reperfusió.

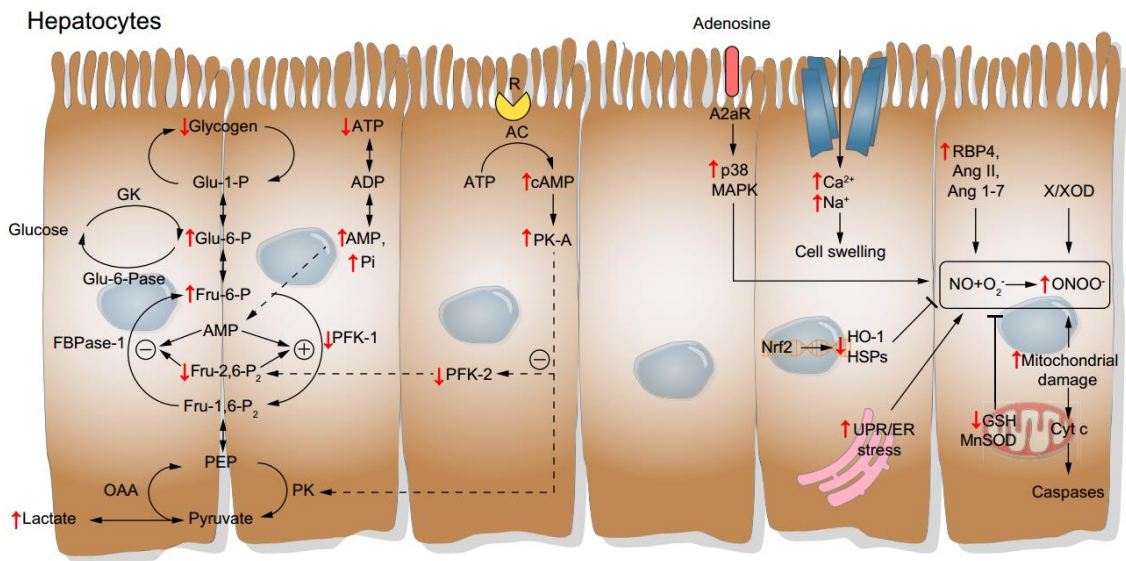


Figura 5. Desregulacions del fenotip hepatocitari a causa del dany per isquèmia i reperfusió. Adaptat de "Peralta, Jiménez-Castro & Gracia-Sancho. 2013, *Journal of Hepatology*".

2.5.2. Reperfusió

En etapes inicials de la reperfusió (2h), l'entrada sobtada d'oxigen incrementa dramàticament la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (92) a causa de les alteracions ocorregudes durant la isquèmia (increment de l'activitat xantina oxidasa, alteració de la cadena de transport d'electrons). L'anió O_2^- , que és el principal radical lliure produït, reacciona amb l'NO formant $ONOO^-$, que modifica tot tipus de molècules (proteïnes, àcids nucleics i lípids) i promou la secreció de mediadors pro-inflamatoris (interleucines, factor de necrosi tumoral (TNF)- α , factor d'activació plaquetària (PAF)) (93,94). A més a més dels efectes directes d'aquestes ROS sobre l'estrès oxidatiu cel·lular, els alts nivells de O_2^- deplecionen gran part de l'NO disponible en la reacció de formació de $ONOO^-$.

(95,96), contribuint així a la disfunció microvascular, ja condicionada durant la isquèmia per la davallada de KLF2.

A temps més avançats de reperfusió (6-24h), però, els mecanismes principals de dany hepàtic passen a ser mediats per la inflamació. Els danys a les KC activen la producció de citocines inflamatòries (IL-1, IL-2, TNF- α , interferó (IFN)- γ) (97,98). Aquestes citocines amplifiquen la resposta inflamatòria de l'endoteli, el qual expressa molècules d'adhesió cel·lular (ICAM-1, VCAM-1, E i P-selectina) i indueixen el reclutament i l'activació de neutròfils (3,99,100). Aquests extravasaran gràcies a la interacció de les seves integrines a les molècules d'adhesió endotelials, agreujant el dany hepàtic.

L'endoteli hepàtic és molt susceptible al dany per I/R, sobretot quan es tracta d'isquèmia freda, de manera que fins a un 50% de les LSEC mor durant aquest procés (101–104). Les obertures creades a la paret del sinusoides per la mort endotelial permeten el contacte directe dels neutròfils amb el parènquima, exacerbant encara més l'extravasació de neutròfils i l'alliberació dels seus enzims citotòxics (105). Per altra banda, l'edema i la mort endotelials, juntament amb l'agregació plaquetària i la depleció/manca de síntesi d'NO i l'increment en la síntesi d'endotelina-I i tromboxà A₂ provoquen la reducció del diàmetre sinusoidal, alterant encara més la reperfusió del fetge (3,106) (Figura 6). Actualment està àmpliament reconegut que el dany endotelial és el primer factor en ocórrer en el desenvolupament de la fallida hepàtica post-cirurgia (101,107). De fet, estudis del nostre grup focalitzats a la preservació de l'endoteli han demostrat que el manteniment de l'expressió de KLF2 i els seus gens diana amb simvastatina millora la microcirculació hepàtica i confereix protecció a tot l'empelt (41,43,45). Tanmateix, els mecanismes moleculars pels quals la simvastatina manté els nivells de KLF2 encara no es coneixen amb certesa.

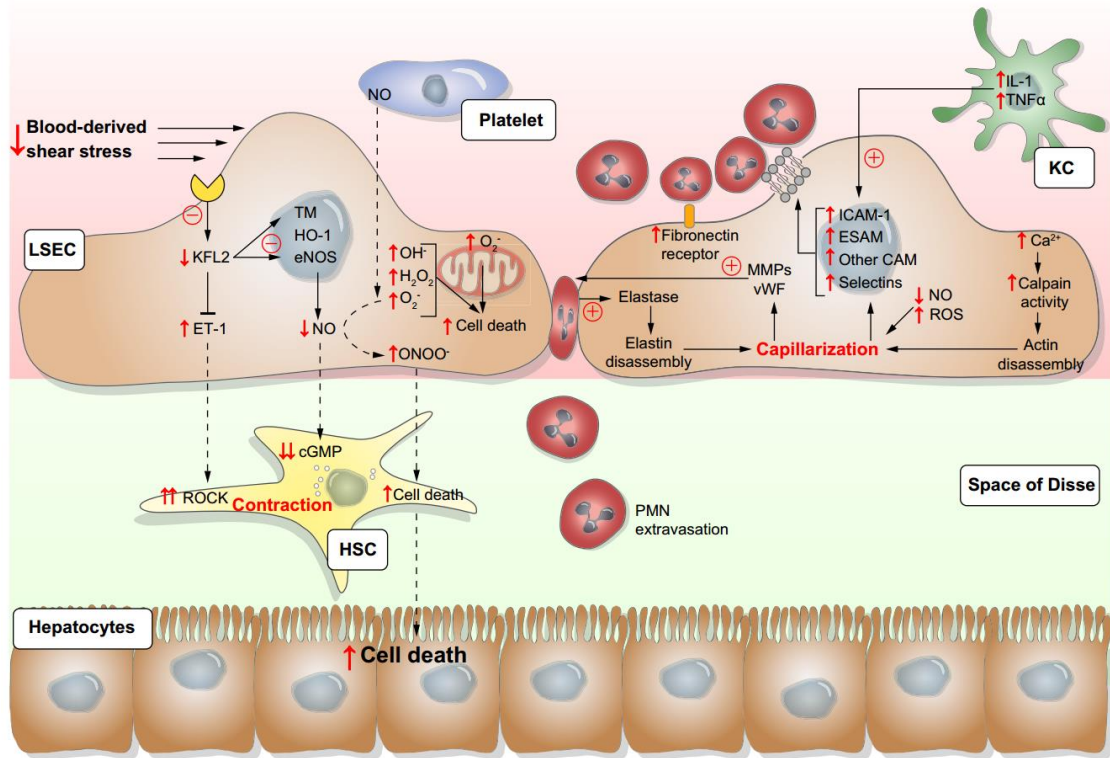


Figura 6. Desregulacions de les cèl·lules sinusoidals a causa del dany per isquèmia i reperfusió. Adaptat de “Peralta, Jiménez-Castro & Gracia-Sancho. 2013, *Journal of Hepatology*”. ESAM: molècula d’adhesió específica d’endoteli; ET-1: endotelina-1; MMP: metal·loproteïnasa de la matriu; PMN: cèl·lules polimorfonuclears; ROCK: quinasa de Rho; TM: trombomodulina; vWF: factor de von Willebrand.

2.6. Autofàgia

L’autofàgia és un procés de degradació intracel·lular amb dues finalitats principals; l’una és eliminar substàncies nocives, com orgànuls disfuncionals o agregats proteics altrament no degradables al proteasoma per la seva mida, i l’altra, obtenir energia a partir dels productes de degradació. Es tracta d’un procés constitutiu, normalment associat a la supervivència cel·lular, que es pot sobre-activar en resposta a estrès (108,109).

Existeixen tres subtipus d’autofàgia diferents i, tot i que tots ells tenen en comú la degradació lisosomal de substàncies intracel·lulars, difereixen en la manera com aquestes s’hi incorporen:

Per una banda, l’autofàgia mediada per xaperones consisteix en l’entrada dirigida de proteïnes al lisosoma mitjançant canals proteics (110), mentre que la microautofàgia es caracteritza per la incorporació de substàncies directament al

lisosoma per mitjà d'invaginacions de la membrana lisosomal de manera constitutiva (111). Per últim, el tipus més rellevant d'autofàgia és la macroautofàgia (a partir d'aquí anomenada directament "autofàgia"). Aquesta consta de diverses etapes que permetran l'embolcallament de les substàncies a degradar en una estructura de doble membrana lipídica anomenada autofagosoma, la qual s'acabarà fusionant amb el lisosoma (109). Aquest últim tipus d'autofàgia és el més estudiat i complex, regulat per les vies metabòliques i de senyalització cel·lulars principals, com la proliferació (112), diferents tipus d'estrès (113,114) i la mort cel·lular (115–117). Les seves etapes es detallen a continuació.

2.6.1. Iniciació de l'autofàgia

Com a procés de reciclatge, manteniment de l'homeòstasi cel·lular i d'obtenció d'energia, entre d'altres, l'autofàgia es troba activada constitutivament, tot i que és ràpidament modulable en resposta a nutrients, oxigen o estrès a través de diverses vies moleculars. En resposta a manca de nutrients, la via de la quinasa de fetge B1 (LKB1) – proteïna-quinasa activada per AMP (AMPK) es reactiva (118), mentre que la manca d'insulina desactiva la via de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) de classe I – proteïna kinasa B (Akt), la qual cosa comporta la desactivació d'mTORC1 (de l'anglès, *mammal target of rapamycin complex 1*), inhibidor de l'autofàgia (112,119,120). Això afavoreix l'activació per fosforilació del complex d'iniciació de l'autofàgia d'unc-51-like kinase 1 (ULK1) (117,118,121).

Per altra banda, l'estrès per manca de nutrients promou la dissociació del complex Beclin-1 – Bcl2 (117). Així, Beclin-1 passa a formar part del complex de Vps34 (PI3K de classe III), que activat pel complex ULK1 afavorirà la formació de l'omegasoma, una estructura precursora de l'autofagosoma (anomenada així per la forma de falç que recorda a la lletra omega de l'alfabet grec) a partir del reticle endoplasmàtic.

En resum, l'autofàgia s'inicia principalment per inhibició d'mTORC, que desencadena la formació de l'omegasoma per mitjà del complex Vps34. És per això que un dels activadors de l'autofàgia més emprats és la rapamicina, inhibidor d'mTOR (122–124), mentre que l'inhibidor de la formació de

l'autofagosoma més comú és la 3-metiladenina, inhibidor de la PI3K de classe III (Vps34) (114,125).

2.6.2. Elongació de l'autofagosoma

Un cop iniciada la formació de l'autofagosoma, aquest pateix un procés d'elongació i maduració per tal de tancar-se al voltant d'allò que s'ha de degradar. Aquest procés es caracteritza per la incorporació de la proteïna LC3 a la membrana de l'autofagosoma. Per a què això passi, la proteïna pro-LC3 ha de madurar primer per acció d'*autophagy-related protein* (Atg)4 a LC3-I, que és la forma soluble d'aquesta proteïna (109) i, seguidament, a LC3-II per acció d'un complex format per Atg12, Atg5 i Atg16L1 (126,127). Aquesta darrera modificació d'LC3 consisteix en l'addició d'una cadena lipídica, de manera que LC3-II passa a associar-se a la membrana de l'autofagosoma, on interaccionarà directament amb complexos de degradació com els que forma la proteïna p62 per a dirigir les diferents substàncies cap a l'autofagosoma (108,128). LC3-II, per tant, es troba associat als autofagosomes des d'etapes inicials fins el final del procés autofàgic, essent així el marcador d'autofagosomes més consolidat (108,128). De fet, LC3-II és essencial per al funcionament de l'autofàgia, de manera que els models animals deficients en autofàgia més emprats són *knockouts* per a les diverses Atg que permeten la seva maduració (129,130).

2.6.3. Fusió i flux autofàgic

Com s'ha comentat anteriorment, l'etapa final de l'autofàgia consisteix en la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma, degradant-se així el contingut d'aquell, eliminant així les substàncies danyades i potencialment perilloses per a la cèl·lula i alhora descomponent-les en molècules que serviran com a matèria prima per a la síntesi de molècules noves o per a l'obtenció d'energia, principalment aminoàcids i lípids.

En aquest procés de fusió hi intervé la GTPasa *Ras-related protein* (Rab)7, ubicada a les membranes lisosomal i endosomal, la qual s'uneix directament amb LC3-II quan està activada, permetent així la unió entre ambdós compartiments (lisosoma i autofagosoma) i la culminació de la degradació autofàgica (131).

Com que els productes resultants de l'autòfàgia són substàncies ja presents al citoplasma (aminoàcids o lípids), es fa molt difícil determinar els nivells d'autòfàgia monitoritzant els seus productes finals. És per això que la mesura més emprada en l'estudi de l'autòfàgia és l'avaluació dels nivells d'autofagosomes. Tanmateix, el nombre d'autofagosomes pot variar per un augment en la producció d'aquests o per una inhibició en la degradació, com passa en algunes patologies hepàtiques, com per exemple l'hepatitis vírica (129,132,133). Per tal de poder determinar amb més precisió el *flux autofàgic* (l'activació o inhibició real de l'autòfàgia en un determinat moment), una de les aproximacions més acurades és l'estimació d'aquest flux com l'increment en la quantitat d'autofagosomes després d'inhibir la seva fusió amb inhibidors lisosomals, com cloroquina o bafilomicina (108,128).

$$\text{Flux autofàgic} = \text{Autofagosomes}_{(+ \text{inhibidors})} - \text{Autofagosomes}_{(- \text{inhibidors})}$$

Totes aquestes etapes de l'autòfàgia estan representades a la Figura 7.

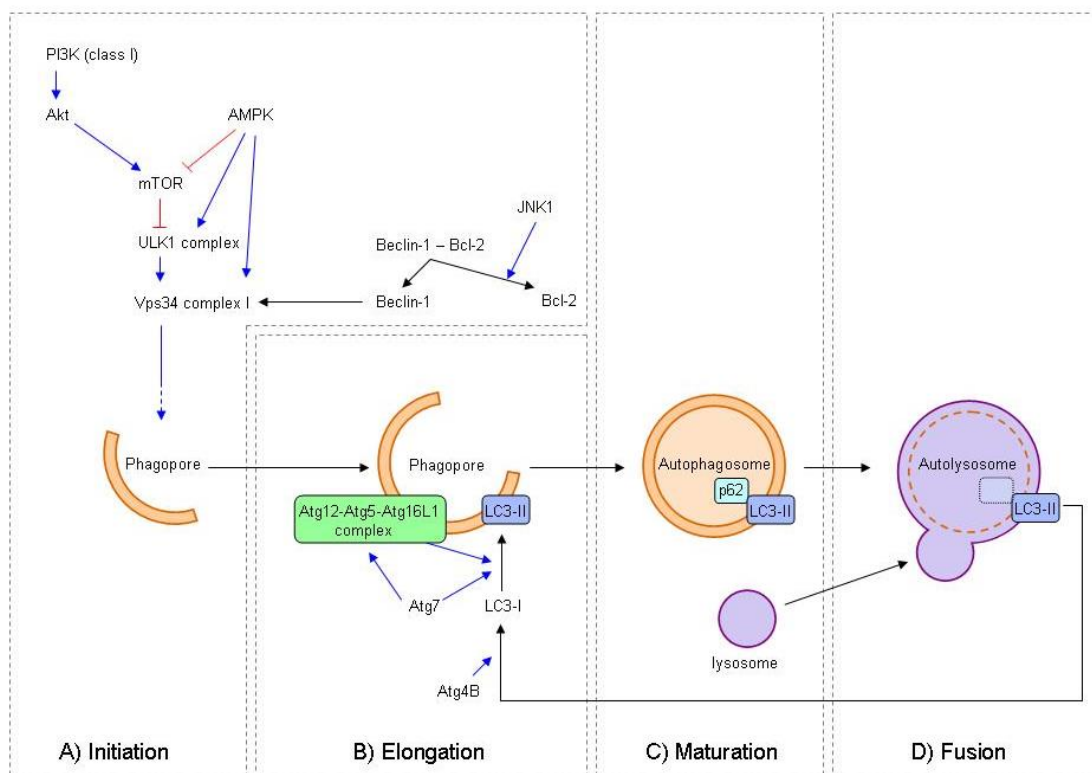


Figura 7. Regulació de l'autòfàgia. Adaptat de "Gracia-Sancho, Guixé-Muntet, Hide & Bosch. 2014, *Expert Opinion on Investigational Drugs*".

2.6.4. Autofàgia hepàtica

Com que l'autofàgia s'associa a la supervivència cel·lular en resposta a diversos tipus d'estrès, s'ha estudiat en les principals malalties hepàtiques (114,134). Per exemple, s'ha descrit que en condicions d'esteatosi i resistència a la insulina, l'autofàgia es troba inhibida, impedit la degradació de gotes lipídiques i empitjorant encara més la malaltia (114,135,136). En canvi, la degradació de gotes lipídiques a les cèl·lules estrellades representa un mecanisme d'obtenció de l'energia necessària per a la seva activació, jugant així un paper pro-fibrogènic a la cèl·lula estrellada (28,27).

Tot i el recent interès en l'estudi de l'autofàgia hepàtica, la dificultat en el seu anàlisi (sobretot *in vivo*) fa que sovint no hi hagi consens sobre el seu grau d'activació i el seu rol en algunes malalties hepàtiques. N'és el cas del dany per isquèmia i reperfusió, on diferents investigadors descriuen activació o inhibició de l'autofàgia depenent del tipus d'isquèmia (freda o calenta) o de la solució de preservació emprada (43,137–141). Tanmateix, la majoria d'aquests estudis s'ha realitzat *in vivo*, essent molt difícil el càlcul acurat del flux autofàgic, mentre que aquells treballs on s'han realitzat anàlisis *in vitro* només han estudiat l'autofàgia a l'hepatòcit, obviant la seva activació o efectes a la microvasculatura, essencial per a entendre el dany per isquèmia i reperfusió. En aquest sentit, hi ha estudis que descriuen que l'autofàgia és necessària per a que l'endoteli respongui a l'estrès per fricció (142,143), mentre que d'altres suggereixen que la simvastatina o el resveratrol, activadors de KLF2, també ho serien de l'autofàgia (144,145), encara que cap d'aquests estudis n'ha estudiat la relació amb KLF2 ni amb la isquèmia i la reperfusió de l'endoteli hepàtic.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

El sinusoides hepàtic és un llit vascular molt especialitzat. La comunicació autocrina i paracrina entre tots els tipus cel·lulars regula els processos d'inflamació, trombosi i el remodelat tissular i determina la correcta modulació del to vascular hepàtic (7).

El dany hepàtic crònic, causat principalment pel consum abusiu d'alcohol, les hepatitis víriques o l'esteatosi altera el fenotip de les cèl·lules sinusoidals, esdevenint pro-trombòtiques, pro-inflamatòries, pro-contràctils i pro-fibròtiques, incrementant la resistència vascular intrahepàtica (1,2). L'elevada resistència provoca l'increment de la pressió portal que desencadena la resta de complicacions clíniques de la cirrosi (54,57).

Tot i que els nous tractaments antivirals i el canvi d'estil de vida per hàbits més saludables eliminen l'agent causant de la cirrosi, en etapes avançades de la malaltia això no és suficient per a la seva regressió. Actualment, els únics tractaments aplicats a la pràctica clínica (β -bloquejadors) són vasoconstrictors sistèmics dirigits a pal·liar l'increment de flux del síndrome hiperdinàmic (62). Tanmateix, els tractaments enfocats a la protecció de les cèl·lules sinusoidals i a la reducció de la resistència vascular intrahepàtica serien l'alternativa farmacològica idònia per tal de corregir les alteracions principals ocorregudes durant la malaltia hepàtica crònica.

D'altra banda, l'única alternativa possible en etapes terminals de la cirrosi és el trasplantament hepàtic (81). Després del procés quirúrgic, però, el fetge pateix els danys per I/R, que condicionen greument l'estat de l'endoteli i de la resta de cèl·lules hepàtiques, essent causa de disfunció primerenca i fallida hepàtica (82). Estudis recents del nostre grup en models animals d'isquèmia freda i reperfusió calenta han demostrat que la preservació del fenotip i la viabilitat de l'endoteli amb simvastatina corregeix la disfunció microvascular i millora la viabilitat de tot l'òrgan (41,43,45). L'autofàgia, un procés de reciclatge de components intracel·lulars relacionada amb l'homeòstasi i la supervivència cel·lulars i induïble amb simvastatina (145), podria tenir un rol protector durant la isquèmia i la reperfusió.

Amb aquests antecedents, els objectius dels estudis de la present tesi doctoral han estat els següents:

3.1. Estudi 1

Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: Evidence from translational studies.

Com hem exposat a la introducció d'aquesta tesi, les HSC tenen un paper dual en l'increment de la resistència vascular intrahepàtica, ja que regulen tant el seu component dinàmic (vasoconstricció) com l'estructural (producció de fibra) (60,61).

La liraglutida és un anàleg de la hormona incretina GLP-1. Està aprovada per a l'ús humà i és emprada en el tractament de la diabetis de tipus II. Estudis previs han demostrat els efectes antiinflamatoris d'aquest fàrmac en la malaltia de fetge gras d'origen no alcohòlic (NAFLD) (79,80,146). Com que la inflamació és un factor implicat en l'inici i la progressió de la cirrosi hepàtica (147), la liraglutida podria tenir efectes protectors en aquest context, essent un fàrmac ràpidament aplicable a la pràctica clínica. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi ha estat avaluar els efectes de la liraglutida sobre el fenotip de les HSC, la funció microvascular i els seus efectes derivats en models pre-clínics de malaltia hepàtica crònica.

3.2. Estudi 2

Cross-talk between autophagy and KLF2 determines endothelial cell phenotype and microvascular function in acutely injured rat livers.

L'estudi de l'autofàgia ha cobrat interès recentment a causa del seu rol protector. El fet de ser un mecanisme implicat en la prevenció del dany cel·lular que comparteix regulació amb vies de proliferació (mTOR) (112) i mort cel·lular (Bcl2 – Beclin-1) (115–117) i regulable pels nivells de nutrients fa que estigui implicada en la majoria de malalties hepàtiques (134,148). Tanmateix, hi ha controvèrsia en el rol que desenvolupa durant la I/R, on diferents investigadors en descriuen efectes oposats segons el tipus d'isquèmia o la solució de preservació emprada (43,137–141). A més a més, cap d'aquests estudis avalua l'autofàgia a l'endoteli

sinusoïdal durant aquests processos. Amb aquests antecedents i tenint en compte que l'autofàgia és induïble amb l'activador de KLF2 simvastatina (145), els objectius d'aquest estudi van ser 1) caracteritzar la possible interrelació entre l'autofàgia i KLF2 a l'endoteli, 2) definir l'autofàgia endotelial en el context d'I/R hepàtica i 3) modular l'autofàgia hepàtica *in vitro* i *ex vivo* per a corregir els efectes negatius de la I/R.

4. CÒPIA DELS ARTICLES ORIGINALS

4.1. Estudi 1

LIRAGLUTIDE IMPROVES LIVER MICROVASCULAR DYSFUNCTION IN CIRRHOSIS: EVIDENCE FROM TRANSLATIONAL STUDIES.

Fernanda Cristina de Mesquita*, **Sergi Guixé-Muntet***, Anabel Fernández-Iglesias*, Raquel Maeso-Díaz, Sergi Vila, Diana Hide, Martí Ortega-Ribera, José Luís Rosa, Juan Carlos García-Pagán, Jaime Bosch, Jarbas Rodrigues de Oliveira#, Jordi Gracia-Sancho#

Nature Scientific Reports. 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-02866-y

IF: 5,28

* co-primer autors

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: Evidence from translational studies

Fernanda Cristina de Mesquita^{1,3}, Sergi Guixé-Muntet^{1,2}, Anabel Fernández-Iglesias¹, Raquel Maeso-Díaz¹, Sergi Vila¹, Diana Hide¹, Martí Ortega-Ribera¹, José Luís Rosa⁴, Juan Carlos García-Pagán^{1,2}, Jaime Bosch^{1,2}, Jarbas Rodrigues de Oliveira³ & Jordi Gracia-Sancho¹

Hepatic stellate cells (HSC) play a key role in the development of chronic liver disease (CLD). Liraglutide, well-established in type 2 diabetes, showed anti-inflammatory and anti-oxidant properties. We evaluated the effects of liraglutide on HSC phenotype and hepatic microvascular function using diverse pre-clinical models of CLD. Human and rat HSC were *in vitro* treated with liraglutide, or vehicle, and their phenotype, viability and proliferation were evaluated. In addition, liraglutide or vehicle was administered to rats with CLD. Liver microvascular function, fibrosis, HSC phenotype and sinusoidal endothelial phenotype were determined. Additionally, the effects of liraglutide on HSC phenotype were analysed in human precision-cut liver slices. Liraglutide markedly improved HSC phenotype and diminished cell proliferation. Cirrhotic rats receiving liraglutide exhibited significantly improved liver microvascular function, as evidenced by lower portal pressure, improved intrahepatic vascular resistance, and marked ameliorations in fibrosis, HSC phenotype and endothelial function. The anti-fibrotic effects of liraglutide were confirmed in human liver tissue and, although requiring further investigation, its underlying molecular mechanisms suggested a GLP1-R-independent and NF- κ B-Sox9-dependent one. This study demonstrates for the first time that Liraglutide improves the liver sinusoidal milieu in pre-clinical models of cirrhosis, encouraging its clinical evaluation in the treatment of chronic liver disease.

