



Papel del factor de transcripción Kruppel-like factor 2 en la disfunción endotelial hepática asociada a la hipertensión portal y al daño por isquemia y reperfusión

Lucia Russo

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) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina

**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN KRUPPEL-
LIKE FACTOR 2 EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
HEPÁTICA ASOCIADA A LA HIPERTENSIÓN PORTAL Y
AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

Tesis presentada por

LUCIA RUSSO

Para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado de Medicina

Directores: Dr. Jorge Gracia-Sancho / Prof. Jaime Bosch

**Trabajo realizado en los laboratorios de Hemodinámica Hepática e
Hipertensión Portal del Hospital Clínico de Barcelona-IDIBAPS**

Año académico 2011-2012

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Barcelona, 25 de Octubre de 2011.

Jorge Gracia-Sancho, Investigador del Laboratorio de Hemodinámica Hepática del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), y Jaime Bosch Genover, catedrático de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona y Consultor Senior del Servei d' Hepatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral *PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN KRUPPEL-LIKE FACTOR 2 EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL HEPÁTICA ASOCIADA A LA HIPERTENSIÓN PORTAL Y AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN*, presentada por Lucia Russo para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona se ha realizado bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos necesarios para ser defendida ante el Tribunal de evaluación correspondiente.

Jorge Gracia-Sancho

Jaime Bosch i Genover

Ai miei genitori

Índice

Introducción	1
I.- El endotelio	3
1.- Características generales	3
1.1- Estructura	3
1.2- Funciones	4
2.- Regulación de los mecanismos de coagulación	5
2.1- La Trombomodulina	5
3.- Regulación del tono vascular	6
3.1- El óxido nítrico	7
4.- Activación de las CEs	8
5.- Modulación biomecánica del fenotipo de las CEs	10
5.1- Kruppel-like factor 2 (KLF2)	11
6.- El endotelio hepático	13
II.- Disfunción endotelial	15
1.- Definición	15
2.- Disfunción endotelial en la hipertensión portal	16
2.1- Fisiología de la hipertensión portal	17
2.2- El componente dinámico de la resistencia intrahepática	18
2.2.1- Déficit en la producción de vasodilatadores e hiporrespuesta a vasodilatadores	19
2.2.2- Exceso de vasoconstrictores y hiperrespuesta a vasoconstrictores	21
3.- Disfunción endotelial en el daño hepático por isquemia reperusión	22
3.1- Isquemia	23
3.2- Reperusión	24

III.- El trasplante hepático	27
1.- Aspectos generales	27
2.- Procedimiento de trasplante hepático	28
3.- Estrategias para prevenir la lesión por isquemia-reperfusión asociada a la preservación de injertos hepáticos para trasplante	29
3.1- Preservación en frío y soluciones de preservación	29
3.2- Preservación de la función endotelial	31
3.2.1- <i>Machine perfusion</i>	31
3.2.2- Estatinas	32
3.3- Precondicionamiento isquémico	35
Objetivos	37
Resultados	43
I.- Artículo 1	45
II.- Artículo 2	57
Discusión	93
Conclusiones	103
Bibliografía	107
Agradecimientos	121

Introducción

I. EL ENDOTELIO

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El endotelio cubre la superficie interna de toda la vasculatura y regula una gran variedad de respuestas biológicas y funciones fisiológicas del organismo a través de la producción y liberación de múltiples sustancias (1).

Histológicamente, el endotelio es una unicapa de 10-50µm de espesor, formada por células poligonales orientadas longitudinalmente en dirección al flujo sanguíneo, que muestra una marcada heterogeneidad tanto en aspectos estructurales y funcionales como en marcadores proteicos y en respuesta a factores de crecimiento. Esta heterogeneidad se observa a diferentes niveles: entre órganos, entre zonas de un mismo órgano y entre células endoteliales (CEs) micro- y macrovasculares (2).

1.1 Estructura

El endotelio puede ser continuo, discontinuo, fenestrado o no fenestrado. El endotelio continuo forma una capa ininterrumpida alrededor de toda la circunferencia del vaso y se encuentra en arterias, venas y capilares de cerebro, piel, corazón y pulmón. El endotelio continuo fenestrado presenta poros transcelulares de unos 70 nm de diámetro, llamados fenestras, que se extienden a través de toda la célula endotelial. Está presente en zonas caracterizadas por filtración incrementada o con mayor transporte transendotelial, como por ejemplo capilares de glándulas de secreción interna, mucosa gastrointestinal, plexo coroideo, glomérulos y algunos túbulos renales. El endotelio discontinuo presenta fenestras más amplias (de 100-200 nm de diámetro) y una lámina basal discontinua, lo que aumenta el intercambio entre la sangre y el tejido. Se encuentra en los lechos vasculares sinusoidales, principalmente en el hígado.

Las CEs presentan dos tipos principales de uniones intercelulares, las *tight junctions* y las *adherens junctions*. Las *tight junctions* constituyen una barrera de transporte entre las CEs y ayudan a mantener la polaridad celular. En la microvasculatura, estas uniones son más estrechas en las arteriolas que en los capilares. En las vénulas son aún más débiles para facilitar la extravasación de los leucocitos durante la inflamación. Además, las CEs están dotadas de elementos estructurales importantes para la vía endocítica (invaginaciones, vesículas recubiertas de clatrina, lisosomas) y están implicadas en el transporte por transcitosis (caveolas y orgánulos vesículo-vacuolares), que permite transferir macromoléculas a través del endotelio (3).

1.2 Funciones

Las CEs llevan a cabo diferentes funciones, muchas realizadas por tipos específicos de vasos sanguíneos o lechos vasculares (3):

- Regulan la permeabilidad y el transporte de macromoléculas.
- Mantienen la homeostasis tisular y regulan los mecanismos de coagulación.
- Participan en la inmunidad innata y adquirida.
- Controlan el tráfico leucocitario.
- Regulan el tono vascular.
- Sintetizan sustancias del tejido conjuntivo.
- Participan en el metabolismo lipídico.
- Regulan la proliferación y la muerte celular.

Aquellas funciones más estrechamente relacionadas con la presente tesis doctoral son detalladas a continuación.

2. REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE COAGULACIÓN

Una de las principales funciones del endotelio es mantener la sangre en un estado fluido con un correcto balance entre factores procoagulantes y anticoagulantes. Entre los factores procoagulantes, las CEs sintetizan *tissue factor*, *plasminogen activator inhibitor* (PAI)-1, von Willebrand factor (vWF) y *protease activated receptor*. Entre los factores anticoagulantes, las CEs expresan *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), trombomodulina (TM), *endothelial protein C receptor* (EPCR), *tissue-type plasminogen activator* (t-PA), ecto-ADPase, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y producen prostaciclina y heparano. Todos estos factores están distribuidos de forma irregular a lo largo la vasculatura. El endotelio es capaz de cambiar el balance hemostático en función de las señales extracelulares y de las vías de señalización y mecanismos de regulación de la expresión génica activos en los diferentes subtipos celulares (4).

2.1 La Trombomodulina (TM)

La trombomodulina (TM) es una proteína integral de membrana que se expresa de forma constitutiva en la superficie de las CEs. Funciona como cofactor de la trombina en la activación de la proteína C que, inactivando por proteólisis los factores V y VIII, tiene un rol anticoagulante (5). Además, el complejo TM/trombina reduce la fibrinólisis activando el *thrombin-activable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) en el plasma (6). El dominio N-terminal (*lectin-like-domain*) de la TM presenta actividad antiinflamatoria, reduciendo la activación de las CEs y la adhesión leucocitaria. Abeyama et al. (7) demostraron que este dominio puede unirse a la proteína *high mobility group box* (HMGB)1, inhibiendo sus propiedades proinflamatorias (Figura 1).

La liberación de moléculas solubles de TM de la superficie celular es considerada índice de daño endotelial y/o de elevado *turnover* del endotelio (8).

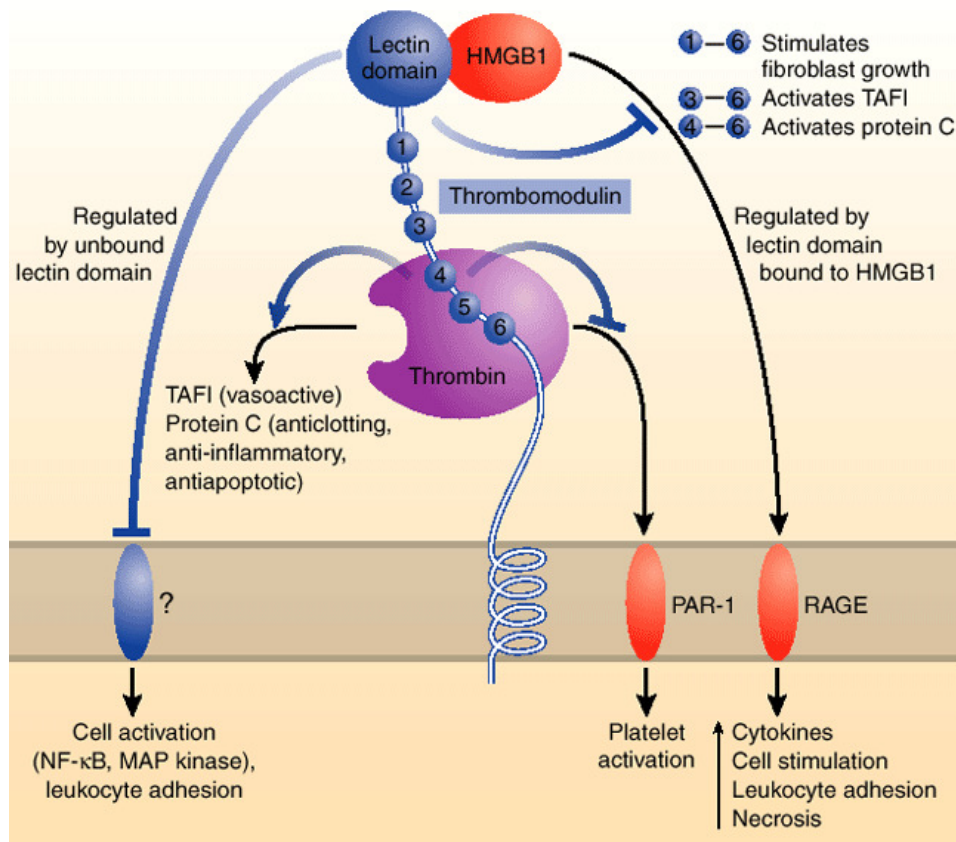


Figura 1. Mecanismos de acción y funciones de la trombomodulina (Esmon C, Nature Medicine 2005).

3. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR

Las CE sintetizan una serie de moléculas vasoactivas destinadas a mantener el tono vascular y la perfusión. Entre estas sustancias destacan factores vasoconstrictores como la angiotensina II (Ang II), la endotelina-1 (ET-1), el tromboxano A₂ (TXA₂), los isoprostanos o la uridina, y factores vasodilatadores como la bradiquinina, la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO), la adenosina, la acetilcolina o el péptido natriurético C (CNP). Las sustancias vasoactivas actúan de forma coordinada para mantener la función normal del endotelio, ejerciendo un mecanismo de apoyo cuando una de las vías no funciona correctamente (9).

3.1 El óxido nítrico (NO)

El NO es una molécula gaseosa hidrófoba con una vida media de 3-5 segundos, involucrada en importantes procesos biológicos, como la vasodilatación, la neurotransmisión, la citotoxicidad, la apoptosis, la defensa contra agentes patógenos y la inhibición de la coagulación y de la agregación plaquetaria (10).

La óxido nítrico sintasa (NOS) es una enzima con actividad NADPH dependiente responsable de la producción de NO a partir de L-arginina. Existen tres isoformas de esta enzima: la isoforma neuronal (nNOS o NOS1), la inducible (iNOS o NOS2) y la endotelial (eNOS o NOS3). La nNOS es una enzima dependiente del complejo calcio-calmodulina que produce NO a concentraciones bajas (nM) y se expresa principalmente en tejido neuronal, músculo esquelético y mácula densa. La iNOS, en cambio, se expresa en macrófagos, hepatocitos, células hepáticas estrelladas (CHEs) y otros tipos celulares tras su inducción por LPS u otras citoquinas proinflamatorias. Esta isoforma sintetiza elevados niveles de NO independientemente de estímulos mecánicos o hemodinámicos. La eNOS es la isoforma más sensible a las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , se expresa constitutivamente de forma mayoritaria en las CEs y puede ser inducida por estímulos como el estrés de rozamiento (o *shear stress*), los estrógenos, el VEGF, la acetilcolina, la bradiquinina u otros agonistas de receptores acoplados a proteínas G (11). Estos estímulos determinan un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , activación de la eNOS y producción de NO, que difunde a las células musculares adyacentes (o CHEs en el hígado) y activa la guanilato ciclasa soluble. La guanilato ciclasa convierte la guanosina trifosfato en guanosín monofosfato cíclico (GMPc). El acumulo de GMPc promueve la fosforilación de diferentes substratos mediada por la *cGMP-dependent protein kinase* (PKG), lo que permite modular, entre otros procesos, la relajación celular. La producción basal de NO,

debida a las fuerzas hemodinámicas de la sangre y al estiramiento pulsátil de las paredes vasculares, es importante para mantener el tono y el estado antiaterogénico del endotelio (12). Además, la actividad de la eNOS es finamente regulada a nivel post-transcripcional y post-traduccionales. Entre las modificaciones post-traduccionales destacan la fosforilación en los residuos de serina, treonina y tirosina (13) y las interacciones proteína-proteína, como la caveolina-1 (14) (Figura 2).

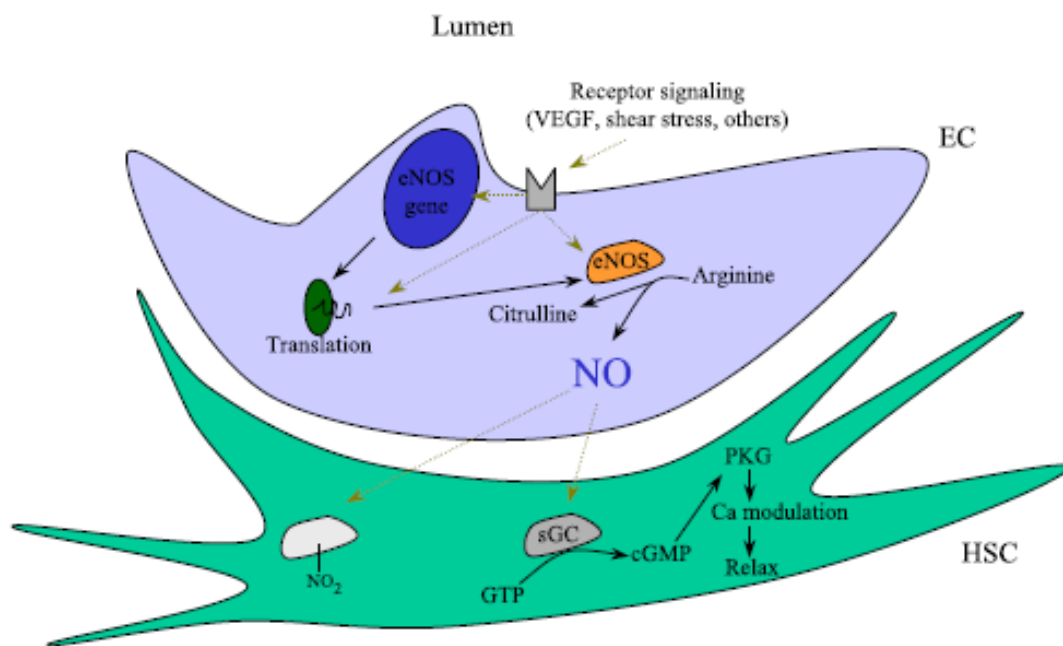


Figura 2. Regulación del Óxido Nítrico en los sinusoides hepáticos. Los estímulos extracelulares modulan la expresión y la actividad de eNOS a diferentes niveles, incluyendo la transcripción, la estabilización del mRNA y las modificaciones post-traduccionales. EL NO, generado por la eNOS por la conversión de la arginina a citrulina, ejerce sus efectos paracrinos sobre las células hepáticas estrelladas adyacentes a través de la activación de la PKG, la nitrosilación de proteínas y la formación de peroxinitritos. (Langer DA and Shah VH, J. of Hepat. 2006).

4. ACTIVACIÓN DE LAS CEs

Durante un proceso de inflamación aguda, se observa el rápido reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la que se suele llamar activación de las CEs. Este fenómeno de activación prevé la adquisición de nuevas capacidades por parte de las CEs y consta

de dos fases diferenciadas: una rápida que es independiente de la expresión génica *de novo* (activación de tipo I) y una fase más lenta que depende de la expresión génica (activación de tipo II) (15).

El tráfico de leucocitos desde la sangre a los tejidos incluye diferentes etapas: adhesión inicial, rodamiento, adhesión y trans migración. En las dos primeras etapas están implicadas las glicoproteínas de membrana llamadas selectinas. El endotelio expresa las selectinas P y E, los leucocitos la selectina L. La P-selectina se expresa de forma constitutiva y se acumula en los cuerpos de Weiber-Palade, así puede ser liberada en pocos minutos en respuesta a la activación de tipo I. La E-selectina se sintetiza *de novo* en respuesta a la activación endotelial por parte de LPS, IL-1 o *tumor necrosis factor* (TNF)- α (16).

A continuación, las integrinas de los leucocitos se unen a las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio activado como *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 y *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1. VCAM-1 se sintetiza *de novo* en respuesta a la estimulación por IL-1 o TNF- α y se une a las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ (17). La expresión de ICAM-1 e ICAM-2 es constitutiva aunque pueda aumentar en respuesta a citoquinas, ambas se unen a las integrinas CD11/CD18, Mac-1 y LFA-1 (18, 19).

Los mecanismos de trans migración son menos conocidos. Parece que involucren CD99 y CD31 (PECAM-1) que, a parte, estimula la movilización de algunas integrinas a la superficie de los leucocitos y la expresión de MMP-9 aumentando la direccionalidad de los leucocitos (19).

Cuando la reacción inflamatoria no puede erradicar el estímulo que la provoca, se activa una respuesta inmune adaptativa que determina la evolución del proceso inflamatorio a un estado crónico. En este proceso las CEs participan presentando antígenos a las células T memoria y efectoras (20).

5. MODULACIÓN BIOMECÁNICA DEL FENOTIPO DE LAS CEs

Las CEs son sensibles a las fuerzas hemodinámicas generadas por el flujo sanguíneo. En respuestas agudas al flujo pueden liberar potentes moléculas vasoactivas, en cambio, en las crónicas se observa un cambio en el fenotipo funcional a través de la regulación de diversos programas transcripcionales. El flujo sanguíneo puede ser más o menos complejo en las distintas regiones vasculares, cambiando de laminar (en un rango de *shear stress* de 5-15 dynes/cm²) a turbulento. Las turbulencias del flujo sanguíneo a nivel de bifurcaciones y curvas de los vasos determinan un aumento de la permeabilidad a macromoléculas y de la expresión de moléculas de adhesión, reclutamiento de los leucocitos, acumulación de lipoproteínas y daño de las CEs. De hecho, hace algún tiempo se demostró que distintos tipos de *shear stress* se relacionan perfectamente a regiones del endotelio más o menos susceptibles al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Además, en las regiones de flujo turbulento se pierde la forma y el alineamiento ordenado de las CEs (y de sus núcleos) en la dirección del mismo, característicos de las regiones de flujo laminar (21, 22).

Varios estudios se han centrado en identificar los genes endoteliales regulados por el *shear stress*, hallándose los genes codificantes de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1, factores de crecimiento como PDGF-A y PDGF-B, superóxido dismutasa (SOD), ciclooxigenasa (COX)-2 y eNOS (23-25). Mucha atención se ha puesto también en la modulación biomecánica de la expresión y activación de factores de transcripción como c-fos, Egr-1 y NFκB (26-28).

Dekker et al en 2005 (29) demostraron la importancia del factor de transcripción Kruppel-like factor (KLF)2 en la regulación del fenotipo endotelial flujo-dependiente, observándose que el *knockdown* de esta proteína prevenía la inducción de eNOS y la reducción de la ET-1 mediadas por el flujo. Un año más tarde, Parmar et al (30)

postularon KLF2 como proteína clave en la integración del fenotipo endotelial dependiente del flujo, revelando que más del 15% de los genes regulados por el flujo dependen de la inducción de este factor de transcripción.

5.1 Kruppel-like factor 2 (KLF2)

Los KLFs son una subclase de las *zinc finger proteins* que regulan el crecimiento celular y el desarrollo tisular (31). Típicamente, se unen a las GC box o a las secuencias CACCC de los promotores de los genes diana regulando su expresión. KLF2 (Figura 3), uno de los miembros de esta familia, se expresa principalmente en el endotelio y es necesario para el correcto desarrollo de los vasos (32, 33). Además, se ha demostrado que la expresión de KLF2 confiere al endotelio un fenotipo antiinflamatorio (reduciendo por ejemplo la expresión de moléculas de adhesión como la E-selectina y VCAM-1) y antitrombótico (induciendo por ejemplo la expresión de la TM) e induce la liberación de vasodilatadores como el NO (30, 34-36) (Figura 4).



Figura 3. Estructura del Kruppel-like factor 2. KLF2 es una proteína de 354aa. Presenta en el extremo N-terminal un dominio de transactivación y uno de represión para regular la expresión génica, en el C-terminal tres Cys2/His2 *zinc finger* para la unión al DNA (Adaptada de Atkins and Jain, Circ. Res. 2008).

Tanto *in vivo* como *in vitro*, la expresión de KLF2 es flujo-dependiente. Las regiones vasculares expuestas a *shear stress* laminar expresan altos niveles del factor de transcripción, que confiere resistencia a la aterosclerosis; dicha expresión no se observa en las regiones atero-sensibles expuestas a *shear stress* no laminar. Los mecanismos que

enlazan las fuerzas hemodinámicas a la expresión de KLF2 prevén la fosforilación/activación del pathway *mitogen-activated protein kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2* (MEK5/ERK5/MEF2), siendo MEF2 capaz de unirse al promotor del gen de KLF2 e inducir su transcripción (29, 36, 37). Huddleson et al (38, 39) han demostrado que también p300/CBP-associated factor (PCAF), *heterogeneous nuclear ribo-nucleoprotein D* y nucleolina son proteínas reguladoras de la expresión de KLF2. A parte, el flujo prolongado es capaz de estabilizar el mensajero de KLF2 a través del *pathway* de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (40). Por el otro lado, los estímulos proinflamatorios pueden inhibir la expresión de KLF2 en las CEs a través de las vías de NFκB y de la *histone deacetylase* (34, 37, 41) (Figura 4).

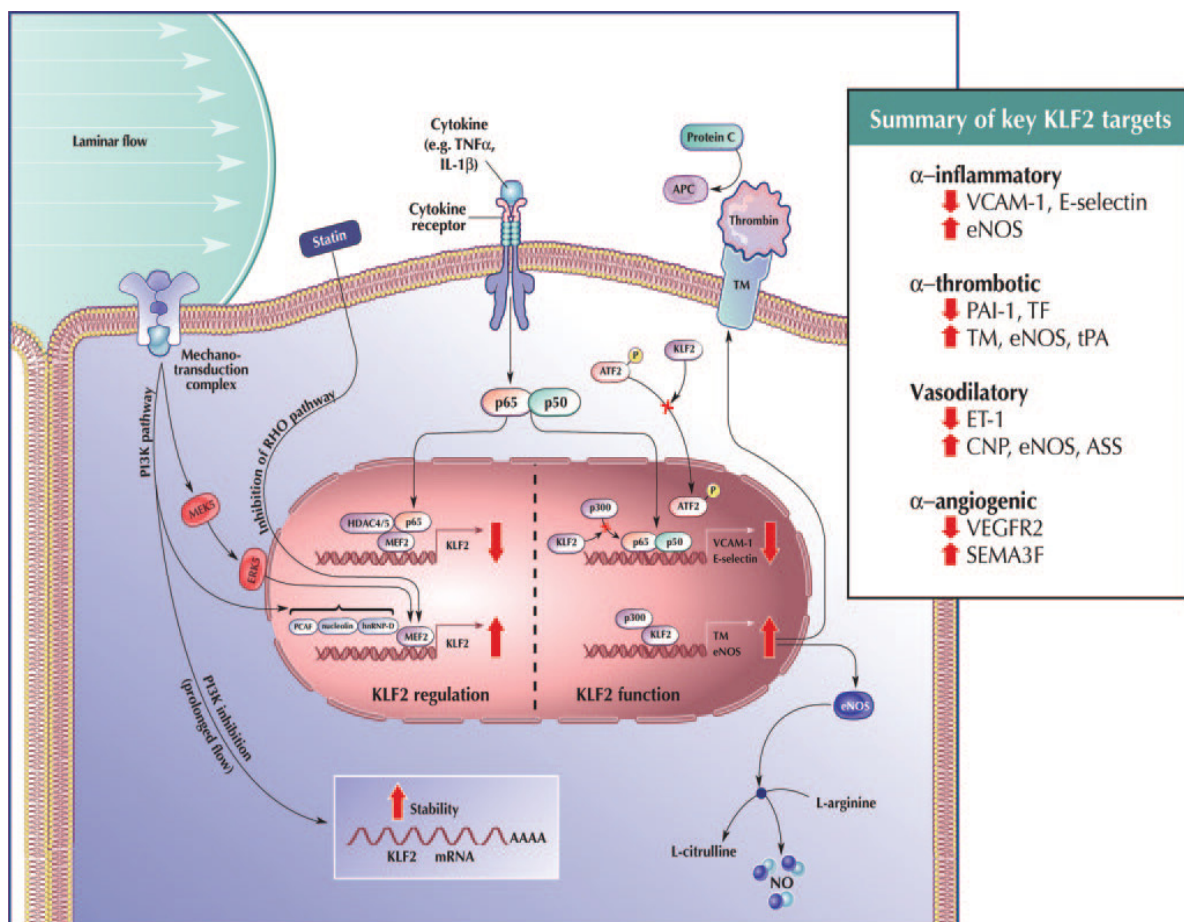


Figura 4. Regulación y funciones de KLF2 (Atkins and Jain, Circ. Res. 2008).

6. EL ENDOTELIO HEPÁTICO

El hígado recibe la sangre desde la arteria hepática, que proporciona sangre oxigenada, y desde la vena porta, que proporciona sangre poco oxigenada, rica en nutrientes procedente de varias estructuras abdominales. Tanto la arteria hepática como la vena porta desembocan en los sinusoides hepáticos, que representan la red capilar en el hígado (Figura 5). Después de circular por los sinusoides, la sangre pasa a las vénulas hepáticas terminales, a la vena hepática y, en última instancia, abandona el hígado vía vena cava inferior hacia la aurícula derecha.

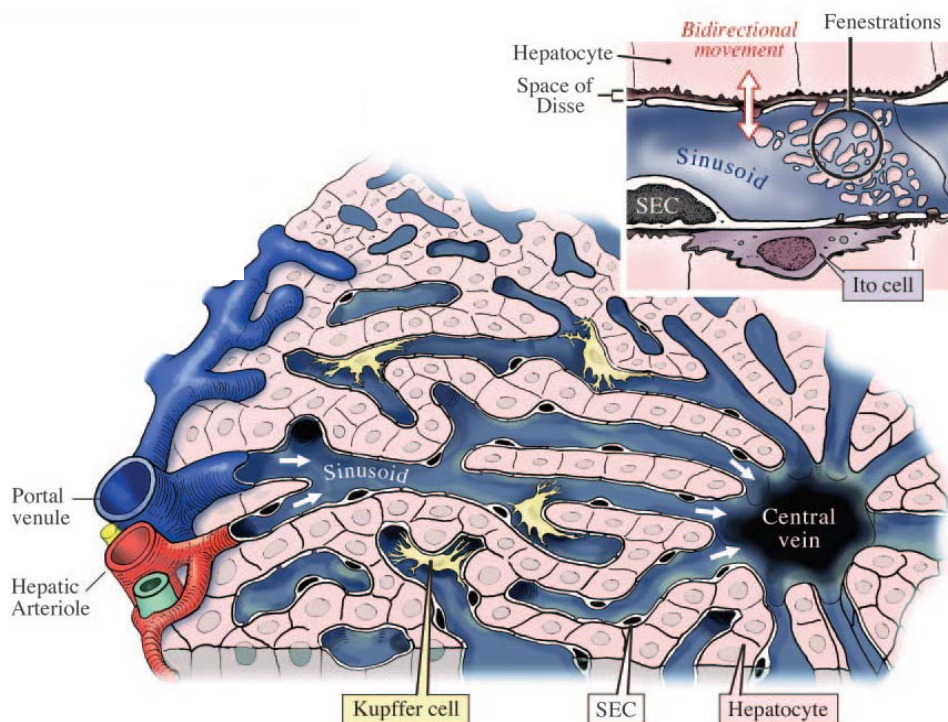


Figura 5. Los sinusoides hepáticos. Cada hepatocito está en contacto directo con la sangre sinusoidal debido a la marcada porosidad de las paredes de los sinusoides (adaptada de Aird WC, Circ. Res. 2007b).

Las CE sinusoidales hepáticas, que aproximadamente constituyen el 50% de las células no parenquimales del hígado, se organizan en un endotelio discontinuo, dotado de amplias fenestras y sin membrana basal. Otra característica peculiar de los sinusoides

hepáticos es la presencia de macrófagos residentes, las células de Kupffer (CKs), en la parte luminal del endotelio. Las CKs constituyen el 15%-20% de las células no parénquimales del hígado y el 50% de todos los macrófagos. El espacio que existe entre los cordones de hepatocitos y la pared del sinusoides se denomina espacio de Disse, y contiene un sistema de fibras de colágeno con función de soporte (42) (Figura 5).

II. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

1. DEFINICIÓN

El término disfunción endotelial fue propuesto para describir el potencial del endotelio vascular de pasar de un fenotipo modulable a un fenotipo incapaz de adaptarse, que se caracteriza por la pérdida o la desregulación de mecanismos homeostáticos característicos de las CEs sanas. Las manifestaciones fundamentales de la disfunción endotelial suelen incluir reactividad vascular alterada, aumento de la permeabilidad a las lipoproteínas plasmáticas y de la adhesividad selectiva de leucocitos mononucleares y complicaciones trombóticas. A nivel celular y molecular, estas manifestaciones de la disfunción endotelial parecen reflejar los cambios moleculares agudos o crónicos que ocurren en diversas funciones del endotelio, como la disminución de la producción de PGI₂ y NO, el aumento de la secreción de quimiocinas, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, la disminución de la resistencia celular al estrés oxidativo o el empeoramiento de la supervivencia celular. Los estímulos fisiopatológicos que conducen a la disfunción endotelial son comunes en una variedad de procesos de respuesta a lesiones, incluyendo las reacciones inflamatorias agudas y crónicas, cicatrización de heridas y angiogénesis. Estos estímulos bioquímicos normalmente ejercen sus efectos a través de distintos receptores de superficie celular acoplados a mecanismos efectores (como la reorganización del citoesqueleto, la secreción de mediadores almacenados, la regulación de la actividad de las enzimas y la activación de la expresión génica) por cascadas de mensajeros secundarios. Además de los mencionados estímulos humorales, las fuerzas biomecánicas generadas por el flujo de la sangre pueden llevar a disfunción endotelial, ya que pueden influir en la estructura y función de las CEs e incluso modular la expresión de genes fisiopatológicamente relevantes (43).

En condiciones normales, el endotelio es capaz de producir factores vasodilatadores en respuesta al aumento del volumen de la sangre, de la presión sanguínea o de factores vasoconstrictores. En diferentes condiciones patológicas (TABLA 1), una de las consecuencias de la disfunción endotelial es la alteración de los mecanismos de vasodilatación dependientes del endotelio (44).

TABLA 1. Adaptada de Verma and Anderson, Circulation 2002

Condiciones patológicas asociadas a disfunción endotelial	Aterosclerosis, hipercolesterolemia, <i>high</i> LDL-C, <i>low</i> HDL-C, hipertensión, edad avanzada, vasculitis, síndrome metabólico, diabetes, isquemia-reperfusión, postmenopausia, infecciones, depresión, obesidad, fallo renal, angina de Prinzmetal, <i>bypass</i> cardiopulmonar, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Chagas, insuficiencia cardíaca, hipertrofia ventricular izquierda.
Estrategias para mejorar la función endotelial	ACE inhibidores, bloqueadores de los receptores de la Angiotensina, bloqueadores de la endotelina, estatinas, tetrahidrobiopterina, folatos, mejorar la sensibilidad a la insulina, reducción de LDL, aumento de HDL, antioxidantes, estrógenos, L-arginina, desferoxamina, glutatión.

2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL

La hipertensión portal es un síndrome que aparece en diversas enfermedades hepáticas y extrahepáticas, caracterizado por el aumento patológico de la presión hidrostática en el territorio venoso portal por encima de su valor normal de 1-5 mmHg, lo que origina la formación de una extensa red de venas colaterales portosistémicas que derivan parte del flujo sanguíneo portal hacia la circulación sistémica e impiden su paso a través del hígado. Las complicaciones que se desarrollan como consecuencia de este síndrome, como la hemorragia por varices esofágicas, ascitis e insuficiencia renal, encefalopatía portosistémica, alteración del metabolismo de fármacos y sustancias endógenas, hiperesplenismo, síndrome hepatopulmonar e infecciones, constituyen el aspecto clínico dominante y más frecuente del proceso hepático subyacente (45).

2.1 Fisiopatología de la hipertensión portal

Como en cualquier sistema hidrodinámico, la presión portal viene determinada por la interrelación entre el flujo sanguíneo portal y la resistencia que se opone al mismo. De acuerdo con la ley de Ohm, el gradiente de presión entre dos puntos (P1 y P2) en un vaso sanguíneo queda definido por la ecuación:

$$P1 - P2 = Q \times R$$

En la que, aplicada al sistema portal, P1 - P2 sería el gradiente de perfusión hepática o gradiente de presión portal (la diferencia entre la presión portal y la presión de la vena cava inferior), Q el flujo sanguíneo portal y R la resistencia vascular intrahepática. De esto se desprende que los dos mecanismos básicos del aumento de la presión portal son el aumento del flujo sanguíneo y el aumento de las resistencias vasculares hepáticas o una combinación de ambos.

El aumento de la resistencia al flujo portal constituye el fenómeno fisiopatológico primario y necesario en el desarrollo de la hipertensión portal (46) y puede ser prehepático, posthepático o intrahepático (47). En la cirrosis hepática, la principal causa de hipertensión portal en nuestro entorno, el aumento de la resistencia es intrahepático. En la hipertensión portal intrahepática el lugar de aumento de la resistencia puede subdividirse a su vez en presinusoidal, sinusoidal o postsinusoidal. En la cirrosis parece estar localizado principalmente en los sinusoides. Ello se debe, en parte, a la profunda distorsión de la arquitectura vascular hepática causada por la fibrosis, cicatrización y formación de nódulos (48). Además, la trombosis de pequeñas vénulas hepáticas y portales puede aumentar la resistencia intrahepática (y por tanto la presión portal) y contribuir a la progresión de la distorsión arquitectural de la cirrosis (49). Estos trastornos estructurales constituyen el factor más importante en el aumento de la

resistencia hepática en la cirrosis. Sin embargo, Bathal y Grossmann demostraron en 1985 (50) que aproximadamente el 40% del aumento de la resistencia hepática en la cirrosis es dinámico, debido a un aumento del tono vascular intrahepático, y, por lo tanto, potencialmente reversible. La presencia de este componente dinámico constituye la base racional del tratamiento de la hipertensión portal con vasodilatadores.

El aumento del flujo sanguíneo portal es el resultado de una marcada vasodilatación arterial en los órganos esplácnicos que drenan el sistema venoso portal que se debe a mecanismos neurogénicos, humorales y locales. Los primeros estudios realizados para determinar las causas responsables del aumento de dicho flujo, evidenciaban el papel de vasodilatadores circulantes como el glucagon, los ácidos biliares, el NO, la PGI₂, los neuropéptidos, la adenosina y otras hormonas gastrointestinales (51, 52). En este contexto, muchos tratamientos para la hipertensión portal van dirigidos a corregir el aumento del flujo portal a través de vasoconstrictores esplácnicos como los beta-bloqueadores no selectivos, la vasopresina o la somatostatina (53, 54).

2.2 El componente dinámico de la resistencia intrahepática

El componente dinámico de la resistencia vascular intrahepática en la cirrosis es el reflejo de la existencia de elementos contráctiles en el hígado, los cuales pueden modular la resistencia hepática en respuesta a factores vasoactivos. Se ha demostrado que en el hígado normal los sinusoides hepáticos tienen capacidad contráctil, y que los cambios en la luz sinusoidal predominan en los lugares donde se localizan las células hepáticas estrelladas (CHEs) (55). Las CHEs, situadas en el espacio de Disse, actúan normalmente como células de depósito de retinoides y regulan el recambio de la matriz celular (56). Sus extensiones citoplasmáticas perisinusoidales y sus propiedades contráctiles permiten que estas células se comporten además de manera análoga a los

pericitos tisulares (57), regulando la microcirculación a través de la contracción de los capilares. La capacidad contráctil de las CHEs es especialmente notable en las situaciones de lesión hepática. Tras una agresión al tejido hepático, las CHEs adquieren un fenotipo “activado”, consistente en una alta capacidad proliferativa, sintética y contráctil, y se comportan como miofibroblastos (56). Una vez activadas, estas células responden con contracción o relajación a diversas sustancias vasoactivas (58-61). En la cirrosis, las CHEs se pueden encontrar también en los septos fibrosos, por lo que su contracción, junto con la de miofibroblastos portales, podría generar fuerzas de tracción en el tejido cicatrizal y, como consecuencia, una disminución del calibre de vénulas portales o *shunts* portohepáticos presentes en estos septos (56), con marcados efectos sobre la resistencia intrahepática. En el hígado normal se ha demostrado que las vénulas portales también se contraen en respuesta a la ET-1 (62). La contribución de dichas vénulas al aumento de la presión portal en la cirrosis no está todavía bien caracterizada. Independientemente de las estructuras implicadas, diversos vasoconstrictores y vasodilatadores pueden modificar la resistencia intrahepática. En el hígado cirrótico hay un desequilibrio entre las fuerzas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, exhibiendo un exceso de sustancias vasoconstrictoras y un déficit de producción de sustancias vasodilatadoras. Por otra parte, estas alteraciones se ven amplificadas por el hecho de que, respecto al hígado normal, la respuesta de la circulación hepática a vasoconstrictores está aumentada y la respuesta a los vasodilatadores, disminuida (figura 6).

2.2.1 Déficit en la producción de vasodilatadores e hiporrespuesta a vasodilatadores

El hígado normal responde a los aumentos del *shear stress* con un aumento de producción de NO (63). Esto permite que el hígado normal sea un órgano con una

compliance muy elevada que permite grandes cambios en el flujo hepático. Por lo contrario, en el hígado cirrótico existe una disfunción del endotelio vascular caracterizada por una insuficiente producción de NO (64-66), una incorrecta adaptación al aumento de flujo sanguíneo portal que contribuye a aumentar el tono vascular hepático y, por lo tanto, al desarrollo y la progresión de la hipertensión portal (67). Este déficit intrahepático de NO es tanto sinusoidal como postsinusoidal (68).

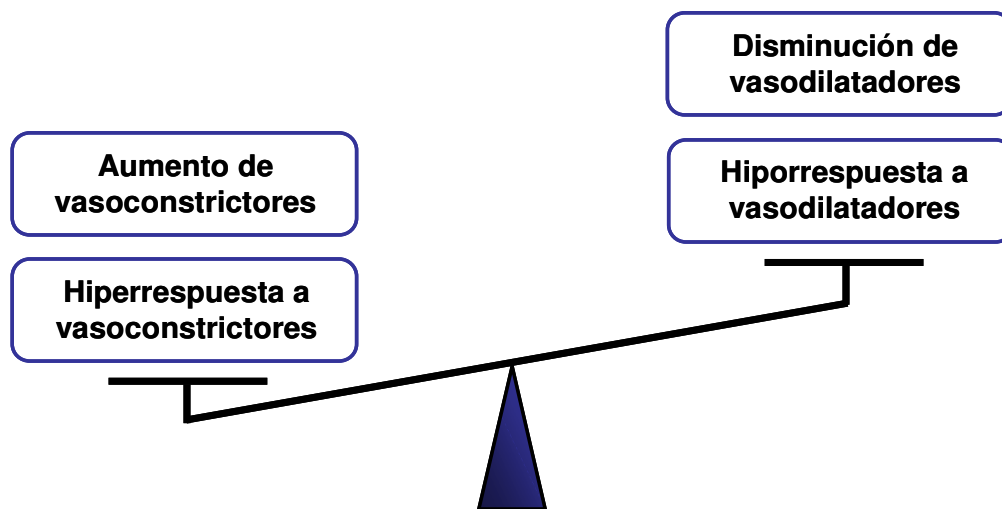


Figura 6. Componente dinámico del aumento de la resistencia hepática en la cirrosis.

Los mecanismos implicados en el déficit de producción de NO intrahepático en la cirrosis no han sido totalmente definidos. La expresión de eNOS en el hígado cirrótico se ha encontrado tanto normal (65, 69) como disminuida (70), mientras que la disminución de la actividad de la eNOS ha sido un hallazgo constante (64, 65, 70, 71). Dicha disminución de la actividad de la enzima se debe a los mecanismos de regulación postraduccional. En el hígado cirrótico se ha descrito, por ejemplo, un aumento de la expresión de caveolina 1 y una mayor interacción de ésta con la eNOS (69, 71, 72), y una disminución de su fosforilación dependiente de Akt (73), regulando a la baja su

actividad y la producción de NO. Además, como las variaciones en las fuerzas hemodinámicas observadas en la cirrosis pueden modificar la expresión de KLF2 en las CEs hepáticas, esto podría estar implicado en las variaciones transcripcionales de la eNOS.

Por otra parte, la circulación intrahepática en la cirrosis responde inadecuadamente al NO (74). Recientemente se ha demostrado que en el hígado cirrótico existe un déficit en la degradación de anión superóxido (O_2^-) secundaria a una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). El exceso de O_2^- resultante actuaría como *scavenger* de NO y disminuiría su biodisponibilidad (75).

2.2.2 Exceso de vasoconstrictores y hiperrespuesta a vasoconstrictores

En la cirrosis hepática, tanto la producción hepática como las concentraciones circulantes de diversos vasoconstrictores se encuentran aumentadas (76-79). Por otra parte, el hígado cirrótico presenta una respuesta aumentada a determinados vasoconstrictores respecto al hígado normal (76, 80-82). Esta respuesta aumentada a vasoconstrictores está relacionada con diversas alteraciones: *a)* aumento en la cantidad de tejido contráctil, debido a la activación de las CHEs y al aumento de miofibroblastos; *b)* déficit de sustancias vasodilatadoras; *c)* aumento de la densidad o cambio de sensibilidad de los receptores para los vasoconstrictores, y *d)* producción secundaria de otras sustancias vasoconstrictoras.

La ET-1 es probablemente el vasoconstrictor más estudiado en la circulación intrahepática. Hay evidencias de que tanto las concentraciones circulantes de ET-1 como su producción intrahepática están aumentadas en la cirrosis (78, 83) y que la ET-1 es capaz de aumentar la resistencia intrahepática del hígado cirrótico (84). Los cistenil leucotrienos son sustancias derivadas del ácido araquidónico a través de su metabolismo

por la 5 lipooxigenasa (5-LO) cuya producción, así como la expresión de 5-LO, está aumentada en el hígado cirrótico (77, 82). Las CKs parecen ser la fuente principal de leucotrienos en el hígado cirrótico (82, 85). Además, el estímulo alfadrenérgico aumenta el tono vascular hepático, de forma más marcada en el hígado cirrótico que en el normal (80). La hiperrespuesta al agonista alfadrenérgico metoxamina, que conlleva la liberación del precursor de prostanoídes ácido araquidónico, no se explica totalmente por un déficit en la producción de NO por parte del hígado cirrótico. De hecho, tras la estimulación con metoxamina, éste responde con un aumento en la producción de prostanoídes vasoconstrictores derivados de la COX, principalmente tromboxano A₂ (TXA₂), que amplifican la respuesta vasoconstrictora (76). Más concretamente, se ha demostrado que las CEs hepáticas juegan un importante papel al sintetizar elevados niveles de este vasoconstrictor (86). Por otro lado, la respuesta anormal del hígado cirrótico al vasodilatador dependiente de endotelio acetilcolina también es consecuencia de un aumento en la producción de TXA₂ (87). Por lo tanto, la disfunción endotelial del hígado cirrótico no sólo se caracteriza por una disminución de la producción de NO, sino también por un aumento de la producción de prostanoídes vasoconstrictores y una exagerada respuesta a éstos.

3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL DAÑO HEPÁTICO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La privación de oxígeno que acontece durante la preservación de hígados para trasplante (ampliamente descrita en el capítulo III), la trombosis de la arteria hepática de los injertos o la interrupción del flujo portal en las resecciones hepáticas (*Pringle maneuver*), es responsable del daño por isquemia. La lesión por reperfusión representa un empeoramiento del insulto isquémico debido a la introducción de sangre oxigenada.

3.1 Isquemia

Los injertos hepáticos están expuestos a periodos variables de isquemia fría y caliente durante la preservación y la reanastomosis del ducto biliar y de los vasos sanguíneos. La interrupción del aporte de oxígeno detiene la cadena respiratoria mitocondrial, lo que comporta una depleción de *adenosine triphosphate* (ATP) y la estimulación de la glucólisis anaeróbica (88). La acidosis resultante altera la cinética de las enzimas y la depleción de ATP provoca la acumulación de sus productos de degradación como la hipoxantina y la xantina. En estas condiciones, las células se ven privadas de la energía necesaria para mantener la homeostasis, con consiguiente pérdida de gradiente de los iones de Na^+ y Ca^{2+} a través de las membranas celulares. La acumulación del Ca^{2+} citosólico activa diferentes sistemas enzimáticos, tales como fosfolipasas y proteasas implicadas en la respuesta inflamatoria que se desarrollará en la fase de reperfusión. Las proteasas, tras su activación, catalizan la conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XOD), enzima implicado en la formación de radicales libres del oxígeno (ROS) durante la reperfusión. La acumulación de Na^+ provoca edema intracelular y la consiguiente alteración en los orgánulos citoplasmáticos y en la integridad de la membrana pudiendo desencadenar la muerte celular (89-91) (figura 7). Evidencias experimentales sugieren que las CEs sinusoidales serían más susceptibles a la isquemia fría que los hepatocitos (92) ya que conlleva a daños ultraestructurales que incluyen una ampliación del diámetro de las fenestraciones endoteliales, vacuolización celular y denudación sinusoidal. La separación de las CEs sinusoidales de su matriz depende de diferentes proteasas y es un evento clave en el fenómeno isquémico, que en parte determina la viabilidad del órgano (93).

Durante la isquemia caliente, los hepatocitos pueden ser más vulnerables que las CEs sinusoidales y las células epiteliales biliares. Este fenómeno depende más del aumento

de la actividad de las proteasas no lisosómicas que de la variación en los niveles de ATP (94).

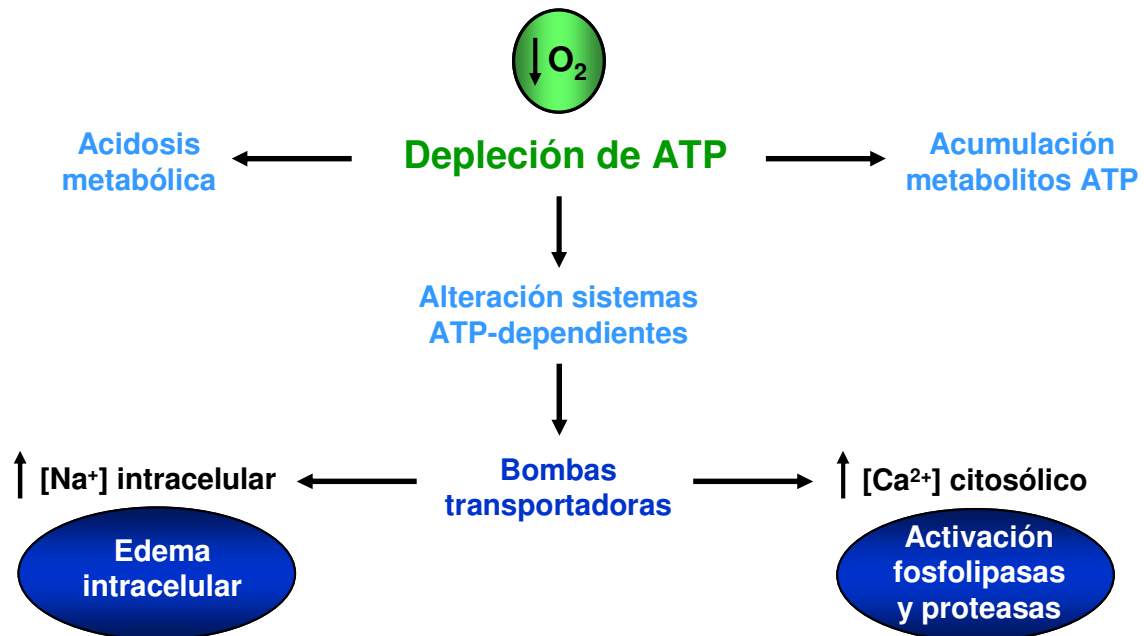


Figura 7. Resumen de mecanismos moleculares derivados de la privación de aporte de O₂ durante la isquemia.

3.2 Reperusión

La reperusión del hígado previamente isquémico inicia toda una serie de fenómenos inflamatorios en los que está implicado el endotelio.

La lesión por reperusión ocurre de forma bifásica (95-96). La fase inicial tiene lugar en las primeras horas de reperusión (< 6 h) y se caracteriza por la activación de las CKs y la siguiente liberación de ROS (principalmente anión superóxido y peróxido de hidrógeno) en el espacio vascular, que determina acúmulo de granulocitos y fallo de la microcirculación mediado por citoquinas (97). La producción intracelular de ROS por el sistema XDH/XOD y por la mitocondria también contribuye a la lesión de I/R (98, 99). Datos experimentales indican que los ROS estimulan la secreción de factor activador de

plaquetas (PAF), interleuquinas y TNF α por parte de las CEs y de los monocitos y pueden modular, en hepatocitos y CEs, la actividad de kinasas y de factores de transcripción que regulan la expresión de genes proinflamatorios como el factor nuclear (NF) κ B, el activador de proteínas (AP)-1 y *hipoxia-inducible factor* (HIF)-1 (100-103). En esta fase inicial de reperfusión se produce un desequilibrio entre los factores vasoconstrictores (ET-1, TXA₂) y vasodilatadores (NO, PGI₂) liberados al espacio vascular sinusoidal, determinando la vasoconstricción de los sinusoides hepáticos y exacerbando el daño isquémico tras reperfusión.

La reducción de la biodisponibilidad de NO se debería a: a) reducción de los niveles de cofactores necesarios para su síntesis (NADPH y oxígeno); b) reducción de los niveles de L-arginina por degradación de la arginasa liberada; c) inhibición de la eNOS; d) inactivación del NO por parte del O₂ (104). La inhibición de la eNOS aumenta el fallo microcirculatorio mientras que la suplementación con NO ejerce un papel protector en la lesión por I/R regulando el diámetro sinusoidal, reduciendo la adhesión leucocitaria y la agregación plaquetaria y haciendo de *scavenging* de los ROS (105, 106).