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists (GLP-1RA) are a new class of anti-diabetic medications that mimic the effects of incretin hormones¹. As an incretin hormone, which is synthesized in response to food intake, GLP-1 can stimulate insulin release by pancreatic β -cells in a glucose-dependent manner and suppress glucagon secretion from α -cells². The favourable actions of GLP-1 on glucose homeostasis are mediated through GLP-1 receptors. However, native GLP-1 is rapidly degraded in circulation³. Liraglutide, a synthetic GLP-1RA that shares 97% homology with the structure of human GLP-1, possesses a much longer circulating half-life, thereby making it a novel anti-diabetic drug suitable for once-daily injection¹. Apart from the pancreatic islets, GLP-1 receptors are present in many other tissues and, although its expression within the liver is not clear^{4,5}, recent studies demonstrated efficacy of GLP-1RA in liver diseases, such as NAFLD^{6,7}. In this regard, studies showed other beneficial properties for this type of drugs, including anti-inflammatory and anti-oxidant^{8,9}, which are also important for the resolution of chronic liver disease (CLD).

Cirrhosis is the end stage of CLD that starts with deregulations in the phenotype of all hepatic cells leading to parenchymal and sinusoidal dysfunction¹⁰. In CLD, both architectural alterations of the liver parenchyma and

¹Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab, IDIBAPS Biomedical Research Institute - CIBEREHD, Barcelona, Spain. ²University of Barcelona Medical School, Barcelona, Spain. ³Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, PUCRS, Porto, Alegre-RS, Brazil. ⁴Departament de Ciències Fisiològiques, IDIBELL, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Fernanda Cristina de Mesquita, Sergi Guixé-Muntet and Anabel Fernández-Iglesias contributed equally and share first authorship. Jarbas Rodrigues de Oliveira and Jordi Gracia-Sancho co-last authors. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G. (email: jordi.gracia@idibaps.org)

Received: 1 March 2017

Accepted: 19 April 2017

Published: xx xx xxxx

sinusoidal microvascular dysfunction contribute to the development of portal hypertension¹¹. Architectural distortion of the cirrhotic liver is mainly due to excessive synthesis and deposition of extracellular matrix performed by deregulated fibrogenic cells mainly hepatic stellate cells (HSC)¹². Indeed, in response to liver injury, HSC gradually transdifferentiate to an activated α -SMA-positive phenotype with extensive proliferation, and high vasoconstrictive and pro-inflammatory properties^{13,14}. It is widely accepted that activation of HSC is a key factor in the pathogenesis of liver fibrosis, CLD and portal hypertension¹⁵. Moreover, an intimate crosstalk between HSC and other sinusoidal cells further contribute to the development and aggravation of CLD¹⁶.

CLD may improve in response to injury cessation, blockade of pro-fibrogenic mediators or drug-induced HSC inactivation¹⁷. Unfortunately, current treatment options for CLD and its main complication portal hypertension are limited, and importantly there is no effective therapy available to efficiently ameliorate the hepatic microcirculation of CLD¹⁸. Therefore, novel therapeutic strategies based on EMA/FDA approved drugs with no systemic adverse effects are required to improve treatments for patients with CLD.

The primary purpose of the present study was to evaluate the effects of liraglutide on HSC phenotype, liver microvascular function and underlying mechanisms in pre-clinical models of CLD.

Results

Liraglutide improves the phenotype of Hepatic Stellate Cells. Effects of liraglutide on HSC phenotype were assessed in diverse pre-clinical models of CLD. After preliminary dose- and time-response experiments (Supplementary Fig. 1), we characterized liraglutide's effects promoting the de-activation of cirrhotic primary hHSC and in the prevention of activation of control primary hHSC undergoing 7-day plastic activation. Both conditions showed a marked down-regulation in the activation markers collagen I and α -SMA at a concentration of 50 μ M and after 72 h of treatment (Fig. 1A left and middle panels). The anti-fibrotic effects of liraglutide were further validated in human precision-cut liver slices (PCLS) (Fig. 1A right). In addition, the amelioration in hHSC phenotype in response to liraglutide was validated using a functional assay. As shown in Fig. 1B, liraglutide significantly prevented the contraction of primary hHSC.

The effects of liraglutide on activated HSC were further analyzed in LX-2, a widely-accepted human cell line mimicking activated HSC. These experiments indeed showed de-activation of LX-2 cells in response to liraglutide (Fig. 2A), which was associated with significant reductions in the pro-inflammatory and pro-fibrogenic markers TNF- α and TGF- β 1 (Fig. 2A).

Interestingly, LX-2 cells treated with liraglutide showed no significant changes in viability when compared to controls, as observed with the double staining with AO-PI (Fig. 2B). Contrarily, using two different analysis of cell proliferation, the trypan blue exclusion assay and the expression of the proliferative marker PDGFR β , we herein show the anti-proliferative effects of liraglutide in HSC (Fig. 2C), which were accompanied with a marked reduction in their contraction ability (Fig. 2D). Altogether, validating the global improvement in HSC phenotype in response to liraglutide.

Similar beneficial effects of liraglutide were observed in rat primary HSC (Supplementary Fig. 2).

Liraglutide improves HSC phenotype and portal hypertension in CLD-rats. The potential beneficial effects of liraglutide as a new therapeutic strategy to improve CLD and portal hypertension were also analyzed *in vivo*. After 15 days of treatment, CLD-rats treated with liraglutide displayed lower expression of α -SMA and PDGFR β (Fig. 3A), accompanied by reductions in extracellular matrix synthesis and deposition as demonstrated by diminished collagen expression and hepatic fibrosis (Fig. 3B). No significant differences in TIMPs and MMPs were observed, thus suggesting that the peak of fibrinolysis already occurred (Supplementary Fig. 3). No effects on HSC viability (desmin expression) were observed, thus supporting the results obtained *in vitro*. Additional analysis of HSC phenotype in cells freshly isolated from CLD-rats treated with liraglutide, or vehicle, confirmed the marked beneficial effects of the drug promoting HSC deactivation (Fig. 3C).

Possible beneficial effects of liraglutide on hepatic and systemic hemodynamic in CLD-rats were also analyzed. Table 1 shows the morphometric and hemodynamic data from these animals. As expected, CLD-rats treated with liraglutide exhibited a slight but significant reduction in body weight, which is in agreement with previous studies¹⁹. Importantly, liraglutide-treated animals showed significantly lower portal pressure than vehicle-treated animals (11.6 ± 0.8 vs. 9.3 ± 1.0 mmHg; -20% ; $p = 0.03$) without changes in portal blood flow, thus suggesting an improvement in the hepatic vascular resistance (9.5 ± 1.8 vs. 5.7 ± 1.3 mmHg·mL·min⁻¹·g⁻¹; -23% ; $p = 0.1$). No effects of liraglutide on systemic hemodynamic or biochemical tests were observed.

Intrahepatic microcirculatory amelioration in response to liraglutide was further confirmed analyzing the hepatic microvascular phenotype. Indeed, LSEC from animals receiving liraglutide showed a significant reversal in their capillarization, as suggested by marked increments in fenestrae frequency and porosity (Fig. 4A), and a trend to higher nitric oxide bioavailability (Fig. 4B). In addition, characterization of the hepatic microvascular function *ex vivo* confirmed the global sinusoidal improvement, as demonstrated by reduction in HVR (Table 1) and improved liver vascular response to incremental doses of acetylcholine (Fig. 4C).

Liraglutide has a complementary effect with simvastatin improving HSC. Treatment of LX-2 cells with liraglutide did not modify the expression of the simvastatin-inducible transcription factor KLF2 (Supplementary Fig. 4 left). However, LX-2 treated with liraglutide or simvastatin showed reduced levels of α -SMA in the same magnitude. Interestingly, when both drugs were combined further reduced α -SMA (Supplementary Fig. 4 right), altogether suggesting that liraglutide has a complementary effect to simvastatin improving the phenotype of activated HSC.

Liraglutide improves HSC phenotype and liver microcirculation probably through a GLP1-R independent mechanism. Analysis of GLP1-R expression in rat and human liver tissues and HSC showed

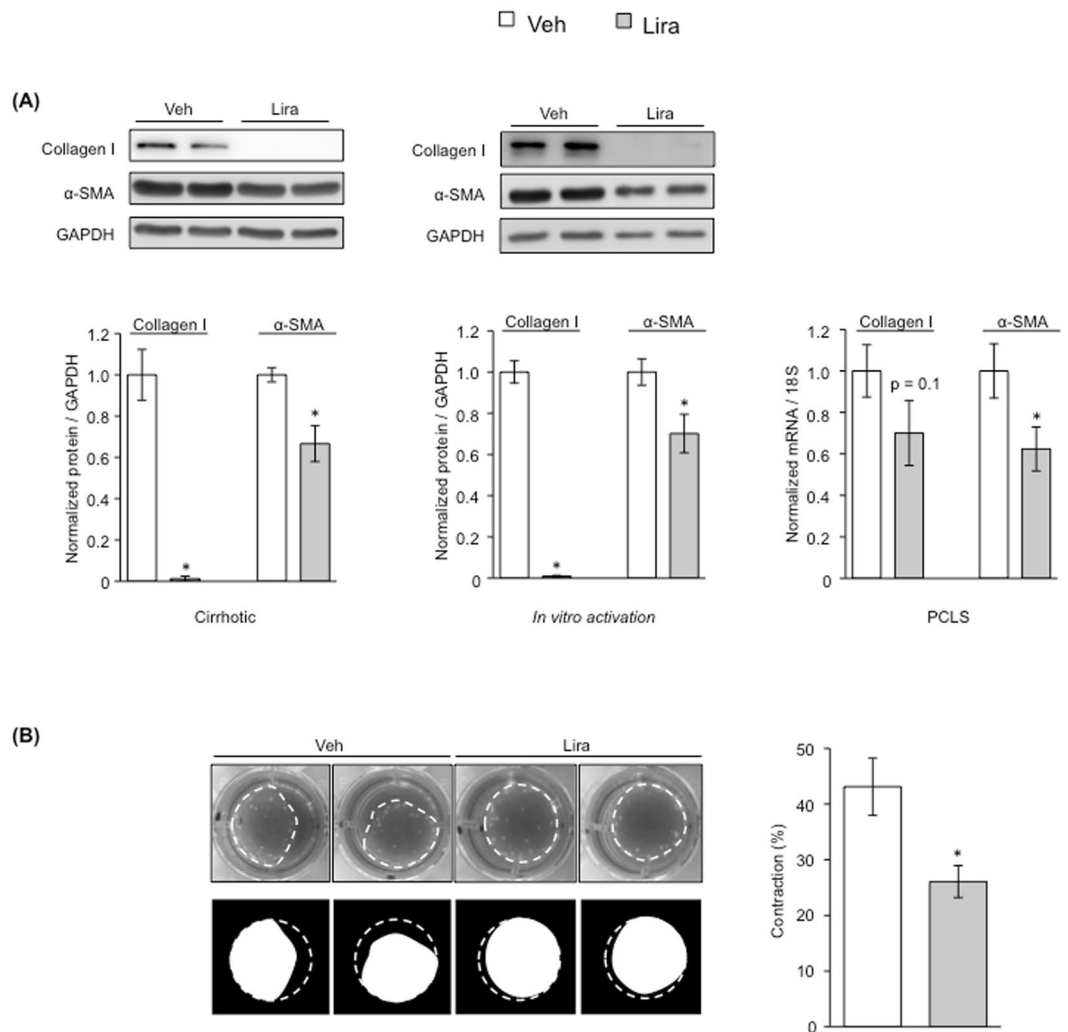


Figure 1. Amelioration of human primary HSC in response to liraglutide. **(A)** Expression of depicted proteins/genes after *in vitro* treatment with 50 μ M liraglutide or vehicle in: 1-HSC isolated from cirrhotic human livers (left), 2-quiescent human HSC undergoing *in vitro* activation (middle), and 3-human precision-cut liver slices (PCLS) (right). **(B)** Effects of liraglutide, or its vehicle, on the contraction of primary human HSC. $n = 3$ per experimental condition. * $p < 0.05$ vs. vehicle.

no detectable mRNA expression (Supplementary Fig. 5A), while a band corresponding to 53 kDa (predicted GLP-1R molecular weight) was only detected in LX-2 and barely present in cirrhotic and NASH human livers, but not in control human or rat livers (either control or cirrhotic) (Supplementary Fig. 5B). Accordingly, analysis of the GLP-1R secondary messenger PKA in rHSC and LX-2 treated with liraglutide did not show differences in its phosphorylation in comparison to cells treated with vehicle (Supplementary Fig. 5C), and incubation of LX-2 with the GLP-1R antagonist Exendin 9–39 did not affect the de-activation effects of liraglutide (Supplementary Fig. 5D). Oppositely, liraglutide did repress the NF- κ B molecular pathway (Supplementary Fig. 6).

Discussion

The major findings of the current study are that liraglutide promotes a marked amelioration in the phenotype of activated HSC, which in a pre-clinical model of chronic liver disease leads to significant improvement in portal hypertension and liver fibrosis. Importantly, the de-activating effects of liraglutide are herein demonstrated in human primary HSC and human liver tissue.

Liraglutide was developed as an anti-diabetic drug predictably acting on GLP-1R in pancreatic β -cells. Interestingly, different studies have demonstrated that these receptors may not be only limited to pancreatic β -cells. Considering the beneficial anti-inflammatory effects of GLP-1R agonists on cardiac fibrosis and NASH^{20–22}, we aimed the present study at analyzing the effects of liraglutide in chronic liver disease (CLD).

Liver cirrhosis is the end stage situation of CLD being the main triggering factor a complex multicellular response of all hepatic cells. Indeed, in front of a chronic injury both parenchymal and non-parenchymal cells undergo profound changes in their phenotype, becoming highly de-regulated and ultimately leading to fibrosis and microvascular dysfunction¹⁶. The most relevant clinical consequence of sinusoidal cells de-regulation is the

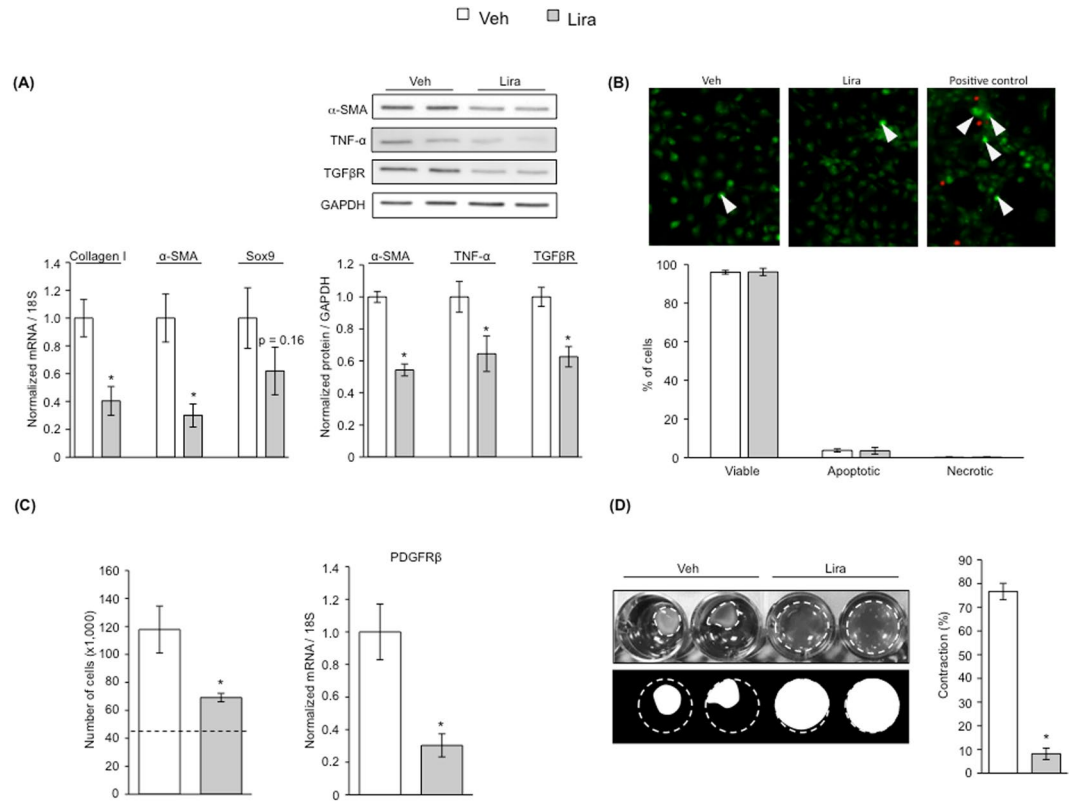


Figure 2. Underlying effects of HSC deactivation due to liraglutide. After 72 h of treatment with 50 μ M liraglutide, LX-2 cells were assessed for markers of HSC activation (A), cell viability by double staining with acridine orange (green dense nuclei: apoptosis, indicated by arrowheads) and propidium iodide (red cells: necrosis) (B), HSC proliferation assessed by cell counting and expression of the proliferative marker PDGFR β (C), and cell contraction (D). n = 3 per experimental condition. *p < 0.05 vs. vehicle.

development of portal hypertension, which derives both from pathological increases in intrahepatic vascular resistance and in portal blood flow. Considering the importance of HSC in CLD progression and aggravation, many studies focused on liver-specific drugs capable of inactivating the HSC, however few studies have advanced to the clinical stage²³.

Our study is the first showing that liraglutide is able to improve the phenotype of HSC. Indeed, we performed dose- and time-dependent experiments indicating that liraglutide de-activates HSC as demonstrated by reduced expression of α -SMA and collagen. Similarly, we observed prevention of HSC activation in response to liraglutide, therefore suggesting possible beneficial effects of the drug when administered at early stages of CLD. Importantly, we planned this study as a bed to bench-side one, and not vice versa, therefore firstly evaluating the effects of liraglutide in human primary HSC, to latterly use different preclinical models of CLD to further study the molecular mechanisms of such ameliorations.

Hepatic stellate cells are activated in response to different liver injuries, or due to paracrine factors, promoting tissue repair. Their response includes cell mobilization, proliferation, migration towards the lesion, and production of extracellular matrix components. When continuous liver injury occurs, HSC become chronically activated, acquire high expression of pro-inflammatory, pro-fibrogenic and proliferative markers like TNF- α , TGF β and PDGFR β , ultimately representing the main cell-type responsible for fibrosis deposition^{24, 25}. In the present study, we show that improvement in HSC phenotype in response to liraglutide was accompanied by marked reductions in the expression of these cytokines and proliferation markers, without affecting cell viability. Altogether suggesting that liraglutide promotes the de-activation of HSC, reduces their proliferation but does not induce cell apoptosis. Such anti-inflammatory effects, which are potentially optimal for the resolution of liver fibrosis *in vivo*, are quite different from previous studies showing concomitant de-activation and apoptosis/necrosis of HSC in response to certain therapeutic strategies²⁶⁻²⁸. Importantly, analysis of HSC was not limited to molecular markers, but also included the cell contraction functional assay, which further confirmed the global improvement of HSC phenotype in response to liraglutide.

Additionally, we tested the possible beneficial effects of liraglutide when administered to human liver tissue. Taking advantage of the precision cut liver slices technique, considered an excellent tool to analyze the effects of drugs within the liver²⁹, we observed marked reductions in the expression of α -SMA and collagen in response to liraglutide therefore corroborating the anti-fibrotic effects of the drug.

Once the phenotype of HSC was characterized *in vitro*, we studied the effects of a physiological-relevant dose of liraglutide administered *in vivo*. Liraglutide treatment markedly improved both HSC and LSEC phenotypes.

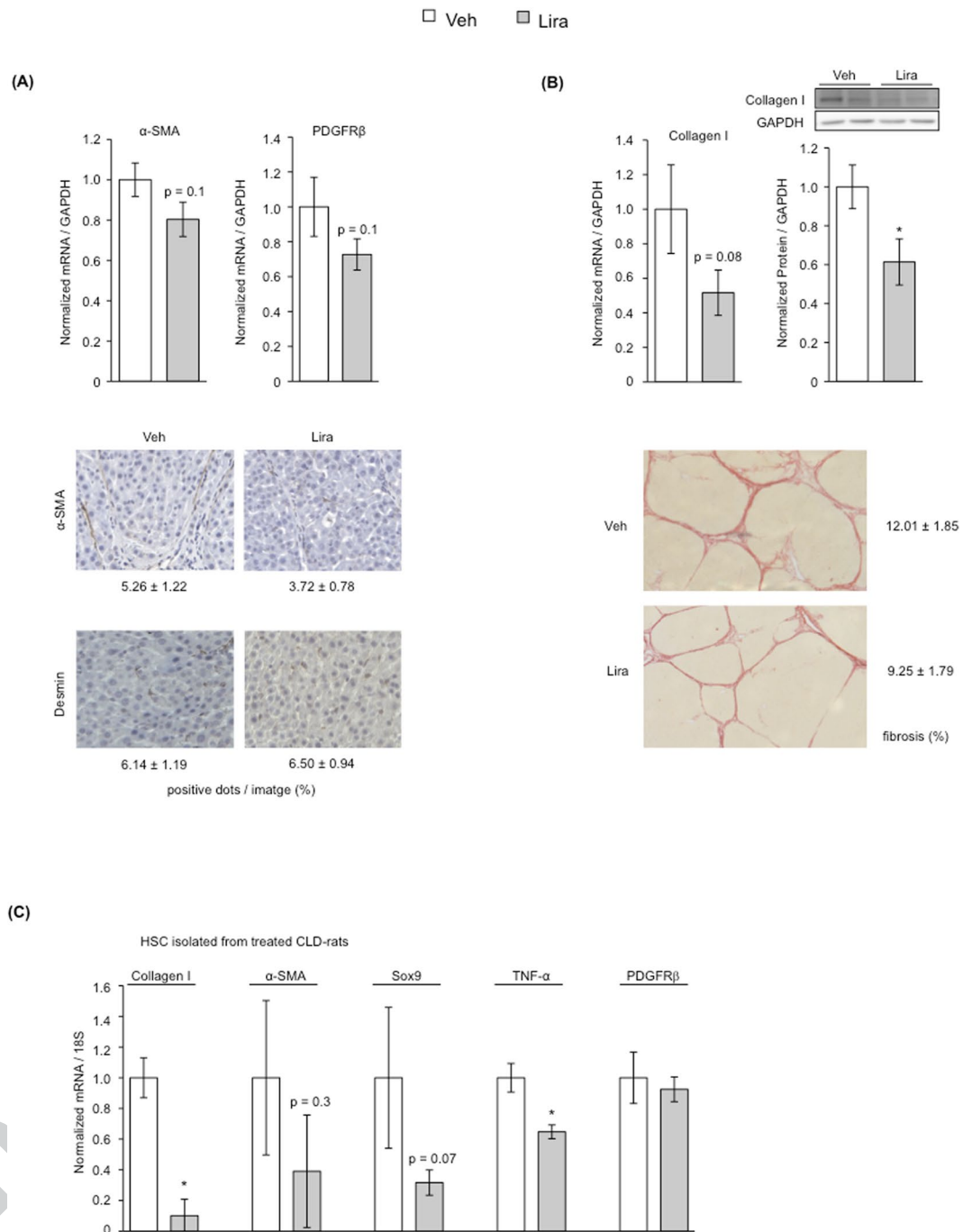


Figure 3. Analysis of HSC phenotype and liver fibrosis in CLD-rats treated with liraglutide. **(A)** Expression of HSC activation markers (α -SMA and PDGFR β) and Desmin in livers from TAA-CLD-rats treated for 15 days with liraglutide or vehicle. **(B)** Analysis of hepatic fibrosis in rats described in A (collagen I expression and Sirius Red staining). **(C)** Analysis of the phenotype of HSC freshly isolated from rats described in (a). * $p < 0.05$ vs. vehicle. $n = 8$ (A and B) and $n = 3$ (C) per group. Results are indicated as mean \pm s.e.m.

In fact, HSC activation markers collagen I, α -SMA and PDGFR β were reduced in CLD rats receiving liraglutide, which was accompanied by amelioration in LSEC fenestrae and NO bioavailability. Although we herein demonstrate direct action of liraglutide on HSC, we do not rule out possible paracrine interactions between both sinusoidal cell types in response to the drug^{16,30}. Importantly, global improvement in the sinusoidal phenotype led to regression of liver fibrosis, and to significant amelioration in the hepatic microvascular dysfunction. Indeed, liraglutide was able to reduce the PP in rats with CLD and portal hypertension. Such improvement in hepatic hemodynamics was mostly due to a significant improvement in the intrahepatic microvascular dysfunction, as demonstrated by the estimations of the *in vivo* and *ex vivo* HVR, and the analysis of the *ex vivo*

| | Vehicle n = 11 | Liraglutide n = 11 | p value |
|---|-------------------|-----------------------|---------|
| PP (mmHg) | 11.6 ± 0.8 | 9.3 ± 1.0 | 0.03 |
| MAP (mmHg) | 99.5 ± 7.2 | 89.9 ± 7.1 | 0.4 |
| PBF (mL/min) | 11.9 ± 1.0 | 11.5 ± 2.3 | 0.5 |
| HVR (mmHg·min·mL ⁻¹ ·g ⁻¹) | 9.5 ± 1.8 | 5.7 ± 1.3 | 0.1 |
| <i>ex vivo</i> HVR (mmHg·min·mL ⁻¹ ·g ⁻¹) | 1.6 ± 0.3 | 0.9 ± 0.04 | 0.07 |
| Body weight pre-treatment (g) | 289 ± 12 | 288 ± 7 | 0.5 |
| Body weight post-treatment (g) | 310 ± 9 | 274 ± 9 | 0.03 |
| Liver weight (g) | 8.4 ± 0.7 | 6.7 ± 0.4 | 0.1 |
| AST (U/L) | 105 ± 14 | 126 ± 14 | 0.3 |
| ALT (U/L) | 61 ± 10 | 67 ± 4 | 0.5 |
| Albumin (g/L) | 15.3 ± 1.3 | 16.3 ± 0.5 | 0.5 |
| Cholesterol (mg/dL) | 54.0 ± 8.3 | 44.6 ± 5.8 | 0.4 |
| TG (mg/dL) | 31.2 ± 5.6 | 26.8 ± 3.4 | 0.5 |
| FFA (μmol/L) | 506 ± 66 | 477 ± 55 | 0.7 |

Table 1. Effects of Liraglutide on hepatic and systemic hemodynamic, and biochemical parameters in rats with chronic liver disease due to chronic TAA administration, represented as mean ± s.e.m. PP, portal pressure; MAP, mean arterial pressure; PBF, portal blood flow; HVR, hepatic vascular resistance; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; TG, triglycerides; FFA, free fatty acids.