La reperfusión de los hígados se acompaña, también, de liberación de ET-1 que, además de su actividad vasoconstrictora, puede inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias (107). La inhibición de la actividad o la reducción de los niveles de ET-1 pueden reducir el fallo microcirculatorio y el daño tisular (108, 109). Además, se ha demostrado que la reperfusión de hígados de ratas preservados en frío lleva a un aumento de la presión portal que puede ser antagonizado mediante la infusión del antioxidante glutatión (110). Parece que las prostaglandinas y la *protein kinase C* (PKC) estén implicadas en esta constricción sinusoidal mediada por ROS (111) pero aún faltan por esclarecer los mecanismos y el papel de otros vasoconstrictores.

Otro componente importante en el desarrollo de la disfunción vascular durante la fase inicial de la reperfusión es la activación local del complemento, que lleva a la formación de productos quimiotácticos y citotóxicos que favorecen la activación de las CKs, la acumulación de plaquetas y neutrófilos y que pueden tener efecto citolítico directo (112, 113). La adhesión de las plaquetas a las CEs sinusoidales puede producir su muerte por apoptosis y contribuir de este modo a la disfunción hepática (114, 115).

La fase tardía, segunda fase del daño por reperfusión, comienza después de 6 horas de reperfusión y se prolonga durante algunos días. Se caracteriza por la lesión inflamatoria provocada por la infiltración masiva de neutrófilos desde el endotelio vascular hasta el parénquima hepático y la liberación de mediadores citotóxicos, principalmente ROS y proteasas (116, 117). La acumulación de neutrófilos activados en el tejido hepático es facilitada por la expresión de moléculas de adhesión y por la denudación de los sinusoides e induce numerosas respuestas proinflamatorias: liberación de quemoquinas por parte de las CEs y de los hepatocitos, activación de macrófagos y producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las CKs (118-120).

Debido a algunas características histológicas, durante mucho tiempo se ha asumido que la lesión hepática por reperfusión era una lesión de tipo necrótico. Sin embargo, varias evidencias han indicado que tanto en los hígados que han sufrido isquemia fría que en los que han sufrido isquemia caliente, las CEs sinusoidales y los hepatocitos pueden morir rápidamente por apoptosis tras la reperfusión (121, 122).

III. EL TRASPLANTE HEPÁTICO

1. ASPECTOS GENERALES

El trasplante está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas y en las que la supervivencia esperada al año sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante (123). Las indicaciones más comunes son la cirrosis secundaria a infección crónica por el virus de la hepatitis C y la cirrosis alcohólica. En niños, la indicación principal suele ser la atresia biliar. Otras enfermedades hepáticas susceptibles de ser tratadas con trasplante comprenden cirrosis causada por el virus de la hepatitis B, hepatitis autoinmune, colangitis esclerosante primaria, carcinoma hepatocelular, enfermedades metabólicas (como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis hereditaria) e insuficiencia hepática aguda y grave (123, 124).

Pese a las mejoras introducidas en la técnica del trasplante hepático, todos los hígados sufren daño por I/R durante la intervención quirúrgica. Este fenómeno es, en la actualidad, la principal causa tanto del mal funcionamiento inicial como del fallo primario del injerto hepático (FPI), caracterizado por inestabilidad hemodinámica, fallo renal, acidosis, coagulopatía, hipotermia, hipoglicemia y/o pérdida de la producción de bilis (91, 125).

Tras la intervención quirúrgica, el hígado sufre un periodo de disfunción que puede ser reversible. Si no logra recuperarse, la disfunción desemboca en el FPI, que puede causar la muerte del paciente a menos que éste sea retrasplantado urgentemente (126). El FPI es responsable del 81% de los retrasplantes durante la primera semana tras la intervención quirúrgica (Organización Nacional de Trasplante). Estos datos de disfunción primaria que ocurren en hígados sanos aún son mayores cuando el injerto es

esteatósico o proviene de donante cadavérico (hígados marginales), agravando la escasez de donantes en los bancos de órganos (127, 128).

La mayoría de los órganos para trasplante procede de donantes por muerte cerebral, aunque el uso de órganos de donantes por muerte cardíaca está en aumento (129). La falta de donantes es, actualmente, la principal limitación del trasplante hepático. Aunque, según la Organización Nacional de Trasplante, España tiene una de las mayores tasas de donantes de órganos a nivel mundial, solo un 40% de las personas en lista de espera recibe un órgano antes de tres meses y, lamentablemente, un 7-8% de los pacientes que entran en lista fallecen durante la espera. Esto obliga a la expansión de los límites en la obtención de los órganos a hígados marginales y segmentos de hígados de donante vivo (130, 131).

2. PROCEDIMIENTO DE TRASPLANTE HEPÁTICO

El procedimiento estándar para el trasplante hepático se inicia con la extracción del hígado del donante (o parte de éste). Para los donantes por muerte cerebral, la disección de las estructuras vasculares mayores y la movilización del órgano se realiza prioritariamente en caliente, antes de la heparinización, *clamping* de la aorta y lavado con una solución de preservación fría. En los donantes por muerte cardíaca el procedimiento de obtención del órgano se realiza prioritariamente en frío, con *clamping* rápido de la aorta y siguiente lavado. A continuación, el hígado es extraído del donante y colocado en solución de preservación a bajas temperaturas (2-4° C), con la finalidad de ralentizar el metabolismo hepático hasta su posterior implante en el receptor. Tras este periodo de isquemia fría, el órgano es sometido a un periodo de isquemia caliente, que se prolonga desde que el órgano es situado en la cavidad abdominal del receptor hasta que se restablece el flujo sanguíneo en el hígado trasplantado. Es decir, este

periodo de isquemia caliente corresponde al tiempo empleado en realizar la anastomosis de los vasos sanguíneos hepáticos en la intervención quirúrgica. Después de la reperusión se realizan las anastomosis del ducto biliar. Al restablecerse el flujo sanguíneo en el órgano comienza la fase de reperusión (132). En el capítulo II de la introducción de esta tesis se ha recopilado los datos de la literatura sobre los principales mediadores y mecanismos implicados en la lesión hepática por I/R.

3. ESTRATEGIAS PARA PREVENIR LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERUSIÓN ASOCIADA A LA PRESERVACIÓN DE INJERTOS HEPÁTICOS PARA TRASPLANTE

El desarrollo de estrategias encaminadas a minimizar los efectos adversos del proceso de I/R en el trasplante hepático podría, por un lado, aumentar el número de órganos disponibles para el trasplante (al permitir la utilización de los hígados marginales) y, por otro, aumentar el número de pacientes que se recuperen exitosamente tras un trasplante hepático, reduciendo así el número de retrasplantes y evitando el desaprovechamiento de órganos. En definitiva, la reducción o abolición del daño por I/R conllevaría un marcado aumento del número de trasplantes hepáticos con pronóstico favorable, reduciendo listas de espera y mortalidad.

A continuación, se detallan las principales estrategias desarrolladas para reducir la lesión por I/R.

3.1 Preservación en frío y soluciones de preservación

Una de las primeras estrategias aplicadas para reducir la lesión de I/R fue la reducción de la actividad metabólica por enfriamiento del órgano a 2-4°C. Mediante esta estrategia la actividad metabólica residual es del 10-12% y se puede preservar el hígado para el

trasplante durante unas 12 horas antes de la reperfusión (en comparación con órganos conservados a temperatura ambiente que tan solo toleran 1 hora) (133).

El enfriamiento del órgano implica la utilización de soluciones de preservación, por lo que muchas estrategias se han encaminado a mejorar las soluciones de preservación con el objetivo de extender el periodo de tiempo de preservación y reducir los efectos negativos de la hipotermia sobre el órgano. Como resultado de estas investigaciones, diferentes soluciones han sido diseñadas para mantener el injerto en condiciones óptimas durante la isquemia fría. La más utilizada en la práctica clínica para el trasplante de riñón, hígado, páncreas e intestino delgado es la University of Wisconsin Solution (UWS). A diferencia de las restantes, esta solución no contiene glucosa, lo que evita la producción de lactato y los problemas de acidosis, contiene adenosina, que inhibe la agregación plaquetaria, la acumulación de neutrófilos y que es un sustrato para la síntesis de ATP, y contiene antioxidantes como glutatión y alopurinol para evitar los efectos deletéreos de los ROS. La presencia del lactobionato, además, reduce el *swelling* celular e inhibe algunas proteasas responsables del proceso de separación de las CEs sinusoidales de su matriz. El uso de la UWS, sin embargo, presenta algunas limitaciones: una de estas es la presencia de hidroxietilamidón, proagregante de glóbulos rojos que puede producir un lavado incompleto del injerto hepático con el consiguiente estasis venoso y respuesta inflamatoria. Además, algunas de las sustancias que se encuentran en la UWS no protegen adecuadamente el órgano por no estar en concentraciones óptimas o por tener dificultades para llegar al lugar de acción (134-137). Considerando estos datos, actualmente se sigue estudiando la posibilidad de añadir componentes a la UWS que puedan mejorar su eficacia y mejorar así la viabilidad del injerto (138-140).

3.2 Preservación de la función endotelial

Recientemente se ha demostrado que la interrupción de las fuerzas hemodinámicas derivadas del flujo sanguíneo, que acontece durante la preservación en frío, se acompaña de una reducción de los programas endoteliales vasoprotectores y del aumento de la activación celular y de la apoptosis. Este hecho, observado en cultivos de CEs humanas, se debe en parte a la pérdida de expresión de factor de transcripción KLF2 y se puede prevenir añadiendo un inductor de KLF2 como la simvastatina a la solución de preservación (36). En el 2005 Parmar y colegas (141) demostraron que la expresión de KLF2 es inducida por las estatinas, la clase de medicamentos más usada en las enfermedades cardiovasculares. El estudio de Gracia-Sancho y colegas (36) ofrece las bases para investigar la preservación de órganos con perfusión continua (*machine perfusion* – donde la ausencia del estímulo hemodinámico derivado del flujo sanguíneo se minimiza) o en soluciones de preservación suplementadas con moléculas que mantengan la función endotelial, como las estatinas.

3.2.1 *Machine perfusion*

El concepto de preservación de órganos con perfusión continua es más antiguo que la preservación en frío. Ya en el 1968 Belzer y colegas llevaron a cabo con éxito un trasplante de riñón después de 17 horas de perfusión continua (142), pero con el pase del tiempo esta técnica se fue abandonando por problemas de logística y porque la preservación en frío es claramente más sencilla. En realidad, la perfusión continua ofrece muchas ventajas como el suministro de oxígeno y nutrientes y la detoxificación continua del órgano. Además, el mantenimiento de la estimulación hemodinámica de la vasculatura podría conferir vasoprotección asociada a la expresión de genes protectores del endotelio como KLF2 (36, 143). Esto permitiría prolongar los tiempos de

preservación de los órganos y reducir la incidencia de disfunción de los injertos, razones para retomar la *machine perfusion* en la práctica clínica.

La perfusión continua en hígado no parece tan sencilla como en riñón, debido probablemente a las diferencias macroscópicas, microcirculatorias y celulares existentes entre los dos órganos. Actualmente, se están llevando a cabo estudios para definir las mejores condiciones para perfusión continua en el hígado: temperatura de preservación, composición de la solución, oxigenación, tipo de flujo y presión (pulsátil o no), perfusión individual (arteria hepática o vena porta) o doble (144). Brockmann y colegas han demostrado muy claramente que la condición de normotermia es la más efectiva para la preservación de los hígados en perfusión continua (145).

En el Hospital Clínico de Barcelona, el grupo de García-Valdecasas y Fondevila ha desarrollado una máquina de perfusión para hígados aislados que trabaja en normotermia y perfunde el órgano con sangre oxigenada con dos bombas separadas para la arteria hepática (flujo pulsátil) y la vena porta (flujo continuo). Los estudios experimentales llevados a cabo en hígados de cerdos son muy prometedores, demostrando que esta tecnología mejora la función y la histología hepática, reduce el daño tisular y hasta puede mejorar la viabilidad de los injertos obtenidos de donante por muerte cardíaca además de ofrecer la oportunidad de tratar farmacológicamente el injerto antes del implante (146).

3.2.2 Estatinas

Los inhibidores de la *hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase* (estatinas), desarrollados y aprobados como reductores de los niveles de colesterol, pueden ser beneficiosos también en situaciones de septicemia (147), accidente cerebrovascular (148), artritis reumatoide (149) y carcinoma del colon (150), evidencias

que sugieren la capacidad de estos medicamentos de ejercer protección independientemente de la síntesis de lípidos.

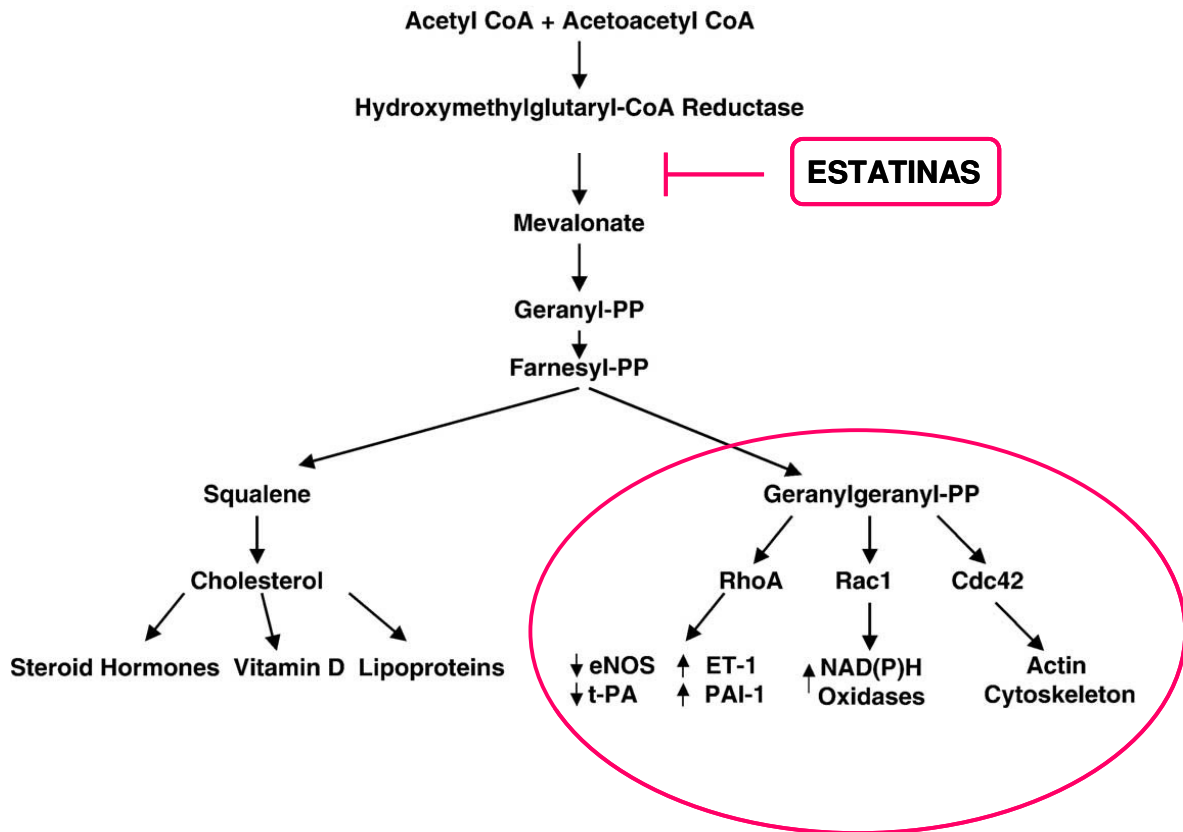


Figura 9. Metabolismo y acciones biológicas del mevalonato. Los efectos “no lipídicos” de las estatinas dependen de la falta de producción del intermedio isoprenoide geranylgeranyl-PP (GGPP) (adaptada de Beckman JA and Creager MA, TCM 2006).

Las estatinas interfieren en el metabolismo del mevalonato inhibiendo su producción por parte de la HMG-CoA reductasa (figura 9). En condiciones fisiológicas, los productos derivados del mevalonato regulan diferentes procesos celulares, entre estos la modulación del estrés oxidativo, el mantenimiento de la membrana celular, la síntesis de glicoproteínas, de colesterol y de hormonas esteroideas (151). La inhibición de la síntesis de mevalonato previene la formación de los intermedios isoprenoides como el *farnesylpyrophosphate* (FPP), necesario para la síntesis de escualeno y colesterol, y el

geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), que regula las pequeñas GTPasas Rho, Rac1, Ras (152). Estas GTPasas, a través de la PI3K, participan en la regulación de la motilidad celular y del transporte de membrana y pueden influir en diferentes aspectos de la función endotelial regulando la síntesis de NO, ET-1 y ROS y la expresión de factores inflamatorios y antitrombóticos (153) (TABLA 2).

TABLA 2. Efectos de las estatinas sobre los reguladores de la función vascular

Anti-aterogénicos	Pro-aterogénicos
↑ KLF2	↓ NFκB
↑ NO	↓ ET-1
↑ PGI ₂	↓ Ang II
↑ EDHF	↓ O ₂
↑ TM	↓ PAI-1
↑ tPA	↓ TNFα, IL-6
	↓ P-, E-selectina
	↓ ICAM-1, VCAM-1

(Adaptada de Beckman and Creager, TCM 2006)

De hecho, nuestro grupo ha demostrado que la administración aguda y crónica de simvastatina a pacientes cirróticos con hipertensión portal reduce la resistencia vascular hepática y que la administración del fármaco a ratas con hipertensión portal mejora la función endotelial aumentando de forma selectiva la biodisponibilidad de NO en el hígado (154-156).

Los efectos de las estatinas sobre la función vascular se deben, en parte, a la reducción de la actividad de NFκB (157, 158) y al aumento de la actividad de KLF2 (159).

3.3 Precondicionamiento isquémico

El precondicionamiento isquémico (PI) es una estrategia quirúrgica que consiste en la aplicación de breves periodos de I/R antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada. En cada órgano el efecto protector se consigue tras la aplicación de diferentes ciclos de I/R. En el hígado, el efecto protector del PI se consigue mediante la aplicación de un único ciclo de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión. La magnitud de la protección no aumenta si se aplican varios episodios de precondicionamiento (160).

Los mecanismos por los que el PI confiere protección contra el daño por I/R son objeto de continuas investigaciones. En general, se trata de una secuencia rápida de acontecimientos en la que una señal desencadenaría un mensaje intracelular y la posterior amplificación de los mecanismos responsables de la protección (105). El NO y la adenosina parecen jugar un papel muy importante en esta secuencia de eventos. A los pocos minutos de realizar el PI en el hígado, se libera adenosina al espacio extracelular y esta activa la eNOS y la producción de NO (161). En esta situación se ha comprobado una mejora en la oxigenación tisular y en la microcirculación del hígado (162). Por otra parte, el PI también se ha mostrado eficaz para inhibir la producción de endotelinas (163), prevenir el estrés oxidativo (164), modular la acumulación de neutrófilos (165), reducir el consumo de ATP y la acumulación de lactato (166).

Objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

El endotelio disfuncional presenta, entre otras características, alteración en los mecanismos de vasodilatación, complicaciones trombóticas, disminución de la resistencia al estrés oxidativo, aumento de la expresión de moléculas de adhesión y de la secreción de moléculas proinflamatorias. El factor de transcripción endotelial KLF2 juega un papel importante en la regulación del fenotipo protector endotelial y su expresión depende de las fuerza hemodinámicas generadas por el flujo sanguíneo y de la administración exógena de estatinas.

La hipertensión portal y el daño hepático por I/R son dos condiciones patológicas asociadas a disfunción endotelial. Los trastornos estructurales característicos de la cirrosis hepática, la mayor causa prevalente de hipertensión portal en nuestro entorno, se acompañan de variaciones en las fuerzas hemodinámicas que pueden modificar la expresión de KLF2 y su programa transcripcional vasoprotector. Asimismo, durante la isquemia asociada a la preservación de injertos hepáticos para trasplante, la interrupción de las fuerzas hemodinámicas generadas por el flujo sanguíneo podría resultar en la reducción de los *pathways* endoteliales vasoprotectores, que se debe en parte a la pérdida de expresión de KLF2.

Los trabajos de investigación de la presente tesis doctoral están globalmente orientados a ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la disfunción endotelial hepática y a averiguar si la modulación de la expresión/actividad de KLF2 puede ser beneficiosa en el tratamiento de la hipertensión portal y en la preservación de injertos hepáticos para trasplante.

Estudio 1: Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver.

La hipertensión portal se manifiesta con un aumento patológico de la presión venosa portal derivado de un incremento en la resistencia intrahepática y/o del flujo sanguíneo portal, y representa la principal complicación de la cirrosis hepática (45). El aumento de la resistencia del hígado al flujo sanguíneo portal es el resultado de la combinación de trastornos estructurales y disfunción del endotelio, que sintetiza una mayor cantidad de prostanoïdes vasoconstrictores (76, 86) y cantidades reducidas de vasodilatadores (65).

En otras patologías vasculares, estímulos nocivos como el flujo turbulento pueden conllevar que el endotelio pierda su funcionalidad. Sin embargo, el flujo laminar confiere a las CEs fuertes propiedades antitrombóticas, antiinflamatorias y vasodilatadoras (167). Hace algunos años, se ha demostrado que este fenotipo vasoprotector es modulado por la expresión del factor de transcripción KLF2 (30).

Con estos antecedentes, la principal **hipótesis** de este estudio fue que las variaciones hemodinámicas intrahepáticas que ocurren durante el desarrollo de la cirrosis hepática podrían modificar la expresión endotelial de KLF2, alterando así el fenotipo vasoprotector modulado por el factor de transcripción.

Por lo tanto, nuestro **objetivo** fue caracterizar la expresión de KLF2 y sus programas vasoprotectores en tres fases diferentes de inducción de cirrosis experimental.

Estudio 2: Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers.

La recuperación de la función hepática tras el trasplante, depende del grado de protección logrado durante la obtención y preservación del órgano. Actualmente, el método más común para la preservación de órganos es la preservación en frío, que consiste en la rápida perfusión del injerto seguida de su inmersión en una solución de preservación fría (132). La disfunción del endotelio que se produce durante la preservación en frío representa el primer factor responsable del desarrollo del daño por I/R, determinando activación plaquetaria, vasoconstricción persistente, aumentada expresión de moléculas de adhesión, estrés oxidativo, activación de las CKs, infiltración leucocitaria y muerte hepatocitaria (168, 169).

A día de hoy, se han descrito diferentes mecanismos de daño endotelial durante la preservación en frío y/o la reperfusión caliente, relacionados con la ausencia de aporte de O₂ durante la isquemia y la generación de ROS en el periodo de reperfusión (90, 170). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la falta de estímulos hemodinámicos que ocurre durante la preservación en frío para trasplante es el principal efecto perjudicial sobre el fenotipo endotelial (36). De hecho, el cese de flujo en sí determina una reducción significativa de los *pathways* vasoprotectores con consiguiente activación celular y apoptosis. Estos efectos negativos de la preservación en frío, observados en cultivos de CEs humanas, se deben en parte a la pérdida de la expresión de KLF2 y se pueden prevenir mediante la adición de un inductor de KLF2, como la simvastatina (141), a la solución de preservación (36).

Considerando estos antecedentes, la principal **hipótesis** de este estudio fue que la protección del endotelio durante la preservación de hígados para trasplante mediante la

inducción de los programas vasoprotectores dependientes de KLF2, puede ser un factor clave para su viabilidad y funcionalidad.

Por lo tanto, el **objetivo** principal del presente estudio fue evaluar los efectos de la preservación en frío sobre el fenotipo endotelial hepático y si la adición de un inductor de KLF2, como la simvastatina, a la solución de preservación puede mejorar la lesión por I/R observada tras la reperfusión.

Resultados

I. ARTÍCULO 1

Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver.

1. Los hígados de ratas controles y los hígados de ratas cirróticas por CCl₄ expresan tanto el mRNA como la proteína de KLF2. Dicha expresión parece ser únicamente endotelial.
2. La expresión de KLF2 está aumentada ya a las 6 semanas de desarrollo de cirrosis y se acompaña de un aumento de los mRNA de los genes diana eNOS, TM y CNP. En esta fase intermedia de la cirrosis, no se observan cambios en la expresión proteica de los genes diana, mientras que una vez totalmente desarrolladas la cirrosis la expresión proteica de la TM aumenta. Además, en estadios de la enfermedad, los hígados cirróticos presentan una reducción significativa de la eNOS fosforilada (forma activa).
3. En las CEs aisladas de hígados normales y cirróticos la expresión génica de KLF2 es flujo-dependiente. Tras 12 horas de exposición al flujo, las CEs hepáticas presentan un aumento en la expresión de dicho factor de transcripción comparadas con células cultivadas en condiciones estáticas. Dicho aumento se magnifica en las CEs precedentes de hígados cirróticos.
4. Ratas cirróticas tratadas con simvastatina presentan un aumento en la expresión génica de KLF2, eNOS y TM comparadas con ratas cirróticas tratadas con vehículo.

Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver

Jorge Gracia-Sancho,^{1,2} Lucia Russo,¹ Héctor García-Calderó,¹
Joan Carles García-Pagán,¹ Guillermo García-Cardeña,² Jaime Bosch¹

► An additional figure 1 is published online only. To view this file please visit the journal online (<http://gut.bmj.com>).

¹Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, IMDIM, Hospital Clínic—IDIBAPS, University of Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain

²Laboratory for Systems Biology, Center for Excellence in Vascular Biology, Departments of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence to

Dr Jaime Bosch, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; jbosch@clinic.ub.es

Revised 11 October 2010
Accepted 13 October 2010
Published Online First
26 November 2010

ABSTRACT

Objective The transcription factor Kruppel-like factor 2 (KLF2) modulates the expression of multiple endothelial vasoprotective genes. In the absence of KLF2, the endothelial phenotype becomes dysfunctional. To date, blood-derived shear stress is the main physiological stimulus identified to trigger and sustain endothelial KLF2 expression. Portal hypertension is a common complication of cirrhosis. Sinusoidal distortion and endothelial dysfunction play a significant role in its pathogenesis. This study aimed to assess whether abnormal intrahepatic haemodynamics in cirrhosis could modify KLF2 expression and consequently its downstream transcriptional programmes.

Design Rats received carbon tetrachloride or vehicle for two (acute injury), six (early cirrhosis) and twelve weeks (advanced cirrhosis). Systemic and hepatic haemodynamic parameters were measured in vivo. Hepatic expression of KLF2 and its vasoprotective targets were determined. Additionally, KLF2 expression was determined in liver sections, in freshly-isolated hepatic endothelial cells, and in livers from simvastatin-treated cirrhotic animals.

Results Cirrhotic livers have increased endothelial KLF2 expression compared with controls. KLF2 elevation, observed at six weeks of cirrhosis induction, was accompanied by a parallel increase in portal pressure and an increase in the expression of its target genes eNOS, thrombomodulin and CNP. Simvastatin administration further increased hepatic KLF2 and target genes expression.

Conclusions This study shows an increase in the expression of the vasoprotective transcription factor KLF2 in the cirrhotic liver, accompanied by an activation of its downstream transcriptional programmes. These data suggest that the marked increase in KLF2 expression may represent an endothelial compensatory mechanism to improve the ongoing vascular dysfunction in the cirrhotic liver.

Kruppel-like factors (KLF) are a subclass of the zinc finger family of transcription factors that regulate cellular growth and tissue development.¹ KLF typically bind to GC-rich or CACCC sequences in the promoter region of target genes to regulate their transcriptional activity. One member of the KLF family, KLF2, is highly expressed in the vascular endothelium and it is required for normal vessel development.^{2–3} It has been demonstrated that KLF2 expression confers endothelial protection against inflammation, thrombosis and vasoconstriction (figure 1). In fact, KLF2 expression

Significance of this study

What is already known about this subject?

- The transcription factor KLF2 protects the endothelium inducing the expression of a variety of vasoprotector genes/proteins.
- Shear stress is the most potent inducer of KLF2 expression.
- Most of these findings were described in cultured endothelial cells isolated from large vessels. Characterisation of KLF2 in microvascular vessels or specialised endothelium such as the liver SEC has never been reported.

What are the new findings?

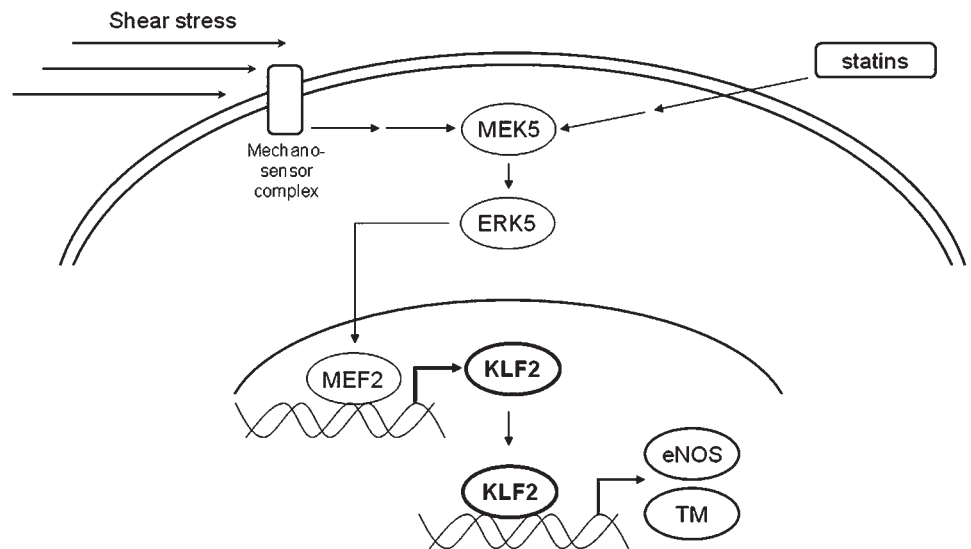
- SEC express KLF2 in a shear stress-dependent manner.
- Cirrhotic livers exhibit an upregulation in KLF2 and its vasoprotective target genes mRNA expression (including eNOS and thrombomodulin).
- The determined increment in KLF2 mRNA expression results in an increase in KLF2 and thrombomodulin protein expression; however, eNOS protein synthesis is misregulated in cirrhotic livers.
- Simvastatin upregulates hepatic KLF2 and its derived vasoprotective transcriptional programmes.

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

- Our data suggest that upregulation in KLF2 expression may represent a compensatory mechanism to improve the sinusoidal endothelial dysfunction characteristic of the cirrhotic liver.
- Our data open the rationale to investigate whether modulating KLF2 expression/activity may be a potential target in the management of cirrhosis and in liver preservation.

attenuates cytokine-mediated induction of pro-inflammatory targets such as E-selectin,⁴ inhibits the expression of vascular destabilisation molecules such as angiotensin II,⁵ induces gene expression of antithrombotic agents such as the blood coagulation inhibitor thrombomodulin,^{6–7} and potently activates vasodilatory pathways such as the endothelial-derived hyperpolarising factor c-type natriuretic peptide (CNP) or the endothelial nitric oxide synthase (eNOS).⁵

Figure 1 Scheme of Kruppel-like factor 2 (KLF2) induction and regulation in endothelial cells. Mitogen-activated protein kinase 5 (MEK5), mitogen-activated protein kinase 7 (ERK5), myocyte enhancing factor 2 (MEF2), KLF2, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and thrombomodulin (TM).



Blood flow-derived shear stress is one of the most important biomechanical stimuli that induces KLF2 expression, both *in vivo* and in cultured endothelial cells.^{5 8 9} In addition, endothelial cells exposed to disturbed shear stress do not express KLF2, providing evidence that KLF2 expression is selectively induced by distinct types of flow.^{5 8 9}

Portal hypertension syndrome is defined by a pathological increase in the portal venous pressure derived from increments in intrahepatic resistance (IHR) and portal blood flow (PBF) and represents a major complication of liver cirrhosis.¹⁰ This increased liver resistance to PBF is partly the result of an injured and therefore dysfunctional hepatic endothelium, which synthesises large amounts of vasoconstrictor prostanoids^{11 12} and reduced quantities of vasodilators such as nitric oxide (NO).¹³

The main hypothesis of the present study was that hepatic haemodynamic variations occurring during cirrhosis development could modify the hepatic endothelial KLF2 expression, thus altering the vasoprotective KLF2 target gene expression. In the present study we thus characterised the expression of KLF2 and its main target genes at three different phases of the induction of experimental cirrhosis.

METHODS

Induction of cirrhosis by CCl₄

Eighteen male Wistar rats weighing 50–75 g underwent inhalation exposure to carbon tetrachloride (CCl₄) for 2, 6 or 12 weeks (n=6 per group). Phenobarbital (0.3 g/l) was added to the drinking water as previously described.¹¹ After these periods of CCl₄ administration, treatment was stopped and the subsequent experiments were performed 1 week later. Age-matched control animals (n=6 per group) received only phenobarbital. The animals were kept in environmentally controlled animal 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 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (National Institutes of Health, NIH publication 86-23, revised 1985).

In-vivo haemodynamic studies

Under anaesthesia with intraperitoneal ketamine hydrochloride (Ketalar, 100 mg/kg bodyweight; Parke-Davis SL, El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) and midazolam (5 mg/kg body-

weight; Reig Jofre SA, Sant Joan d'Espí, Barcelona, Spain) a tracheotomy was performed and a polyethylene PE-240 tubing was inserted into the trachea to ensure a patent airway. PE-50 catheters were introduced into the femoral artery, for arterial pressure recording (mm Hg), and into the portal vein through an ileocolic vein, to measure portal pressure (mm Hg). Then, the portal vein was carefully dissected free from connective tissue, and a non-constrictive perivascular transit-time ultrasonic flow probe (2PR, 2-mm diameter; Transonic Systems, Ithaca, New York, USA) was placed around this vessel. The flow probe was connected to a flow metre, to measure the portal vein blood flow (ml/min 100 g/bodyweight). Intrahepatic resistance (mm Hg/ml per min/g) was calculated as: portal pressure/(portal vein blood flow/liver weight). Blood pressures and flows were registered on a multichannel computer-based recorder (PowerLab; ADInstruments, Colorado Springs, Colorado, USA). The external zero reference point was placed at the midportion of the animal. Haemodynamic data were collected after a 30-min stabilisation period.

Liver histology

Liver tissue blocks from animals receiving CCl₄ were fixed in 10% buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (10 µm) were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E) and with Masson's trichromatic staining specifically to stain fibrous tissue components. The degree of fibrosis was assessed using image analysis techniques. Briefly, 10 Masson's staining representative sections per animal were obtained and the positive area was measured with freeware NIH Image J 1.38 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). The results were expressed as a fibrosis ratio (%), calculated as the ratio of the Masson's positive area to the total area examined.

SEC isolation and exposure to shear stress

Sinusoidal endothelial cells (SEC) were isolated from control and cirrhotic rat livers (n=3 per group) and cultured as previously described.^{12 14} Briefly, after liver collagenase perfusion and isopycnic sedimentation of the resulting dispersed cells through a two-step density gradient of Percoll, pure monolayer cultures of SEC were established by selective attachment on a substrate of collagen I. SEC monolayers were cultured in the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF; 40 ng/ml) and exposed to static conditions or to unidirectional laminar flow for

12 h using a cell culture flow chamber (IBIDI, Munich, Germany). Applied shear stress (14.1 dyn/cm^2) was previously characterised for SEC in-vitro flow studies.¹⁵ All experiments were performed on high purity (>90%) and viability (>95%) cells on the first passage. To preserve its typical phenotype shear stress stimulus was initiated 12 h after SEC isolation.

In-vivo KLF2 induction

A subgroup of cirrhotic animals (12 weeks of CCl_4 exposure, $n=6$ per group) received the KLF2-inducer simvastatin (25 mg/kg per day, by mouth), or its vehicle, for 3 days.¹⁶ Afterwards, the expression of KLF2 and its vasoprotective target genes was determined as described below.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was isolated from frozen control and CCl_4 -treated rat livers and from fresh SEC using the Trizol method (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain). RNA was treated with DNase (Ambion, Austin, Texas, USA) to eliminate contaminating DNA. For complementary DNA synthesis, $1 \mu\text{g}$ of total RNA was retrotranscribed using Moloney-murine leukemia virus (MLV) reverse transcriptase and random hexamers, as described by the manufacturer (Invitrogen).

Real-time quantitative PCR of KLF2 and its target genes

cDNA templates were amplified by real-time quantitative (RT)-PCR using the fluorescent TaqMan technology (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on an ABI Prism 7900 sequence Detection System (Applied Biosystems). The quantification of rat KLF2, its target genes thrombomodulin, eNOS, CNP, VEGF, angiotensin 2 and the endogenous control 18S RNA was performed using pre-designed gene expression assays obtained from Applied Biosystems according to the manufacturer's protocol.

Each PCR reaction was carried out with $2 \mu\text{l}$ of the hepatic cDNA sample, $1 \times$ TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), and primers and probe in a final volume of $20 \mu\text{l}$, as recommended by the manufacturer. After an initial denaturation step at 95°C for 10 min, 40 cycles were performed as follows: 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

All experiments were performed in duplicate and several negative controls were included. Gene expression was related to

a standard curve derived from serial dilutions (10^{-1} – 10^{-4}) of a random sample cDNA. Standard curves were constructed by plotting the log of standard dilutions versus the threshold cycle (C_T) values, C_T being the fractional cycle number at which the fluorescence passes a fixed threshold. The messenger RNA concentration of each gene in hepatic samples was calculated referring the sample C_T to the standard curve, and normalised with the corresponding value of endogenous control C_T as recommended in the TaqMan user's manual. Values were expressed as relative units.

Western blot analysis of KLF2 and its targets

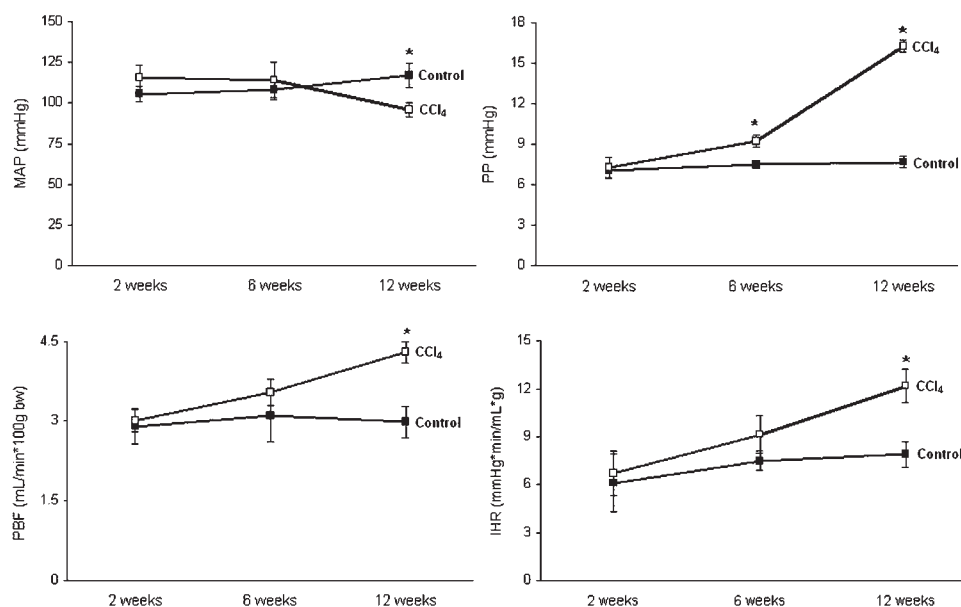
Protein expression for KLF2, thrombomodulin, eNOS, phosphorylated eNOS at Ser¹¹⁷⁶ (P-eNOS), VEGF and CNP in rat livers from CCl_4 -treated and control rat livers was assessed by western blot. Livers were collected, snap frozen in liquid nitrogen and homogenised in triton-lysis buffer as previously described.¹⁷ Aliquots from each sample containing equal amounts of protein ($100 \mu\text{g}$) were run on a 10% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. After the transfer, the blots were subsequently blocked for 1 h with Tris-buffered saline containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 and 5% (wt/vol) non-fat dry milk and subsequently incubated with primary antibodies overnight at 4°C . Then membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature.

Protein expression was determined by densitometric analysis using the Science Lab Image Gauge (Fuji Photo Film GMBH, Düsseldorf, Germany). After stripping, blots were assayed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) expression as standardisation of sample loading. Quantitative densitometric values of all proteins were normalised to GAPDH.

Immunohistochemistry

KLF2 immunostaining was performed in paraffin-embedded liver sections from control and cirrhotic livers using a goat-anti-KLF2 antibody (N-13; Santa Cruz Biotechnology)¹⁸ or phosphate-buffered saline, as negative control, and diaminobenzidine as chromogen. Slides were counterstained with H&E, and images were acquired using a microscope equipped with a digital camera.

Figure 2 Haemodynamic studies. Mean arterial pressure (MAP), portal pressure (PP), portal blood flow (PBF) and intrahepatic resistance (IHR) variations along cirrhosis induction in rats by carbon tetrachloride (CCl_4) inhalation (CCl_4 group) compared with age-matched vehicle-receiving animals (control group). Results are shown as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$ vs control).



Drugs and reagents

Collagenase was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Percoll was from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Reagents for cell culture were provided by Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Gey's balanced salt solution (GBSS), acrylamide and other chemical reagents were purchased from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 14.0 for Windows statistical package. All results are expressed as mean±SEM. Comparisons between groups were performed with analysis of variance followed by Tukey's test or with Student's *t* test or the Mann–Whitney *t* test when adequate. Differences were considered significant at a *p* value less than 0.05.

RESULTS

Haemodynamic changes during induction of cirrhosis by CCl₄ administration

Two weeks of cirrhosis induction did not modify any of the systemic or the hepatic haemodynamic parameters compared with control animals (figure 2).

At 6 weeks of CCl₄ treatment rats showed a significant increase in the portal pressure compared with those animals receiving vehicle. This was associated with non-significant increases in IHR and PBF (figure 2).

After 12 weeks of CCl₄ administration, animals presented with ascites, hypotension and a further significant increase in portal pressure, due to both a rise in PBF and in intrahepatic vascular resistance compared with animals receiving vehicle (figure 2).

Liver fibrosis

CCl₄ administration led to progressive hepatic fibrosis and architectural damage (figure 3). Whereas no significant histological changes were observed after 2 weeks of CCl₄ administration, at 6 weeks of starting the cirrhosis induction programme rats receiving CCl₄ presented with periportal fibrosis and the formation of thin septa, with complete nodule formation in half of the animals. These changes were approximately threefold greater at 12 weeks, when rats had already developed advanced cirrhosis and ascites.

Hepatic KLF2 expression

Control and CCl₄-treated rat livers expressed KLF2 mRNA and protein.

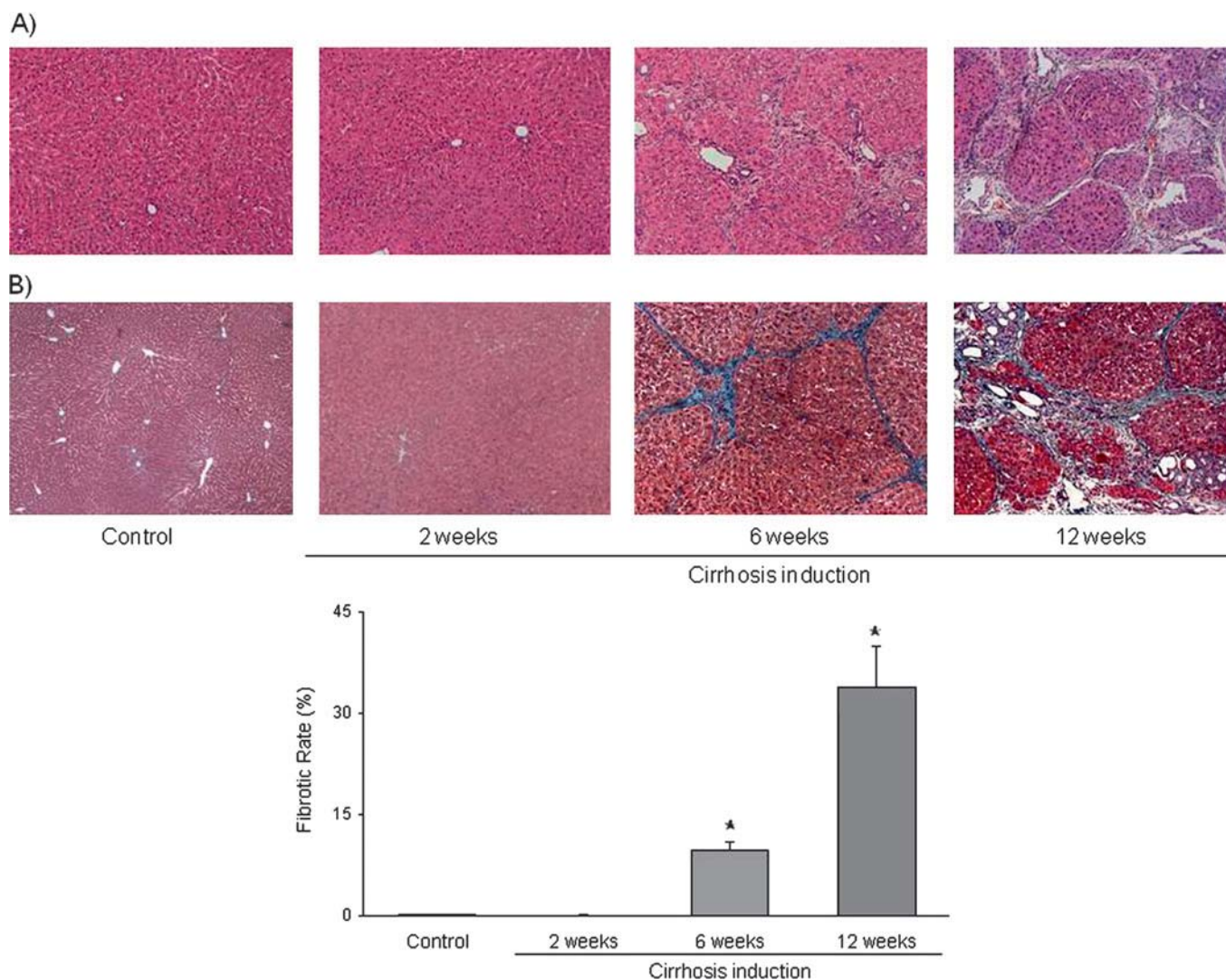


Figure 3 Histopathology analysis. (A) Representative images of haematoxylin and eosin-stained liver sections from control and carbon tetrachloride (CCl₄)-treated rats. (B) Top: Representative images of Masson's trichromic stained liver sections from control and CCl₄-treated rats. Images visualised and collected with light microscopy. Original magnification 20×. Bottom: Fibrosis quantification, values represent the ratio of the Masson's positive area to the total examined area (n=10 images per group).

No differences in KLF2 mRNA or protein expression were observed after 2 weeks of vehicle or CCl₄ administration (figure 4A,B). However, after 6 weeks CCl₄-treated animals showed a significant increase in the hepatic KLF2 mRNA and protein expression compared with the matched control animals. Differences between both groups increased at 12 weeks of CCl₄ administration, when animals had developed advanced cirrhosis (figure 4A,B).

To confirm the hepatic subcellular source of KLF2 expression and to know whether hepatic KLF2 expression responds to variations in flow stimulus, KLF2 expression was analysed in freshly isolated SEC exposed to static or physiological flow conditions and in liver sections. Figure 4C shows that SEC, freshly isolated from control or cirrhotic livers, express KLF2 in a flow-dependent manner; indeed SEC exposed for 12 h to flow-derived shear stress exhibited a significant upregulation in KLF2 expression compared with cells cultured under static conditions. KLF2 increment was significantly higher in cirrhotic SEC than in controls.

Localisation of KLF2 using immunohistochemistry revealed that hepatic KLF2 protein expression, at least in cirrhotic livers,

is almost solely endothelial. In fact, KLF2 protein expression was specifically detected in the endothelium of both portal and arterial beds. In contrast, intrahepatic KLF2 was barely detected in control rats using immunostaining, confirming a lower expression of this transcription factor in control livers (figure 4D). Unspecific background staining detected in fibrotic tissue from cirrhotic slides is shown in supplementary figure 1 (available online only).

KLF2 target gene expression

Analysis of KLF2-targeted genes and proteins involved in vascular physiology showed no differences in their hepatic expression comparing animals that received CCl₄ or vehicle for 2 weeks (figures 5 and 6). However, in accordance with the observed increases in KLF2 expression, animals receiving CCl₄ for 6 weeks showed a marked increase in hepatic eNOS, thrombomodulin and CNP mRNA expression compared with those receiving vehicle (figure 5), whereas no differences were observed in angiotensin 2 and VEGF mRNA expression. In contrast, at this point of cirrhosis development no differences in any of the evaluated KLF2-targeted hepatic proteins were

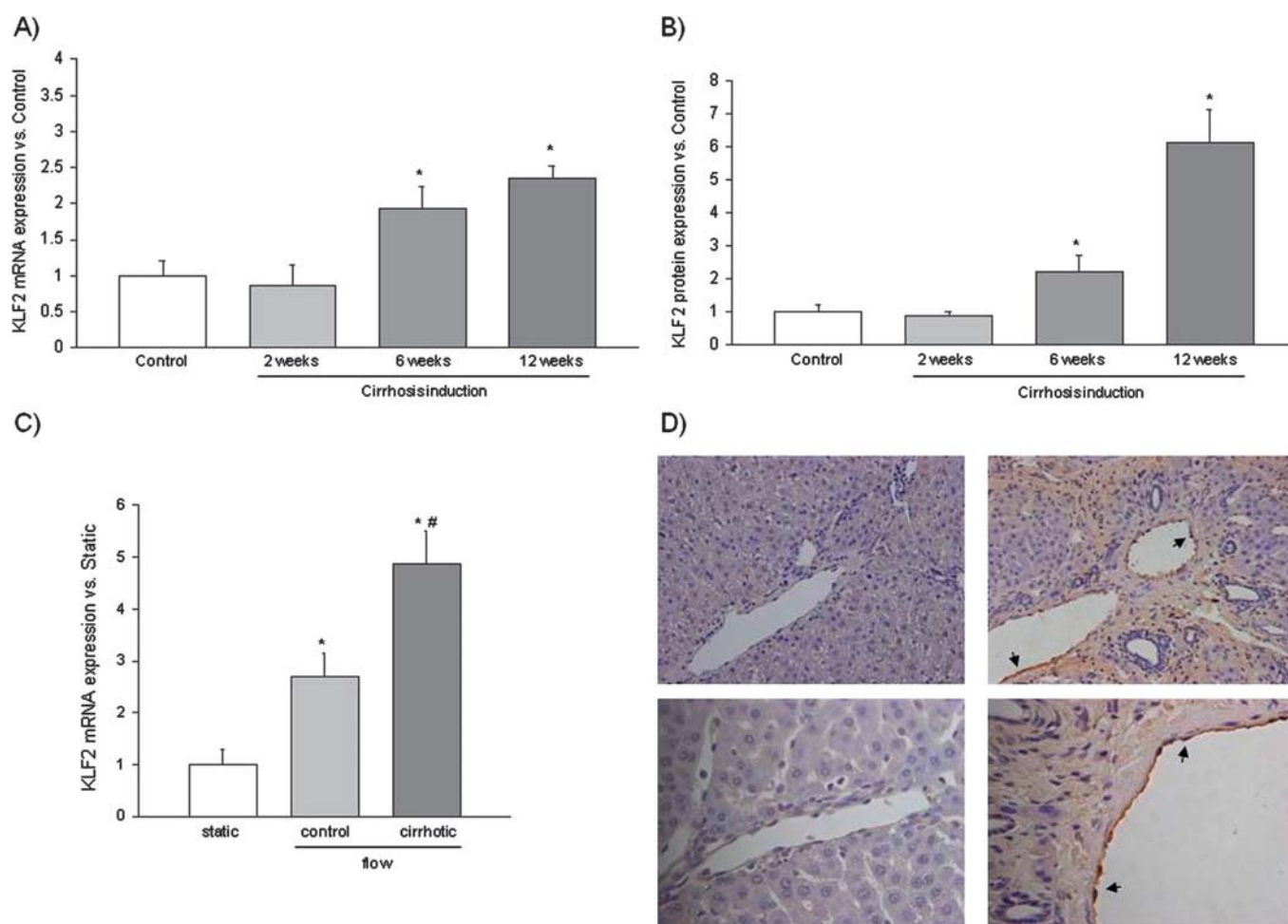


Figure 4 Kruppel-like factor 2 (KLF2) expression. (A) Hepatic KLF2 mRNA expression levels in rats receiving carbon tetrachloride (CCl₄) for 2, 6 and 12 weeks (n=6 per group). Values for KLF2 amplification from liver cDNA have been normalised to an endogenous reference gene (RNA 18S). Values (mean±SEM) are normalised to age-matched control liver expression (*p<0.05 vs control). (B) Hepatic KLF2 protein expression in rats receiving CCl₄ (n=6 per group). Densitometry analysis of western blots were normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and referred to controls (n=6). Values represent mean±SEM. (*p<0.05 vs control). (C) KLF2 mRNA expression determined in sinusoidal endothelial cells, freshly isolated from control and cirrhotic rat livers, cultured under static conditions or exposed for 12 h to laminar shear stress (n=3 per group). Values (mean±SEM) are normalised to endogenous reference gene (*p<0.05 vs its corresponding static; #p<0.05 vs control). (D) KLF2 protein expression (dark brown areas, indicated with arrowheads) detected by immunohistochemistry in control (left) and cirrhotic (right) rat liver sections. Representative images were visualised with a light microscope and are showed with 20× (top) and 40× (bottom) magnifications.