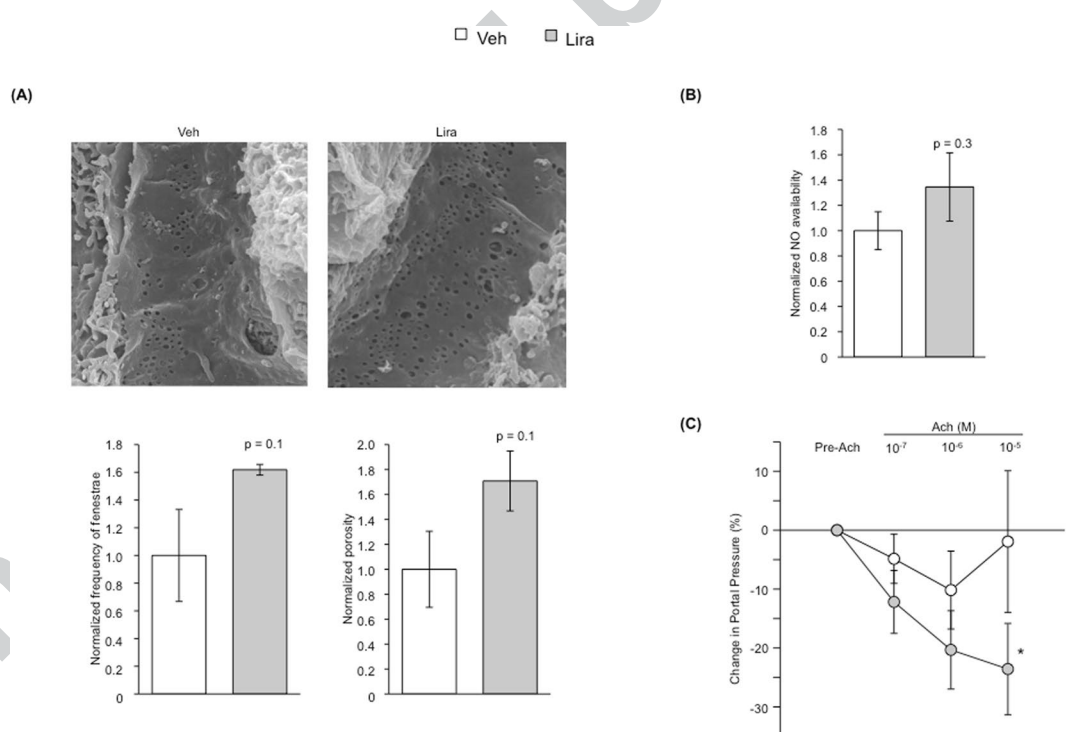


Figure 4. Effects of liraglutide on hepatic endothelial phenotype and microvascular function. **(A)** Liver sinusoidal fenestrae analysis by means of frequency (no. fenestrae/cell area) and porosity (fenestrae area/cell area) in TAA-CLD-rats treated with liraglutide or vehicle. **(B)** Hepatic nitric oxide (NO) bioavailability in rats described in A. **(C)** Hepatic microvascular function, calculated as the decrease in portal pressure in response to increasing doses of the endothelium-dependent vasodilator acetylcholine after vasoconstriction with methoxamine. *p < 0.05 vs. vehicle. n = 3 (A), n = 8 (B) and n = 5 (C) per group.

vasodilatory capacity in response to incremental doses of acetylcholine. Importantly, liraglutide did not affect systemic hemodynamics.

We next ascertained which could be the molecular pathway underlying liraglutide effects on HSC, and consequently on liver microcirculation and fibrosis. First, and considering that liraglutide was formulated to act on GLP-1 receptor, we analyzed the expression of this receptor both in HSC isolated from rat and humans, and also in liver tissues. Surprisingly, GLP-1R mRNA was not detected in whole liver homogenates, primary HSC

or LX-2 cells using two different Taqman probes with PCR reactions going up to 60 cycles. At the protein level, western blot of hepatic samples using an antibody against GLP-1R showed signal in LX-2 lysates at the predicted GLP-1R molecular weight, but this signal was barely present in cirrhotic and NASH human tissue, while it was not detected in control human livers or rat liver tissue (either control or cirrhotic). These observations suggest that the beneficial effects of liraglutide in rat HSC and its effects *in vivo* would not be dependent on GLP-1R. Previous reports already showed contradictory results in terms of GLP-1R expression within the liver^{4,5}, and we are not totally convinced that the band detected by the antibody in human samples really corresponds to GLP-1R (as it is contradictory to the two specific mRNA TaqMan probes). In agreement, additional experiments showed lack of protein kinase A phosphorylation (marker of GLP-1R activation)^{31,32} in response to liraglutide, and no differences in liraglutide-mediated HSC de-activation and proliferation when an antagonist of GLP-1R was used. Secondly, we analyzed the expression of the transcription factor Kruppel-like factor 2 (KLF2) in response to liraglutide since the effects of liraglutide on HSC were quite similar to those previously observed using statins^{26,33–35}. These experiments showed no up-regulation in response to the drug, moreover a synergistic effect of liraglutide and simvastatin de-activating HSC was observed, thus suggesting that they act by different pathways and could be used in combination at the bedside. Lastly, we evaluated the NF- κ B molecular pathway, which plays a major role in liver fibrosis³⁶ and is inhibited by liraglutide in the endothelium³⁷. Interestingly, liraglutide down-regulated the expression of NF- κ B, and also of its target gene Sox9.

With these results we cannot delineate the exact molecular mechanism driving liraglutide's beneficial effects, and represents a limitation of the study. Nevertheless, considering the main role of NF- κ B and Sox9 modulating HSC phenotype^{38,39}, and the findings described above, we herein suggest that in the specific scenario of CLD liraglutide may improve HSC phenotype and liver microcirculation through a GLP-1R independent mechanism, being the NF- κ B–Sox9 pathway a solid candidate to mediate, at least in part, these effects. Desirable future experiments, out of the scope of the present study, will clarify the specific receptor and the molecular mechanisms that mediate the beneficial effects of this drug in chronic liver disease.

In conclusion, the present study describes the anti-fibrotic effects of liraglutide both in rodent and, importantly, human pre-clinical models of chronic liver disease, therefore encouraging its application at the bedside as new therapeutic tool to improve cirrhosis and portal hypertension. Moreover, the potential results of the LEAN trial opens the possibility to use liraglutide not only to improve mild NASH⁷, but promote regression of advanced chronic liver disease. Desirable future trials will clarify this promising therapeutic alternative.

Materials and Methods

Animal models of chronic liver disease (CLD). The study was carried out in male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). Animals were kept in environmentally controlled animal facilities. All procedures were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with the European Community guidelines for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EEC Directive 86/609). The personnel who prepared and administered treatments and those that performed the experimental studies were different. Treatment's codes were not open for interpretation of the results until the inclusion of all animals.

Induction of CLD by thioacetamide (TAA). TAA (Sigma Chemical Co) was dissolved in 0.9% normal saline approximately one hour before injection. Treatment groups received 200 mg/kg of TAA twice per week for a total of 12 weeks while control groups received the same volume of 0.9% normal saline¹⁸.

Induction of CLD by Carbon Tetrachloride (CCl₄). Rats underwent inhalation exposure to CCl₄ (Sigma) and received phenobarbital (0.3 g/L) in the drinking water. When rats developed ascites, toxicants administration was stopped⁴⁰.

HSC isolation, culture and treatments. *Isolation and culture of HSC.* HSC were isolated from human (hHSC: control or cirrhotic) and rat (rHSC: control, TAA-CLD or CCl₄-CLD) livers as described²⁶ with minor modifications. Briefly, liver tissues were perfused with collagenase A, pronase and DNase (all Roche) in Gey's Balanced Salt Solution (GBSS; Sigma), and dispersed cells were fractionated by density gradient centrifugation using 11.5% Optiprep (Sigma). HSC were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Invitrogen, Gibco) supplemented with fetal bovine serum, glutamine, antibiotics and amphotericin B. Results using primary HSC derived from at least 3 independent isolations and 3 replicates.

Immortalized human-activated HSC LX-2 were cultured as described¹¹. Results using LX-2 derived from at least three replicates per experimental condition.

HSC treatments. HSC were incubated with liraglutide (Novo Nordisk), or its vehicle PBS, at different concentrations (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M and 100 μ M) and for different periods of time (24 h, 48 h and 72 h). *In vitro* dosing of liraglutide was based on previous literature⁴¹. Considering that liraglutide exerted beneficial effects at 50 μ M and after 72 h of treatment, all subsequent experiments were performed using these experimental conditions. Simvastatin was used in 10 μ M dose alone and in combination with liraglutide. Exendin fragment 9–39 (Sigma-Aldrich; 10 nM–1 μ M) was used as a GLP-1R antagonist⁴¹.

Cell viability & proliferation. Equal number of LX-2 were seeded and after 72 h of liraglutide or vehicle, floating and adhered cells were collected and counted using a hemocytometer with trypan blue dye exclusion (FLUKA).

Cell apoptosis. Cells were incubated with fresh medium containing 800 ng/mL Acridine Orange (AO) and 5 μ g/mL Propidium Iodide (PI) for 10 min at 37 °C and then washed with PBS. Fresh medium was added and cell

death was examined using a fluorescence microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus, DP72). AO is a metachromatic dye that stains both viable and apoptotic cells by intercalating into DNA and emits green fluorescence upon excitation at 480–490 nm. Nevertheless, nuclear condensation that occurs during apoptosis glares a more intense fluorescence. PI is excluded by viable cells but can penetrate cell membranes of dying or dead cells due to necrosis, emitting red fluorescence. Positive controls (*in vitro* ischemia and reperfusion), and negative controls (without dye) were included²⁶.

Cell contraction. Contraction of HSC was performed as previously described with some modifications⁴². Briefly, culture plates were incubated with 1% BSA-PBS and afterwards filled with a mix of collagen (2 mg/mL) and human HSC ($1-2 \times 10^5$ cells/mL). Once the gels were solidified, serum free IMDM with 50 μ M liraglutide or vehicle was added. After 24 h, contraction was induced by adding 10% FBS for 24 h. Finally, the contraction area was digitalized and measured with ImageJ software. The results are expressed as % of contraction relative to the initial area of the gel.

Characterization of CLD-rats treated with liraglutide. *Liraglutide administration.* TAA-CLD-rats received by subcutaneous injections, twice a day, either liraglutide (0.5 mg/kg/day; $n = 11$) or vehicle (0.9% NaCl; $n = 11$) during 15 days. The dose was selected based on a conversion calculation starting from the dose used in humans and agreed with previous publications^{19,43,44}. Administration of liraglutide to CLD-rats started one week after stopping the administration of TAA.

In vivo hemodynamics. Rats ($n = 8$ per group) were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/Kg; Merial Laboratories) plus midazolam (5 mg/kg; Laboratorios Reig Jofré) intraperitoneally. A tracheotomy was performed and a polyethylene tube PE-240 was inserted into the trachea to ensure a patent airway. PE-50 catheters were introduced into the femoral artery to measure mean arterial pressure (MAP; mmHg) and into ileocolic vein to measure portal pressure (PP; mmHg). A perivascular ultrasonic flow probe (Transonic System) was placed around the portal vein, as close as possible to the liver to avoid portal-collateral blood flow, in order to measure portal blood flow (PBF; mL·min⁻¹). Hepatic vascular resistance (mmHg·min·mL⁻¹·g⁻¹) was calculated as: PP/PBF. Blood pressures and flows were registered on a multichannel computer based recorder (Power Lab; AD Instruments). Temperature of the animals was maintained at 37 ± 0.5 °C and hemodynamic data were collected after 20 min stabilization^{40,45}. Blood serum and plasma samples were stored for biochemical analysis.

Liver microvascular function. Immediately after recording *in vivo* hemodynamics, rat livers were isolated and perfused with Krebs buffer as previously described ($n = 5$ per group)^{45,46}. The perfused rat liver preparation was allowed to stabilize for 20 min before vasoactive substances were added. Intrahepatic microcirculation was pre-constricted by adding the α 1-adrenergic agonist methoxamine (Mtx; 10^{-4} M; Sigma) to the reservoir, and liver microvascular function was assessed as concentration–response curves to cumulative doses of acetylcholine (ACh; 10^{-7} – 10^{-5} M; Sigma). Liver tissue was snap-frozen for subsequent molecular analysis.

Evaluation of hepatic fibrosis. CLD-rat livers were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with 0.1% Sirius Red, photographed, and analyzed using a microscope equipped with a digital camera. The red-stained area was measured using Axiovision software²⁶. Values are expressed as the mean of 8 fields per sample.

Sinusoidal characterization using Scanning Electron Microscope. In a sub-group of animals ($n = 3$ per group), after obtaining *in vivo* hemodynamics, livers were perfused through portal vein with a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde and fixed overnight at 4 °C. Samples were washed 3 times with 0.1 M cacodylate buffer. Liver sections were fixed with 1% osmium in cacodylate buffer, dehydrated in ethanol, and dried with hexamethyldisilazane. Six randomly selected blocks from each animal were mounted onto stubs, and sputter coated with gold. 10 images per animal were acquired at a resolution of 15,000x using a Jeol 6380 Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Liver sinusoidal fenestrations were quantified using ImageJ Software (NIH)⁴⁷.

Nitric Oxide bioavailability. Levels of cGMP, a marker of NO bioavailability, were analyzed in liver homogenates using an enzyme immunoassay (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) as previously described⁴⁸.

RNA isolation and quantitative PCR. RNA from cells and tissue were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) and Trizol (Life Technologies), respectively. RNA quantification was performed using a NanoDrop spectrophotometer. cDNA was obtained using QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). Real-Time PCR were performed in an ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System, using TaqMan predesigned probes for Col1A1 (Hs00164004_m1, Rn01463848_m1), α -SMA (Hs00426835_g1, Rn01759928_g1), PDGFR β (Hs01019589_m1, Rn01491838_m1), GLP1-R (Hs00157705_m1, Hs01006326_m1), Sox9 (Hs00165814_m1, Rn01751070_m1) and GAPDH or 18S as endogenous controls. Results, expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$, represent the x-fold increase of gene expression compared with the corresponding control group.

Western blot analysis. Cells were rinsed twice with PBS and lysed with Triton lysis buffer. Livers were homogenized in triton-lysis buffer for whole protein extraction. Aliquots from each sample containing equal amounts of protein were run on a sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. After the transfer, blots were blocked with Tris buffered saline containing 0.05% Tween-20 and 5% non-fat dry milk or 3% albumin and subsequently incubated overnight at 4 °C with primary antibodies

against collagen I (ABT123, Millipore), α -SMA (A2547, Sigma), TNF- α (sc-1351, Santa Cruz Biotechnology), TGF β R (sc-398, Santa Cruz Biotechnology), GAPDH (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology), p-PKA (4781, Cell Signaling), NF- κ B (6956, Cell Signaling) and I κ B (4812, Cell Signaling), all at 1:1000 dilution. Then membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature. Protein expression was determined by densitometric analysis using the LAS4000 (GE Healthcare) and Image Studio Lite software (LI-COR). Quantitative densitometric values of all proteins were normalized to GAPDH.

Precision-cut liver slices of human livers (PCLS). Fresh human liver biopsies were used to obtain 250 μ m slices using a Vibratome VT1000S (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Samples were washed in PBS, soaked in 4% agarose solution (Ultrapure LMP Agarose, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for 20 min, and then orientated, mounted and immobilized using cyanoacrylate glue. Tissue slices were placed on organotypic tissue culture plate inserts (Millicell[®]-CM; Millipore). Tissues were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator using 1.1 mL of Williams' Medium E supplemented with 1% inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-Glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin. Tissue slices were incubated with 50 μ M liraglutide for 24 h. Sections were then transferred to a 1.5 mL tube and lysed for RNA isolation and qPCR²⁹.

Ethics information. Quiescent hHSC (for prevention of *in vitro* activation) and PCLS were obtained from remnants from partial hepatectomy. Livers were considered control, but exhibited fibrosis staging between F1 and F2. In all cases surgery was recommended to excise tumor metastasis from colon carcinoma. Cirrhotic hHSC (for *in vitro* de-activation) were isolated from remnant cirrhotic livers (all alcoholic aetiology) obtained after transplantation. The Ethics Committee of the Hospital Clinic de Barcelona approved the experimental protocol, samples manipulation and isolation procedures were carried out following good laboratory practices; in all cases patients signed the informed consent.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with the SPSS V.23.0 for Windows statistical package (IBM, Armonk, New York, USA). Results are expressed as mean \pm s.e.m. Normality of samples was assessed using the Kolmogorov Smirnov test. For samples following a normal distribution, comparisons between groups were performed with the Student t test or analysis of variance, followed by a Bonferroni Post Hoc test when adequate. Otherwise, comparisons were assessed with the non-parametric Mann-Whitney U or Kruskal Wallis test when adequate. Differences were considered significant at a *p* value < 0.05.

References

- Nauck, M. A. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am. J. Med.* **124**, S3–18 (2011).
- Kazafeos, K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93**(Suppl 1), S32–6 (2011).
- Drucker, D. J. The biology of incretin hormones. *Cell Death Differ.* **3**, 153–165 (2006).
- Gupta, N. A. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis *in vitro* by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology* **51**, 1584–1592 (2010).
- Pyke, C. *et al.* GLP-1 Receptor Localization in Monkey and Human Tissue: Novel Distribution Revealed With Extensively Validated Monoclonal Antibody. *Endocrinology* **155**, 1280–1290 (2014).
- Wang, X.-C., Gusdon, A. M., Liu, H. & Qu, S. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation. *World J. Gastroenterol.* **20**, 14821–14830 (2014).
- Armstrong, M. J. *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England)* **387**, 679–90 (2016).
- McCLean, P. L., Jalewa, J. & Hölscher, C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav. Brain Res.* **293**, 96–106 (2015).
- Shiraki, A. *et al.* The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* **221**, 375–82 (2012).
- Fernández-Iglesias, A. & Gracia-Sancho, J. How to face chronic liver disease: the sinusoidal perspective. *Front. Med.* **4**, 7 (2017).
- Marrone, G. *et al.* The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J. Hepatol.* **58**, 98–103 (2013).
- Pinzani, M. & Gentilini, P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* **19**, 397–410 (1999).
- Török, N. J. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J. Gastroenterol.* **43**, 315–21 (2008).
- Soon, R. K. & Yee, H. F. Stellate Cell Contraction: Role, Regulation, and Potential Therapeutic Target. *Clin. Liver Dis.* **12**, 791–803 (2008).
- Reynaert, H. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* **50**, 571–581 (2002).
- Marrone, G., Shah, V. H. & Gracia-Sancho, J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J. Hepatol.* **65**, 608–17 (2016).
- Kisseleva, T. *et al.* Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 9448–9453 (2012).
- Cerini, F. *et al.* Enoxaparin reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **64**, 834–42 (2016).
- Gao, H. *et al.* The Glucagon-Like Peptide-1 Analogue Liraglutide Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biol. Pharm. Bull.* **694**, 694–702 (2015).
- Gaspari, T. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of glucagon-like peptide-1 receptor agonist-mediated attenuation of cardiac fibrosis. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **13**, 56–68 (2016).
- Armstrong, M. J. *et al.* Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **64**, 399–408 (2016).
- Steven, S. *et al.* Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Res. Cardiol.* **110**, 6 (2015).
- Schuppan, D. & Kim, Y. O. Evolving therapies for liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1887–1901 (2013).
- Weiskirchen, R. & Tacke, F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* **3**, 344–363 (2014).
- Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D. & Pinzani, M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J. Hepatol.* **62**, S15–S24 (2015).
- Marrone, G. *et al.* KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* **64**, 1434–43 (2015).

27. Klein, S. *et al.* Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab. Invest.* **92**, 1440–1450 (2012).
28. Wright, M. C. *et al.* Gliotoxin Stimulates the Apoptosis of Human and Rat Hepatic Stellate Cells and Enhances the Resolution of Liver Fibrosis in Rats. *Gastroenterology* **121**, 685–698 (2001).
29. Olinga, P. & Schuppan, D. Precision-cut liver slices: A tool to model the liver *ex vivo*. *J. Hepatol.* **58**, 1252–1253 (2013).
30. Xie, G. *et al.* Role of Differentiation of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Progression and Regression of Hepatic Fibrosis in Rats. *Gastroenterology* **142**, 918–927 (2012).
31. Laviola, L. *et al.* Glucagon-like peptide-1 counteracts oxidative stress-dependent apoptosis of human cardiac progenitor cells by inhibiting the activation of the c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway. *Endocrinology* **153**, 5770–81 (2012).
32. Wang, L. *et al.* GLP-1 analog liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic β -cells via a PKA-dependent pathway. *Endocrinology* **155**, 3817–28 (2014).
33. Abraldes, J. G. *et al.* Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl₄ cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 1040–6 (2007).
34. Trebicka, J. *et al.* Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* **46**, 242–253 (2007).
35. La Mura, V. *et al.* Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* **57**, 1172–1181 (2013).
36. Luedde, T. & Schwabe, R. F. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 108–118 (2011).
37. Gaspari, T. *et al.* A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE^{-/-} mouse model. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **8**, 117–24 (2011).
38. Pritchett, J. *et al.* Osteopontin is a novel downstream target of SOX9 with diagnostic implications for progression of liver fibrosis in humans. *Hepatology* **56**, 1108–1116 (2012).
39. Martin, K. *et al.* PAK proteins and YAP-1 signalling downstream of integrin beta-1 in myofibroblasts promote liver fibrosis. *Nat. Commun.* **7**, 12502 (2016).
40. Gracia-Sancho, J. *et al.* Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* **60**, 517–24 (2011).
41. Cantini, G. *et al.* Effect of liraglutide on proliferation and differentiation of human adipose stem cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **402**, 43–50 (2015).
42. Perri, R. E. *et al.* Defects in cGMP-PKG pathway contribute to impaired NO-dependent responses in hepatic stellate cells upon activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G535–42 (2006).
43. Lu, N. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonist Liraglutide has anabolic bone effects in ovariectomized rats without diabetes. *PLoS One* **10**, e0132744 (2015).
44. Hoang, V., Bi, J., Mohankumar, S. M. & Vyas, A. K. Liraglutide Improves Hypertension and Metabolic Perturbation in a Rat Model of Polycystic Ovarian Syndrome. *PLoS One* **10**, e0126119 (2015).
45. Hide, D. *et al.* Effects of warm ischemia and reperfusion on the liver microcirculatory phenotype of rats: underlying mechanisms and pharmacological therapy. *Sci. Rep.* **6**, 22107 (2016).
46. Gracia-Sancho, J. *et al.* Evidence Against a Role for NADPH Oxidase Modulating Hepatic Vascular Tone in Cirrhosis. *Gastroenterology* **133**, 959–966 (2007).
47. Hilmer, S. N. *et al.* Age-related changes in the hepatic sinusoidal endothelium impede lipoprotein transfer in the rat. *Hepatology* **42**, 1349–1354 (2005).
48. Hide, D. *et al.* A novel form of the human manganese superoxide dismutase protects rat and human livers undergoing ischaemia and reperfusion injury. *Clin. Sci. (Lond.)* **127**, 527–37 (2014).

Acknowledgements

Authors are in debt with Drs Garcia-Valdecasas and Molina for providing human biopsies, Dr Bataller for providing LX-2 cells, and Bibiana Rius and Dr Clària for their expertise in PCLS. This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad – Instituto de Salud Carlos III, FIS (PI14/00029 and PI13/00341), and the European Union (Fondos FEDER, “una manera de hacer Europa”). FCdM has a Fellowship from CAPES/Ciência sem Fronteiras - Brazil, and SG-M from the Fundació Catalana de Trasplantament. AF-I has a Sara Borrell contract from the Instituto de Salud Carlos III. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Author Contributions

F.C.d.M., S.G.-M. and A.F.-I. designed the research, conceived ideas, performed experiments, and wrote the manuscript. R.M.-D., S.V., D. H. and M. O.-R. performed experiments and analyzed data. J.L.R. and J.C.G.-P. critically revised the manuscript. J.B. critically revised the manuscript and obtained funding. J.R.dO. conceived ideas and critically revised the manuscript. J.G.-S. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and directed the study. All authors edited and reviewed the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02866-y

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

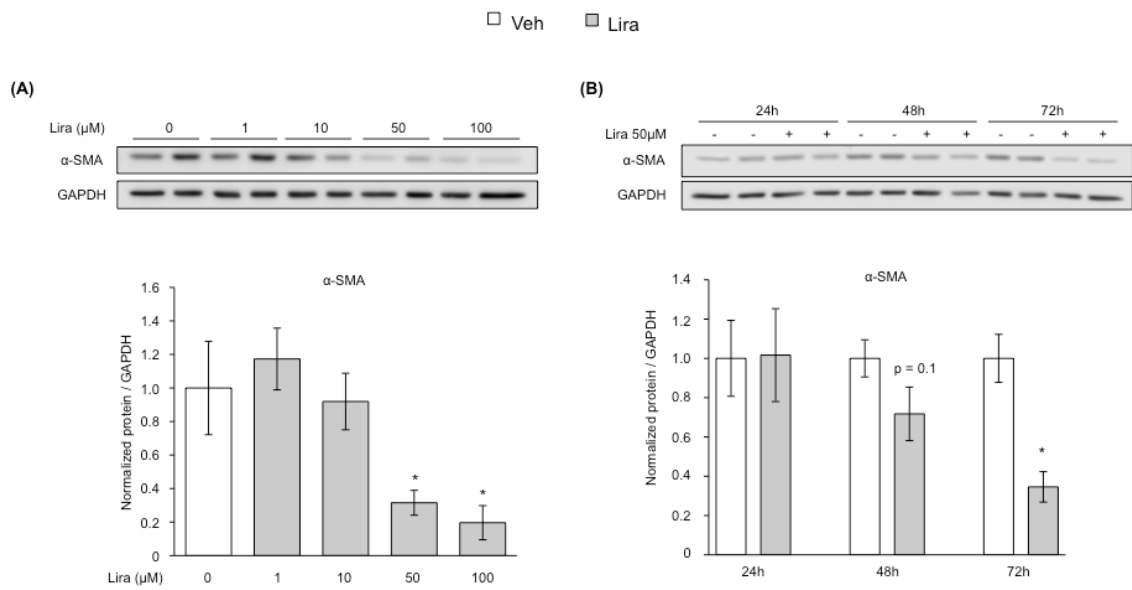
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



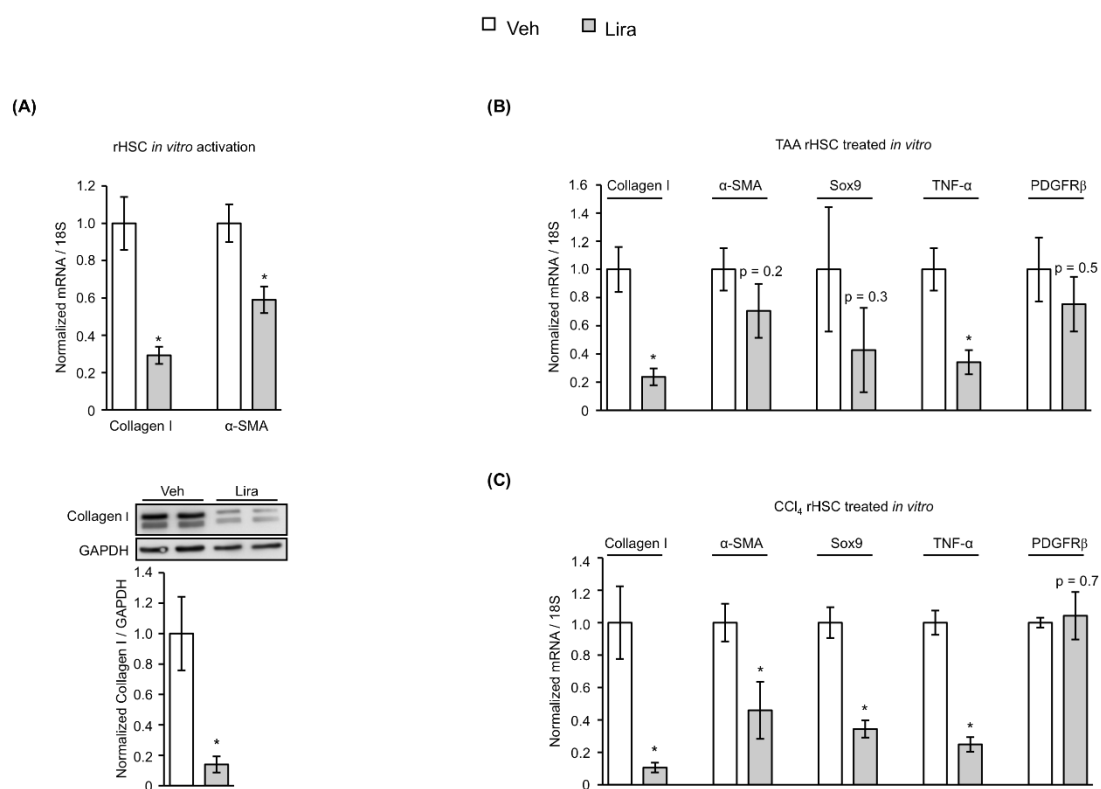
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s)

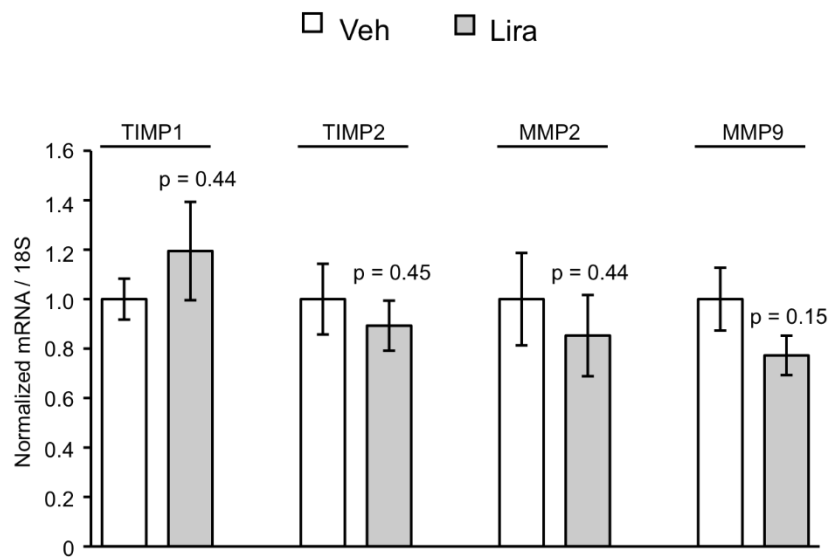
Supplementary Figures



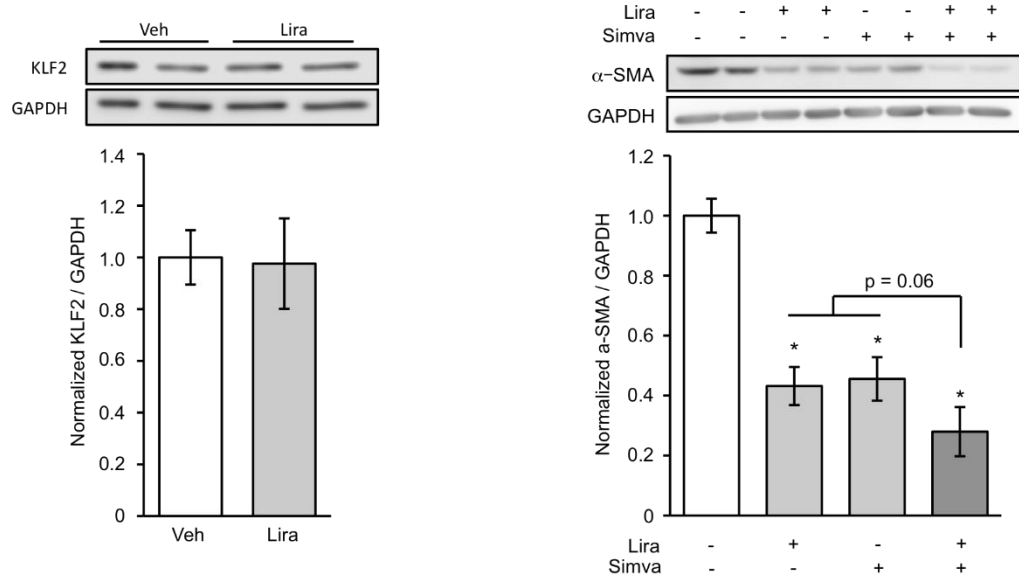
Supplementary figure 1. Analysis of LX-2 de-activation in terms of $\alpha\text{-SMA}$ expression in response to liraglutide administered at different doses **(a)** and times **(b)**. $n=3$ per experimental condition. * $p<0.05$ vs. vehicle.



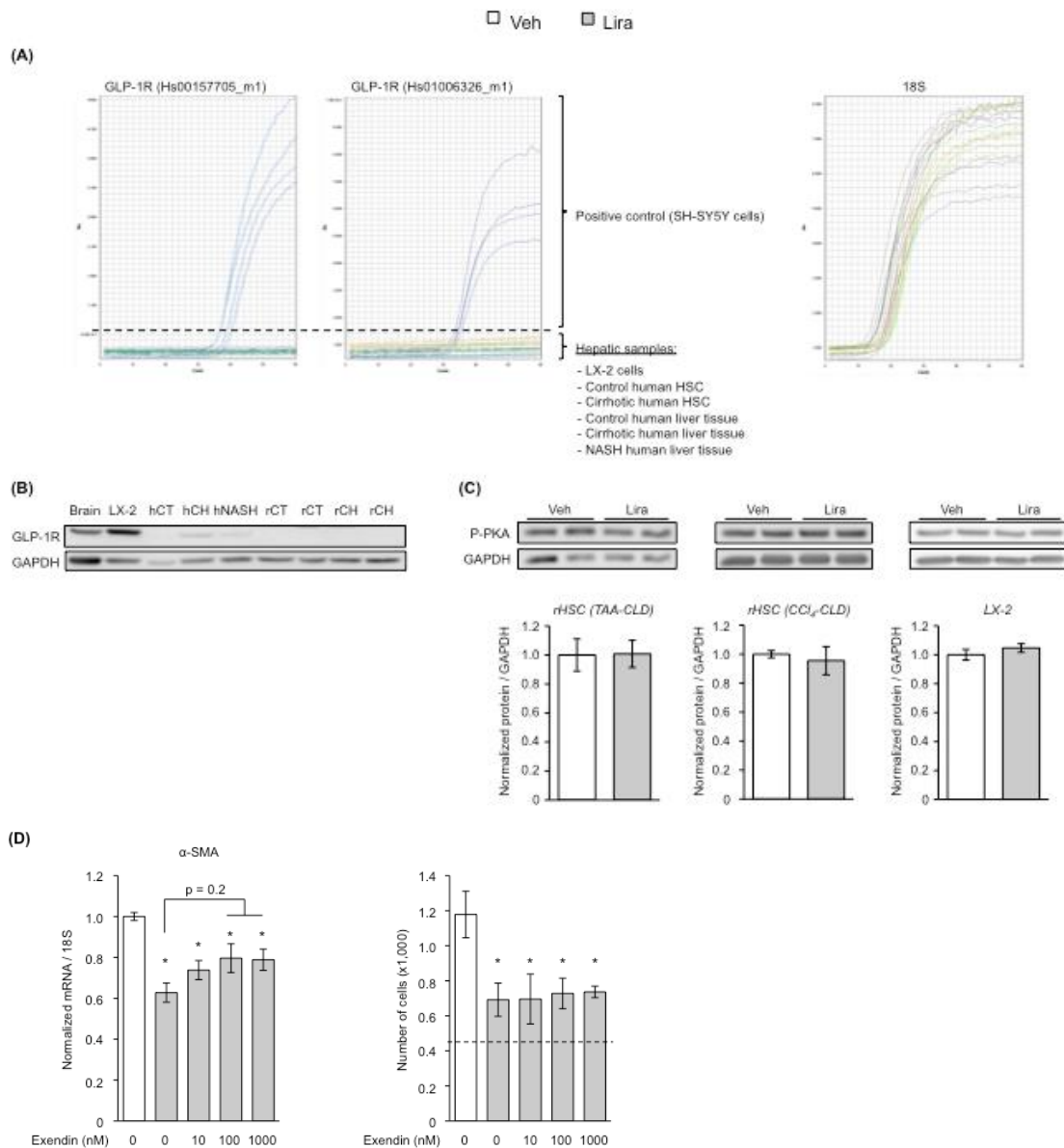
Supplementary figure 2. Effects of 72h-liraglutide on the *in vitro* activation of primary quiescent HSC isolated from healthy rats **(a)**, and in the amelioration of activated HSC isolated from TAA-CLD **(b)** and CCl₄-CLD **(c)** rats. n=3 per group. *p<0.05 vs. vehicle.



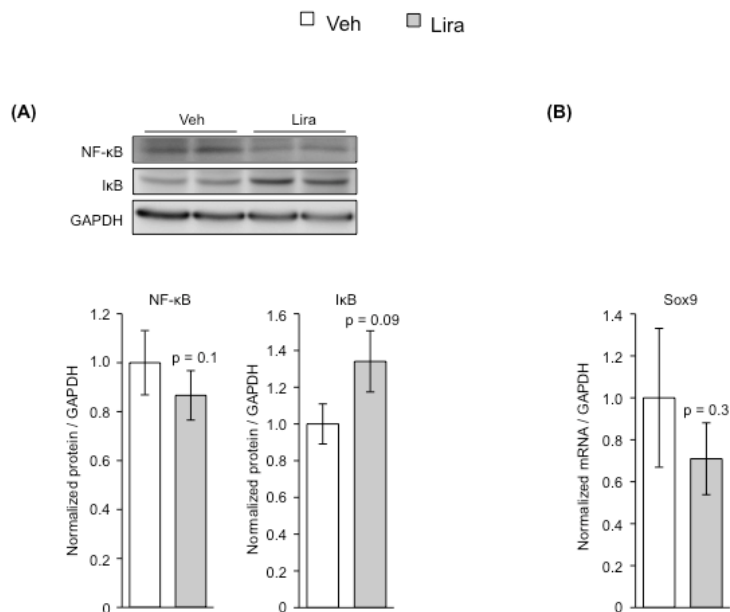
Supplementary figure 3. Expression of TIMPs and MMPs in livers from TAA-CLD-rats treated for 15 days with liraglutide, or vehicle. n=8 per group.



Supplementary figure 4. (a) Expression of the transcription factor KLF2 in LX-2 cells treated with 50 μ M liraglutide, or vehicle. **(b)** Expression of α -SMA in LX-2 cells treated with 50 μ M liraglutide, or vehicle, in combination with 10 μ M simvastatin, or its vehicle. n=3 per experimental condition. *p<0.05 vs. vehicle



Supplementary figure 5. (a) 60-cycle amplification charts of GLP-1R mRNA expression analyzed in human liver & cells samples using the human cell line SH-SY5Y as positive control. **(b)** Western blot of different hepatic samples using a GLP-1R antibody (Abcam ab189397). From left to right, brain tissue as positive control, LX-2 cells, human liver tissue (control, cirrhotic, NASH) and rat liver tissue (control, cirrhotic). **(c)** p-PKA protein expression in primary cirrhotic HSC from TAA-CLD (left), CCl₄-CLD (middle) and in LX-2 cells (right) in response to 50 μM liraglutide. **(d)** Effects of the GLP-1R antagonist exendin 9-39 on α-SMA mRNA expression (left) and proliferation (right) in LX-2 cells. n=3 per experimental condition. *p<0.05 vs. vehicle.



Supplementary figure 6. (a) Protein expression of NF-κB and its inhibitor IκB and **(b)** mRNA expression of Sox9 in livers from TAA-CLD-rats treated with liraglutide, or vehicle. n=8 per group.

4.2. Estudi 2

CROSS-TALK BETWEEN AUTOPHAGY AND KLF2 DETERMINES ENDOTHELIAL CELL PHENOTYPE AND MICROVASCULAR FUNCTION IN ACUTELY INJURED RAT LIVERS

Sergi Guixé-Muntet, Fernanda Cristina de Mesquita, Sergi Vila, Virginia Hernández-Gea, Carmen Peralta, Juan Carlos García-Pagán, Jaime Bosch, Jordi Gracia-Sancho

Journal of Hepatology. 2017, 66(1); 86-94

IF: 10,59

Cross-talk between autophagy and KLF2 determines endothelial cell phenotype and microvascular function in acute liver injury

Sergi Guixé-Muntet¹, Fernanda Cristina de Mesquita^{1,2}, Sergi Vila¹, Virginia Hernández-Gea¹, Carmen Peralta³, Juan Carlos García-Pagán¹, Jaime Bosch¹, Jordi Gracia-Sancho^{1,*}

¹Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab., IDIBAPS – Hospital Clínic – CIBEREHD, University of Barcelona Medical School, Barcelona, Spain;

²Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil; ³IDIBAPS & CIBEREHD, Spain

Background & Aims: The transcription factor Krüppel-like factor 2 (KLF2), inducible by simvastatin, confers endothelial vasoprotection. Considering recent data suggesting activation of autophagy by statins, we aimed to: 1) characterize the relationship between autophagy and KLF2 in the endothelium, 2) assess this relationship in acute liver injury (cold ischemia/reperfusion) and 3) study the effects of modulating KLF2-autophagy *in vitro* and *in vivo*.

Methods: Autophagic flux, the vasoprotective KLF2 pathway, cell viability and microvascular function were assessed in endothelial cells and in various pre-clinical models of acute liver injury (cold storage and warm reperfusion).

Results: Positive feedback between autophagy and KLF2 was observed in the endothelium: KLF2 inducers, pharmacological (statins, resveratrol, GGTI-298), biomechanical (shear stress) or genetic (adenovirus containing KLF2), caused endothelial KLF2 overexpression through a Rac1-rab7-autophagy dependent mechanism, both in the specialized liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and in human umbilical vein endothelial cells. In turn, KLF2 induction promoted further activation of autophagy.

Cold ischemia blunted autophagic flux. Upon reperfusion, LSEC stored in University of Wisconsin solution did not reactivate autophagy, which resulted in autophagosome accumulation probably due to impairment in autophagosome-lysosome fusion, ultimately leading to increased cell death and microvascular dysfunction.

Simvastatin pretreatment maintained autophagy (through the upregulation of rab7), resulting in increased KLF2, improved cell viability, and ameliorated hepatic damage and microvascular function.

Conclusions: We herein describe for the first time the complex autophagy-KLF2 relationship, modulating the phenotype and survival of the endothelium. These results help understanding the mechanisms of protection conferred by KLF2-inducers, such as simvastatin, in hepatic vascular disorders.

Lay summary: Autophagy and the transcription factor KLF2 share a common activation pathway in the endothelium, being able to regulate each other.

Statins maintain microvascular function through the inhibition of Rac1, which consequently liberates Rab7, activates autophagy and increments the expression of KLF2.

© 2016 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Autophagy is a constitutive process that maintains cellular homeostasis in a wide variety of cell types through the encapsulation of damaged proteins or organelles in double-membrane vesicles called autophagosomes, which fusing with lysosomes allow degradation of the cargo. As a result, cells obtain amino-acids, lipids and other components that will serve as a source of energy and new building blocks for synthesis. Regulation of autophagy is complex since it shares molecular signaling with cell proliferation and apoptosis [1,2]. Cells activate autophagy as a mechanism of cellular recycling and survival in response to cellular stresses like low nutrients, low ATP or hypoxia [3,4].

Autophagy plays a role in the pathophysiology of diverse liver diseases, including non-alcoholic steatohepatitis, viral hepatitis, fibrosis, and hepatocellular carcinoma [5–7]. However, there is no consensus about the role of autophagy in ischemia and reperfusion injury, where autophagy may be differentially regulated, and have opposite effects, depending on type of ischemia (warm or cold) or the preservation solution used [7–11]. Moreover, the possible role of autophagy in the maintenance of liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) phenotype is completely unknown.

The vasoprotective transcription factor Krüppel-like factor 2 (KLF2) is expressed in the liver endothelium in response to blood flow-derived shear stress and plays a key role in the pathophysiology of hepatic ischemia and reperfusion injury [12,13]. In fact, when the liver is ischemic due to cold preservation or to surgical procedures, the endothelium rapidly loses its KLF2 expression leading to the dysregulation of its specialized phenotype (capillarization), development of hepatic microvascular dysfunction, and ultimately hepatic injury.

Keywords: Statins; Simvastatin; Ischemia/reperfusion; LSEC; HUVEC; Rab7; Rac1.
Received 21 December 2015; received in revised form 27 July 2016; accepted 30 July 2016; available online 18 August 2016

* Corresponding author. Address: Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab., Rosselló 149, 4th floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275707x4306.

E-mail address: jordi.gracia@idibaps.org (J. Gracia-Sancho).



Pharmacologically, KLF2 can be efficiently induced by statins. Although these FDA/EMA approved drugs were designed to reduce cholesterol synthesis, several reports demonstrated that statins are potent KLF2 activators independently of their lipid lowering effects but dependent on the geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) pathway [14,15]. In the field of acute liver injury, previous studies demonstrated that simvastatin protects healthy and steatotic rat livers through the maintenance of LSEC vasoprotective phenotype [13,16,17].

Considering this background and recent studies suggesting that KLF2 activators such as simvastatin and resveratrol might be able to increase autophagic flux in the endothelium [18–20], and that autophagy is required for the endothelium to respond to shear stress [21], the present study aimed at: 1) characterizing the possible cross-link between autophagy and KLF2 in the endothelium; 2) defining endothelial autophagy in the context of liver ischemia/reperfusion; and 3) modulating hepatic autophagy *in vitro* and *ex vivo* to revert the negative effects of ischemia/reperfusion.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (Charles River) weighting 300–350 g were kept in environmentally controlled facilities at the IDIBAPS. All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with the European Community guidelines for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (European Economic Community (EEC) Directive 86/609).

Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) isolation

Rat LSEC were isolated as described in [Supplementary methods](#). LSEC used in the present study showed average viability of 96% (by trypan blue exclusion) and 92% purity (by acetylated-low density lipoprotein (Ac-LDL) incorporation and Reca-1 staining) [22,23].

In vitro cold ischemia and warm reperfusion (I/R)

Freshly isolated LSEC were washed twice with warm phosphate balanced saline (PBS) and cultured at 4 °C in cold Celsior or University of Wisconsin (UWS) solutions. Using an oxygen microsensor (Unisense OX-NP), O₂ availability was measured demonstrating that cold storage solutions have a 35% reduction in O₂ saturation in comparison to standard culture conditions, therefore ensuring an appropriate hypoxic environment.

After ischemia time, cells were washed twice with cold PBS and *in vitro* reperfusion was mimicked incubating LSEC in complete media during 2 h at 37 °C in normoxic humid atmosphere.

Endothelial cells treatments

Primary rat LSEC or human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Lonza) were treated with 5 μM simvastatin (Calbiochem), 5 μM mevastatin (Calbiochem), 10 μM GGPP (Sigma), 5 μM GGTI-298 (Sigma), 20 μM chloroquine (CQ; Sigma), 2 μM rapamycin (Santa Cruz), 1 μM resveratrol (Sigma), 50 μM NSC23766 (Sigma) or 50 nM bafilomycin (Baf; Sigma) when appropriate. Drugs concentrations derive from previously published reports [14,19,23,24] or from preliminary studies performed by our team.

For each experiment, culture medium was aliquoted and complemented with the corresponding drug or vehicle and added to the corresponding wells. Results from endothelial cells derive from at least n = 3 independent experiments (different isolations for LSEC; different commercial batches for HUVEC always below passage 6) with n = 2–3 replicates for each experimental condition.

Adenoviral overexpression of KLF2

Cells were seeded at a 60% confluence in complete medium. At the time of infection, plates were washed twice with PBS and were incubated with 10 MOI of adenovirus containing KLF2 (AdKLF2) or adenovirus containing green fluorescent protein (AdGFP) (kindly provided by Prof Garcia-Cardena) for 2 h in culture medium containing 2% FBS. After infection, the medium containing the adenovirus was removed and cells were incubated for 24 h [25].

Endothelial shear stress

HUVEC were seeded in gelatin-coated μSlide flow chambers (IBIDI) at a confluence of 100,000 cells/chamber and maintained at the incubator for 12 h. Afterwards, culture media (Medium 199 with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 0.1 mg/ml heparin, 0.05 mg/ml endothelial mitogen and 2% dextran) was added and cells were cultured for 24 h in static or dynamic conditions (12 dyn/cm²) [23].

Endothelial viability

Cell death was analyzed by double staining with acridine orange and propidium iodide (AO-PI) and by trypan blue exclusion assay, as previously described [25]. Briefly, for AO-PI staining, endothelial cells were incubated with 800 ng/ml acridine orange and 5 μg/ml propidium iodide for 10 min. Plates were washed twice with PBS and complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) without phenol red media was added. Cells were observed with a fluorescence microscope (Olympus BX51 with a U-LH100HG light source). Four fields were randomly selected per well and pictures of visible light, green light (488 nm emission) and red light (555 nm emission) were taken at 200x magnification. Images were merged using ImageJ software (NIH). Cells stained in plain green were counted as viable, cells with bright and green dotted nuclei were counted as apoptotic, and cells stained in red were counted as necrotic.

The trypan blue exclusion assay was performed on plate. Trypan blue (Fluka) was added to the medium at a final concentration of 0.04 mg/ml. Cells were incubated at 37 °C for 10 min and pictures were taken for further analysis.

Two independent researchers (SG-M and FM) performed the analysis of all pictures blindly.

Immunofluorescence

Endothelial cells were seeded onto 12 mm confocal coverglasses (Electron Microscopy Sciences). At the end of treatments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, rinsed with PBS and permeabilized with 0.1% triton X-100 (Sigma) for 5 min. Cells were blocked for 30 min with 1% BSA in PBS and subsequently incubated with primary antibodies against LC3B (1:200, cell signaling) and Lamp2 (1:50, Santa Cruz) overnight at 4 °C. Incubation with secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488/555 (1:300, Invitrogen) was performed at room temperature for 1 h along with DAPI (3 ng/ml, Invitrogen). Preparations were then mounted using Fluoromount-G (Bionovaciencia) and dried overnight. Six images per preparation and channel (visible; green, 488 nm; red, 555 nm) were obtained with a spectral confocal microscope (Leica TCS-SP5). Images were then analyzed with the ImageJ software (NIH).

Ex vivo model of ischemia/reperfusion

Male Wistar rats (250–300 g; n = 8 per experimental condition) were pre-treated with the autophagy inhibitor CQ (60 mg/kg, i.p., t = –24 h and –2 h) [26], or its vehicle, followed by the KLF2 inducer simvastatin (1 mg/kg, i.v., t = –1 h) or vehicle. Afterwards, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg i.p; Merial Laboratories, Barcelona, Spain) + midazolam (5 mg/kg i.p; Laboratorios Reig Jofré, Barcelona, Spain). Livers were exsanguinated with Krebs buffer, flushed through the portal vein with 10 ml of ice-cold UWS and explanted. Grafts were kept submerged in this solution for 16 h and reperfused for 2 h with warm Krebs buffer [13,16]. Then, liver microvascular function was evaluated analyzing endothelium-dependent vasorelaxation to incremental doses of acetylcholine (10^{–7}–10^{–5} M) after pre-constriction with methoxamine (10^{–4} M) [27].

Samples of perfusion buffer and liver tissue were stored for molecular analyses.

Research Article

mRNA and protein analysis

Please see [Supplementary methods](#) for detailed information regarding RNA extraction, qPCR and Western blotting.