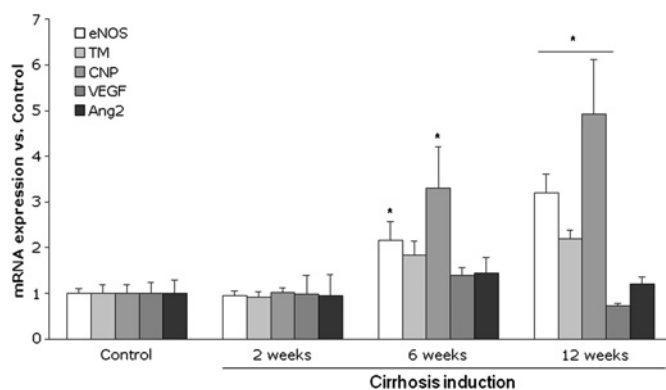
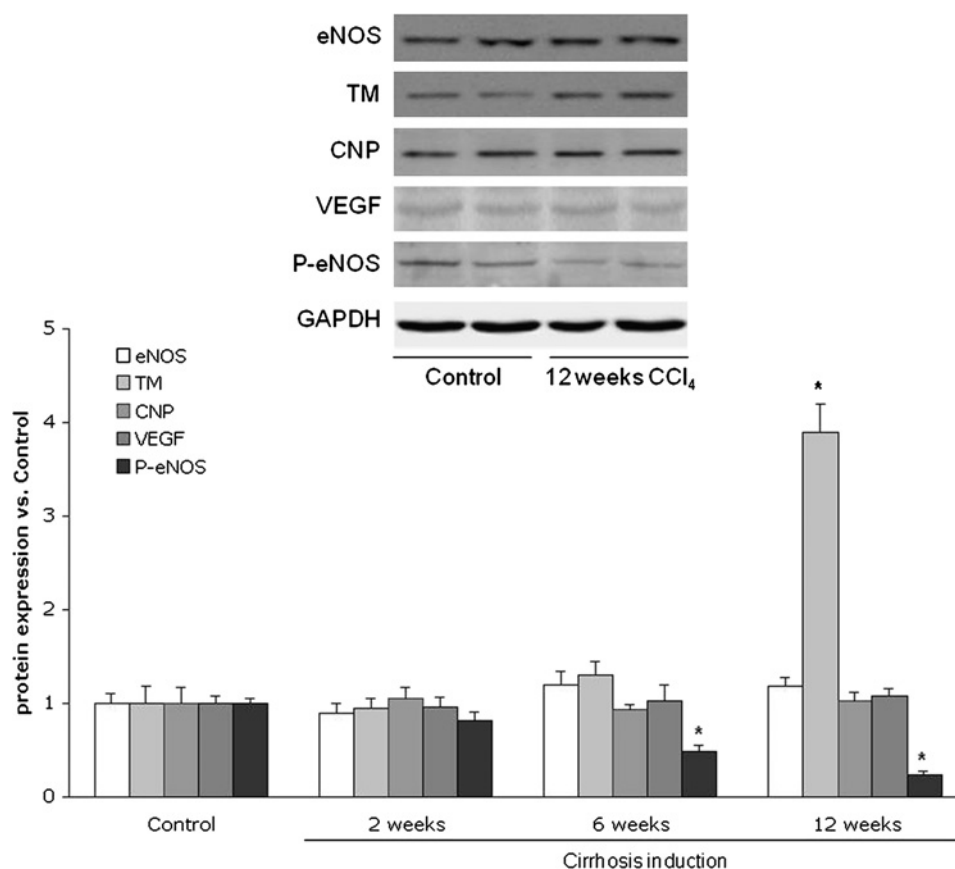


Figure 5 Hepatic Kruppel-like factor 2 (KLF2) target genes mRNA expression levels in rats receiving carbon tetrachloride for 2, 6 and 12 weeks (n=6 per group). Values for endothelial nitric oxide synthase (eNOS), thrombomodulin (TM), c-type natriuretic peptide (CNP), vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiotensin 2 (Ang2) amplification from liver cDNA have been normalised to an endogenous reference gene (RNA 18S). Values (mean±SEM) are normalised to age-matched control liver expression (*p<0.05 vs control).

observed compared with control animals (figure 6); however, a significant reduction in eNOS phosphorylation was observed in CCl₄-treated animal livers compared with controls (figure 6).

Animals with advanced cirrhosis (12 weeks of CCl₄) showed a clear and significant increase in hepatic eNOS, thrombomodulin and CNP mRNA expression, whereas no differences in angiotensin 2 and VEGF gene expressions were observed (figure 5). Thrombomodulin protein expression was increased, there were no differences in the protein expression of eNOS, VEGF and CNP and there was a significant reduction in p-eNOS in cirrhotic rat livers compared with controls (figure 6).

Figure 6 Hepatic endothelial nitric oxide synthase (eNOS), thrombomodulin (TM), vascular endothelial growth factor (VEGF), phosphorylated-eNOS (P-eNOS) and c-type natriuretic peptide (CNP) protein expression in rats receiving carbon tetrachloride (CCl₄). Top, representative western blots of indicated proteins. Bottom, densitometry analysis of western blots normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and referred to age-matched controls (n=6 per group). Values represent mean±SEM (*p<0.01 vs control).



Effects of simvastatin on the expression of KLF2 and vasoprotective genes in cirrhotic rat livers

Cirrhotic animals treated with simvastatin showed a significant increase in hepatic KLF2 and its target gene expression compared with cirrhotic animals receiving vehicle (figure 7).

DISCUSSION

The vascular endothelium is an essential organ implicated in the regulation of vasomotor tone, vascular homeostasis and inflammatory processes.¹⁹ In a healthy liver, sinusoidal endothelium plays an important role regulating hepatic vascular tone by releasing vasoactive substances that diffuse to the hepatic stellate cells inducing their constriction or relaxation, thereby changing sinusoidal diameter and modulating intrahepatic haemodynamics.^{20 21} However, cirrhotic liver endothelium loses its vasodilatory, antithrombotic, and anti-inflammatory properties to acquire a vasoconstrictor, prothrombotic and inflammatory phenotype in the context of hepatic sinusoidal dysfunction.^{15 22–24} In fact, it is well known that cirrhotic hepatic endothelium produces large amounts of vasoconstrictor substances (eg, thromboxane A₂)¹² and reduced quantities of vasodilators (principally NO)^{13 22} contributing to increase IHR and consequently aggravating portal hypertension syndrome. However, the molecular mechanisms responsible for endothelium phenotype modulation during cirrhosis development remain poorly understood.^{23 25}

In other vascular pathologies, different noxious stimuli such as turbulent flow can render the endothelium dysfunctional. However, healthy laminar flow modulates the phenotype of endothelial cells, conferring strong antithrombotic, anti-inflammatory and vasodilator properties to the endothelium.¹⁹ In addition, it has been shown that this vasoprotective phenotype is modulated by the expression of the transcription factor

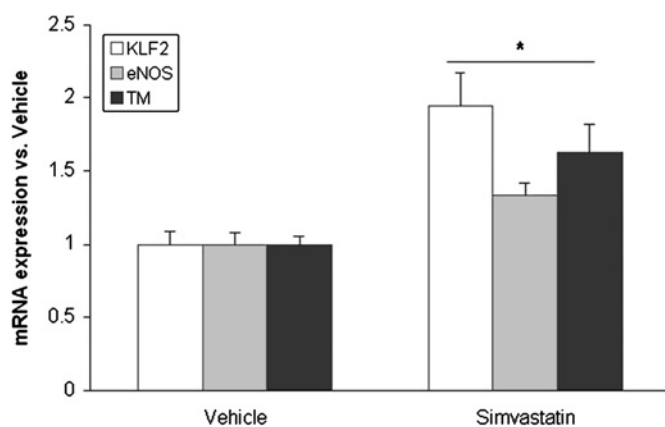


Figure 7 Hepatic Kruppel-like factor 2 (KLF2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and thrombomodulin (TM) mRNA expression in cirrhotic rats (12 weeks of carbon tetrachloride administration) treated for 3 days with simvastatin or its vehicle (n=6 per group). Values for gene amplification from cDNA have been normalised to an endogenous reference gene (RNA 18S). Values (mean±SEM) are normalised to vehicle-receiving animals (*p<0.05 vs vehicle).

KLF2.⁵ In the vasculature KLF2 is endothelial specific and its expression, which is modulated by different flow patterns, confers endothelial protection against inflammation, thrombosis and vasoconstriction.^{9 26} In fact, in atherosclerosis patients it has been demonstrated that vascular regions exposed to laminar shear stress highly express KLF2 and are thus resistant to atherosclerosis; whereas KLF2 expression is comparatively absent in atheroprone regions exposed to non-laminar shear stress.⁹

Our study demonstrates, for the first time, that the transcription factor KLF2 is highly expressed in the cirrhotic liver and, moreover, its expression is induced early during the progression of the disease. In particular, KLF2 gene and protein expression is upregulated in those animals with early and advanced cirrhosis (6 and 12 weeks of cirrhosis induction, respectively) compared with control animals.

Previous studies have demonstrated that in the vasculature KLF2 is specifically expressed in the endothelium; however, little is known about its expression in a given organ. The present study demonstrates that KLF2 expression within the liver is localised in the endothelium, and that its expression responds to flow stimulation. In fact, shear stress-derived KLF2 upregulation is significantly higher in hepatic endothelial cells from cirrhotic livers, suggesting that the hepatic endothelial phenotype in cirrhosis is partly primed to respond to this vasoprotective stimulus.

The main in-vivo biomechanical stimulus able to induce KLF2 expression is blood-derived shear stress, and interestingly it has been reported that shear stress upregulates the KLF2 target eNOS in the liver endothelium;^{15 27} therefore, we characterised the systemic and hepatic haemodynamics of all animals included in the present study. Animals with advanced cirrhosis, highly expressing KLF2, presented a marked increase in the quantity of blood flow entering the liver through the portal vein, thus favouring the expression of those endothelial genes upregulated by shear stress, including KLF2. However, the findings in animals treated with CCL₄ for 6 weeks, showing no significant increment in PBE, suggest that other mechanisms, perhaps related to the intrahepatic architectural disturbances (including cell stretch), to metabolic changes or circulating factors (ie, bacterial products, growth factors, etc.) or hypoxic processes

occurring during cirrhosis progression, could modify endothelium phenotype and upregulate KLF2 expression.^{9 28–30} The precise nature of these mechanisms needs to be characterised further.

Among other functions, healthy vascular endothelium maintains blood fluidity by producing different factors that promote fibrinolysis or inhibit blood coagulation. One of these is thrombomodulin, a factor involved in the generation of activated protein C through interactions with thrombin. KLF2 potentially induces thrombomodulin expression by binding to its promoter being necessary for endothelial coagulant gene expression and function regulation.⁶ In the present study we demonstrate that increased hepatic KLF2 expression is accompanied by elevated hepatic thrombomodulin gene and protein expression, suggesting that KLF2 is active and induces the antithrombotic pathway in the cirrhotic liver. This may be of relevance delaying or attenuating vascular occlusion and subsequent parenchymal extinction lesions, which lead to morphological progression in cirrhosis.^{31 32} Our findings suggest that this process might be accelerated if the increase in the expression of KLF2 was not present.

As described above, increased IHR in the cirrhotic liver is partly due to a reduced bioavailability of vasodilators, mainly NO. Such an insufficient sinusoidal NO availability has been related to a reduced production by eNOS,^{13 22} together with an increase in its scavenging by elevated levels of superoxide radicals.¹⁴ Previous studies have shown that one of the more potent inducers of genes implicated in regulating vascular tone is KLF2. In fact, the expression of KLF2 stimulates eNOS expression and activity and also the expression of CNP.⁵ Our group and others have demonstrated that rats with advanced cirrhosis present reduced hepatic eNOS activity with no differences in total hepatic eNOS protein expression compared with controls.^{15 14 22 33} However, the present study adds new and potentially decisive data about eNOS expression regulation. This is demonstrated by our finding that, following KLF2 expression, eNOS mRNA is significantly induced both in rats with early and advanced cirrhosis compared with their matched controls, suggesting that in cirrhotic livers eNOS mRNA transcription could be deregulated. Similarly, hepatic mRNA expression of CNP is significantly induced during cirrhosis development, but no differences in its protein expression are observed. In addition, we observed that already at the stage of early cirrhosis, rats present a marked decrease in hepatic eNOS phosphorylation, indicating a reduction in its enzymatic activity. Interestingly, both data coincide with the haemodynamic observation that rats with early cirrhosis exhibit a significant increase in portal pressure, which could result from hepatic architectural disturbances present in these animals together with a reduced hepatic NO production by eNOS.

Statins, well-known inducers of endothelial KLF2 expression,^{34 35} represent one of the most promising drugs to ameliorate portal hypertension. In fact, it has been shown that statin administration to cirrhotic animals, partly by increasing NO production, reduces IHR and improves portal hypertension.^{16 36} Moreover, recent studies have validated the beneficial effects of statins on human portal hypertension;^{37 38} however, the underlying mechanisms involved are unknown. Herein we demonstrate that cirrhotic animals treated with simvastatin exhibit increased hepatic levels of KLF2 and its vasoprotective target genes, eNOS and thrombomodulin, compared with cirrhotic animals receiving vehicle. Our data suggest that statins' beneficial effects on hepatic haemodynamics in cirrhosis would be partly KLF2 mediated.

In summary, the present study demonstrates that the transcription factor KLF2 is induced early in the cirrhotic liver endothelium, inducing the expression of its vasoprotective target genes. These data suggest that the marked upregulation in KLF2 expression may represent an endothelial compensatory mechanism to improve the vascular disorders ongoing in the cirrhotic liver. Moreover, our data open the rationale to investigate whether this transcription factor is involved in the pathogenesis and resolution of liver diseases occurring with endothelial dysfunction.

Acknowledgements The authors are grateful to Montse Monclús for excellent technical assistance.

Funding JGS was supported by the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH) and the Catalan Digestology Society (SCD). The study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI06-0623 and PI09-01261), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 07/61298) and NIH (HL-076686 and HL-090856). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

1. **Bieker JJ**. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001;**276**:34355–8.
2. **Anderson KP**, Kern CB, Crable SC, *et al*. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:5957–65.
3. **Kuo CT**, Veselits ML, Barton KP, *et al*. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev* 1997;**11**:2996–3006.
4. **SenBanerjee S**, Lin Z, Atkins GB, *et al*. KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 2004;**199**:1305–15.
5. **Parmar KM**, Larman HB, Dai G, *et al*. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest* 2006;**116**:49–58.
6. **Lin Z**, Kumar A, SenBanerjee S, *et al*. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circ Res* 2005;**96**:e48–57.
7. **Gracia-Sancho J**, Villarreal G Jr, Zhang Y, *et al*. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:514–19.
8. **Dekker RJ**, van Soest S, Fontijn RD, *et al*. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002;**100**:1689–98.
9. **Dekker RJ**, van Thienen JV, Rohlena J, *et al*. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* 2005;**167**:609–18.
10. **Bosch J**, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;**32**(1 Suppl):141–56.
11. **Graupera M**, Garcia-Pagan JC, Abalde JG, *et al*. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;**37**:172–81.
12. **Gracia-Sancho J**, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, *et al*. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;**47**:220–7.
13. **Rockey DC**, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;**114**:344–51.
14. **Gracia-Sancho J**, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, *et al*. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;**47**:1248–56.
15. **Shah V**, Haddad FG, Garcia-Cardena G, *et al*. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997;**100**:2923–30.
16. **Abalde JG**, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, *et al*. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;**46**:1040–6.
17. **Gracia-Sancho J**, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, *et al*. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;**133**:959–66.
18. **Wang N**, Miao H, Li YS, *et al*. Shear stress regulation of Kruppel-like factor 2 expression is flow pattern-specific. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**341**:1244–51.
19. **Gimbrone MA Jr**, Topper JN, Nagel T, *et al*. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2000;**902**:230–9; discussion 239–40.
20. **Zhang JX**, Pegoli W, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;**266**:G624–32.
21. **Rockey DC**, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993;**92**:1795–804.
22. **Gupta TK**, Toruner M, Chung MK, *et al*. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;**28**:926–31.
23. **Iwakiri Y**, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007;**46**:927–34.
24. **Shah V**. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001;**5**:629–44.
25. **Harrison DG**. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;**100**:2153–7.
26. **Dai G**, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, *et al*. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:14871–6.
27. **Qi K**, Qiu H, Rutherford J, *et al*. Direct visualization of nitric oxide release by liver cells after the arrest of metastatic tumor cells in the hepatic microvasculature. *J Surg Res* 2004;**119**:29–35.
28. **Kawanami D**, Mahabeleshwar GH, Lin Z, *et al*. Kruppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1 α expression and function in the endothelium. *J Biol Chem* 2009;**284**:20522–30.
29. **Sako K**, Fukuhara S, Minami T, *et al*. Angiotensin II induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem* 2009;**284**:5592–601.
30. **Dach K**, Zovko J, Hogardt M, *et al*. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor Klf2 via inactivation of RhoA and RhoGTPase 1. *Infect Immun* 2009;**77**:5583–92.
31. **Wanless IR**, Wong F, Blendis LM, *et al*. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995;**21**:1238–47.
32. **Tanaka M**, Wanless IR. Pathology of the liver in Budd–Chiari syndrome: portal vein thrombosis and the histogenesis of veno-centric cirrhosis, veno-portal cirrhosis, and large regenerative nodules. *Hepatology* 1998;**27**:488–96.
33. **Shah V**, Garcia-Cardena G, Sessa WC, *et al*. The hepatic circulation in health and disease: report of a single-topic symposium. *Hepatology* 1998;**27**:279–88.
34. **Parmar KM**, Nambudiri V, Dai G, *et al*. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem* 2005;**280**:26714–19.
35. **Sen-Banerjee S**, Mir S, Lin Z, *et al*. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 2005;**112**:720–6.
36. **Trebicka J**, Hennenberg M, Laleman W, *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**:242–53.
37. **Zafra C**, Abalde JG, Turnes J, *et al*. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004;**126**:749–55.
38. **Abalde JG**, Albillos A, Banares R, *et al*. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2009;**136**:1651–8.



Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver

Jorge Gracia-Sancho, Lucia Russo, Héctor García-Calderó, et al.

Gut 2011 60: 517-524 originally published online November 26, 2010
doi: 10.1136/gut.2010.220913

Updated information and services can be found at:

<http://gut.bmj.com/content/60/4/517.full.html>

	<i>These include:</i>
Data Supplement	"online appendix" http://gut.bmj.com/content/suppl/2011/04/13/gut.2010.220913.DC1.html
References	This article cites 38 articles, 14 of which can be accessed free at: http://gut.bmj.com/content/60/4/517.full.html#ref-list-1
Email alerting service	Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:

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

To order reprints go to:

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

To subscribe to BMJ go to:

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

II. ARTÍCULO 2:

Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers.

1. Los hígados preservados en frío muestran un descenso tiempo-dependiente en la expresión de KLF2 y genes diana eNOS, TM y hemooxigenasa (HO)-1. La adición de simvastatina a la solución de preservación mantiene los programas vasoprotectores de KLF2.
2. La pérdida de expresión de KLF2 y sus genes diana también se observa en CEs en condiciones de preservación en frío, siendo evitada al añadir simvastatina. El efecto protector de la simvastatina se anula si la expresión de KLF2 es previamente mutada con un siRNA específico para KLF2.
3. La preservación de hígados en condiciones de trasplante se acompaña de marcada presencia de daño hepático, elevados niveles de transaminasas y LDH, producción reducida de bilis y presencia de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis. Dichos efectos deletéreos de la preservación en frío se atenúan o se previenen completamente añadiendo simvastatina a la solución de preservación.
4. Aquellos hígados preservados en frío para trasplante presentan una aumentada resistencia vascular intrahepática y disfunción endotelial. La adición de simvastatina a la solución de preservación mejora la microcirculación hepática y previene la disfunción endotelial tras la reperusión.

5. El deterioro de la microcirculación hepática y el desarrollo de disfunción endotelial en los hígados preservados en frío se acompañan de un marcado descenso en la expresión y actividad de eNOS y reducción en los niveles de cGMP, sin observarse modificaciones en la expresión del colágeno-1 (marcador de activación de las HECs). La adición de simvastatina a la solución de preservación mantiene la expresión de eNOS y mejora su actividad, que se asocia a un aumento de los niveles de cGMP.

September 29, 2011

Prof. Jaime Bosch
Hospital Clinic, Barcelona
Liver Unit
Villarroel 170
Barcelona
08036
Spain

HEP-11-1124.R1

ADDITION OF SIMVASTATIN TO COLD STORAGE SOLUTION PREVENTS ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EXPLANTED RAT LIVERS

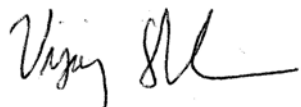
Dear Prof. Bosch:

We are pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication. Your manuscript will be sent to the publisher, John Wiley & Sons. You should receive the galley proofs directly via email from the publisher.

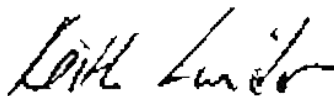
We are enclosing with this letter an Authors Agreement, which **must be signed and dated by all authors**. Please return the completed form to the attention of HEPATOLOGY at the address on this letter. You may fax or email the completed forms to us. Our fax number is 703-299-9676 and our email address is hepatology@aasld.org.

Again, thank you for submitting to HEPATOLOGY. Your paper will provide important information to our readers. We appreciate your contribution to the journal and look forward to receiving future submissions from you.

Sincerely,



Dr. Vijay Shah
Associate Editor, Hepatology



Dr. Keith Lindor
Editor, Hepatology

ADDITION OF SIMVASTATIN TO COLD STORAGE SOLUTION PREVENTS ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EXPLANTED RAT LIVERS

Lucia Russo*¹, Jorge Gracia-Sancho*¹, Héctor García-Calderó¹, Giusi Marrone¹, Juan Carlos García-Pagán¹, Guillermo García-Cardena² and Jaime Bosch¹

1- Hepatic Hemodynamic Lab, Liver Unit, IMDIM, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

2- Center for Excellence in Vascular Biology, Departments of Pathology, Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

* These authors equally contributed to this study and share first authorship.

Keywords: Kruppel-like factor 2; KLF2; transplantation; endothelium; machine perfusion

Correspondence to Prof. Jaime Bosch, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; jbosch@clinic.ub.es, phone: +34932275400 ext 3330, fax: +34932279856, or Dr. Jorge Gracia-Sancho, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Hospital Clínic de Barcelona - IDIBAPS – Esther Koplowitz Centre, Rosselló 149, Room 4.5, 08036 Barcelona, Spain; jgracia@clinic.ub.es, phone +34932275400 ext 4306.

Abbreviations: DHE: dihydroethidium; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HEC: hepatic endothelial cells; HO-1: hemeoxygenase-1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; I/R: ischemia/reperfusion; KLF2: Kruppel-like Factor 2; LDH: lactate dehydrogenase; NO: nitric oxide; TM: thrombomodulin; UWS: University of Wisconsin solution.

Financial support: This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PS 09/01261 to J.B. and FIS 11/00235 to J.G.-S.) and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2010/17043 to J.C.G.-P.). G.M. is a recipient of a fellowship from Instituto de Salud Carlos III (PFIS 09/00540), and J.G.-S. of a contract from the Programa Ramón y Cajal, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. Ciberehd is funded by Instituto de Salud Carlos III.