LC3 turnover assay

Autophagic flux was calculated as the accumulation of autophagosomes after inhibition of autophagosomes-lysosomes fusion with CQ or Baf for 2 h. Autophagic flux = LC3-II (CQ or Baf)/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) - LC3-II (vehicle)/GAPDH for each experimental condition.

Transmission electron microscopy

Livers were perfused through portal vein with a fixation solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde and fixed overnight at 4 °C. Samples were washed 3 times with 0.1 M cacodylate buffer. Liver sections were fixed with 1% osmium in cacodylate buffer and, after dehydration in acetone gradients, embedded in Spurr resin. Ultrathin sections (50 nm) were counterstained with uranyl acetate and lead citrate [28]. Samples were analyzed using a JEOL J1010 microscope and an ORIUS camera (Gatan, Inc.; Roper Technologies, Inc.). Ultrastructural analysis derived from $n = 3$ rats per group, with 3 different tissue areas from each liver and at least 10 pictures of each one.

Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS V.19.0 software for Windows (IBM, Armonk, New York, USA). All results are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed as follows: normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. For experimental data following a normal distribution we performed the one-way ANOVA test followed by least significant difference (LSD) and Bonferroni *post hoc* tests. Otherwise, non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U* test were performed when groups did not follow normality. Differences were considered significant at a p value < 0.05 .

Results

KLF2 upregulation induces autophagy in endothelial cells

Effects of KLF2 upregulation on the autophagy axis were analyzed using pharmacological, adenoviral and biomechanical strategies. Treatment of primary LSEC with the KLF2 activators simvastatin and resveratrol did not modify the protein expression of the autophagosome-formation mediator Atg7, or the ubiquitin-binding autophagic adaptor p62, but significantly upregulated autophagic flux as demonstrated by the LC3 turnover assay and autophagosome-lysosome colocalization (Fig. 1A, B and [Supplementary Fig. 1](#)). Rapamycin was used as positive control, showing comparable activation of autophagy. Simvastatin effects on autophagic flux were validated using a different statin formulation, mevastatin ([Supplementary Fig. 2](#)).

Modulation of the KLF2 protective pathway by inhibiting geranylgeranylation with GGTI-298 (activator of KLF2) mimicked the effects of simvastatin on autophagy (Fig. 1C left), while addition of the KLF2 inhibitor GGPP abrogated simvastatin effects (Fig. 1C right).

In addition, specific KLF2 overexpression using adenoviral constructs codifying for this transcription factor (AdKLF2) (Fig. 1D) or biomechanical stimulation by shear stress (Fig. 1E) markedly increased autophagic flux, altogether demonstrating that KLF2 *per se* activates autophagy in the endothelium.

Effects of I/R on endothelial viability and autophagy

LSEC cultured under cold ischemia conditions, without reperfusion, did not exhibit significant changes in viability when compared to controls. However, cells that after cold preservation were subsequently warm reperfused displayed increased cell death, as observed with double staining with AO-PI and by trypan blue exclusion assay, and its magnitude was dependent on time of ischemia (Fig. 2A, B).

Analysis of autophagic flux in LSEC undergoing I/R revealed profound inhibition of autophagy in response to cold ischemia (both at 6 h, 12 h or 24 h of cold storage) using either Celsior or UW solutions. Upon reperfusion, LSEC stored in Celsior reactivated autophagy in an ischemia time-dependent manner. However, those cells kept in UWS failed to reactivate autophagic flux. In fact, they displayed marked accumulation of autophagosomes, suggesting that fusion of autophagosomes with lysosomes was impaired under these conditions (Fig. 2C). *In vitro* culture of LSEC did not modify autophagy as demonstrated analyzing cells cultured in standard conditions during the same periods of time.

Simvastatin stimulates the KLF2-autophagy axis and improves cell viability in endothelial cells undergoing I/R

LSEC pretreated with simvastatin 1 h before undergoing UWS cold ischemia showed proper upregulation of KLF2, activation of autophagy, and consequently preservation of cell viability (Fig. 3A–C). The beneficial effects of simvastatin were not observed when the simvastatin-KLF2 pathway was blocked with GGPP, or when autophagy was blocked with CQ, suggesting that simvastatin requires autophagy to induce KLF2 and confer vaso-protection. To note, endothelial cells preserved in Celsior solution did not show activation of autophagy in response to simvastatin (Fig. 3D), and was associated with no changes in cell viability (data not shown).

Simvastatin reactivates autophagic flux through Rab7 upregulation

Endothelial cells that underwent cold storage in UWS displayed lower levels of the autolysosome-formation mediating protein Rab7 in comparison to those cells stored in Celsior. Such decrease in Rab7 was prevented administering statins prior to cold ischemia (Fig. 4A and [Supplementary Fig. 2](#)).

Similarly, HUVEC and LSEC cultured under standard conditions and treated for 24 h with simvastatin exhibited significantly increased protein levels of Rab7 in comparison to vehicle-treated cells (Fig. 4B). This effect, together with activation of KLF2, was at least in part dependent on the small GTPase Rac1. Indeed, treatment of LSEC and HUVEC with the Rac1 inhibitor NSC23766 significantly upregulated Rab7, the KLF2 protective pathway (measured as KLF2 and its target gene eNOS), and autophagic flux (Fig. 5 and [Supplementary Fig. 3](#)).

A more detailed analysis of Rab7 upregulation in response to simvastatin revealed that statins do not promote *Rab7* transcription, measured as mRNA expression, nor inhibit its protein degradation, since Rab7 protein levels still increased in the presence of protease inhibitors ([Supplementary Fig. 4](#)). These data suggest that statins modulate Rab7 availability at its translational level.

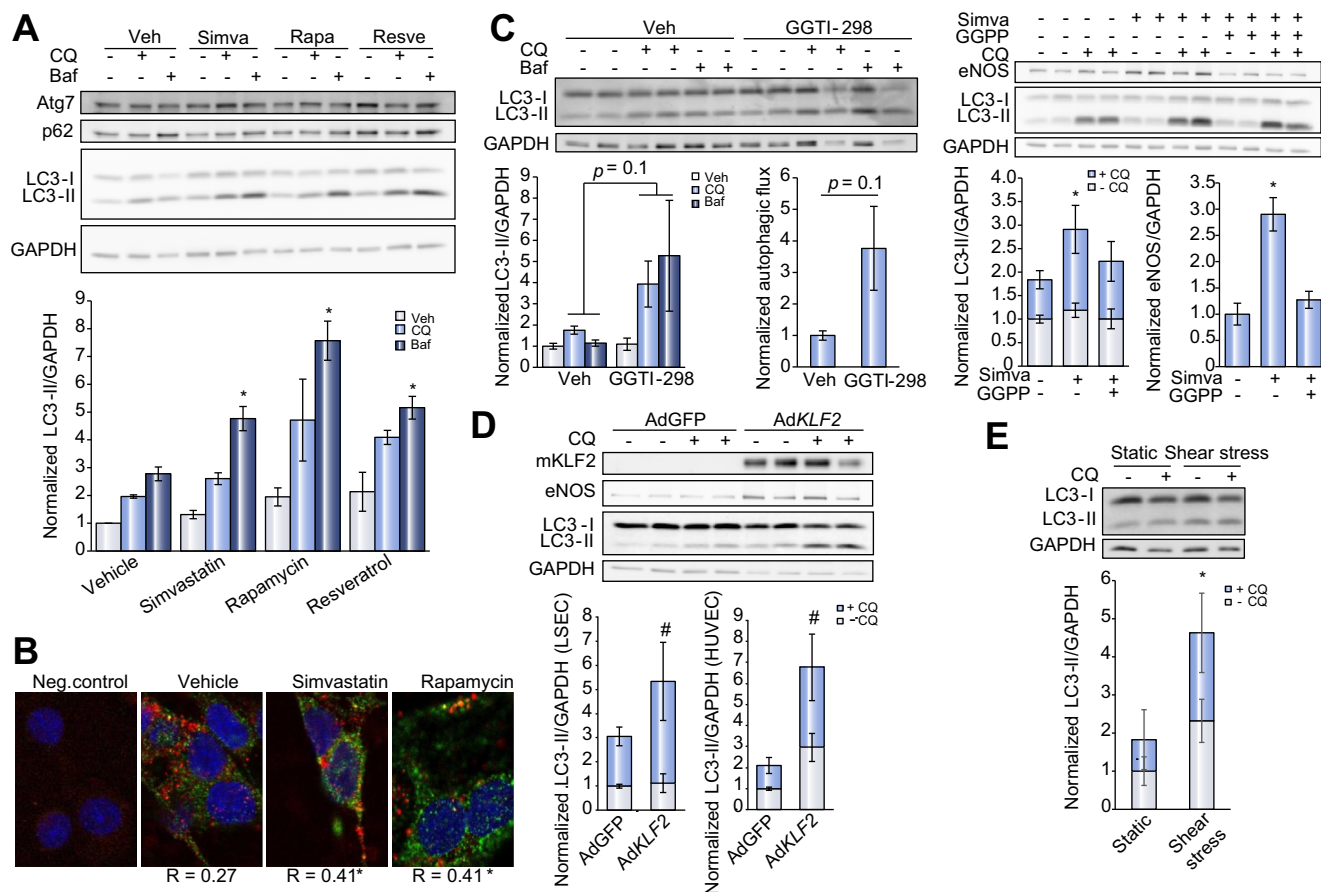


Fig. 1. KLF2 upregulates autophagy in the endothelium. (A) Protein expression of autophagy markers Atg7, p62 and LC3-II in primary liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) treated with different vasoprotective drugs. The LC3 turnover is represented in the graph below (CQ: chloroquine, Baf: bafilomycin). (B) Representative images of autophagosomes (LC3, green) with lysosomes (Lamp2, red) colocalization in LSEC. Quantification of colocalization (R value representing autophagy) derives from n = 60–80 cells per condition from n = 3 independent experiments. (C) Autophagic flux in response to KLF2 modulators. Left, GGTI-298 as KLF2 inducer. Right, GGPP as KLF2 repressor. (D) Autophagic flux in response to genetic upregulation of KLF2 (mKLF2: transfected mouse KLF2) in LSEC and HUVEC. (E) Autophagic flux in HUVEC cultured under static conditions or biomechanical shear stress stimulation. **p* < 0.05 vs. its corresponding control; #*p* < 0.05 vs. AdGFP.

Autophagy mediates the protective effects of simvastatin in livers undergoing I/R

Fig. 6 shows that livers undergoing UWS cold storage and warm reperfusion displayed marked accumulation of autophagosomes, both in the endothelium and in hepatocytes, that was accompanied by the development of acute microcirculatory dysfunction (Fig. 7). These detrimental effects of I/R were not observed in rats that received simvastatin prior to cold ischemia, which in fact exhibited increased autophagosome clearance and improved microcirculatory relaxation in response to acetylcholine. Importantly, pharmacological inhibition of hepatic autophagy using CQ completely abrogated the beneficial effects of simvastatin.

To denote, CQ had no effect in vehicle-treated animals, therefore suggesting that CQ specifically affected autophagy (which was indeed downregulated due to cold storage and warm reperfusion) and did not impair microcirculation independently of simvastatin action. Please find additional transmission electron microscopy (TEM) images at different magnifications in Supplementary Fig. 5.

Discussion

Different studies have recently reported that autophagy is inducible by simvastatin or resveratrol [18–20]. These drugs, in addition, are known to strongly activate KLF2 [14,29], a vasoprotective transcription factor determinant in the state and phenotype of the endothelium. Considering this background, we herein aimed to determine the possible link between KLF2 and autophagy in the unique liver sinusoidal endothelium. Interestingly, treatment of LSEC with pharmacological activators of KLF2 increased autophagic flux, demonstrated via two well-accepted techniques, which are the LC3 turnover assay using two different autophagy inhibitors (CQ and Baf) and the colocalization of autophagosomes with lysosomes using confocal microscopy. Moreover, precise upregulation of KLF2 using an adenovirus coding for KLF2 or due to biomechanical shear stress stimulation resulted in markedly increased autophagic flux not only in LSEC, but also in not so specialized endothelial cells (HUVEC), altogether demonstrating for the first time that KLF2 is able to activate autophagy. This finding is consistent with other results indicating that targets of

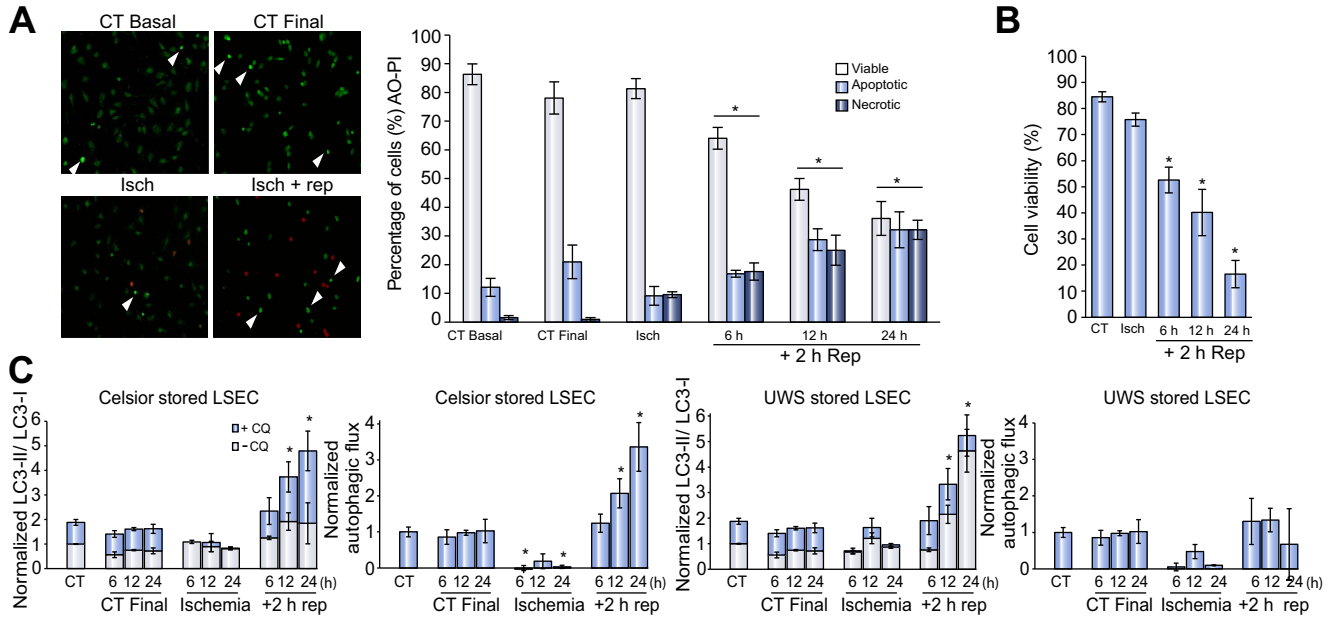


Fig. 2. Characterization of cell death and autophagy in *in vitro* acute liver injury. (A) Evaluation of cell death by double staining with acridine orange & propidium iodide in liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) freshly isolated (control cells; CT basal), cultured in standard conditions for 24 h (CT final), cold stored for 24 h (Isch), or cold stored for 6 h, 12 h and 24 h and afterwards warm reperfused (Rep). Plain and tenuous green cells were counted as viable, cells with bright green nucleus (arrow heads) were considered apoptotic, and red cells, as necrotic. (B) Cell viability of cells described in A assessed by trypan blue exclusion assay. **p* < 0.05 vs. CT. (C) LC3 protein expression in LSEC described in A using Celsior or University of Wisconsin (UWS), as cold storage solutions. Autophagosomes are represented as white bars. Autophagic flux, i.e., autophagosomes accumulation after inhibition of autophagy with chloroquine (CQ), is represented as light blue bars. **p* < 0.05 vs. CT.

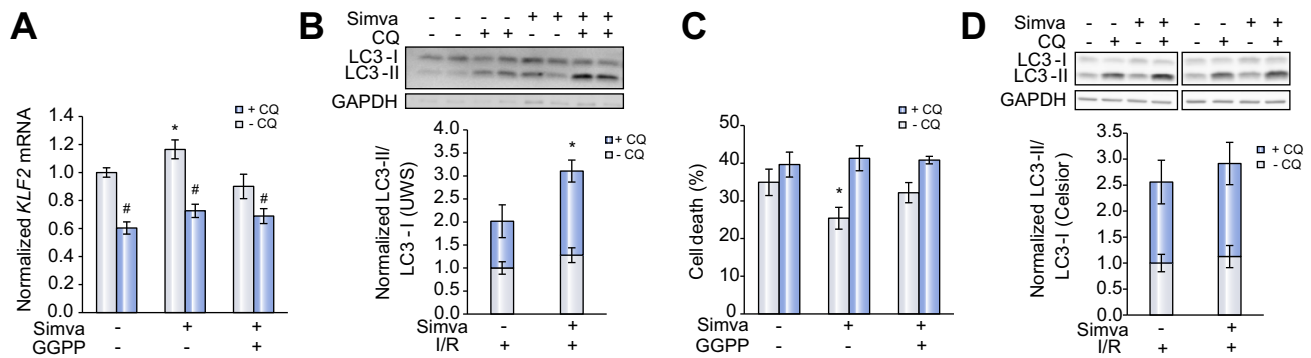


Fig. 3. Simvastatin reactivates the KLF2-autophagy vasoprotective pathway in UWS cold-stored endothelial cells. KLF2 levels (A), autophagic flux (B) and cell death (apoptotic + necrotic cells; C) in UWS cold stored/warm reperfused LSEC pretreated with simvastatin, the KLF2 inhibitor geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP), the autophagy inhibitor CQ, or their corresponding vehicles. (D) Autophagic flux in LSEC cold stored in Celsior solution and warm reperfused. **p* < 0.05 vs. corresponding vehicle; #*p* < 0.05 vs. no-CQ.

KLF2 like HO-1 are associated with autophagy activation and liver protection [26].

Considering that autophagy is a general survival process that is involved in various types of liver injury and may confer opposite properties (i.e., protective or harmful) [7,30], we specifically characterized the viability status and the possible role of autophagy in endothelial cells suffering acute injury by means of cold ischemia and warm reperfusion. To properly evaluate cell viability, we performed a commonly used and well-described technique as is trypan blue exclusion assay, and a more specific fluorescent staining that allows to differentiate between apoptosis and necrosis (AO-PI) [25,31]. As expected, ischemia *per se* did not affect LSEC viability. However, LSEC survival dramatically

decreased upon reperfusion depending on ischemia time, and independent of using Celsior or Wisconsin solutions. Upon reperfusion, cells that were stored in Celsior solution reactivated autophagy in an ischemia time-dependent manner. However, cells stored under UWS exhibited basal accumulation of autophagosomes and were unable to properly reactivate autophagic flux, suggesting impairment of clearance of autophagosomes. It is intriguing how UWS may inhibit the fusion of autophagosomes and lysosomes, especially since its composition does not reveal known inhibitors of autophagy. However, it is important to denote that beyond its composition, previous studies reported significantly better maintenance of energy status (ATP levels) in cells preserved in UWS than in Celsior [32],

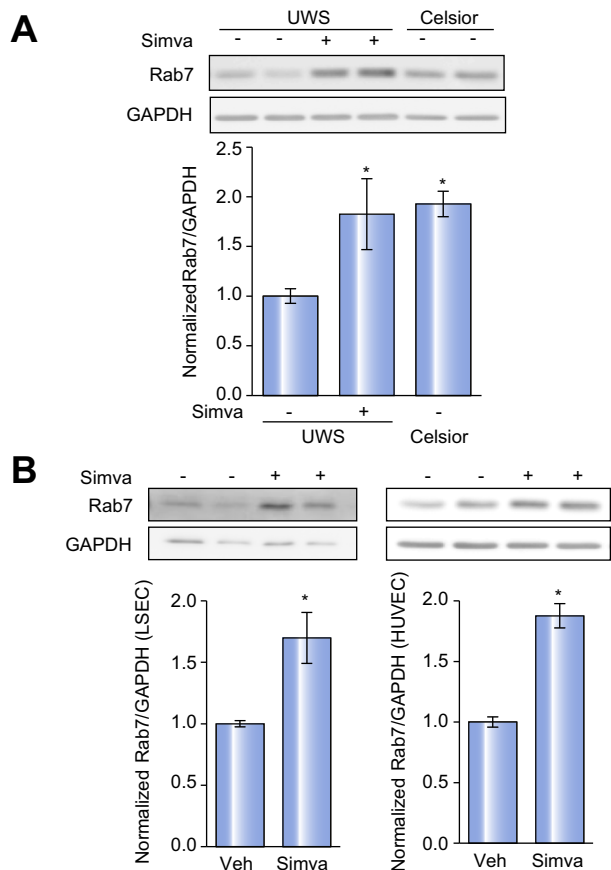


Fig. 4. Simvastatin upregulates Rab7 in endothelial cells. Rab7 protein expression in cold stored/warm reperfused endothelial cells (A), and endothelial cells cultured under standard conditions (B), in response to simvastatin or vehicle. **p* <0.05 vs. vehicle.

which may itself impair autophagic flux. Altogether suggests that UWS protective capability may be further potentiated through the exogenous addition of autophagy activators.

In order to better understand the underlying mechanism for this inhibited formation of autolysosomes, we analyzed the expression of Rab7, a small GTPase responsible for fusion of cellular vesicles that has been reported to mediate the fusion of autophagosomes with lysosomes [33]. These experiments revealed that endothelial cells stored in UWS displayed lower protein levels of Rab7 in comparison to Celsior stored cells.

Considering the above-described inter-relation between KLF2 and autophagy, we next evaluated the possible protective effects of simvastatin in the specific scenario of liver endothelial I/R injury. As expected, simvastatin significantly increased the expression of KLF2 in endothelial cells, which prevented cell damage. It is important to note that the maintenance of cell viability achieved with simvastatin was not observed when LSEC were pretreated with the KLF2 inhibitor GGPP, therefore confirming KLF2-mediated protection. However, when autophagosome-lysosome fusion was blocked using CQ, KLF2 levels and cell viability fell to a threshold level regardless of simvastatin pretreatment, suggesting that autophagy would be upstream of KLF2 in this case. As shear stress is the natural inducer of KLF2, our findings are in agreement with a recent report demonstrating

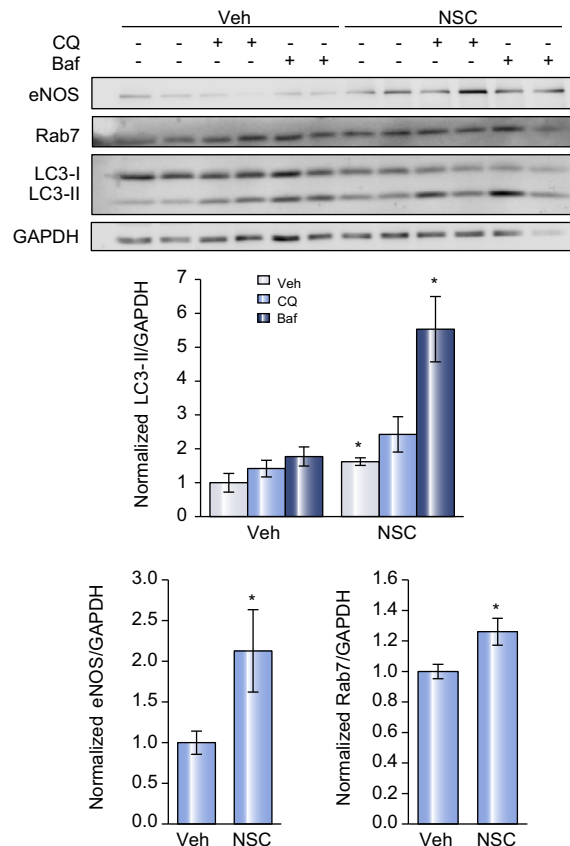


Fig. 5. Inhibition of Rac1 activates the Rab7-autophagy-KLF2 pathway. Protein expression, and relative quantification, of autophagic flux, eNOS (as major KLF2 target gene) and Rab7 in primary LSEC treated for 24 h with the Rac1 inhibitor NSC23766, or its vehicle. **p* <0.05 vs. vehicle.

that autophagy is required to transduce shear stress signaling to nitric oxide production [21].

In addition, regarding the underlying molecular mechanism on how KLF2 activators promote cell survival, we herein demonstrate for the first time that simvastatin activates autophagic flux in the cold stored sinusoidal endothelium, ultimately conferring vasoprotection. It is worth noting that this KLF2 activator did not increase autophagosomes, demonstrated by unchanged levels of Atg7 and basal LC3-II, but promoted their fusion with lysosomes probably through upregulation of Rab7. It is intriguing that p62 levels remain stable in response to simvastatin or rapamycin, however our results are in line with previous data demonstrating that p62 protein expression does not always correlate with autophagic flux, as it can be transcriptionally regulated during autophagy and also be degraded through the proteasomal pathway [33]. Accordingly, despite protein levels of p62 being invariant, autophagy activators increased transcription of p62, altogether suggesting enhanced p62 turnover and thus increased autophagic flux.

Importantly, the novel mechanism of protection of simvastatin was also confirmed in HUVEC and LSEC cultured under standard conditions, moreover validated using mevastatin, thus proposing a new pan-endothelial mechanism by which KLF2 activators may exert their vasoprotection.

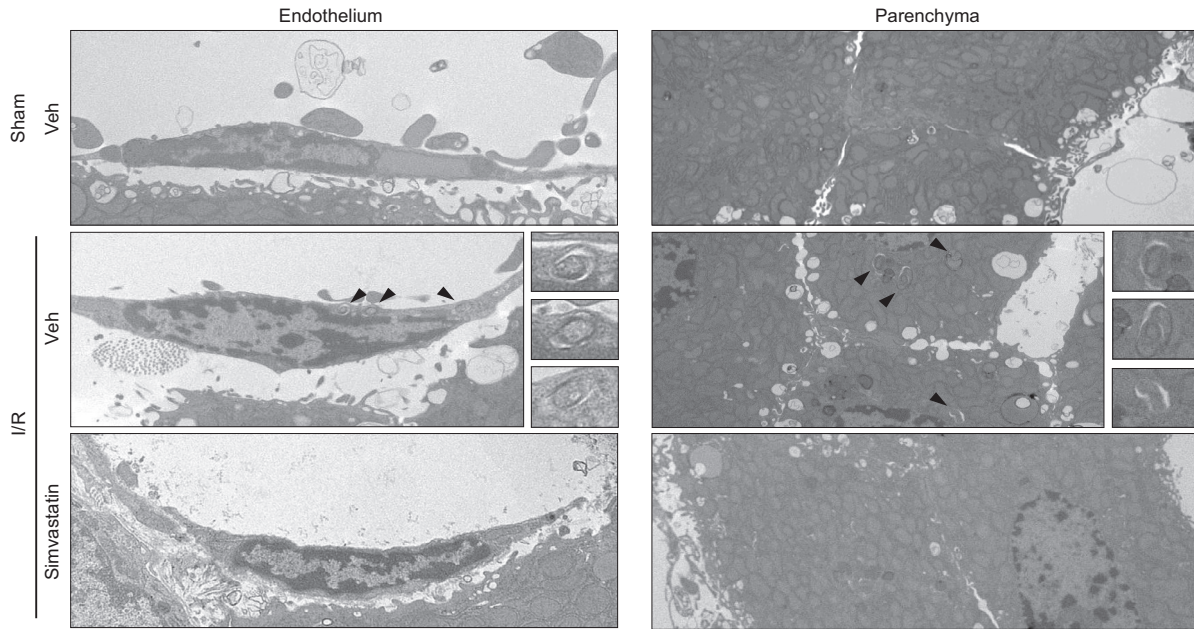


Fig. 6. Simvastatin prevents impairment of autophagosome clearance after I/R in rat livers. Representative TEM images of the endothelium (left panels, 12,000x magnification) and parenchyma (right panels, 6000x magnification) of livers from sham animals, and animals pretreated with simvastatin, or vehicle, and afterwards cold stored and warm reperfused (I/R). Autophagosomes are indicated with arrowheads and amplified on the right side of each image.

To ascertain the molecular link between autophagy activation and KLF2 upregulation, we focused on the GTPase Rac1. In fact, it has been shown that: 1) Rac1 represses autophagy [19], 2) its activity is modulated by geranylgeranylation [34], therefore representing a possible regulator of KLF2 expression, and 3) Rac1 regulates Rab7 protein availability [35]. Considering these data, we assessed whether Rac1 inhibition could have a crucial role in endothelial autophagy. Interestingly, we herein show that specific Rac1 inhibition using NSC23766 was associated with a significant activation of the Rab7-autophagy-KLF2 axis, both in LSEC and HUVEC. Although our results are consistent, it should be noted that previous studies showed opposed effects of statins on autophagy due to the inhibition of Rab11 [36], and that Rab GTPases may also be post-translationally modified by geranylgeranylation [37], so further desirable studies would clarify Rab7 activity and location under these circumstances. Nevertheless, our manuscript adds a significant piece of knowledge regarding the intermediaries involved in the molecular pathway activated by statins and ultimately leading to KLF2 expression. From the current studies it is clear that Rac1 should be now considered as the protein responsible for GGPP-mediated repression of KLF2 expression, either direct or indirectly, and therefore deserves further investigation.

The relevance of these results was also validated in *in vivo* and *ex vivo* models: Firstly, we confirmed the abrogation of autophagic flux in UWS cold stored livers. Indeed, transmission electron microscopy images revealed that rat livers cold stored using UWS showed marked accumulation of double-membraned structures, both in the sinusoidal endothelium and the parenchyma, compared to control rat livers. An increase in the number of autophagosomes after hepatic I/R in UWS was previously reported by others [8,38], but it was associated with an increase in autophagy. However, in the present study, the use of dynamic techniques to monitor autophagic flux *in vitro* suggests that this

increase in autophagosomes after I/R in UWS is caused by a downstream impairment of autophagy also *ex vivo*. This is the reason why we investigated whether the microcirculatory protective effects of statins in the setting of hepatic I/R, previously shown by our group and others [13,16,39], may derive from the reactivation of autophagy. The results of these studies revealed that pretreatment of animals with simvastatin shortly before cold storage activated hepatic autophagic flux (demonstrated by ameliorated autophagosome clearance), leading to improvement of liver microvascular function upon reperfusion (measured as *ex vivo* vasodilatation in response to increasing concentrations of acetylcholine) in comparison to animals receiving vehicle. Moreover, the beneficial effects of simvastatin were dependent on autophagy, as they were not observed when autophagy was effectively blocked in the liver by administering CQ before statin. Aside from the protective effects of autophagy activation by simvastatin in the hepatic microcirculation, we didn't observe any other endothelial protective effects *in vivo*, such as improvement in endothelial cell phenotype (in terms of eNOS and vWF analysis; data not shown), suggesting that reactivation of endothelial autophagy by statins may also have KLF2-independent effects in the hepatic microcirculation, p.e. increased sinusoidal paracrine cross-talk due to rab7-mediated secretion of endothelial autophagic bodies [40–42]. It is also important to note that the *ex vivo* perfusion model used to mimic reperfusion injury reproduces only in part the detrimental effects of this process. Indeed, it lacks blood components such as polymorphonuclear neutrophils and platelets, which may also contribute to LSEC dysfunction and respond to statins.

Finally, and considering previous studies demonstrating simvastatin-mediated KLF2 upregulation in LSEC physiologically stimulated with shear stress [23], we herein propose that activation of autophagy through a simvastatin-KLF2-mediated mechanism may also confer protection in ischemia-independent

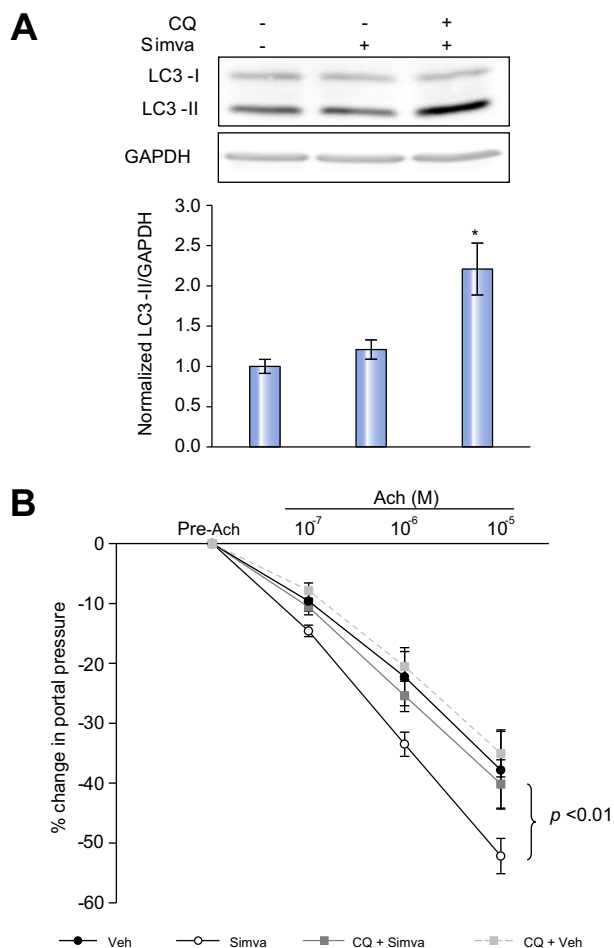


Fig. 7. Autophagy mediates simvastatin-protective effects on microvascular function of rat livers. (A) LC3-II Western blot and quantification in livers from rats pretreated with the autophagy inhibitor chloroquine (CQ), or vehicle, followed by simvastatin, or its vehicle, cold stored for 16 h and warm reperused. (B) Hepatic microcirculatory function of livers described in A calculated as relaxation in response to increasing doses of acetylcholine (Ach) after pre-contraction with methoxamine. *p < 0.05 vs. all.

situations, such as chronic liver disease or other types of acute liver injury.

In conclusion, we herein report for the first time the intimate cross-talk between autophagy and the transcription factor KLF2 in the endothelium. KLF2 *per se* is able to activate autophagy, but in an acute liver injury situation as is I/R, simvastatin would maintain proper autophagic flux through a Rac1-Rab7 pathway, which in turn would maintain KLF2 levels, ultimately conferring endothelial, microvascular and parenchymal protection. Our results help understanding the molecular mechanisms of statin-mediated vasoprotection and developing new therapeutic strategies for the treatment of hepatic and extrahepatic vascular diseases.

Financial support

This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad – Instituto de Salud Carlos III, FIS (PI14/00029 and PI13/00341), and the European Union (Fondos FEDER, “una manera de hacer

Europa”). SG-M has a Fellowship from the Fundació Catalana de Trasplantament. JG-S has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Authors’ contributions

S.G.-M. designed the research, conceived ideas, performed experiments, and wrote the manuscript. F.C.dM. and S.V. performed experiments and analyzed data. V.H.-G., C.P. and J.C.G.-P. critically revised the manuscript. J.B. critically revised the manuscript and obtained funding. J.G.-S. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and directed the study. All authors edited and reviewed the final manuscript.

Acknowledgments

Authors are indebted to Diana Hide for her expert help in electron microscopy, and Martí Ortega-Ribera and Jose Yeste for their expertise in O₂ measurements.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.051>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:2201–2214.
- [2] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:3448–3459.
- [3] Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011;331:456–461.
- [4] Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 2013;152:290–303.
- [5] Amir M, Czaja MJ. Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5:159–166.
- [6] Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:187–200.
- [7] Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Hide D, Bosch J. Modulation of autophagy for the treatment of liver diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2014;23:967–977.
- [8] Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, et al. Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy* 2009;5:351–360.
- [9] Minor T, Stegemann J, Hirner A, Koetting M. Impaired autophagic clearance after cold preservation of fatty livers correlates with tissue necrosis upon

Research Article

- reperfusion and is reversed by hypothermic reconditioning. *Liver Transpl* 2009;15:798–805.
- [10] Wang JH, Ahn IS, Fischer TD, Byeon JI, Dunn Jr WA, Behrns KE, et al. Autophagy suppresses age-dependent ischemia and reperfusion injury in livers of mice. *Gastroenterology* 2011;141:2188–2199.
- [11] Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int* 2015;2015:417590.
- [12] Gracia-Sancho J, Villarreal Jr G, Zhang Y, Yu JX, Liu Y, Tullius SG, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation* 2010;90:142–149.
- [13] **Russo L, Gracia-Sancho J**, Garcia-Caldero H, Marrone G, Garcia-Pagan JC, Garcia-Cardena G, et al. Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology* 2012;55:921–930.
- [14] Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone Jr MA, Garcia-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem* 2005;280:26714–26719.
- [15] **Sen-Banerjee S, Mir S**, Lin Z, Hamik A, Atkins GB, Das H, et al. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 2005;112:720–726.
- [16] Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Hide D, Marrone G, Guixé-Muntet S, Peralta C, et al. Simvastatin maintains function and viability of steatotic rat livers procured for transplantation. *J Hepatol* 2013;58:1140–1146.
- [17] La Mura V, Pasarin M, Meireles CZ, Miquel R, Rodriguez-Vilarupla A, Hide D, et al. Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* 2013;57:1172–1181.
- [18] Guo H, Chen Y, Liao L, Wu W. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013;27:189–198.
- [19] Wei YM, Li X, Xu M, Abais JM, Chen Y, Riebling CR, et al. Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes. *Cell Physiol Biochem* 2013;31:925–937.
- [20] Andres AM, Hernandez G, Lee P, Huang C, Ratliff EP, Sin J, et al. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:1960–1973.
- [21] Bharath LP, Mueller R, Li Y, Ruan T, Kunz D, Goodrich R, et al. Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear-stress-induced increases in nitric oxide bioavailability. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:605–612.
- [22] Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220–227.
- [23] **Marrone G, Russo L**, Rosado E, Hide D, Garcia-Cardena G, Garcia-Pagan JC, et al. The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J Hepatol* 2013;58:98–103.
- [24] Dutting S, Heidenreich J, Cherpokova D, Amin E, Zhang SC, Ahmadian MR, et al. Critical off-target effects of the widely used Rac1 inhibitors NSC23766 and EHT1864 in mouse platelets. *J Thromb Haemost* 2015;13:827–838.
- [25] **Marrone G, Maeso-Díaz R**, Garcia-Cardena G, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Gracia-Sancho J. KLF2 exerts anti-fibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut* 2015;64:1434–1443.
- [26] Yun N, Cho HI, Lee SM. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: heme oxygenase-1 as a possible regulator. *Free Radic Biol Med* 2014;68:168–177.
- [27] Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926–931.
- [28] McLean AJ, Cogger VC, Chong GC, Warren A, Markus AM, Dahlstrom JE, et al. Age-related pseudocapillarization of the human liver. *J Pathol* 2003;200:112–117.
- [29] **Gracia-Sancho J, Villarreal Jr G**, Zhang Y, Garcia-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res* 2010;85:514–519.
- [30] Rautou PE, Mansouri A, Lebrech D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* 2010;53:1123–1134.
- [31] Foglieni C, Meoni C, Davalli AM. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. *Histochem Cell Biol* 2001;115:223–229.
- [32] Janssen H, Janssen PH, Broelsch CE. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl* 2004;10:1514–1523.
- [33] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010;140:313–326.
- [34] Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Curran RO, et al. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem* 2008;283:25150–25163.
- [35] Carroll B, Mohd-Naim N, Maximiano F, Frasa MA, McCormack J, Finelli M, et al. The TBC/RabGAP Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. *Dev Cell* 2013;25:15–28.
- [36] Miettinen TP, Bjorklund M. Mevalonate pathway regulates cell size homeostasis and proteostasis through autophagy. *Cell Rep* 2015;13:2610–2620.
- [37] Coxon FP, Ebetino FH, Mules EH, Seabra MC, McKenna CE, Rogers MJ. Phosphonocarboxylate inhibitors of Rab geranylgeranyl transferase disrupt the prenylation and membrane localization of Rab proteins in osteoclasts in vitro and in vivo. *Bone* 2005;37:349–358.
- [38] Lu Z, Dono K, Gotoh K, Shibata M, Koike M, Marubashi S, et al. Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation. *Arch Histol Cytol* 2005;68:71–80.
- [39] Trocha M, Merwid-Lad A, Szuba A, Chlebda E, Piesniewska M, Sozanski T, et al. Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Pharmacol Rep* 2010;62:343–351.
- [40] Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease Aβ peptide. *Bioessays* 2014;36:570–578.
- [41] **Baietti MF, Zhang Z, Mortier E**, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:677–685.
- [42] Jae N, McEwan DG, Manavski Y, Boon RA, Dimmeler S. Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Lett* 2015;589:3182–3188.

Supplementary Materials and Methods

LSEC isolation

Rat livers were perfused through the portal vein with 200mL of Hanks buffer (HBSS) without calcium and magnesium containing 12.5mM Hepes (pH 7.4), 0.5mM EGTA and 2% BSA, followed by perfusion of 0.02% collagenase A in HBSS containing 12mM Hepes (pH=7.4) and 5mM CaCl₂. Livers were explanted, kindly disaggregated and further digested *in vitro* in this solution for 10 minutes. Resulting cells were filtered through a 100µm nylon filter and collected in cold Krebs buffer. Cells were centrifuged at 50g for 5 minutes in order to eliminate the hepatocytes. The supernatant was then centrifuged at 800g for 10 minutes and the pellet containing LSEC and Kupffer cells (KC) was resuspended in cold PBS and centrifuged again at 800g in a two phase Percoll gradient (25%/50%). The central fraction containing LSEC and KC was collected, washed with PBS and resuspended in LSEC media (RPMI 10% FBS, 2mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1% amphotericin B, 0.1mg/mL heparin and 0.05mg/mL endothelial mitogen). The resulting cell suspension was seeded in a non-coated plate for 30 minutes (37°C, 5% CO₂). KC attached to the plate were discarded and the supernatant containing LSEC was seeded in collagen-treated culture plates for 1h and washed afterwards. The resulting cells were incubated at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂, pharmacological compounds were added to LSEC 2h after isolation.

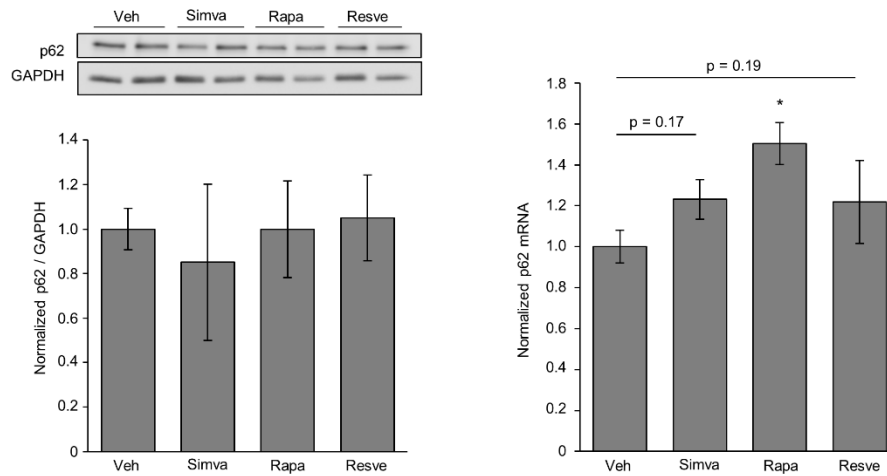
RNA extraction and real-time PCR

Cells were lysed and RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen). The resulting RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer. cDNA was obtained using QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). Real-Time PCR were performed in an ABI PRISM® 7900HT Fast Real-Time PCR System, using TaqMan® predesigned probes for KLF2 and GAPDH or 18S as endogenous controls.

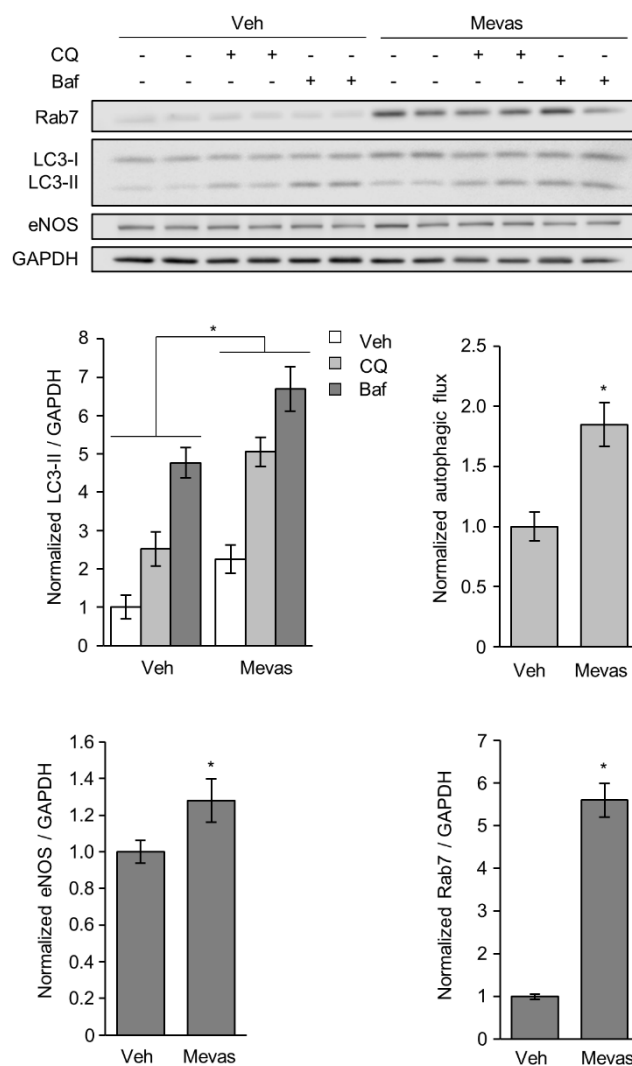
Western Blot

Cells were rinsed twice with PBS and lysed by adding 100 μ L of triton-lysis buffer per well, with the aid of a scrapper. Liver samples were snap-frozen, thoroughly minced with mortar and pestle under liquid nitrogen and added to a tube containing triton-lysis buffer. After that, samples were centrifuged for 10 minutes at 14000g and 4°C and supernatants, containing the protein fraction, were collected. Aliquots containing equal amounts of each sample (10 μ g) were loaded on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels (12%) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked for 1h with Tris buffered saline containing 0.05% Tween-20 and 3% BSA and subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1:1000) against LC3B (Cell Signaling), p62 (Enzo Life Science), Atg7 (Cell Signaling), KLF2 (Santa Cruz Biotechnology), mouse KLF2 (LifeSpan BioScience), eNOS (BD Biosciences), Rab7 (Abcam) and GAPDH (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were used at 1:10000 in 5% non-fat dried milk for 1h. Membranes were developed in a LAS400 (GE Healthcare) and images were analyzed using the Fujifilm Multigauge V2.1 software.

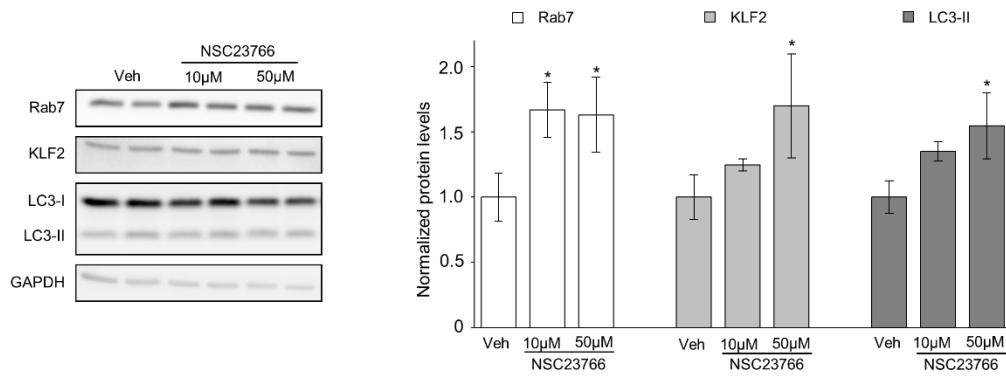
Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Levels of p62 in liver sinusoidal endothelial cells. Protein (left) and mRNA (right) expression of p62 determined in primary rat LSEC treated with vasoprotective drugs or vehicle. * $p < 0.05$ vs. vehicle.

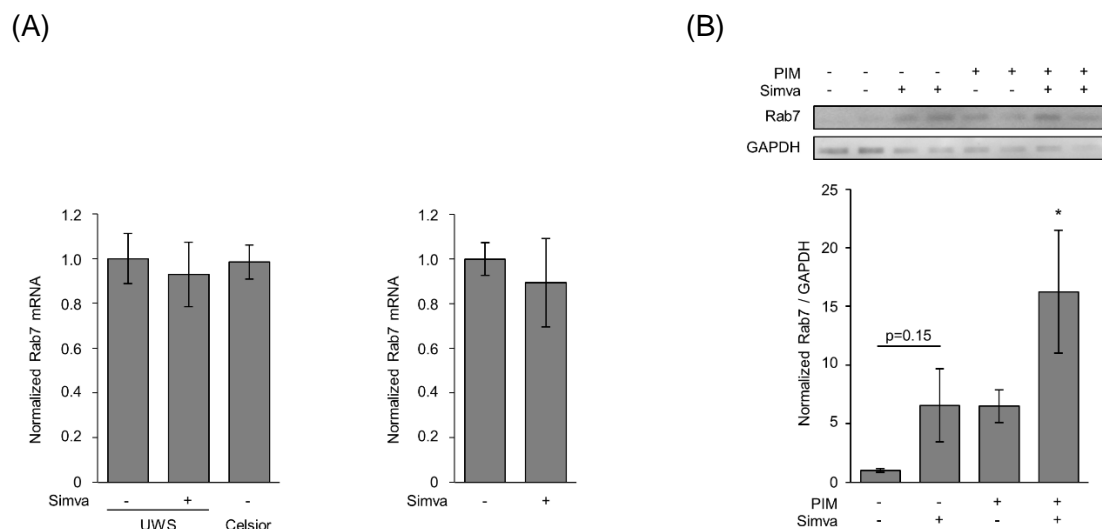


Supplementary Figure 2. Mevastatin activates the Rab7-autophagy-KLF2 protective pathway in LSEC. Treatment of LSEC with 5 μ M Mevastatin for 24h increased the KLF2 axis, Rab7 and autophagic flux. * $p < 0.05$ vs. vehicle.

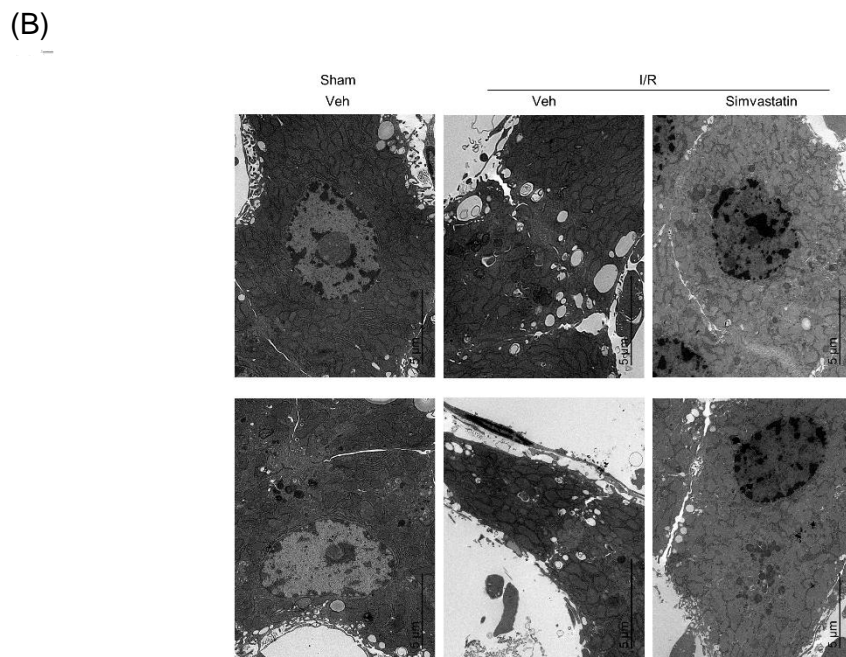
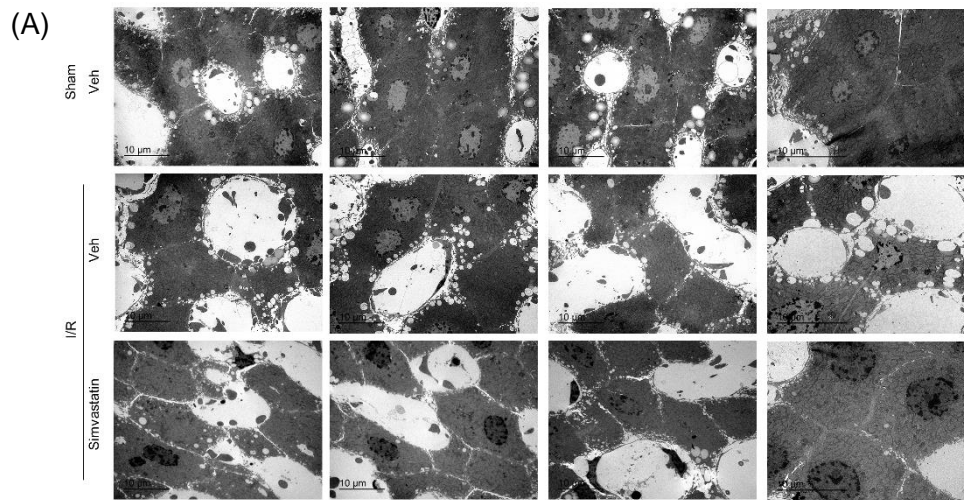


Supplementary Figure 3. Inhibition of Rac1 promotes Rab7, KLF2 and autophagy in HUVEC.