Author contribution: L.R. designed the research, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. J.G.-S. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and co-directed the study. H.G.-C. and G.M. performed experiments and analyzed data. J.C.G.-P. conceived ideas, critically revised the manuscript and obtained funding. G.G.-C. conceived ideas and critically revised the manuscript. J.B. designed the research, conceived ideas, wrote the manuscript, obtained funding and co-directed the study. All authors edited and reviewed the final manuscript.

ABSTRACT

Pathophysiological alterations in the endothelial phenotype result in endothelial dysfunction. Flow cessation, occurring during organ procurement for transplantation, triggers the endothelial dysfunction characteristic of ischemia/reperfusion injury, partly due to a reduction in the expression of the vasoprotective transcription factor Kruppel-like Factor 2 (KLF2). We aimed at 1-characterizing the effects of flow cessation and cold storage on hepatic endothelial phenotype and, 2-ascertaining if the consequences of cold stasis on the hepatic endothelium can be pharmacologically modulated, improving liver graft function.

Expression of KLF2 and its vasoprotective programs was determined in a) hepatic endothelial cells (HEC) incubated under cold storage conditions with or without the KLF2-inducer simvastatin, and b) rat livers not cold stored or preserved in cold University of Wisconsin Solution (UWS) supplemented with simvastatin or its vehicle. In addition, upon warm reperfusion, hepatic vascular resistance, endothelial function, nitric oxide vasodilator pathway, apoptosis, inflammation, and liver injury were evaluated in not cold stored livers or livers preserved in cold UWS supplemented with simvastatin or vehicle.

Expression of KLF2 and its vasoprotective programs decrease in HEC incubated under cold storage conditions. Cold stored rat livers exhibit a time-dependent decrease in KLF2 and its target genes, liver injury, increased hepatic vascular resistance and endothelial dysfunction. The addition of simvastatin to the storage solution, maintained KLF2-dependent vasoprotective programs, prevented liver damage, inflammation and oxidative stress and improved endothelial dysfunction.

Conclusion: Our results open the rationale to evaluate the beneficial effects of a vasoprotective preservation solution on human livers procurement for transplantation.

Liver transplantation is the only life-saving therapy for most types of advanced liver failure. Despite the advancement in surgical techniques, postoperative care and immunosuppressive therapies, which have improved short-term and long-term graft survival, approximately 20% of liver transplants are associated with serious clinical problems¹. Moreover, liver transplantation is limited by the shortage of adequate organs for clinical use, which have led to the use of “marginal” livers from non-healthy steatotic donors or non heart-beating donors. However, marginal livers are much more prone to primary graft failure after transplantation². Hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury is considered one of the main determinants of the outcome after liver transplantation^{3,4}.

The process of hepatic I/R injury is a sequence of events involving many interconnected factors occurring in a variety of cell types. Liver endothelial cells are particularly vulnerable to I/R injury and develop serious alterations during cold storage, such as retraction, cell body detachment, and apoptosis which are magnified upon warm reperfusion^{5,6}. It is currently accepted that hepatic endothelium damage occurring during cold preservation represents the initial factor leading to hepatic I/R injury, determining poor graft microcirculation, platelet activation, persistent vasoconstriction, up-regulation of adhesion molecules, oxidative stress, Kupffer cell activation, neutrophil infiltration and hepatocyte death^{7,8}.

Different mechanisms for endothelial damage during cold storage and/or warm reperfusion have been described^{9,10}. We have recently unravelled that lack of hemodynamic stimulation occurring during cold storage conditions is the main detrimental effect of organ preservation for transplantation on the endothelial phenotype¹¹. In fact, flow cessation *per se* results in a significant reduction in

endothelial vasoprotective pathways leading to cell activation and apoptosis. These negative effects of cold storage conditions, observed in cultured endothelial cells, are partly due to the loss of expression of the vasoprotective transcription factor Kruppel-like Factor 2 (KLF2) and can be prevented by adding a KLF2-inducer, such as simvastatin¹², to the cold preservation solution¹¹.

Considering that endothelial protection during cold storage represents a key factor for a successful transplantation, and that induction of KLF2-derived transcriptional programs confers endothelial protection, the main purpose of the present study was to evaluate the effects of cold storage on the hepatic endothelial vasoprotective phenotype and if supplementing a cold preservation solution with the KLF2-inducer simvastatin ameliorates the hepatic I/R injury observed upon reperfusion.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Wistar rats from Charles River laboratories SA (Barcelona, Spain), weighting 275-300 grams, were used. The animals were kept in environmentally controlled animal facilities at the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, NIH Publication 86-23, revised 1996).

Hepatic endothelial cells isolation and cold preservation

Rat hepatic endothelial cells (HEC) were isolated as previously described¹³. Briefly, after perfusion of the livers with 0,015% collagenase A and isopycnic sedimentation of the resulting dispersed cells through a two-step density gradient of Percoll (25-50%), monolayer cultures of HEC were established by selective attachment on a collagen I substrate. Cells were cultured (37°C, 5% CO₂) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 as previously described¹³. Highly pure and viable cells were used.

After two hours of isolation, HEC were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed (no cold storage group) or incubated 16h at 4°C in University of Wisconsin solution (UWS) supplemented with Simvastatin 1µM (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or its vehicle (dimethyl sulfoxide 0.1% v/v) (n=4 per group). The dose of simvastatin used has been previously validated^{11,12}.

siRNA Experiments

siRNA transfection was performed as previously described with minor modifications^{14 11}. Briefly, HEC were transfected with a siRNA targeting rat KLF2 (5nM, s157429, Life Technologies, Carlsbad, CA), or with a control siRNA (5nM, 4390843, Life Technologies) using siPORT transfection agent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. 24h post-transfection, cells were treated for an additional 16h with either 1 μ M simvastatin or its vehicle.

Cold preservation of liver

Rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg intraperitoneally; Merial Laboratories, Barcelona, Spain) plus midazolam (5mg/kg intraperitoneally; Laboratorios Reig Jofré, Barcelona, Spain). Afterwards the abdomen was opened, liver was exsanguinated with Krebs' buffer and flushed via the portal vein with cold UWS supplemented with simvastatin (10 μ M) or its vehicle.

Rat livers (n=7 per group) were harvested and one lobe from each liver was immediately snap frozen and other three were incubated at 4°C for 1h, 6h or 16h in UWS supplemented with simvastatin or its vehicle. Then, liver lobes were snap frozen for molecular studies.

Liver vascular studies

Liver vascular responses were assessed in the isolated, *in-situ* liver perfusion system, as described previously¹⁵. Briefly, after cannulation of the bile duct, livers were perfused through the portal vein with Krebs' buffer in a recirculation

fashion at a constant flow rate of 30 mL/min with a total volume of 100 mL. An ultrasonic transit-time flow probe (model T201; Transonic Systems, Ithaca, NY) and a pressure transducer (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) were placed on line, immediately ahead of the portal inlet cannula, to continuously monitor portal flow and perfusion pressure. Another pressure transducer was placed immediately after the thoracic vena cava outlet for measurement of outflow pressure. The flow probe and the two pressure transducers were connected to a PowerLab (4SP) linked to a computer using the Chart version 5.0.1 for Windows software (ADInstruments, Mountain View, LA). The average portal flow, inflow and outflow pressures were continuously sampled, recorded and afterwards blindly analyzed under code. After 20 minutes of stabilization, the livers were flushed with cold UWS or with cold UWS supplemented with simvastatin (10 μ M), and then cold stored for 16h in UWS or in UWS supplemented with simvastatin (n= 7 per group).

After cold storage livers were exposed at room temperature (22°C) for 20 min, to mimic warm ischemia period, and reperfused via the portal vein with Krebs' buffer (37°C). During the first 10 minutes of reperfusion (initial stabilization period), portal flow was progressively increased up to 30 mL/min. The perfusion preparations were continuously monitored during 60 minutes. Afterwards, liver endothelial function was evaluated by performing flow pressure curves (increases of 5 mL/min every 2 minutes)¹⁶. Intrahepatic vascular resistance (IVR) was calculated as: (inflow portal pressure – outflow portal pressure) / portal flow.

In an independent group of rats (n=5 per group), following warm reperfusion hepatic endothelial 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)^{17,18}.

Control livers (no cold storage) were perfused, flushed with UWS, harvested and immediately reperfused *ex vivo*.

Aliquots of the perfusate were sampled for the measurement of transaminases and lactate dehydrogenase (LDH). Bile output (reported as μ L of bile/ g of liver) was evaluated at the end of the study.

Analysis of hepatic transaminases and LDH

Hepatic injury was assessed in terms of transaminases and LDH levels analysed with standard methods at the Hospital Clinic of Barcelona's CORE lab.

Measurement of cGMP

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 described¹⁹. Results were expressed as pmol/mg tissue.

Dihydroethidium staining

In situ superoxide (O_2^-) levels were evaluated with the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Molecular Probes)²⁰. Briefly, liver cryosections (10μ m) were incubated with DHE (10μ mol/L) in phosphate-buffered saline. Fluorescence images were obtained with a laser scanning confocal microscope (TCS-SL DMIRE2, Leica), and quantitative analysis was performed with Image J 1.43m software (National Institutes of Health).

Histological Analysis

Liver samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned (thickness of 2 μm), and slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to analyze the hepatic parenchyma.

The samples were photographed and analyzed using a microscope equipped with a digital camera and the assistance of Axiovision software (Zeiss, Jena, Germany).

RNA Processing and Real-Time TaqMan Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA from HEC was isolated and purified using the Trizol method (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain). Total RNA from rat tissue was isolated and purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions. RNA quality was verified using Agilent's 2100 Bioanalyzer. RNA was reverse transcribed to cDNA using QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA). cDNA templates were amplified by real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) on an ABI Prism 7900 sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Expression of KLF2 and its target genes eNOS, thrombomodulin (TM) and hemeoxygenase (HO-1), and Collagen-I was analyzed using predesigned gene expression assays obtained from Applied Biosystems according to the manufacturer's protocol and reported relative to endogenous control 18S. All PCR reactions were performed in duplicate and using nuclease-free water as no template control.

Western blotting

Liver samples were processed as previously described²¹. Aliquots from each sample containing equal amounts of protein (40–100 µg) were run on 8-15% SDS–polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Equal loading was ensured by Ponceau staining. The blots were subsequently blocked for 1 h and probed overnight at 4°C with antibodies recognizing eNOS (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), phosphorylated eNOS at Ser1176 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY), cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) or ICAM-1 (R&D systems, Minneapolis, MN), all 1:1000, followed by an incubation with their corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (1:10000, Stressgen, Glandford Ave, Victoria, BC, Canada) for 1 h at room temperature. Blots were revealed by chemiluminescence. Protein expression was determined by densitometric analysis using the Science Lab 2001, Image Gauge (Fuji Photo Film Gmbh, Düsseldorf). Blots were assayed for GAPDH (Santa Cruz Biotech Santa Cruz, USA) content as standardization of sample loading.

Drugs and Reagents

Collagenase was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Percoll was from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Collagen type I was from Invitrogen (El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain). Reagents for cell culture were provided by Biological Industries, Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 for Windows statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL). All results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Comparisons between groups were performed with analysis of variance followed by Tukey's test or with Student's t test or the Mann-Whitney t test when adequate. Differences were considered significant at a p value less than 0.05.

RESULTS

Simvastatin Maintains the Expression of KLF2 and its Vasoprotective Target Genes in the Liver During Cold Storage

Rat liver lobes cold stored for 1h, 6h and 16h in UWS exhibited a significant reduction in KLF2 expression compared with their corresponding control liver lobes (Fig.1A). KLF2 reduction was accompanied by a significant decrease in the expression of its vasoprotective target genes eNOS, TM and HO-1 (Fig.1B). Simvastatin addition to UWS totally prevented the decay of hepatic KLF2, eNOS, TM and HO-1 during cold storage (Fig.1 A and B). Considering that after 16h of cold storage there was a maximal decrease of the vasoprotective genes that was completely abrogated by adding simvastatin to cold storage solution, this time-point was chosen for all following experiments.

Simvastatin Preserves the Expression of KLF2 and its Vasoprotective Target Genes in Hepatic Endothelial Cells During Cold Storage

As shown in Figure 2, freshly isolated hepatic endothelial cells cold stored for 16h in UWS exhibited a significant reduction in the expression of KLF2, eNOS and TM compared with cells not cold stored. Addition of simvastatin to UWS

maintained the endothelial expression of KLF2 and its vasoprotective target genes during cold storage. Importantly, the ability of simvastatin to maintain the expression of the studied vasoprotective genes was annulled when KLF2 expression was muted by siRNA silencing (Fig 2).

Simvastatin Addition to UWS Significantly Protects Liver Function and Viability During Cold Storage and Warm Reperfusion.

To evaluate the effects of simvastatin addition to UWS on hepatic injury derived from cold preservation and warm reperfusion, hepatic architecture distortion, hepatic function, bile production and presence of oxidative stress, inflammation and apoptosis were analyzed.

Histological examination revealed that livers cold stored for 16h in UWS exhibited evident hepatocellular lesions, mainly in centrilobular areas, defined by loss of cohesion of cell plates, necrotic hepatocytes, presence of Councilman Bodies and anoxia-derived small fat vacuoles (Fig. 3A). These histological changes were much attenuated or absent in liver grafts cold stored for 16 hours in UWS supplemented with simvastatin.

As shown in Figure 3B and 3C, cold stored and warm reperfused liver grafts released higher amounts of transaminases and LDH and lower quantity of bile in comparison to grafts reperfused without previous cold preservation. These detrimental effects were not observed in liver grafts cold stored in UWS supplemented with simvastatin.

Figure 4 depicts significantly higher levels of O_2^- , ICAM-1 and cleaved caspase-3 in cold stored and warm reperfused livers grafts comparing to control livers, indicating increased oxidative stress, inflammation and apoptosis respectively.

These negative events from cold storage-derived were markedly attenuated, or entirely prevented, in liver grafts cold stored in simvastatin-containing UWS.

Simvastatin Addition to UWS Improves Liver Microcirculation and Prevents Endothelial Dysfunction upon Reperfusion

Livers cold stored for 16h exhibited a deteriorated microcirculation upon reperfusion, as demonstrated by significantly increased liver vascular resistance as compared to control livers (Fig 5A). Cold storage-derived increments in liver vascular resistance were not observed in liver grafts cold preserved in the presence of simvastatin.

In addition liver grafts stored for 16h in cold UWS exhibit endothelial dysfunction (Fig 5B and 5C). As depicted in the figure 5B, in response to portal flow increments between 35 and 60 mL/min control livers were able to maintain a constant hepatic vascular resistance, thus demonstrating normal flow-dependent vasodilatation of the liver vascular bed. However, cold stored livers preserved in UWS did not accommodate portal flow increases, exhibiting a marked and significant increment in their vascular resistance. Remarkably, cold storage-derived endothelial dysfunction was entirely prevented in livers cold preserved in UWS supplemented with simvastatin.

Similarly, dose-response curves to Ach evidenced that cold stored livers exhibit significantly reduced endothelial-derived vasodilatation in comparison to no cold stored livers (Fig 5C), further demonstrating the development of acute endothelial dysfunction during cold storage. This pathological phenomenon was prevented when livers were cold stored in the presence of simvastatin.

Liver microcirculation deterioration and development of endothelial dysfunction after cold preservation were accompanied by significant reductions in eNOS expression and activity, and cGMP levels comparing to controls (Fig 6), with no modification in collagen-I expression (1.00 ± 0.16 controls vs. 0.92 ± 0.32 cold stored; NS), a known marker of hepatic stellate cell activation. Simvastatin addition to the cold storage solution maintained hepatic eNOS expression and improved eNOS phosphorylation, which was associated with up-regulation of cGMP levels.

DISCUSSION

The endothelium is the primary target of cold preservation and reperfusion injuries in liver transplantation. Liver sinusoidal endothelial injury involves cell activation, apoptosis and detachment, leading to hepatic microcirculatory dysfunction^{7,22}. Up to now, the reduction in endothelial function and viability during liver procurement for transplantation has been mostly attributed to the deleterious effects derived from ischemia²³. However, a recent study from our group demonstrated that absence of blood flow-derived shear stress stimuli *per se*, which occurs during organ procurement for transplantation, negatively affects the endothelial vasoprotective phenotype inducing acute endothelial dysfunction¹¹.

This pioneering study opened the rationale to investigate strategies for organ preservation based on machine perfusion of kidney or liver grafts^{24,25}. Furthermore, it allows studying the molecular mechanisms leading to increased endothelial sensitivity to injury in the absence of shear stress, with the aim of discovery druggable targets to prevent endothelial and tissue

damage during organ procurement. For this purpose, we analyzed the effects of shear stress interruption and cold storage on the hepatic endothelial phenotype and function, and developed a pharmacological strategy to maintain endothelial health in the setting of organ transplantation.

We firstly characterized the hepatic endothelial vasoprotective phenotype during cold storage, both at tissular and cellular levels, by analyzing the KLF2-derived protective pathways. Our study demonstrates that during cold storage conditions, the hepatic endothelial vasoprotective phenotype is rapidly lost. Indeed, the hepatic expression of KLF2 and its target genes eNOS, TM and HO-1 is significantly reduced just after 1h or 6h of cold storage. Reduced expression of KLF2 and its transcriptional target progressively increased throughout cold storage. Although it is well established that within the liver, as well as in the vasculature, the expression of KLF2 is mainly endothelial^{11,26,27}, we further characterized the effects of shear stress termination and cold storage conditions on the vasoprotective phenotype in freshly isolated hepatic endothelial cells. These *in vitro* experiments confirmed that once flow stimulus is terminated, and cells are preserved under cold storage conditions, hepatic endothelial KLF2-derived vasoprotective pathways are significantly downregulated.

To understand the pathophysiological consequences of an abnormal endothelial phenotype occurring during cold storage, we characterized the hepatic microcirculation status and the hepatic endothelial function during warm reperfusion. These experiments showed that upon reperfusion, cold stored liver grafts exhibit much higher hepatic vascular resistance, as comparing to liver grafts not cold stored. Moreover, these liver grafts exhibit acute endothelial

dysfunction. These microcirculatory abnormalities were accompanied by significant hepatic injury, as demonstrated by marked increments in: hepatic enzymes release, inflammation, apoptosis, oxidative stress, histological injury and significant reduction in bile production. Our results are in agreement with previous reports describing increased vascular tone, apoptosis and inflammation following cold storage and warm reperfusion^{8,28-32}, further supporting the concept that both the endothelium and the liver parenchyma are negatively affected by cold storage and warm reperfusion.

It is well known that successful graft function and patient recovery after transplantation depends on the degree of organ protection achieved during cold storage, being the composition of the organ preservation solution crucial to reach maximum protection^{33,34}. A variety of studies have evaluated the possible beneficial effects of new or modified organ preservation solutions on liver function and viability upon reperfusion^{28,35}; however none of them focused at improving endothelial protection during cold storage. In our study, we addressed this question by analyzing the possible beneficial effects of adding simvastatin, a drug known for its vasoprotective properties, to a standard solution for organ preservation.

Statins, or HMG-CoA reductase inhibitors, up-regulate KLF2-derived transcriptional programs improving endothelial function^{12,19,27,36}. This kind of drugs have been described as prophylactic agents to treat ischemia-reperfusion injuries³⁷. Moreover we recently suggested that simvastatin could be used as a supplement for organ preservation solutions due to its capability to sustain the expression of KLF2-derived vasoprotective transcriptional pathways in cold stored endothelial cells¹¹. Here we demonstrate that the addition of simvastatin

to the UWS, a commonly used cold storage solution, maintains KLF2-derived vasoprotective pathways during short and long periods of cold liver ischemia. Furthermore, simvastatin addition to UWS dramatically improves the capacity of this solution to protect liver viability and function during cold storage and to inhibit the development of hepatic microcirculatory dysfunction and liver injury upon warm reperfusion. Specifically, liver grafts cold stored in the presence of simvastatin and afterwards warm reperfused exhibited significantly reduced hepatic injury, normal hepatic resistance and improved endothelial function as compared to grafts cold stored without simvastatin in the preservation solution. Remarkably, the protective effects of simvastatin were observed in liver grafts cold stored for 16h, a period of time where UWS no longer provides protection^{38,39}, thus opening up the possibility to lengthen liver procurement periods.

Liver function and viability protection conferred by simvastatin, defined as normalization of liver enzymes release and bile production, can be partly explained by the prevention of inflammation, apoptosis and oxidative stress, as demonstrated by their surrogate markers ICAM-1, cleaved caspase-3, and O_2^- . These results, which are in accordance with previous reports describing KLF2-derived anti-inflammatory, anti-apoptotic and antioxidant effects^{14,40}, suggest that the beneficial effects of simvastatin on liver function derive from its ability to maintain KLF2-derived vasoprotective pathways during cold storage.

To understand the molecular mechanisms responsible for the simvastatin-derived liver microcirculation protection, and considering that statins enhance endothelial NO production by upregulating eNOS expression and activity⁴¹, and that NO donors protect livers against I/R injury⁴², we characterized the NO

pathway in the liver grafts included in the present study. These experiments demonstrated that simvastatin addition to cold storage solution leads to an upregulation of hepatic NO bioavailability, measured as its secondary messenger cAMP. The up-regulation in NO levels could derive from increased eNOS expression and activity, as suggested by increased expression of the biologically active phosphorylated eNOS together with reduced levels of its scavenger superoxide (O_2^-)²⁰. All together, these observations suggest that maintenance of an adequate NO generation may be responsible, at least in part, for preventing the increase in liver vascular resistance as well as for the normal endothelial function observed in liver grafts cold stored with simvastatin. Two important clinical implications derive from the present study. Firstly it has been recently suggested that improvement in organ function post-transplantation achieved by machine continuous perfusion preservation may be partly derived from endothelial protection due to up-regulation of shear stress-sensitive protective genes⁴³. The data included in our study demonstrate that addition of a vasoprotective agent, such as simvastatin, to a liver cold storage preservation solution represents a much easier and cost-effective alternative to machine perfusion preservation. Secondly, it is well known that cold storage and warm reperfusion injuries are especially severe, and are associated with serious morbidity and mortality, when using expanded criteria donors or marginal². The new approach for better preservation of organs for transplantation described in the present study opens the possibility to improve the function of liver grafts from marginal donors by using vasoprotective preservation solutions, which would represent a main step forward to improve donor pools and overcome current problems of organ shortage.

Reference List

1. Pirenne J, van GF, Aerts R, et al. Abdominal Transplant Surgery and Transplant Coordination University Hospitals Leuven 1997-2007: an overview. *Acta Chir Belg* 2008;108:15-21.
2. Busuttil RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:651-663.
3. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200-1208.
4. Selzner N, Rudiger H, Graf R, et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-936.
5. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, et al. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989;10:292-299.
6. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, et al. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989;48:463-468.
7. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004;39:1110-1119.
8. Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, et al. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc* 2006;38:3351-3357.
9. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 1999;13:155-168.
10. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-G26.
11. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Jr., Zhang Y, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation* 2010;90:142-149.
12. Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, et al. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem* 2005;280:26714-26719.
13. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Enhanced vasoconstrictor prostanoid production by sinusoidal endothelial cells

- increases portal perfusion pressure in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2007;47:220-227.
14. Parmar KM, Larman HB, Dai G, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest* 2006;116:49-58.
 15. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, et al. 5-Lipoxygenase Inhibition Reduces Intrahepatic Vascular Resistance of Cirrhotic Rat Livers: A Possible Role of Cysteinyl-Leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;122:387-393.
 16. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, et al. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003;39:940-946.
 17. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, et al. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-931.
 18. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;39:515-521.
 19. Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;46:1040-1046.
 20. Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248-1256.
 21. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Evidence against NADPH oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:959-966.
 22. Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997;25:664-671.
 23. Rauen U, de GH. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 2004;52:299-309.
 24. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:7-19.
 25. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant* 2010;10:372-381.

26. Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, et al. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* 2005;167:609-618.
27. Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, et al. Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* 2011;60:517-524.
28. Ben M, I, Rosello-Catafau J, fany-Fernandez I, et al. Addition of carvedilol to University Wisconsin solution improves rat steatotic and nonsteatotic liver preservation. *Liver Transpl* 2010;16:163-171.
29. El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, et al. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. *Hepatology* 2004;39:1553-1562.
30. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, et al. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 1992;52:377-382.
31. Topp SA, Upadhyga GA, Strasberg SM. Leukocyte adhesion to cold-preserved rat endothelial cells: role of actin disassembly and ICAM-1. *Liver Transpl* 2003;9:1286-1294.
32. Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, et al. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1997;3:407-415.
33. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007;83:1289-1298.
34. Vos IH, Briscoe DM. Endothelial injury: cause and effect of alloimmune inflammation. *Transpl Infect Dis* 2002;4:152-159.
35. Bachmann S, Peng XX, Currin RT, et al. Glycine in Carolina rinse solution reduces reperfusion injury, improves graft function, and increases graft survival after rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1995;27:741-742.
36. Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, et al. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 2005;112:720-726.
37. Joyce M, Kelly C, Winter D, et al. Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2001;101:79-84.
38. Todo S, Nery J, Yanaga K, et al. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989;261:711-714.
39. Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, et al. The impact of extended preservation on clinical liver transplantation. *Transplantation* 1990;50:438-443.

40. Dai G, Vaughn S, Zhang Y, et al. Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ Res* 2007;101:723-733.
41. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-1135.
42. Ben M, I, Massip-Salcedo M, Fernandez-Monteiro I, et al. Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat steatotic livers. *Liver Transpl* 2007;13:410-425.
43. Tullius SG, Garcia-Cardena G. Organ procurement and perfusion before transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:78-80.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Simvastatin maintains KLF2 and its vasoprotective target genes expression in livers during cold storage. (A) KLF2 and (B) eNOS, TM and HO-1 mRNA expression was determined in livers not cold stored or stored for 1h, 6h or 16 h in University of Wisconsin Solution supplemented with Simvastatin (10 μ M) or its vehicle (* p <0.05 vs. no cold storage and simvastatin; n =7 per condition).