Protein expression, and relative quantification, of Rab7 (white), KLF2 (light grey) and LC3-II (dark grey) in endothelial cells treated for 24h with increasing concentrations of the Rac1 inhibitor NSC23766, or its vehicle. * $p < 0.05$ vs. vehicle.



Supplementary Figure 4. Characterization of induction of Rab7 in response to simvastatin. (A) Rab7 mRNA expression in cold stored/warm reperfused LSEC (left), and LSEC cultured under standard conditions (right), in response to simvastatin or vehicle. (B) Levels of Rab7 protein in LSEC cultured under standard conditions and pretreated with Protease Inhibitor Mix (PIM: 0.5 μ M aprotinin, 5 μ M chymostatin, 5 μ M leupeptin, 5 μ M pepstatin, 3.3 μ g/mL trypsin inhibitor; all from Sigma) or vehicle for 1h followed by addition of 5 μ M simvastatin or vehicle for 24h. * $p < 0.05$ vs. its vehicle.



Supplementary figure 5. Simvastatin prevents impairment of autophagosome clearance after I/R in rat livers. Extended data from Figure 6. TEM images (A: 4000x magnification; B: 6000x) of livers from sham rats and animals pre-treated with simvastatin, or vehicle, and afterwards cold stored and warm reperfused (I/R).

5. RESUM DELS RESULTATS

5. RESUM DELS RESULTATS

5.1. Estudi 1

Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: Evidence from translational studies.

- La liraglutida millora el fenotip de les HSC (primàries humanes i de rata, i LX-2), prevenint-ne l'activació *in vitro*, induint-ne la desactivació (cirròtiques) i reduint-ne la proliferació i la contracció. Aquests efectes s'han validat també en talls hepàtics de precisió (PCLS) provinents de teixit humà.
- La liraglutida millora la hipertensió portal en rates que pateixen malaltia hepàtica crònica, a causa d'una reducció en la HVR derivada d'una millora en el fenotip de les HSC, LSEC i en la funció microvascular.
- Els efectes de la liraglutida són independents dels de la simvastatina en la desactivació de les HSC, suggerint efectes complementaris.
- El mecanisme molecular associat seria independent del receptor de GLP-1, ja que vam ser incapaços de veure'n l'expressió en mostres de diferents teixits hepàtics tant per RT-PCR com per Western Blot, així com tampoc vam observar canvis en l'activació de la seva proteïna diana PKA.
- Els efectes de la liraglutida estan possiblement relacionats amb la via de NF-κB – Sox9.

5.2. Estudi 2

Cross-talk between autophagy and KLF2 determines endothelial cell phenotype and microvascular function in acutely injured rat livers

- La inducció de KLF2, ja sigui farmacològica (simvastatina, resveratrol), genètica (adenovirus) o fisiològica (estès per fricció), activa el flux autofàgic, tant a les LSEC com a l'endoteli general (HUVEC).
- Les LSEC que han patit I/R presenten nivells de mort cel·lular proporcionals al temps d'isquèmia.

- Les cèl·lules que han patit isquèmia en solució Celsior reactiveven l'autofàgia durant la reperfusió també de manera proporcional a la isquèmia. En canvi, aquelles cèl·lules preservades en UWS no són capaces de reactivar el flux autofàgic i presenten nivells d'autofagosomes elevats, suggerint una inhibició de la fusió entre l'autofagosoma i el lisosoma.
- Les LSEC preservades en UWS presenten nivells inferiors de Rab7 (mediador de la fusió autofagosoma – lisosoma) a les que s'han preservat en Celsior. El pretractament amb simvastatina incrementa els nivells de Rab7 quan s'empra UWS. La simvastatina també indueix l'expressió de Rab7 en LSEC o HUVEC en condicions basals.
- La reactivació de l'autofàgia amb simvastatina confereix protecció davant la mort cel·lular a causa del manteniment de l'expressió de KLF2. Tanmateix, l'expressió de KLF2 és alhora dependent dels nivells d'autofàgia, suggerint un efecte de retroalimentació positiva entre KLF2 i autofàgia.
- La inhibició de Rac1 incrementa els nivells de Rab7 i KLF2 i activa el flux autofàgic en LSEC i HUVEC.
- Els efectes beneficiosos de la simvastatina derivats de l'activació de l'autofàgia es van validar també *in vivo*. La simvastatina augmenta el flux autofàgic dels fetges preservats en UWS i en millora la funció microvascular durant la reperfusió, però no quan l'autofàgia s'inhibeix prèviament amb cloroquina.

6. DISCUSSIÓ

6. DISCUSSIÓ

La cirrosi és la situació terminal de la malaltia hepàtica crònica, desencadenada per una resposta multicel·lular de totes les cèl·lules hepàtiques (7). En resposta al dany crònic, tant les cèl·lules sinusoïdals com les parenquimals pateixen canvis severos en el seu fenotip, esdevenint altament desregulades i provocant l'aparició de fibrosi i disfunció microvascular (7,10,24). La conseqüència clínica més rellevant de la desregulació de les cèl·lules sinusoïdals és la hipertensió portal, que deriva tant de l'increment patològic de la HVR com de l'ulterior increment del flux portal (10,60,61). Considerant la importància de les HSC en l'aparició i progressió de la cirrosi, s'han realitzat diversos estudis amb fàrmacs amb especificitat hepàtica capaços d'inactivar les HSC (46,149,70,72–74). Tanmateix, pocs d'ells han arribat a fases clíniques avançades. Quan la cirrosi es descompensa i no hi ha alternativa terapèutica possible, l'única solució per als pacients és el transplantament hepàtic (81). Tot i això, els danys ocasionats pel procés d'I/R, principalment derivats de la desprotecció endotelial (per pèrdua d'expressió de KLF2) (35,41,43,45) i per l'elevada mort cel·lular derivada d'alts nivells d'estrès oxidatiu (101–104), són la causa principal de disfunció microvascular i fallida hepàtica post-transplantament.

Els estudis descrits en aquesta tesi doctoral estan dirigits a caracteritzar els mecanismes del dany hepàtic en la cirrosi i la isquèmia/reperfusió, així com a proposar noves aproximacions farmacològiques fàcilment aplicables a la pràctica clínica per a prevenir/revertir el dany hepàtic crònic o, en última instància, millorar el resultat del transplantament.

L'estudi 1 de la present tesi doctoral mostra per primer cop que la liraglutida millora el fenotip de les HSC tant desactivant-les com prevenint-ne l'activació, suggerint beneficiosos efectes administrada tant en etapes inicials com avançades de la malaltia hepàtica crònica. Una de les forteses d'aquest estudi és que vam enfocar-lo des del punt de vista clínic cap al bàsic (no a l'inrevés), avaluant primer els efectes de la liraglutida en HSC humanes primàries i talls de teixit hepàtic humà i, posteriorment, emprant models pre-clínics de malaltia hepàtica crònica per a caracteritzar-ne els efectes *in vivo*. És destacable, a més

a més, que l'estudi molecular compta amb assajos de contracció que permeten validar els efectes observats sobre la funció real de les HSC.

A diferència d'altres estudis que mostren la desactivació de les HSC associada a la inducció de la seva mort (44,150,151), la millora del fenotip de les HSC en resposta a liraglutida s'acompanya d'efectes antiinflamatoris sense canvis en la viabilitat, suggerint que la liraglutida promou la desactivació de les HSC i en redueix la proliferació sense induir-ne l'apoptosi, essent aquests efectes potencialment òptims per a la resolució de la fibrosi *in vivo*.

Els efectes de la liraglutida es van validar en un model animal de malaltia hepàtica crònica mostrant millores en el fenotip de les HSC i l'endoteli, nivells inferiors de fibrosi i una reducció de la pressió portal associada a la reducció de la HVR i a la millora de la funció microvascular, sense afectar a la circulació sistèmica.

Finalment, vam voler avaluar les possibles vies involucrades en els efectes de la liraglutida sobre les HSC. La liraglutida va ser dissenyada com a fàrmac antidiabètic, actuant sobre el receptor de GLP-1 (GLP-1R) a les cèl·lules pancreàtiques β (77). Considerant que hi ha estudis emprant aquest fàrmac en models de fibrosi cardíaca (78) i fins i tot de NASH (79,80,146), esperàvem trobar expressió de GLP-1R als diferents teixits avaluats en aquest estudi com a mediador dels efectes de la liraglutida. Sorprenentment, no vam ser capaços de detectar-ne l'expressió a les mostres hepàtiques, ni d'RNA (en cap dels tipus cel·lulars) ni de proteïna (només detectable en alguns, però no tots els teixits en els quals observàvem efecte de la liraglutida). De fet, això està en concordança amb altres estudis que qüestionen l'expressió de GLP-1R al fetge (152). En línia amb aquests resultats, la liraglutida no va tenir efecte en l'activació de PKA (diana de GLP-1R) i la inhibició farmacològica de GLP-1R amb exendina9-39 no va ser capaç d'impedir la desactivació de les HSC a causa de la liraglutida. En conjunt, aquests resultats suggereixen que la liraglutida actuaria amb independència de GLP-1R.

Com que els canvis obtinguts amb el tractament amb liraglutida són similars als observats prèviament amb estatines, vam comprovar si aquells podrien ser derivats també de l'activació de KLF2. La liraglutida no va afectar l'expressió de

KLF2 en cèl·lules LX-2 i va tenir un efecte sinèrgic al de la simvastatina, obrint la possibilitat d'emprar una combinació de liraglutida i simvastatina a la pràctica clínica. És interessant com ambdós fàrmacs tenen efectes protectors sobre el fenotip microvascular amb mecanismes d'acció independents de les vies per les quals es van dissenyar (la simvastatina per la síntesi de colesterol i la liraglutida per GLP-1R).

Amb aquests resultats, no podem concloure quina és la via molecular implicada en els efectes observats de la liraglutida, però la via de NF- κ B – Sox9, rellevant en l'activació de les HSC i la cirrosi (147,153) i inhibida en resposta a liraglutida, podria estar-hi implicada.

Al segon estudi, vam voler aprofundir en els mecanismes involucrats en la prevenció del dany hepàtic agut per I/R mediat per estatines i KLF2. Considerant que simvastatina i resveratrol (inductors de KLF2) (36,51) són capaços d'activar l'autofàgia (144,145), la qual és un mecanisme de supervivència cel·lular involucrada en les principals malalties hepàtiques (134), primer vam voler determinar quina era la interrelació entre KLF2 i l'autofàgia a l'endoteli.

Com hem comentat a la introducció de la present tesi doctoral, un dels reptes més importants en l'estudi de l'autofàgia és la correcta monitorització del flux autofàgic; com que les substàncies resultants del procés són molècules abundants al citosol (aminoàcids, lípids) que també s'obtenen com a producte d'altres vies metabòliques, no resulta plausible determinar el flux autofàgic mesurant la quantitat dels seus productes de degradació. Per altra banda, la mesura del nombre d'autofagosomes no és un indicador fiable del flux autofàgic, ja que el seu nombre pot variar per increments en la seva síntesi, però també per diferències en les etapes finals del procés. És per això que les tècniques òptimes per al seu estudi consisteixen en observar la colocalització dels autofagosomes amb els lisosomes o en provocar una aturada de l'autofàgia i mesurar el grau d'acumulació d'autofagosomes. Per a dur a terme aquestes tècniques, la caracterització *in vitro* és gairebé obligada (108,128). Per tant, vam aïllar LSEC primàries i en vam analitzar l'autofàgia en resposta a activadors de KLF2 farmacològics (simvastatina, resveratrol), genètics (adenovirus KLF2) i fisiològics (estrès per fricció). Els resultats d'aquests estudis suggereixen que KLF2, *per se*,

és capaç d'induir l'autofàgia a l'endoteli. Aquest mecanisme no només seria propi de l'endoteli sinusoïdal hepàtic, sinó que s'estendria a tots tipus d'endotelis vasculars. Els nostres resultats són els primers en demostrar l'efecte de KLF2 sobre l'autofàgia i concordarien amb d'altres que mostren l'associació de l'estrès per fricció i gens diana de KLF2 com hemooxigenasa-1 amb l'activació de l'autofàgia endotelial (143,154).

Com que l'autofàgia és un procés generalment associat a supervivència cel·lular però que juga diferents rols en les diverses malalties hepàtiques, vam voler caracteritzar la viabilitat endotelial en condicions d'I/R emprant dues tècniques diferents. Com esperàvem, la isquèmia sola no va afectar la viabilitat de les LSEC. Tanmateix, vam observar un augment dramàtic de la mortalitat durant la reperfusió que era dependent del temps d'isquèmia, independentment de la solució de preservació emprada. De manera similar, vam observar que les LSEC reactiven l'autofàgia de manera depenent del temps que havien estat preservades en Celsior, suggerint un mecanisme compensatori en resposta a l'increment de mortalitat. Tanmateix, la preservació en UWS altera la fusió dels lisosomes amb els autofagosomes, provocant l'acumulació d'aquests últims i bloquejant el flux autofàgic, probablement a causa de la pèrdua de l'expressió de Rab7, una GTPasa petita present als lisosomes i endosomes que s'ha descrit que permet directament la fusió amb l'autofagosoma (131). Com que la composició d'ambdues solucions de preservació no difereix en components moduladors de l'autofàgia, hipotetitzem que el bloqueig de l'autofàgia que ocorre en la preservació en UWS deriva de la seva capacitat de mantenir elevats els nivells cel·lulars d'ATP (155), el qual és un inhibidor de l'autofàgia.

El pretractament amb simvastatina activaria l'autofàgia en aquesta etapa final del procés, ja que indueix l'expressió de Rab7 sense incrementar la síntesi d'autofagosomes i confereix protecció envers la mort cel·lular de manera depenent de l'autofàgia. Sorprenentment, en aquestes condicions KLF2 es troba regulat per l'autofàgia, suggerint un cicle de retroalimentació positiva entre autofàgia i KLF2. De fet, com que l'estrès per fricció és l'activador natural de KLF2 (15), aquests resultats concordarien amb estudis recents que suggereix que l'autofàgia és necessària per a la resposta a l'estrès per fricció o que aquest activa l'autofàgia (142,143).

Per a determinar quin és l'enllaç entre l'expressió de Rab7 i KLF2 i l'activació de l'autofàgia en resposta a simvastatina, ens vam centrar en la GTPasa Rac1, que s'ha descrit que és capaç d'inhibir l'autofàgia (145), s'activa per geranilgeranilació (156) (per tant, essent un possible mediador de la inducció de KLF2 per simvastatina) i regula la disponibilitat de Rab7 (131). De manera interessant, la inhibició farmacològica de Rac1 tant en LSEC com en endoteli vascular reproduïx els efectes observats derivats de la simvastatina (augment de Rab7, KLF2 i flux autofàgic), proposant així a Rac1 com a mediador d'aquests efectes i ampliant així el coneixement dels intermediaris de l'activació de KLF2 per simvastatina.

Finalment, la rellevància d'aquests resultats es va validar *in vivo*, de manera que el pretractament amb simvastatina va reduir l'acumulació hepàtica d'autofagosomes, tant a l'endoteli com als hepatòcits, i va millorar la funció microvascular de manera dependent de l'autofàgia. Seria interessant, però, estudiar els efectes de l'autofàgia hepàtica mediada per simvastatina en un model que també reproduïx els components sanguinis inflamatoris durant la reperfusió.

Per tant, aquest estudi descriu per primera vegada el rol de l'autofàgia endotelial en la I/R, representant una nova diana terapèutica per a la millora de la preservació hepàtica, ampliant sobretot el potencial protector de la solució de preservació UWS.

Els resultats derivats de la present tesi doctoral reforcen la importància del manteniment del fenotip de les cèl·lules sinusoïdals, ja sigui durant el dany agut o crònic. Tot i que cada un dels estudis exposats se centra en un tipus cel·lular sinusoïdal diferent (el primer estudi se centra en la millora de les HSC per mitjà de liraglutida mentre que el segon se centra en la protecció de les LSEC mantenint l'autofàgia endotelial amb simvastatina), ambdós tractaments han demostrat tenir efectes protectors *in vivo* als respectius models animals estudiats a nivell de funció i fenotip microvasculars. Això suggereix que ambdós tractaments millorarien la comunicació entre els diferents tipus cel·lulars sinusoïdals. De fet, estudis recents del nostre grup ja han demostrat efectes beneficiosos de la simvastatina en el *cross-talk* sinusoïdal per efecte de KLF2 (38,44). En aquest sentit, la bibliografia indica que l'autofàgia també intervé en el

procés de comunicació intercel·lular induint la secreció d'exosomes, els quals són vesícules extracel·lulars implicades en la comunicació paracrina entre cèl·lules i la secreció dels quals depèn de les GTPases Rab i altres proteïnes involucrades en l'autofàgia (157). Els resultats del segon estudi mostren per primera vegada com la simvastatina induïx l'expressió de Rab7 endotelial, no només en el context d'isquèmia i reperfusió, sinó que també en condicions basals, de manera que part dels efectes de la simvastatina sobre la comunicació sinusoïdal podrien ser mediats per l'autofàgia.

Per altra banda, també hi ha estudis que suggereixen que la liraglutida és capaç d'activar l'autofàgia (158), obrint la possibilitat a un mecanisme de comunicació també dependent de la maquinària autofàgica. Tanmateix, un efecte directe de la liraglutida sobre el flux autofàgic sembla menys plausible, almenys a les HSC, ja que aquestes cèl·lules utilitzarien l'autofàgia com a mecanisme d'obtenció d'energia per a la seva activació.

En conjunt, els resultats d'ambdós estudis exposats en aquesta tesi doctoral ajuden a ampliar el coneixement sobre la cirrosi i la I/R i proposen nous tractaments i dianes terapèutiques fàcilment aplicables a la pràctica clínica. Aquestes podrien prevenir o corregir el desenvolupament de la cirrosi i, en aquells casos que requereixin transplantament, prevenir la disfunció primerenca.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

7.1. Estudi 1

Liraglutide improves liver microvascular dysfunction in cirrhosis: Evidence from translational studies.

- La liraglutida prevé l'activació i promou la desactivació de les HSC humanes.
- En un model pre-clínic de malaltia hepàtica crònica, la liraglutida millora significativament la hipertensió portal i la fibrosi hepàtica, així com el fenotip endotelial.
- Els efectes de la liraglutida serien independents de GLP-1R i possiblement derivats de la inhibició de la via NF-κB – Sox9.
- La liraglutida té efectes independents de la simvastatina, suggerint que el co-tractament amb ambdós fàrmacs podria tenir efectes sinèrgics en la millora de la cirrosi.

La liraglutida és un fàrmac amb un potencial prometedor per al tractament de la cirrosi, ja que té efectes beneficiosos en mostres humanes i ja està aprovada per a la pràctica clínica.

7.2. Estudi 2

Cross-talk between autophagy and KLF2 determines endothelial cell phenotype and microvascular function in acutely injured rat livers.

- Descrivim per primera vegada la relació entre KLF2 i l'autofàgia endotelial.
- Després de la reperfusió calenta, les LSEC preservades en UWS presenten una inhibició en la formació de l'autolisosoma.
- La simvastatina millora el fenotip hepàtic i la supervivència durant la I/R, reactivant l'autofàgia i mantenint l'expressió de KLF2.
- Aquests efectes podrien ser mediat per la inhibició de Rac1 i el consegüent increment en la GTPasa Rab7.

Aquests resultats ajuden a la comprensió dels mecanismes moleculars de la vasoprotecció mediada per simvastatina i a desenvolupar noves estratègies terapèutiques per al tractament de les malalties hepàtiques i extrahepàtiques.

8. REFERÈNCIES

8. REFERÈNCIES

1. Gracia-Sancho J, Maeso-Díaz R, Fernández-Iglesias A, Navarro-Zornoza M, Bosch J. New cellular and molecular targets for the treatment of portal hypertension. *Hepatol Int.* 2015 Apr 5;9(2):183–91.
2. Fernández-Iglesias A, Gracia-Sancho J. How to face chronic liver disease: the sinusoidal perspective. *Front Med.* 2017;4:7.
3. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):1094–106.
4. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds. *Circ Res.* 2007 Feb 2;100(2):174–90.
5. Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J.* 1990 Mar 1;266(2):313–27.
6. Robson SC. Liver Endothelial Cells: Hemostasis, Thrombosis, and Hepatic Vascular Diseases. In: *Vascular Liver Disease*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 3–23.
7. Marrone G, Shah VH, Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J Hepatol.* 2016 Sep;65(3):608–17.
8. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(24):8681–5.
9. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol.* 2017 Mar 4;
10. García-Pagán J-C, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol.* 2012;57:458–61.
11. Wisse E, Braet F, Dianzhong Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, et al. Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. *Toxicol*

- Pathol. 1996 Jan 1;24(1):100–11.
12. Svistounov D, Zykova SN, Cogger VC, Warren A, Fraser R, Smedsrød B, et al. Pseudocapillarization and the Aging Liver. In: *Vascular Liver Disease*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 41–50.
 13. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2923–30.
 14. Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1689–98.
 15. Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*. 2006 Jan 8;116(1):49–58.
 16. Gimbrone MA, García-Cardena G, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):620–36.
 17. DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, McCuskey RS. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Oct 1;287(4):G757-63.
 18. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, et al. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene*. 1994 Sep;9(9):2683–90.
 19. March S, Hui EE, Underhill GH, Khetani S, Bhatia SN. Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):920–8.

20. Xie G, Choi SS, Syn W-K, Michelotti GA, Swiderska M, Karaca G, et al. Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut*. 2013 Feb;62(2):299–309.
21. DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1740–6.
22. Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. In: *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. p. 1751–74.
23. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2037–48.
24. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1655–69.
25. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology*. 1998 Feb;114(2):344–51.
26. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Bosch J, García-Pagán JC. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 2007 Aug;47(2):220–7.
27. Thoen LFR, Guimarães ELM, Dollé L, Mannaerts I, Najimi M, Sokal E, et al. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*. 2011 Dec;55(6):1353–60.
28. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):938–46.
29. Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal

- pressure and resistance. *Hepatology*. 1996 Jul;24(1):233–40.
30. Bieker JJ. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34355–8.
 31. Atkins GB, Jain MK. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res*. 2007 Jun 22;100(12):1686–95.
 32. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, et al. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*. 2004 May 17;199(10):1305–15.
 33. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, Staniszewski K, Parmar K, Vaughan DE, et al. Kruppel-Like Factor 2 (KLF2) Regulates Endothelial Thrombotic Function. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):e48–57.
 34. Dai G, Vaughn S, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA. Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ Res*. 2007 Sep 28;101(7):723–33.
 35. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, Yu JX, Liu Y, Tullius SG, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation*. 2010 Jul 27;90(2):142–9.
 36. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, García-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res*. 2010 Feb 1;85(3):514–9.
 37. Dekker RJ, van Thienen J V, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J, et al. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol*. 2005 Aug;167(2):609–18.
 38. Marrone G, Russo L, Rosado E, Hide D, García-Cardena G, García-Pagán JC, et al. The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J Hepatol*. 2013 Jan;58(1):98–103.

39. Gracia-Sancho J, Russo L, García-Calderó H, García-Pagán JC, García-Cardena G, Bosch J. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut*. 2011 Apr 1;60(4):517–24.
40. Abrales JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, García-Calderó H, García-Pagán JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol*. 2007 Jun;46(6):1040–6.
41. Russo L, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Marrone G, García-Pagán JC, García-Cardena G, et al. Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology*. 2012 Mar;55(3):921–30.
42. La Mura V, Pasarín M, Meireles CZ, Miquel R, Rodríguez-Vilarrupla A, Hide D, et al. Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology*. 2013;57(3):1172–81.
43. Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Hide D, Marrone G, Guixé-Muntet S, Peralta C, et al. Simvastatin maintains function and viability of steatotic rat livers procured for transplantation. *J Hepatol*. 2013 Jun;58(6):1140–6.
44. Marrone G, Maeso-Díaz R, García-Cardena G, Abrales JG, García-Pagán JC, Bosch J, et al. KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1434–43.
45. Hide D, Ortega-Ribera M, Garcia-Pagan J-C, Peralta C, Bosch J, Gracia-Sancho J. Effects of warm ischemia and reperfusion on the liver microcirculatory phenotype of rats: underlying mechanisms and pharmacological therapy. *Sci Rep*. 2016;6(February):22107.
46. Meireles CZ, Pasarin M, Lozano JJ, García-Calderó H, Gracia-Sancho J, García-Pagán JC, et al. Simvastatin Attenuates Liver Injury in Rodents with Biliary Cirrhosis Submitted to Hemorrhage/Resuscitation. *SHOCK*. 2017 Mar;47(3):370–7.

47. Beckman JA, Creager MA. The nonlipid effects of statins on endothelial function. *Trends Cardiovasc Med*. 2006 Jul;16(5):156–62.
48. Wang C-Y, Liu P-Y, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med*. 2008 Jan;14(1):37–44.
49. Gracia-Sancho J. Enhancing organ pool by statins: Is this the future? *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Aug;27(8):1259–60.
50. Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, Hamik A, Atkins GB, Das H, et al. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation*. 2005 Aug 2;112(5):720–6.
51. Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA, García-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):26714–9.
52. Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, et al. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology*. 2007;46(1):242–53.
53. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749–61.
54. Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1):S121–30.
55. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. The role of central blood volume in the development of sodium retention in portal hypertensive rats. *Gastroenterology*. 1996 Jan;110(1):193–8.
56. Iwakiri Y. Pathophysiology of portal hypertension. *Clin Liver Dis*. 2014 May;18(2):281–91.
57. Bosch J, Abraldes JG. Portal Hypertension: Extrahepatic Mechanisms. In: *Vascular Liver Disease*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 91–100.

58. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology*. 1994 Nov;20(5):1359–63.
59. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, García-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct 1;6(10):573–82.
60. Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):141–56.
61. Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol*. 1985;1(4):325–37.
62. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1983–92.
63. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13;273(46):30249–54.
64. 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 Nov;117(5):1222–8.
65. 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 Aug;125(2):522–31.
66. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase: Fig. 1. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jan 1;284(1):R1–12.
67. Matei V, Rodríguez-Vilarrupla 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

- Jul;44(1):44–52.
68. Yang Y-Y, Lee T-Y, Huang Y-T, Chan C-C, Yeh Y-C, Lee F-Y, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) determines the improvement of hepatic endothelial dysfunction by vitamin E in cirrhotic rats. *Liver Int.* 2012 Jan;32(1):48–57.
 69. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology.* 2007 Dec 10;47(4):1248–56.
 70. Rosado E, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Tripathi D, García-Calderó H, Bosch J, et al. Terutroban, a TP-receptor antagonist, reduces portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2013;58(4):1424–35.
 71. Guillaume M, Rodríguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, Rosado E, Mancini A, Bosch J, et al. Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl₄-cirrhotic rats. *J Hepatol.* 2013 Feb;58(2):240–6.
 72. Di Pascoli M, Diví M, Rodríguez-Vilarrupla A, Rosado E, Gracia-Sancho J, Vilaseca M, et al. Resveratrol improves intrahepatic endothelial dysfunction and reduces hepatic fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol.* 2013 May;58(5):904–10.
 73. Abraldes JG, Albillos A, Bañares R, Turnes J, González R, García-Pagán JC, et al. Simvastatin Lowers Portal Pressure in Patients With Cirrhosis and Portal Hypertension: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology.* 2009 May;136(5):1651–8.
 74. Abraldes JG, Villanueva C, Aracil C, Turnes J, Hernandez-Guerra M, Genesca J, et al. Addition of Simvastatin to Standard Therapy for the Prevention of Variceal Rebleeding Does Not Reduce Rebleeding but Increases Survival in Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2016 May;150(5):1160–1170.e3.
 75. Nauck MA. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med.* 2011 Jan;124(1 Suppl):S3-

- 18.
76. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Death Differ.* 2006;3(3):153–65.
77. Jin T, Weng J. Hepatic functions of GLP-1 and its based drugs: current disputes and perspectives. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Sep 1;311(3):E620-7.
78. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, Hu Y, Widdop RE, Knudsen LB, et al. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE^{-/-} mouse model. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2011 Apr;8(2):117–24.
79. Wang X-C, Gusdon AM, Liu H, Qu S. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation. *World J Gastroenterol.* 2014;20(40):14821–30.
80. Armstrong MJ, Hull D, Guo K, Barton D, Hazlehurst JM, Gathercole LL, et al. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2016;64(2):399–408.
81. Prieto M, Clemente G, Casafont F, Cuende N, Cuervas-Mons V, Figueras J, et al. [Consensus document on indications for liver transplantation. 2002]. *Gastroenterol Hepatol.* 26(6):355–75.
82. Pirenne J, Van Gelder F, Aerts R, Monbaliu D, Van Hees D, de Roey J, et al. Abdominal Transplant Surgery and Transplant Coordination University Hospitals Leuven 1997-2007: an overview. *Acta Chir Belg.* 108(1):15–21.
83. Busuttil R, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transplant.* 2003 Jul;9(7):651–63.
84. Gracia-Sancho J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin Sci.* 2015 Aug 1;129(4):345–62.
85. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ*

- Res. 1989 Oct;65(4):1045–56.
86. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺i, Ca²⁺i, Mg²⁺i, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1992 Apr 5;267(10):6654–63.
 87. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1985 Feb;17(2):145–52.
 88. Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: Role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology*. 2002 Sep;36(3):562–72.
 89. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Apr 14;160(1):140–7.
 90. Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 1994 Jul;20(1 Pt 1):177–85.
 91. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int*. 2007 Feb;27(1):6–16.
 92. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008 Oct 13;1(1):5.
 93. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 1992 Nov;16(5):1236–40.
 94. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Aug;18(8):891–902.
 95. Abdennebi H Ben, Zaoualí MA, Alfany-Fernandez I, Tabka D, Roselló-Catafau J. How to protect liver graft with nitric oxide. *World J Gastroenterol*. 2011 Jun 28;17(24):2879.

96. Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Rodés J, Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res.* 2013 Aug 26;47(8):555–68.
97. Wanner GA, Ertel W, Müller P, Höfer Y, Leiderer R, Menger MD, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock.* 1996 Jan;5(1):34–40.
98. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000 Aug;32(2):169–73.
99. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol.* 1992 Oct;52(4):377–82.
100. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2682–90.
101. Clavien P-A. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology.* 1998 Aug;28(2):281–5.
102. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology.* 1989 Sep;10(3):292–9.
103. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation.* 1989 Sep;48(3):463–8.
104. Miyagawa Y, Imamura H, Soeda J, Matsunaga K, Mochida S, Fujiwara K, et al. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transplant.* 2002 Apr;8(4):370–81.
105. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal

- cell injury. *J Leukoc Biol.* 1997 Jun;61(6):647–53.
106. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994 Dec;145(6):1421–31.
107. Klar E, Angelescu M, Zapletal C, Kraus T, Herfarth C. Impairment of hepatic microcirculation as an early manifestation of acute rejection after clinical liver transplantation. *Transplant Proc.* 31(1–2):385–7.
108. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010 Feb 5;140(3):313–26.
109. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2201–14.
110. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 2014 Jan 26;24(1):92–104.
111. Santambrogio L, Cuervo AM. Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy.* 2011 Jun;7(6):652–4.
112. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Dec;17(6):596–603.
113. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006 Dec 15;26(24):9220–31.
114. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1131–5.
115. Domart M-C, Esposti DD, Sebah M, Olaya N, Harper F, Pierron G, et al. Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. *J Hepatol.* 2009 Nov;51(5):881–9.
116. Wang Y, Han C, Lu L, Magliato S, Wu T. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology.*

- 2013 Sep;58(3):995–1010.
117. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*. 2013;152(1–2):290–303.
 118. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science* (80-). 2010 Jan 28;331(2011):456–61.
 119. Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7772–7.
 120. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):157–68.
 121. Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;1(98):592–602.
 122. Ding W-X, Li M, Chen X, Ni H-M, Lin C-W, Gao W, et al. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1740–52.
 123. Wu D, Wang X, Zhou R, Yang L, Cederbaum AI. Alcohol steatosis and cytotoxicity: The role of cytochrome P4502E1 and autophagy. *Free Radic Biol Med*. 2012 Sep 15;53(6):1346–57.
 124. Lin C-W, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):993–9.
 125. Shinohara Y, Imajo K, Yoneda M, Tomeno W, Ogawa Y, Kirikoshi H, et al. Unfolded protein response pathways regulate Hepatitis C virus replication via modulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Mar 8;432(2):326–32.

126. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 1999 Jul 15;18(14):3888–96.
127. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy.* 2011 Nov 27;7(11):1273–94.
128. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhietty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akemat ZS. Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1–222.
129. Sir D, Chen W, Choi J, Wakita T, Yen TSB, Ou JJ. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology.* 2008 Oct;48(4):1054–61.
130. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari F V. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Aug 18;106(33):14046–51.
131. Carroll B, Mohd-Naim N, Maximiano F, Frasa MA, McCormack J, Finelli M, et al. The TBC/RabGAP Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. *Dev Cell.* 2013 Apr 15;25(1):15–28.
132. Mohl B-P, Tedbury PR, Griffin S, Harris M. Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. *J Virol.* 2012 Oct 1;86(19):10724–32.
133. Sir D, Tian Y, Chen W -I., Ann DK, Yen T-SB, Ou J -h. J. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Mar 2;107(9):4383–8.
134. Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Hide D, Bosch J. Modulation of autophagy for the treatment of liver diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;3784(December):1–13.

135. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J.* 2010 Aug 1;24(8):3052–65.
136. Papáčková Z, Daňková H, Páleníčková E, Kazdová L, Cahová M. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiol Res.* 2012;61 Suppl 2:S67-76.
137. Minor T, Stegemann J, Hirner A, Koetting M. Impaired autophagic clearance after cold preservation of fatty livers correlates with tissue necrosis upon reperfusion and is reversed by hypothermic reconditioning. *Liver Transpl.* 2009 Jul;15(7):798–805.
138. Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, et al. Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy.* 2009 Apr;5(3):351–60.
139. Kim J-S, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, Dunn WA, et al. Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. *Hepatology.* 2008 May;47(5):1725–36.
140. Wang J-H, Ahn I-S, Fischer TD, Byeon J-I, Dunn WA, Behrns KE, et al. Autophagy suppresses age-dependent ischemia and reperfusion injury in livers of mice. *Gastroenterology.* 2011 Dec;141(6):2188–2199.e6.
141. Sun K, Xie X, Liu Y, Han Z, Zhao X, Cai N, et al. Autophagy lessens ischemic liver injury by reducing oxidative damage. *Cell Biosci.* 2013 Jun 10;3(1):26.
142. Bharath LP, Mueller R, Li Y, Ruan T, Kunz D, Goodrich R, et al. Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear-stress-induced increases in nitric oxide bioavailability. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014 Jul;92(7):605–12.
143. Liu J, Bi X, Chen T, Zhang Q, Wang S-X, Chiu J-J, et al. Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression. *Cell Death Dis.* 2015 Jul 16;6(7):e1827.
144. Guo H, Chen Y, Liao L, Wu W. Resveratrol Protects HUVECs from Oxidized-LDL Induced Oxidative Damage by Autophagy Upregulation via

- the AMPK/SIRT1 Pathway. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Jun 29;27(3):189–98.
145. Wei Y-M, Li X, Xu M, Abais JM, Chen Y, Riebling CR, et al. Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31(6):925–37.
146. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England).* 2016 Feb 13;387(10019):679–90.
147. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(2):108–18.
148. Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Nov 5;11(3):187–200.
149. Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla 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 Jan 1;58(1):118–25.
150. Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, et al. Gliotoxin Stimulates the Apoptosis of Human and Rat Hepatic Stellate Cells and Enhances the Resolution of Liver Fibrosis in Rats. *Gastroenterology.* 2001;121(3):685–98.
151. Klein S, Klösel J, Schierwagen R, Körner C, Granzow M, Huss S, et al. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest.* 2012;92:1440–50.
152. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, et al. GLP-1 Receptor Localization in Monkey and Human Tissue: Novel Distribution Revealed With Extensively Validated Monoclonal Antibody. *Endocrinology.* 2014;155(4):1280–90.

153. Pritchett J, Harvey E, Athwal V, Berry A, Rowe C, Oakley F, et al. Osteopontin is a novel downstream target of SOX9 with diagnostic implications for progression of liver fibrosis in humans. *Hepatology*. 2012;56(3):1108–16.
154. Yun N, Cho H-I, Lee S-M. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: heme oxygenase-1 as a possible regulator. *Free Radic Biol Med*. 2014 Mar;68:168–77.
155. Janssen H, Janssen PHE, Broelsch CE. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl*. 2004 Dec;10(12):1514–23.
156. Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, et al. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem*. 2008 Sep 12;283(37):25150–63.
157. Papandreou M-E, Tavernarakis N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease. *Biotechnol J*. 2017 Jan;12(1):1600175.
158. He Q, Sha S, Sun L, Zhang J, Dong M. GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Aug 5;476(4):196–203.

9. ALTRES PUBLICACIONS

9. ALTRES PUBLICACIONS

A continuació es detallen altres publicacions en les quals he participat durant el desenvolupament de la present tesi doctoral:

Article 1 - MODULATION OF AUTOPHAGY FOR THE TREATMENT OF LIVER DISEASES

Gracia-Sancho J, **Guixé-Muntet S**, Hide D, Bosch J

Expert Opinion on Investigational Drugs, 2014; 23; 7; 965-977.

Revisió bibliogràfica. IF: 4,46

Article 2 - RESISTIN AND VISFATIN IN STEATOTIC AND NONSTEATOTIC LIVERS IN THE SETTING OF PARTIAL HEPATECTOMY UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION

Elias-Miró M, Mendes-Braz M, Cereijo R, Villarroya F, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J, **Guixé-Muntet S**, Massip-Salcedo M, Domingo JC, Bermudo R, Rodés J, Peralta C;

Journal of Hepatology, 2014; 60; 1; 87-95.

Article científic. IF: 10,59.

Article 3 - SIMVASTATIN MAINTAINS FUNCTION AND VIABILITY OF STEATOTIC RAT LIVERS PROCURED FOR TRANSPLANTATION

Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Hide D, Marrone G, **Guixé-Muntet S**, Peralta C, García-Pagán JC, Abrales JG, Bosch J

Journal of Hepatology, 2013; 58; 6; 1140-1146.

Article científic. IF: 10,59.

10. AGRAÏMENTS

10. AGRAÏMENTS

Primerament, m'agradaria expressar la meva gratitud als meus directors de Tesi. El 2011 vaig arribar al laboratori sense entrevista prèvia, per assignació unilateral de la Universitat, així que el becari que us va tocar vaig ser jo. Tot i així, em vàreu donar l'opció de seguir al laboratori i us estic molt agraït.

Jordi, gràcies per tenir sempre la porta del despatx oberta per qualsevol consulta. Quan vaig començar, em meravellava com en un determinat moment trucava a la porta del despatx, capcot, amb uns resultats desastrosos, contradictoris i inexplicables i al cap de cinc minuts en sortia amb els mateixos números, però pensant que eren els més *biúrifuls* i *promisings* de tots els possibles. Gràcies per donar consells sempre en positiu i guiar-nos, però deixant-nos marge per a pensar per nosaltres mateixos. També per portar-me de congressos i tenir l'oportunitat d'aprendre a exposar i defensar els resultats davant d'altres experts. Gràcies pel teu *coaching*, les sortides de grup, els esmorzars i dinars o els crosanets/*xuxes* de les reunions. Gràcies també per motivar-nos amb frases com "*Tú mismo, es tu tesis; ¿Tú te quieres doctorar?; Heu de llegir més; Quan jo era predoc, venia a les 4 de la matinada a recollir les biòpsies*" que ens donen ànims per treballar més dur cada dia (també ens has ensenyat a ser sarcàstics jajaja). Broma a part, estic molt content d'haver treballat 6 anys amb tu i poder seguir fent-ho uns quants més.

Jaume, és un honor haver pogut fer la Tesi sota la teva direcció. He après molt de tu, tant a *journal clubs*, reunions, congressos o per les correccions dels articles, i tindrè la sort de seguir-ne aprenent. També vaig descobrir que ets de les persones més divertides de l'Hemodinàmica. No sé si el grup de Suïssa té himne, però si el tenen, no crec que el cantin amb tant de sentiment com es canta el de l'Hemodinàmica.

També voldria fer extensiu el meu agraïment a la resta d'IPs del grup. **Joan Carles**, quan vaig arribar al laboratori encara fèiem reunions de grup conjuntes amb el grup JGS i vaig tenir l'oportunitat d'aprendre molt de la teva visió crítica de l'anàlisi de dades. **Virginia**, gràcies per la teva amabilitat i per donar-me consell quan he tingut dubtes sobre autofàgia. Gràcies també per rescatar-me amb el cotxe a Lleida! **Mercedes**, sempre has tingut paraules amables per a mi

i, encara que gairebé només hem coincidit als *journal clubs* i en algun congrés, he tingut l'oportunitat d'aprendre molt de tu. Gràcies.

A continuació, voldria donar les gràcies als companys de treball que heu compartit espai, feina i vida durant aquesta tesi.

Anabel, mai hagués pensat que riuria tant muntant un gràfic o discutint sobre un WB de GLP-1R amb anti-chicken (faig un incís per agrair a en Jordi la paciència que ha tingut amb nosaltres...). Treballar amb tu és molt fàcil i fa que fins i tot els torns de dia + nit es facin més passables (sobretot quan un s'acostuma a decantar tenint-te al costat) i m'ha permès descobrir que al darrere de la xunga dels “Oye, ¿es una broma o qué?” i els “Eh, en serio, que no nos jodan...” hi ha una gran persona i una amiga amb qui espero no perdre el contacte mai.

Fernanda, cuando llegaste al laboratorio, tuve la suerte de ser yo quien iba a trabajar contigo. Al principio, sólo teníamos que plantar unas LX-2, pero al final nos animamos a hacer experimentos y mira... ¡Un paper entero! Muchas gracias por tu amabilidad y tu ayuda constante. Espero que puedas volver pronto al laboratorio y que nos veamos en breve. **Raquel**, amb tu vaig començar a aprendre a fer aïllaments. És una manera, si més no, original de conèixer algú.

Agraeixo el teu bon humor i les teves rialles constants (que de vegades se senten des de l'office). **Martí**, m'alegro molt d'haver vist l'evolució del “Ai, vols dir?” al “Tot ben net, eh...”. Qui ho havia de dir quan vas arribar! Gràcies per la teva disposició a ajudar i pels teus compliments tan espontanis. Gràcies a tu, a l'Anabel i a la secció de “coses generals” de les reunions JGS per posar-me una mica més al dia del què passa al món.

Nico, ha sido muy fácil trabajar contigo y creo que siempre nos hemos entendido muy bien. Gracias por enseñarme italiano en cultivos (al menos, las expresiones más usadas; porco Dio, Dio cane, entre otras...) mientras nos *regalimava* el hígado por las manos. **Júlia**, no sé si t'ho haurem dit alguna vegada, però és una pena que ens deixis. Ets molt llesta i treballadora, però sobretot ets molt bona persona. Segur que facis el que facis en un futur, t'anirà molt bé.

Gabriela, nos conocemos desde hace poco, pero siempre has sido muy amable conmigo. Espero que no te hayamos asustado mucho con nuestras peculiares conversaciones a la hora de comer o en el office.

Sergi V, gràcies per estar sempre disposat a ajudar en qualsevol cosa i per fer-nos el dia a dia tan fàcil, ja sigui per tema de laboratori, per tema informàtic o en

qualsevol altre aspecte personal. Trobo a faltar els debats sobre independència i que ens posis al dia del que es cou al Twitter. **Giusi**, durante mucho tiempo has sido la becaria senior del grupo y un ejemplo para mí y me alegro de que vuelvas al lab, aunque vayamos a coincidir poco tiempo. De ti aprendí mucho de ciencia e intenté absorber algo de tus ganas de trabajar incansablemente (aunque aún no he llegado a tu nivel de hacer cinco experimentos a la vez). **Diana**, també com a becària sènior he après molt de tu des del primer dia que vaig arribar al laboratori. Ara que marxo a viure sol, m'hagués anat bé que m'ensenyessis també alguna recepta d'aquests dinars tan bons que sempre portaves. M'ho he passat molt bé amb tu, tant al CEK com a les sortides de grup o al congrés als famosos i típics *Viñedos* de San Francisco. **Héctor**, el primer dia de pràctiques, em vas ensenyar a polvoritzar mostra, i recordo que em vas dir "estate atento y toma apuntes porque yo no explico las cosas dos veces". Com pots veure, vaig estar tan atent que encara recordo cada paraula. Allò em va impressionar una mica, però de seguida vaig veure que ets una gran persona. Sempre has estat disposat a ajudar-me en tot el possible, ja sigui per punxar rates, fer estudis, cGMP, analitzar dades... Fins i tot se't pot demanar un tornavís, un connector o ajuda per desembussar una bomba d'aigua, i la llista seguiria. A banda d'això, ets un home molt savi de qui he après molt. Gràcies. **Montse**, al cap de poc d'arribar al CEK vaig pensar que hi hauria d'haver miralls a les cantonades jajaja. Tu em vas ensenyar a treballar a cultius, que és on més estona hi he passat durant la tesi, i vas fer que els nervis del principi s'esvaïssin i m'hi acabés trobant còmode i tot. Gràcies per tenir sempre un moment per ajudar-me en qualsevol cosa, sempre amb un somriure. **Marina**, els primers anys de tesi, érem companys de poyata i compartíem l'ordinador més atrotinat del laboratori i crec que encara ens organitzàvem prou bé! Com que hem estat becaris contemporanis, sempre he pogut consultar-te dubtes sobre beques, congressos i informes del doctorat, que sempre m'has sabut resoldre. Gràcies per les converses sobre OnePiece i d'altres frikades i per fer-me descobrir d'altres títols que han fet que alguns dies arribés a la feina havent dormit massa poc. **Dinesh**, do you remember how we met? I was told by Jordi that an Indian researcher was coming back to the lab and that I was meant to meet with you at the police station. Since that day, you have always had nice words and a big smile for me. Thanks for all the interesting scientific chats we have had the moment before leaving the

lab, so that a simple five minutes question usually became a half an hour discussion. I want to thank **Rupal** too for always being so nice and kind to me. **Erica**, *màx razies*. Quan marxi, trobaré a faltar sentir constantment els teus laments amb veu súper-aguda, però sobretot (i encara que no t'ho sembli) la felicitat i l'alegria que desprends. Gràcies també per abaixar el volum del reguetón quan entrava a la sala d'animals. **Laia**, gràcies per les discussions sobre autofàgia que m'han fet reflexionar sobre experiments i tècniques i per estar sempre disposada a adaptar els calendaris aquelles setmanes amb dos o tres aïllaments dobles diaris. **Maria**, estic molt content d'haver trobat algú amb qui poder parlar de temes importants (*Final Fantasy*, *Skyrim* i *The Witcher* entre d'altres). Gràcies per compartir la teva indignació amb els experiments que et vacil·len, que acaba conduint a converses sobre westerns i aïllaments bastant interessants. **Genís**, el primer dia que vaig parlar amb tu vas fer que tingués la sensació de conèixer-te des de fa molt de temps. Gràcies per les converses sobre autofàgia o PCRs però també sobre viatges o música (et dec una llista de Spotify que espero haver-te enviat abans de llegir aquesta tesi). **Ester**, la més matinera del lab, gràcies per haver-me suportat durant molts matins preparant buffers al darrere teu amb el soroll de la mosca. Gràcies també pel teu tracte tan alegre i per fer que em senti una mica més comprès quan dic que no entenc el “jovent” del lab. **Marc** i **Javi**, us he de fer un agraïment conjunt per treure sempre els temes importants a l'office com els cognoms dels colors, la roba d'entretemps o la pinya a la pizza. Encara que tu, Marc, siguis un expert en cervesa artesana y que tú, Javi, tengas *el argumento* en contra de beber agua, gràcies per acceptar-me com sóc i els meus gustos estranys per la beguda (al menys no prenc infusions de color vermell). **Núria P**, aviat passaré de sentir-te des de l'altra punta del laboratori a anar a viure a un país de gent silenciosa. Em sembla que ho trobaré a faltar. Una mica. **Marta**, gràcies per posar una mica de seny dins de tota aquesta colla i per compartir alguna activitat friki amb mi. **Núria S**, **Salva** i **Carlota**, us desitjo que tingueu molt d'èxit en els vostres projectes, tant actuals com futurs.

També vull donar les gràcies a tothom amb qui vaig coincidir als meus inicis al lab (**Lucia**, **Marcos**, **Eugenio**, **Aina**, **Laura**, **Annalisa**, **Cintia**, **Federica**, **Marco** i **Vincenzo**), que vau acollir-me molt càlidament al laboratori i em vàreu ensenyar

molt sobre ciència, i desitjar el millor a tots aquells que també han compartit amb mi una temporada de les seves vides al laboratori: **Cristina, Anna, Gustavo, Maria N, Estivaliz i Alba**.

Vull donar les gràcies a tota la part clínica de l'Hemodinàmica Hepàtica que, encara que pràcticament només hem coincidit a seminaris, congressos i sopars de Nadal, sempre heu estat molt amables amb mi i m'heu fet sentir molt còmode.

També vull donar les gràcies a tots els companys de la quarta planta del CEK, amb qui he compartit espai de treball durant els anys de la tesi (i més) i heu fet que estar tancat a la sala de cultius o la de microscòpia es fes molt més amè.

Vull donar les gràcies als professors de La Llauna i en especial a la **Roser** i l'**Elena** per despertar-me la curiositat científica i el gust per la bioquímica amb aquelles classes sobre fibrosi quística o la isomeria dels compostos orgànics. Recordo les tardes de pràctiques de biologia o química com de les classes més divertides de l'institut.

Gràcies a en **Pol** i l'**Oriol** per aquests sopars de pans d'olives i pizza d'unes quantes estacions i els passejos per tirar avall que serveixen per posar-nos al dia dels nostres projectes i arreglar el món o, si més no, passar una bona estona de tant en tant (de vegades massa de tant en tant).

Gràcies als bioquímics, **Genís, Alicia, Verònica** i **Laura**, que encara que estiguem una mica escampats pel món, aprofitem les ocasions per retrobar-nos i explicar les novetats, tot i que sempre acabem tornant enrere parlant de les classes sobre fòssils, ratolins *entrepà* o *ginom brausers*, que no deixen mai de perdre la gràcia.

Oscar, gracias por nuestras conversaciones profundas sobre cómo funciona el mundo. Ya sabes que aunque no suelo hablar mucho, me gusta mucho escuchar y aprender de ti. Eso es así, como todo. Gracias también a **Dana** por haber aguantado nuestra tontería desde hace tantos años. Parece que fue ayer.

Gràcies als **Tokyo's 35ers**, per haver-me "fitxat" a l'equip en base a les impressions d'un partit de comiat de solter i per haver-me despertat un altre cop les ganes de bàsquet.

Ja acabant, una abraçada ben forta als **tiets** Guixé i Muntet per interessar-vos freqüentment per com va la tesi i donar-me tants ànims sempre, i tots els **cosins** (noves incorporacions incloses) pels sopars de cosins, les tardes de cine o les partides de *play*.

I per acabar, gràcies **Papa** i **Mama** per recolzar-me sempre i per haver-me donat l'educació i els valors que m'han fet com sóc. **Roger**, gràcies per ser el millor germà i amic del món. Us estimo molt.