Figure 2. Simvastatin induces hepatic endothelial KLF2 and its vasoprotective target genes expression during cold storage. *Top*, KLF2, eNOS and TM mRNA expression was determined in freshly isolated hepatic endothelial cells (HEC) preserved at 4°C for 0h (no cold storage) or 16h in University of Wisconsin Solution supplemented with simvastatin (1 μ M) or its vehicle (* p <0.05 vs. no cold storage and simvastatin; n =4 per condition). *Bottom*, KLF2 and its vasoprotective target genes expression in HEC transfected with specific siRNA against KLF2 or control, and preserved for 16h in the presence of simvastatin (1 μ M) (* p <0.05 vs. siRNA control; n =5 per condition).

Figure 3. Simvastatin ameliorates I/R liver injury. Liver grafts not cold stored (control group) or cold stored for 16h in University of Wisconsin Solution supplemented with simvastatin (10 μ M) or with its vehicle were analyzed following warm reperfusion. Hepatic architecture status was assessed by H&E staining, 20X (top) and 40X (bottom) magnifications (A). Hepatic injury was measured by analyzing transaminases (ALT and AST), lactate dehydrogenase (LDH) levels (B) and bile production (C). (* p <0.05 vs. no cold storage and simvastatin; n =7 per group).

Figure 4. Simvastatin prevents hepatic I/R injury-derived oxidative stress, inflammation and cell death. (A) *Top*, representative confocal microscopy images of

superoxide (O_2^-) *in situ* detection in fresh sections from livers not cold stored (control group) or cold preserved for 16h in University of Wisconsin Solution supplemented with simvastatin (10 μ M) or its vehicle, and afterwards warm reperfused. *Bottom*, liver sections described above fluorescence intensity analysis. (* $p < 0.05$ vs. no cold storage and simvastatin; # $p < 0.05$ vs. vehicle; $n = 3$ per condition). (B) *Top*, representative images of cleaved caspase-3 (apoptosis) and ICAM-1 (inflammation) immunoblots of liver grafts preserved as described above. *Bottom*, densitometric analysis of depicted proteins normalised to GAPDH. (* $p < 0.05$ vs. no cold storage and simvastatin; $n = 7$ per condition).

Figure 5. Simvastatin improves hepatic microcirculation and endothelial dysfunction in livers cold stored and warm reperfused. (A) Intrahepatic vascular resistance (IVR) variation observed during warm reperfusion of livers not cold stored (control group) or livers cold preserved for 16h in University of Wisconsin Solution supplemented with simvastatin (10 μ M) or its vehicle ($n = 7$ per group). (B) Endothelial function evaluation of liver grafts described in A. *Top*, IVR increment due to portal flow increments ($n = 7$ per group). (C) Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine of liver grafts preserved as described in A ($n = 5$ per group). (* $p < 0.05$ vs. no cold storage and simvastatin).

Figure 6. Simvastatin preserves NO bioavailability during liver procurement. (A) *Top*, representative eNOS and p-eNOS western blots of liver grafts not cold stored or cold preserved for 16h in University of Wisconsin Solution supplemented with simvastatin (10 μ M) or its vehicle. *Bottom*, protein densitometric analysis normalised to GAPDH. (B) cGMP levels determined in livers described in A. (* $p < 0.05$ vs. no cold storage and simvastatin; # $p < 0.05$ vs. vehicle; $n = 7$ per group).

Acknowledgements: The work was partly carried out at the Esther Koplowitz Centre, Barcelona. Authors are indebted with Montserrat Monclús for technical assistance, Eugenio Rosado and Marcos Pasarín for helpful discussions and Dr Miquel Bruguera for his expertise in liver histology.

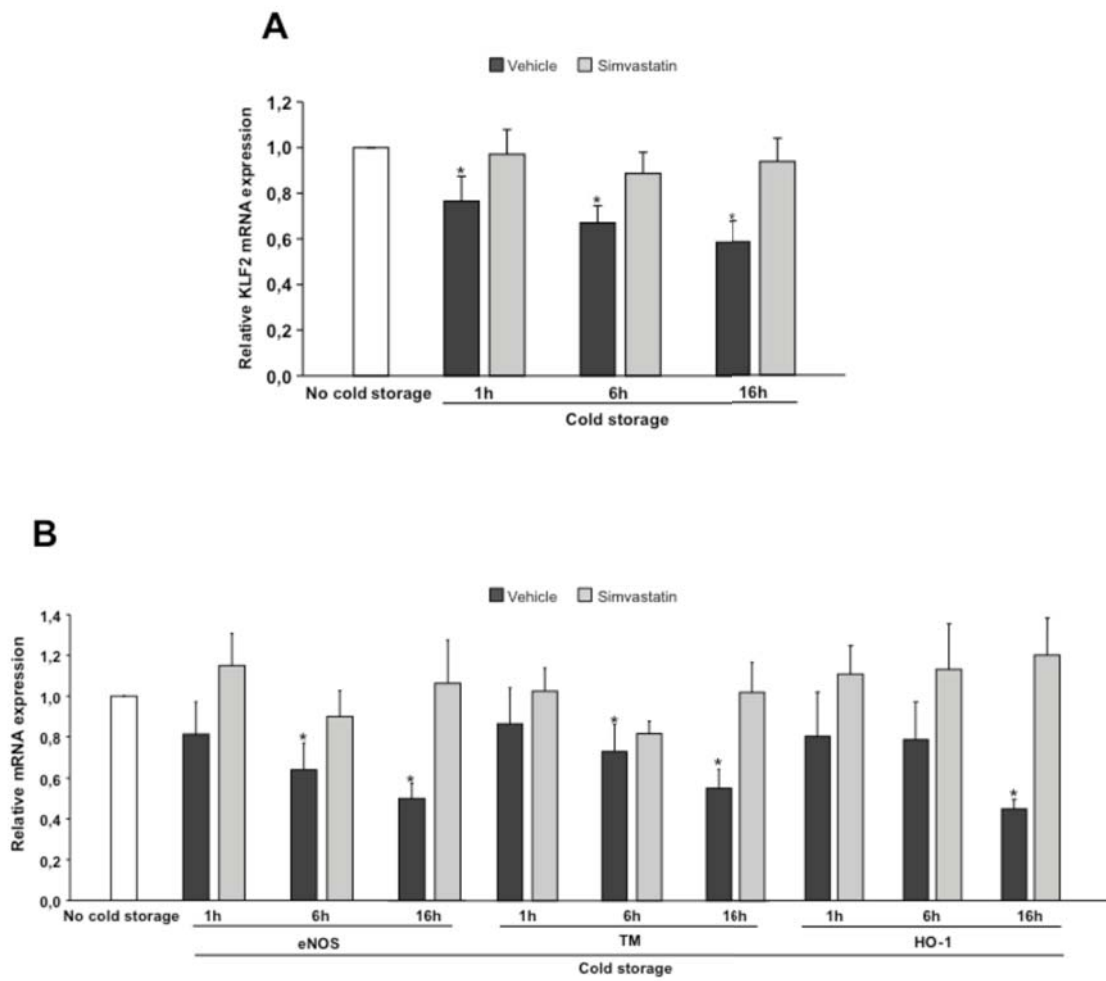


Figure 1

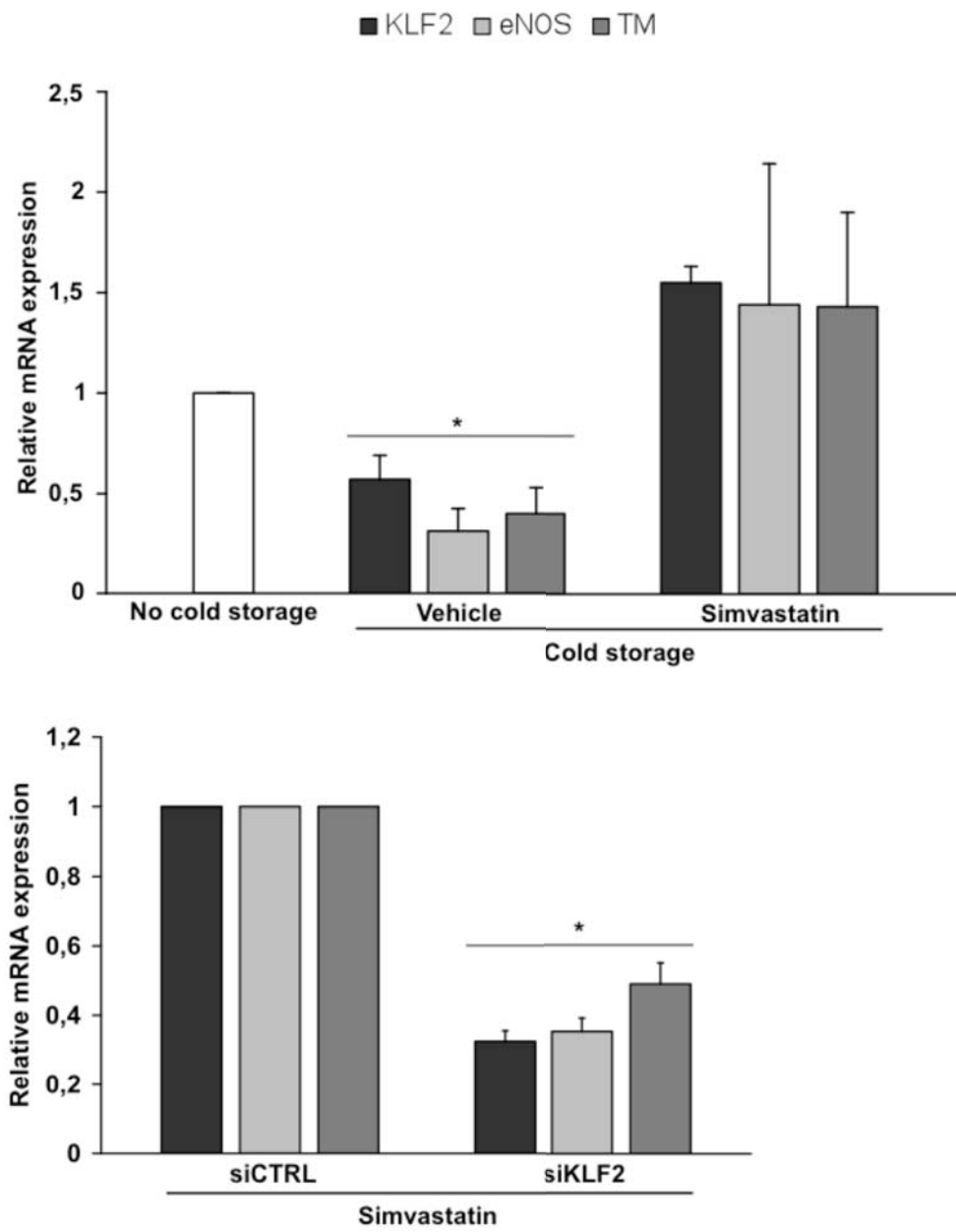
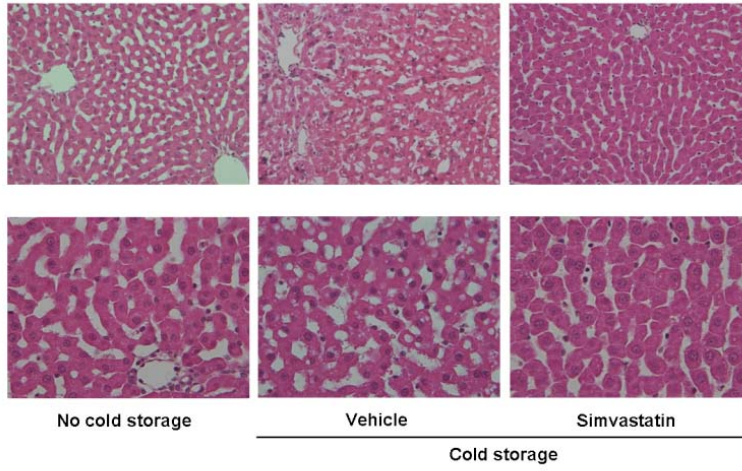
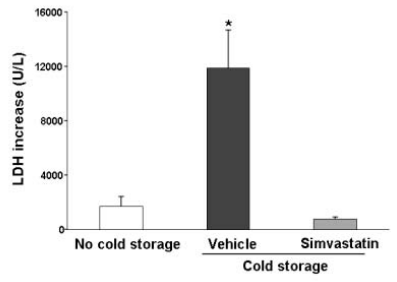
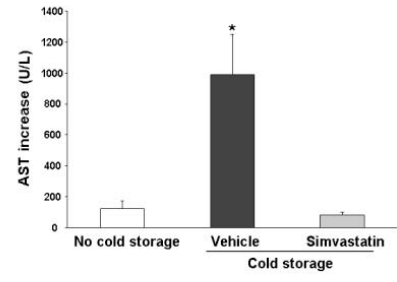
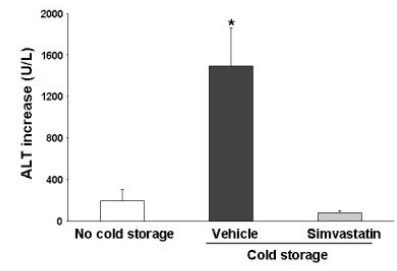


Figure 2

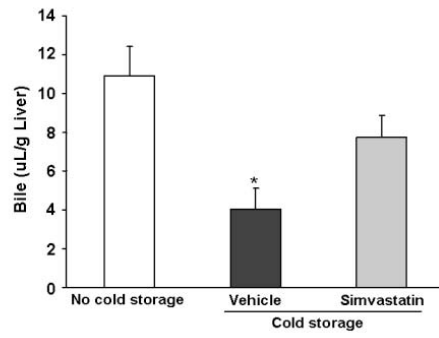
A



B



C



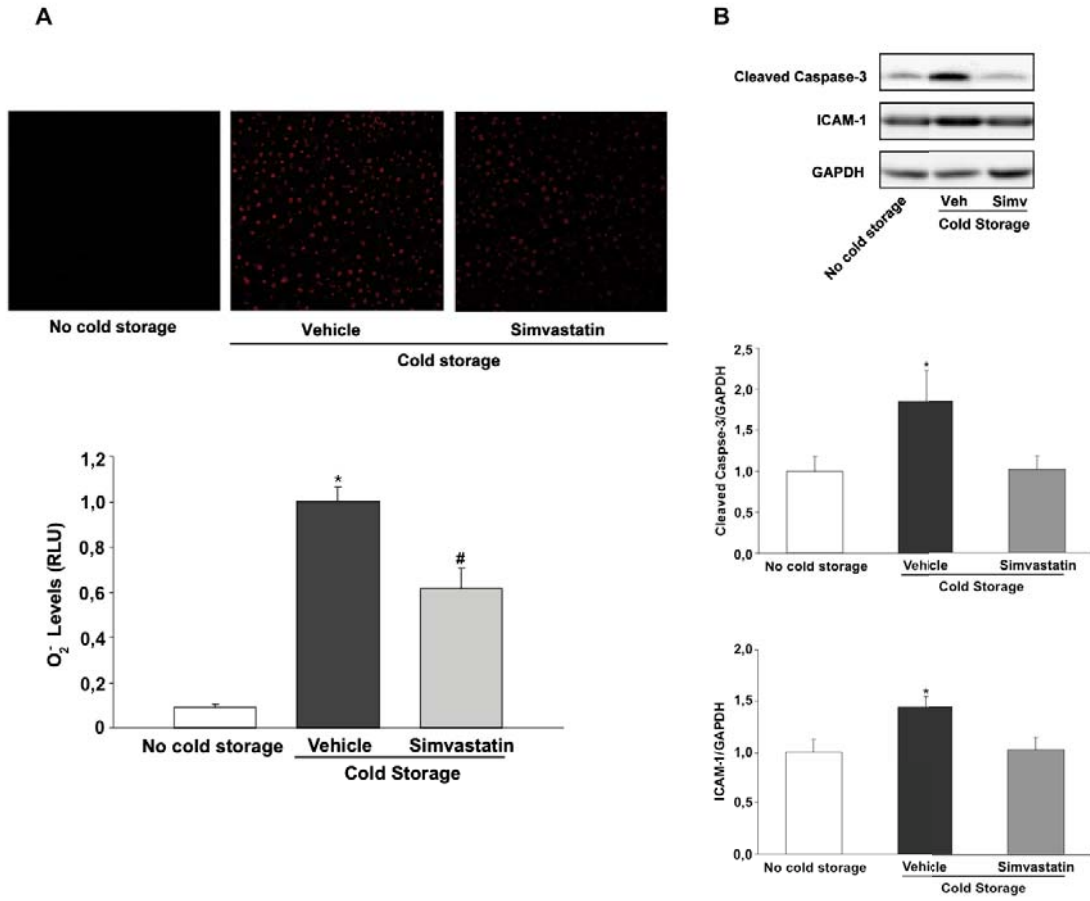


Figure 4

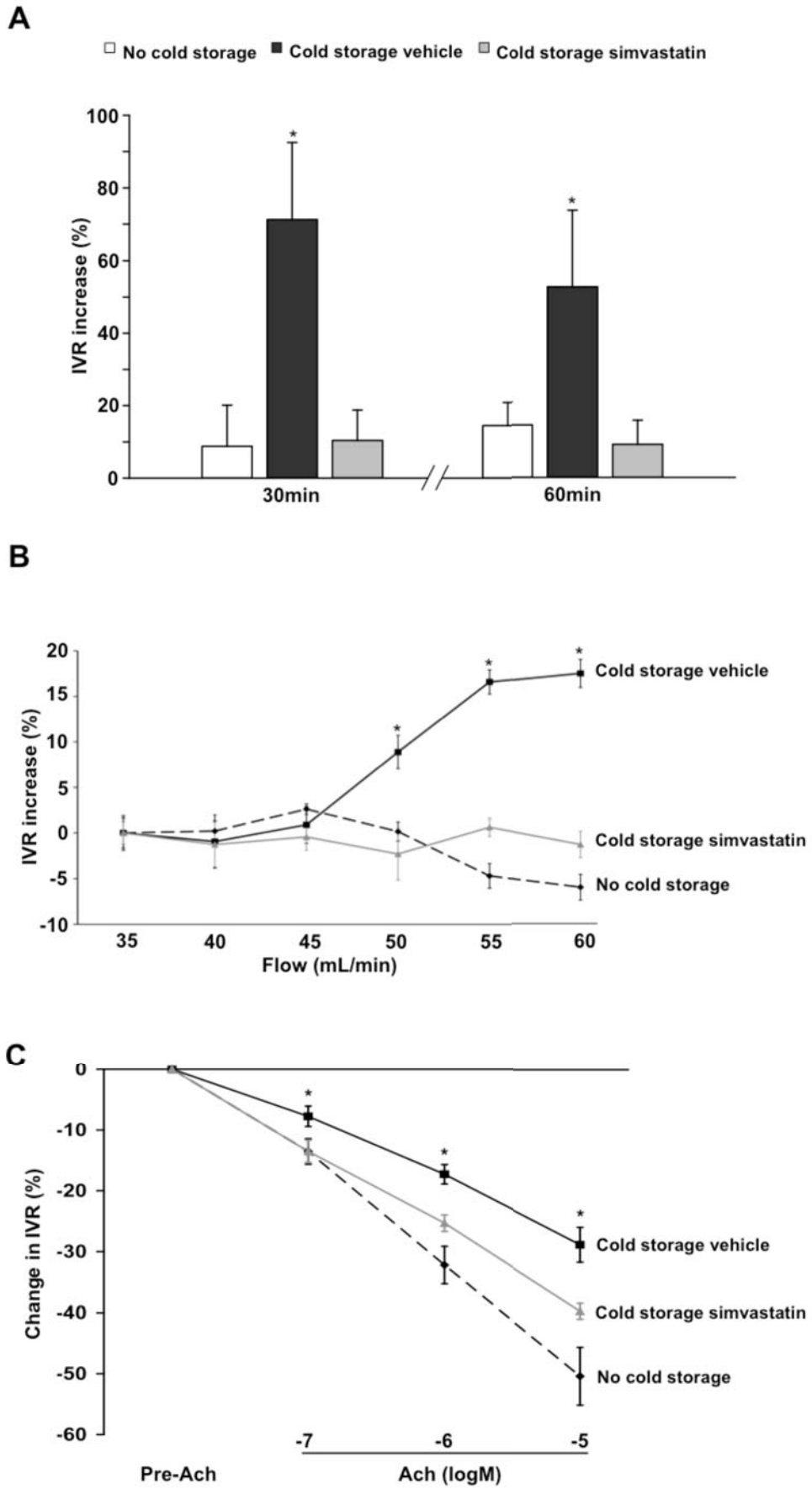
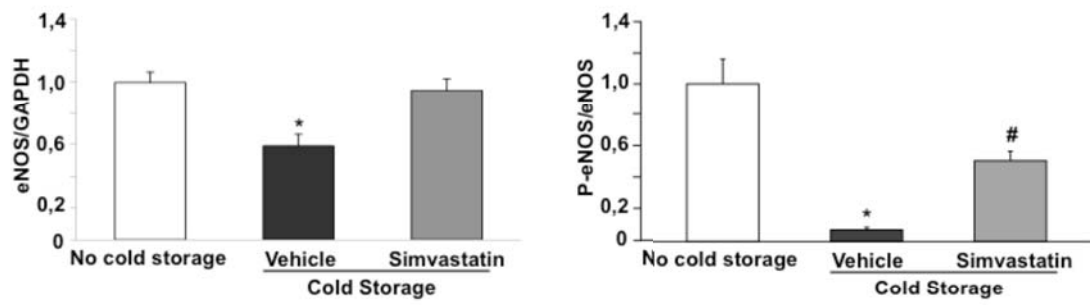
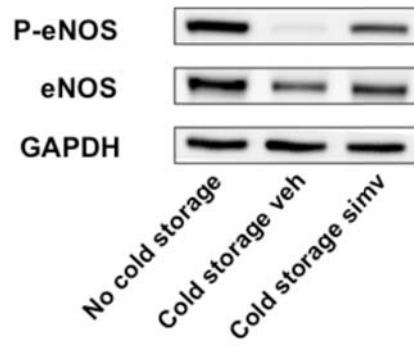


Figure 5

A



B

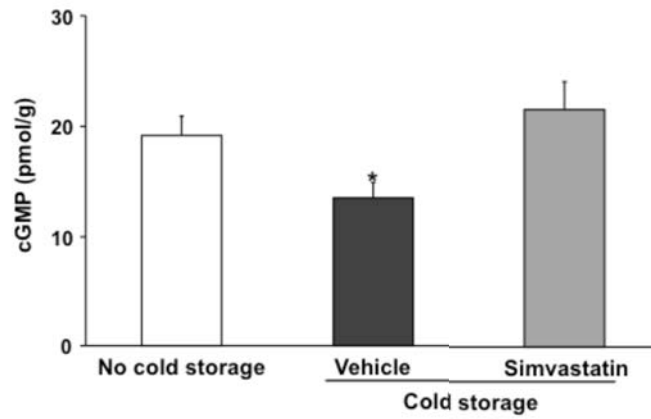


Figure 6

Discusión

El endotelio vascular es un órgano esencial implicado en la regulación del tono vasomotor, la homeostasis vascular y los procesos inflamatorios (167). En un hígado sano, el endotelio sinusoidal juega un papel importante en la regulación del tono vascular hepático liberando sustancias vasoactivas que se difunden a las CHes induciendo su contracción o relajación, modulando así el diámetro sinusoidal y el tono vascular intrahepático (55, 171).

En patologías vasculares, diferentes estímulos nocivos, como el flujo turbulento, pueden hacer que el endotelio pierda su funcionalidad. Sin embargo, el flujo laminar confiere a las CEs fuertes propiedades antitrombóticas, antiinflamatorias y vasodilatadoras (167). Hace algunos años, se demostró que este fenotipo vasoprotector depende de la expresión del factor de transcripción KLF2 (30). En la vasculatura, KLF2 se expresa específicamente en el endotelio y su expresión puede ser modulada por patrones de flujo diferentes. Se ha demostrado, por ejemplo, que las regiones vasculares expuestas a un *shear stress* laminar expresan altos niveles de KLF2 y son resistentes a la aterosclerosis, en cambio las regiones expuestas a un *shear stress* no laminar no expresan o expresan menos KLF2 y son más sensibles a las lesiones ateroscleróticas (29, 172).

En la cirrosis, el endotelio hepático pierde sus propiedades vasodilatadoras, antitrombóticas y antiinflamatorias para adquirir un fenotipo vasoconstrictor, protrombótico y proinflamatorio en el contexto de la disfunción sinusoidal hepática (64, 65, 173). De hecho, es notorio que el endotelio de un hígado cirrótico produce grandes cantidades de sustancias vasoconstrictoras (por ejemplo el TXA₂) (86) y cantidades reducidas de vasodilatadores (principalmente NO) (64, 65), contribuyendo a aumentar la resistencia intrahepática y a agravar el síndrome de hipertensión portal. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de la transformación del fenotipo endotelial durante el desarrollo de la cirrosis están poco caracterizados (44, 66).

El endotelio es también el objetivo primario de las lesiones por I/R en situaciones de trasplante de hígado. El daño endotelial se manifiesta con activación celular, apoptosis y separación de la matriz, lo que lleva a la disfunción de la microcirculación hepática (168, 174). Hasta ahora, la reducción de la función y viabilidad endotelial de los injertos hepáticos ha sido atribuida principalmente a los efectos nocivos derivados de la isquemia (175). Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la ausencia de flujo sanguíneo, que se produce durante la obtención de órganos para trasplante, afecta negativamente a la expresión de KLF2 y sus genes dianas vasoprotectores, induciendo disfunción endotelial aguda (36). Este estudio pone las bases para estudiar los mecanismos moleculares que hacen el endotelio más susceptible al daño por ausencia de flujo.

Los trabajos de investigación de la presente tesis doctoral están orientados a ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la disfunción endotelial y averiguar si la modulación de la expresión/actividad de KLF2 puede ser beneficiosa en el tratamiento de la cirrosis y en la preservación de los injertos hepáticos para trasplante. En el primer estudio hemos caracterizado la expresión del factor de transcripción KLF2 y sus principales programas vasoprotectores en tres fases diferentes de la inducción de la cirrosis experimental.

Por primera vez, hemos demostrado que KLF2 está muy expresado en los hígados cirróticos y que su expresión se induce en las fases tempranas de la progresión de la enfermedad. Tras 6 semanas de administración de CCl₄, los animales presentaron un aumento de la expresión hepática del mRNA de KLF2 y de su proteína comparados con los animales controles. Caracterizando la hemodinámica sistémica y hepática de los animales incluidos en el estudio observamos que aquellos con cirrosis avanzada, que presentaban altos niveles de KLF2, mostraban un marcado aumento en el flujo de la

sangre que entra al hígado a través de la vena porta, lo que favorece la expresión de los genes endoteliales inducidos por el *shear stress*, incluyendo KLF2. Sin embargo, los animales tratados con CCl₄ durante 6 semanas no mostraban aumento significativo en el flujo sanguíneo portal, lo que sugiere que otros mecanismos, tal vez relacionados con los cambios en la arquitectura intrahepática, los cambios metabólicos, los factores de circulación (productos bacterianos, factores de crecimiento, etc) o los procesos de hipoxia que ocurren durante la progresión de la cirrosis, pueden modificar el fenotipo endotelial e inducir la expresión de KLF2 (29, 176-178). Falta por discernir los detalles de estos mecanismos.

Como se ha descrito anteriormente, estudios previos han demostrado que a nivel vascular KLF2 se expresa específicamente en el endotelio. Sin embargo, poco se sabe sobre su expresión en un determinado órgano. El presente estudio demuestra que la expresión KLF2 en el hígado se localiza en el endotelio y que su expresión responde a la estimulación del flujo. De hecho, la inducción de KLF2 por el *shear stress* es significativamente mayor en las CEs de hígados cirróticos que de controles, lo que sugiere que el endotelio hepático en la cirrosis es capaz de responder a este estímulo vasoprotector.

Entre otras funciones, el endotelio vascular mantiene la fluidez de la sangre mediante la producción de diferentes factores que promueven la fibrinólisis o inhiben la coagulación, como la TM. La actividad de KLF2 es necesaria para la regulación de la función anticoagulante del endotelio ya que induce la expresión de TM uniéndose a su promotor (35). En el presente estudio se demuestra que el aumento de la expresión hepática de KLF2 se acompaña de elevados niveles del mensajero y de la proteína de la TM, lo que sugiere que KLF2 está activo y puede inducir el *pathway* antitrombótico en el hígado cirrótico. Esto puede retrasar o atenuar las oclusiones vasculares y las lesiones

de extinción parenquimal, que conducen a la progresión morfológica de la cirrosis (49, 179). Nuestros hallazgos sugieren que este proceso podría acelerarse si el aumento en la expresión de KLF2 no fuera presente.

Como se ha descrito anteriormente, el aumento de la resistencia intrahepática en el hígado cirrótico es en parte debido a una menor biodisponibilidad de vasodilatadores, principalmente NO. Esta insuficiencia en la biodisponibilidad de NO se ha relacionado con una reducción de la producción por parte de la eNOS (64, 65) y con el aumento de su *scavenging* por parte del anión superóxido (75). Estudios anteriores han demostrado que uno de los más potentes inductores de los genes implicados en la regulación del tono vascular es KLF2, que estimula la expresión de eNOS y de CNP (30). Nuestro grupo y otros han demostrado que en las ratas con cirrosis avanzada la actividad de la eNOS está reducida sin que haya diferencias en la expresión proteica entre ratas controles y cirróticas (64, 65, 75, 180). Sin embargo, el presente estudio añade nuevos datos sobre la regulación de la expresión de la eNOS. La aumentada expresión de KLF2 en las ratas con cirrosis se acompaña, tanto a las 6 como a las 12 semanas de tratamiento con CCl₄, de un aumento del mRNA de eNOS, lo que sugiere que en los hígados cirróticos la traducción puede hallarse desregulada. Del mismo modo, la expresión hepática del mRNA de CNP es significativamente inducida durante el desarrollo de cirrosis, pero no se observan diferencias en la expresión de su proteína. Además, hemos observado que ya en la fase temprana de la cirrosis, las ratas presentan una marcada disminución de la fosforilación de la eNOS hepática, lo que indica una reducción en su actividad enzimática. Ambos datos coinciden con las observaciones hemodinámicas: las ratas con cirrosis temprana presentan una presión portal aumentada, que podrían ser el resultado de los trastornos en la arquitectura hepática junto con una menor producción hepática de NO por parte de la eNOS.

Las estatinas (o inhibidores de la HMG-CoA reductasa), conocidos inductores de la expresión de KLF2 (141, 159), representan uno de los medicamentos más prometedores para el tratamiento de la hipertensión portal. De hecho, se ha demostrado que la administración de estatinas a animales cirróticos reduce la resistencia intrahepática y mejora la hipertensión portal, en parte mediante el aumento de la biodisponibilidad de NO (154, 181). Los efectos beneficios de las estatinas sobre la hipertensión portal también se han validado en humanos (155, 156), aunque los mecanismos moleculares implicados son desconocidos. En nuestro trabajo demostramos que los animales cirróticos tratados con simvastatina presentan elevados niveles hepáticos de KLF2 y sus genes diana vasoprotectores eNOS y TM. Estos datos sugieren que los efectos beneficiosos de las estatinas sobre la hemodinámica hepática en la cirrosis podrían ser, en parte, mediados por KLF2. Estudios adicionales serán necesarios para validar esta hipótesis.

El segundo estudio de la presente tesis se centra en la evaluación de los efectos de la preservación en frío de los injertos para trasplante sobre el fenotipo vascular hepático.

Nuestro estudio demuestra que durante la preservación de los hígados en frío la expresión hepática de KLF2 y sus genes diana vasoprotectores eNOS, TM y HO-1 se reduce significativamente ya después de 1 hora y empeora con el tiempo. Además, aunque sea conocido que en el hígado la expresión de KLF2 es principalmente endotelial (182), hemos caracterizado los efectos del cese de flujo y de las condiciones de preservación en frío en cultivos primarios de CEs hepáticas. Estos experimentos *in vitro* confirmaron que el *pathway* vasoprotector dependiente de KLF2 se halla significativamente reducido en aquellas células preservadas en frío.

Para entender las consecuencias fisiopatológicas de los cambios observados durante la preservación en frío, hemos caracterizado el estado de la microcirculación y de la

función endotelial hepática tras reperfusión en caliente. Los hígados preservados en frío presentaron mayor resistencia vascular intrahepática en comparación con hígados no preservados en frío. Además, estos injertos mostraban disfunción endotelial aguda. Estas anomalías en la microcirculación se acompañaban de una lesión hepática significativa, como demuestran los incrementos marcados en: niveles de transaminasas, inflamación, apoptosis, estrés oxidativo, daño histológico, y una reducción significativa en la producción de bilis. Estos resultados corroboran estudios anteriores que describen, parcialmente, aumento del tono vascular, apoptosis e inflamación tras preservación en frío y reperfusión caliente (139, 169, 183).

Como se ha descrito en la introducción, el éxito de un trasplante depende del grado de protección del órgano que se consigue durante la preservación en frío, siendo la composición de la solución de preservación un elemento crucial para alcanzar la máxima protección (184, 185). Diferentes estudios han evaluado los posibles efectos beneficiosos de soluciones de preservación nuevas o modificadas sobre la función hepática y la viabilidad del injerto (139, 186), sin embargo ninguno de ellos se ha centrado en mejorar la protección endotelial durante la preservación en frío. En nuestro estudio, hemos abordado esta cuestión analizando los posibles efectos de la adición de simvastatina a la University of Wisconsin Solution (UWS), la solución más comúnmente usada para la preservación de los injertos hepáticos.

En un estudio reciente publicado en *Transplantation* (36) ya sugerimos que la simvastatina se podría utilizar como suplemento de las soluciones de preservación de órganos debido a su capacidad de mantener la expresión de KLF2 y sus dianas vasoprotectoras en CEs humanas preservadas en frío. En el segundo trabajo de esta tesis doctoral demostramos que la adición de simvastatina a la UWS mantiene los programas vasoprotectores de KLF2, tanto en breves como en largos periodos de isquemia fría.

Además, la adición de la simvastatina a la UWS mejora considerablemente la capacidad de esta solución de proteger la viabilidad hepática durante la preservación en frío e inhibir el desarrollo de la disfunción de la microcirculación hepática tras la reperfusión en caliente. Específicamente, los injertos hepáticos preservados en frío en presencia de simvastatina y luego reperfundidos presentaron menor daño hepático, valores normales de resistencia intrahepática y mejor función endotelial en comparación con los injertos preservados en frío sin simvastatina. Sorprendentemente, los efectos protectores de la simvastatina se observaron en los hígados preservados durante 16 horas, un período de tiempo en el que la UWS ya no proporciona protección (187, 188), abriendo así la posibilidad de ampliar los períodos de preservación para trasplante hepático.

La protección de la función y de la viabilidad hepática conferida por la simvastatina, que se define con la normalización de los niveles de las transaminasas y la producción de bilis, puede explicarse en parte por la prevención de la inflamación, la apoptosis y el estrés oxidativo, demostrado por sus marcadores ICAM-1, cleaved caspasa-3 y anión superóxido. Estos resultados, de acuerdo con estudios anteriores que describen los efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y antioxidantes derivados de KLF2 (30, 189), sugieren que los efectos beneficiosos de la simvastatina sobre la función hepática dependen de su capacidad de mantener los programas vasoprotectores de KLF2 durante la preservación en frío.

Para comprender los mecanismos moleculares responsables de la protección de la microcirculación hepática debida a la simvastatina, y teniendo en cuenta que las estatinas mejoran la producción endotelial de NO induciendo la expresión y la actividad de la eNOS (190), y que los donadores de NO protegen el hígado contra la lesión por I/R (138), hemos caracterizado la vía del NO en los injertos hepáticos incluidos en el presente estudio. Estos experimentos demostraron que la adición de simvastatina a la

solución de preservación da lugar a un aumento de la biodisponibilidad del NO (medido por producción de su segundo mensajero cGMP). El aumento de los niveles de NO podría derivar de una mayor expresión y actividad de eNOS, sugerido por el aumento de expresión de la eNOS fosforilada, junto con la reducción de los niveles de su *scavenger*, el radical O_2^- . En conjunto, estas observaciones sugieren que el mantenimiento de adecuados niveles de NO puede ser responsable, al menos en parte, de los efectos beneficiosos sobre la función endotelial y la resistencia intrahepática observados en los injertos hepáticos preservados con simvastatina.

Un aspecto importante que conviene destacar de este estudio es el gran potencial terapéutico de la simvastatina como protector de endotelio durante la isquemia fría. La adición de este fármaco en las soluciones de preservación de órgano representaría una alternativa sencilla y económica a la preservación con perfusión continua (*machine perfusion*) y hasta podría mejorar la viabilidad de los hígados marginales, aliviando así la problemática de la escasez de órganos disponibles para trasplante.

Conclusiones

Los resultados presentados en esta tesis doctoral indican que:

- La expresión de KLF2 en las CEs hepáticas depende del *shear stress*.
- Los hígados cirróticos presentan una aumentada expresión génica y proteica de KLF2, de los mRNA de sus genes diana vasoprotectores eNOS, TM, CNP y de la proteína TM.
- El aumento de la expresión de KLF2 podría representar un mecanismo compensador para mejorar los desórdenes vasculares característicos de los hígados cirróticos.
- La simvastatina aumenta la expresión hepática de KLF2 y de sus programas vasoprotectores en ratas cirróticas con hipertensión portal.
- Las CEs hepáticas incubadas en condiciones de preservación en frío para trasplante presentan una reducción de la expresión de KLF2 y de sus programas vasoprotectores.
- Los hígados preservados en frío muestran un descenso tiempo-dependiente de KLF2 y sus genes diana vasoprotectores eNOS, TM y HO-1. Tras la reperfusión, estos hígados preservados en condiciones de trasplante presentan daño hepático, resistencia vascular aumentada y disfunción endotelial.
- La adición de simvastatina a la solución de preservación mantiene los programas vasoprotectores dependientes de KLF2, previene el daño hepático, la inflamación y el estrés oxidativo y mejora la disfunción endotelial tras la reperfusión.

- El mantenimiento de adecuados niveles de NO puede ser responsable, al menos en parte, de los efectos beneficiosos sobre la función endotelial y la resistencia intrahepática observados en los injertos hepáticos preservados con simvastatina.

Globalmente, se puede concluir que el factor de transcripción KLF2 contribuye de forma significativa al mantenimiento de la función endotelial hepática. La modulación farmacológica de su expresión puede ser beneficiosa tanto en el tratamiento de la hipertensión portal como en la preservación de injertos hepáticos para trasplante.

Bibliografía

- (1) Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998 May 15;91(10):3527-3561.
- (2) Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003 Apr;31(4 Suppl):S221-S230.
- (3) Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007 Feb 2;100(2):158-173.
- (4) Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med* 1999 May;20;340(20):1555-1564.
- (5) Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987 Mar 13;235(4794):1348-1352.
- (6) Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996 Jul 12;271(28):16603-16608.
- (7) Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005 May;115(5):1267-1274.
- (8) Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest* 1985 Dec;76(6):2178-2181.
- (9) Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003 Sep;196(3):430-443.
- (10) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):109-142.
- (11) Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999 Aug 15;43(3):509-520.
- (12) Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006 Nov 9;355(19):2003-2011.
- (13) Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 Jan;284(1):R1-12.
- (14) 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):30249-30254.
- (15) Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990 Oct;50(4):537-544.
- (16) Ala A, Dhillon AP, Hodgson HJ. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *Int J Exp Pathol* 2003 Feb;84(1):1-16.
- (17) Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995 Jul;9(10):899-909.
- (18) Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000 Jan 3;191(1):189-194.
- (19) Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 2005 Mar;26(3):157-165.

-
- (20) Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004;22:683-709:683-709.
- (21) Davies PF, Barbee KA, Lal R, Robotewskyj A, Griem ML. Hemodynamics and atherogenesis. Endothelial surface dynamics in flow signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 1995 Jan 17;748:86-102; discussion 102-3.:86-102.
- (22) Topper JN, Gimbrone MA, Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999 Jan;5(1):40-46.
- (23) Sampath R, Kukielka GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng* 1995 May;23(3):247-256.
- (24) Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Sep 17;93(19):10417-10422.
- (25) Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* 1996 Jul;79(1):32-37.
- (26) Khachigian LM, Anderson KR, Halnon NJ, Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Collins T. Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Oct;17(10):2280-2286.
- (27) Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Jr., Collins T. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* 1995 Aug;96(2):1169-1175.
- (28) Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA. Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1993 Jan;154(1):143-151.
- (29) Dekker RJ, van Thienen JV, 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):609-618.
- (30) 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;116(1):49-58.
- (31) Bieker JJ. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001 Sep 14;276(37):34355-34358.
- (32) Anderson KP, Kern CB, Crable SC, Lingrel JB. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol* 1995 Nov;15(11):5957-5965.
- (33) Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev* 1997 Nov 15;11(22):2996-3006.
- (34) 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):1305-1315.
- (35) 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-e57.

- (36) Gracia-Sancho J, Villarreal G, Jr., 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):142-149.
- (37) 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 Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002 Sep 1;100(5):1689-1698.
- (38) Huddleson JP, Ahmad N, Srinivasan S, Lingrel JB. Induction of KLF2 by fluid shear stress requires a novel promoter element activated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent chromatin-remodeling pathway. *J Biol Chem* 2005 Jun 17;280(24):23371-23379.
- (39) Huddleson JP, Ahmad N, Lingrel JB. Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires nucleolin. *J Biol Chem* 2006 Jun 2;281(22):15121-15128.
- (40) van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RJ, Rohlena J, van Ijzendoorn GA, Kootstra NA, et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res* 2006 Nov 1;72(2):231-240.
- (41) Kumar A, Lin Z, SenBanerjee S, Jain MK. Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 2005 Jul;25(14):5893-5903.
- (42) Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007 Feb 2;100(2):174-190.
- (43) Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1999 Aug;82(2):722-726.
- (44) Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997 Nov 1;100(9):2153-2157.
- (45) Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):141-156.
- (46) Sikuler E, Groszmann RJ. Interaction of flow and resistance in maintenance of portal hypertension in a rat model. *Am J Physiol* 1986 Feb;250(2 Pt 1):G205-G212.
- (47) Bosch J, Abraldes JG, Groszmann RJ. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003;38(suppl 1):S54-S68.
- (48) Shibayama Y, Nakata K. Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* 1985 Jul;5(4):643-648.
- (49) Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995 May;21(5):1238-1247.
- (50) Bathal PS, Grossmann HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;1:325-329.
- (51) Benoit JN, Barrowman JA, Harper SL, Kvietys PR, Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984 Nov;247(5 Pt 1):G486-G493.
- (52) Martell M, Coll M, Ezkurdia N, Raurell I, Genesca J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol* 2010 Jun 27;2(6):208-220.
- (53) Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010 Nov;53(5):976-980.

-
- (54) Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Bosch J, Fernandez M. The somatostatin analogue octreotide inhibits angiogenesis in the earliest, but not in advanced, stages of portal hypertension in rats. *J Cell Mol Med* 2008 Sep;12(5A):1690-1699.
- (55) Zhang JX, Pegoli W, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994 Apr;266(4 Pt 1):G624-G632.
- (56) Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19(4):397-410.
- (57) Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, et al. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992 Aug;90(2):642-646.
- (58) Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000 Jun;118(6):1149-1156.
- (59) 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):233-240.
- (60) Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993 Apr 15;213(2):815-823.
- (61) Gorbis MN, Gines P, Bataller R, Nicolas JM, Garcia-Ramallo E, Tobias E, et al. Atrial natriuretic peptide antagonizes endothelin-induced calcium increase and cell contraction in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999 Aug;30(2):501-509.
- (62) Kaneda K, Ekataksin W, Sogawa M, Matsumura A, Cho A, Kawada N. Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction. *Hepatology* 1998 Mar;27(3):735-747.
- (63) 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):2923-2930.
- (64) 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 Oct;28(4):926-931.
- (65) 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):344-351.
- (66) Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001 Aug;5(3):629-644.
- (67) Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* 2002 Feb;35(2):478-491.
- (68) Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Apr;284(4):G567-G574.
- (69) 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):1222-1228.

- (70) Van de CM, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, et al. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002 Sep;51(3):440-445.
- (71) Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Jun;280(6):G1209-G1216.
- (72) Yokomori H, Oda M, Ogi M, Sakai K, Ishii H. Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver* 2002 Apr;22(2):150-158.
- (73) Morales-Ruiz M, Cejudo-Martín P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2003 Aug;125(2):522-531.
- (74) Dudenhofer AA, Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Gupta T, Groszmann RJ. Bioactivation of nitroglycerin and vasomotor response to nitric oxide are impaired in cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2002 Aug;36(2):381-385.
- (75) Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, Garcia-Caldero H, Fernandez M, Bosch J, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008 Apr;47(4):1248-1256.
- (76) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003 Jan;37(1):172-181.
- (77) Titos E, Claria J, Bataller R, Bosch-Marce M, Gines P, Jimenez W, et al. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* 2000 Sep;119(3):794-805.
- (78) Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996 Feb;110(2):534-548.
- (79) Bosch J, Arroyo V, Betriu A, Mas A, Carrilho F, Rivera F, et al. Hepatic hemodynamics and the renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis. *Gastroenterology* 1980 Jan;78(1):92-99.
- (80) Ballet F, Chretien Y, Rey C, Poupon R. Differential response of normal and cirrhotic liver to vasoactive agents. A study in the isolated perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Jan;244(1):283-289.
- (81) Grossman HJ, Grossman VL, Bhathal PS. Enhanced vasoconstrictor response of the isolated perfused cirrhotic rat liver to humoral vasoconstrictor substances found in portal venous blood. *J Gastroenterol Hepatol* 1992 May;7(3):283-287.
- (82) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al. 5-Lipoxygenase Inhibition Reduces Intrahepatic Vascular Resistance of Cirrhotic Rat Livers: A Possible Role of Cysteinyl-Leukotrienes. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):387-393.
- (83) Asbert M, Gines A, Gines P, Jimenez W, Claria J, Salo J, et al. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993 May;104(5):1485-1491.
- (84) Elliot AJ, Vo LT, Grossman VL, Bhathal PS, Grossman HJ. Endothelin-induced vasoconstriction in isolated perfused liver preparations from normal and cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 Apr;12(4):314-318.
- (85) Titos E, Claria J, Planaguma A, Lopez-Parra M, Villamor N, Parrizas M, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J* 2003 Sep;17(12):1745-1747.

-
- (86) 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 Aug;47(2):220-227.
- (87) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Pares M, Abraldes JG, Rosello J, Bosch J, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2003;39(4):515-521.
- (88) Ohkohchi N, Sakurada M, Endoh T, Koyamada M, Katoh H, Koizumi M, et al. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991 Oct;23(5):2416-2419.
- (89) Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995 Mar;1(2):124-138.
- (90) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Jan;284(1):G15-G26.
- (91) Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003 Apr;74(2):86-93.
- (92) Otto G, Wolff H, David H. Preservation damage in liver transplantation: electron-microscopic findings. *Transplant Proc* 1984 Oct;16(5):1247-1248.
- (93) McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988 Aug;46(2):178-191.
- (94) Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation* 1993 Sep;56(3):495-500.
- (95) Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:327-38:327-338.
- (96) Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5(4):402-408.
- (97) Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer 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) Pesonen EJ, Linder N, Raivio KO, Sarnesto A, Lapatto R, Hockerstedt K, et al. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology* 1998 May;114(5):1009-1015.
- (99) Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002 Nov;34(7):2659-2661.
- (100) Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992 Nov;16(5):1236-1240.
- (101) Guyton KZ, Xu Q, Holbrook NJ. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* 1996 Mar 1;314(Pt 2):547-554.
- (102) Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996 Jun;23(6):1546-1555.

- (103) Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 1996 Apr 15;156(8):2956-2963.
- (104) Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell CJ, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002 Nov 1;33(9):1200-1208.
- (105) Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995 Oct;4(4):282-288.
- (106) Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E, et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001 Feb 27;71(4):529-536.
- (107) Ruetten H, Thiemermann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997 Dec;48(4):675-688.
- (108) Urakami A, Todo S, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, et al. Attenuation of ischemic liver injury by monoclonal anti-endothelin antibody, AwETN40. *J Am Coll Surg* 1997 Oct;185(4):358-364.
- (109) Peralta C, Bulbena O, Bargallo R, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2000 Dec 27;70(12):1761-1770.
- (110) Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999 Jul;117(1):200-210.
- (111) Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Protein kinase C (PKC) and prostaglandin mediate vasoconstriction during oxidative liver injury: a novel pathomechanism of portal hypertension. *Hepatology* 1998;28:1142A.
- (112) Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993 Apr;264(4 Pt 1):G801-G809.
- (113) Scoazec JY, Borghi-Scoazec G, Durand F, Bernuau J, Pham BN, Belghiti J, et al. Complement activation after ischemia-reperfusion in human liver allografts: incidence and pathophysiological relevance. *Gastroenterology* 1997 Mar;112(3):908-918.
- (114) Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998 Aug;28(2):281-285.
- (115) Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000 Jan;118(1):183-191.
- (116) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995 Feb;117(2):195-200.
- (117) Otsuka M, Takada Y, Fukunaga K, Taniguchi H, Todoroki T. Activation of intracellular neutrophil elastase in the transplantation of ischemic liver. *Eur Surg Res* 2001 Sep;33(5-6):355-360.
- (118) Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997 Jun;61(6):647-653.

- (119) 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):169-173.
- (120) Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001 Feb;181(2):160-166.
- (121) Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998 Jun;27(6):1652-1660.
- (122) Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999 Apr 27;67(8):1099-1105.
- (123) 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* 2003 Jun;26(6):355-375.
- (124) Southern PB, Davies MH. Indication and assessment for liver transplantation. *Clin Med* 2002 Jul;2(4):313-316.
- (125) Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996 Nov;25(5):774-780.
- (126) Bzeizi KI, Jalan R, Plevris JN, Hayes PC. Primary graft dysfunction after liver transplantation: from pathogenesis to prevention. *Liver Transpl Surg* 1997 Mar;3(2):137-148.
- (127) Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21(1):105-113.
- (128) Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003 Jul;9(7):651-663.
- (129) Merion RM, Pelletier SJ, Goodrich N, Englesbe MJ, Delmonico FL. Donation after cardiac death as a strategy to increase deceased donor liver availability. *Ann Surg* 2006 Oct;244(4):555-562.
- (130) Tullius SG, Volk HD, Neuhaus P. Transplantation of organs from marginal donors. *Transplantation* 2001 Oct 27;72(8):1341-1349.
- (131) Schiano TD, Kim-Schluger L, Gondolesi G, Miller CM. Adult living donor liver transplantation: the hepatologist's perspective. *Hepatology* 2001 Jan;33(1):3-9.
- (132) Evenson A.R., Fryer J.P. Transplantation for the general surgeon. 2009.
- (133) Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci* 2008 Jan 1;13:221-35.:221-235.
- (134) Southard JH, Belzer FO. New concepts in organ preservation. *Clin Transplant* 1993 Feb;7(1 part 2):134-137.
- (135) Upadhyya AG, Harvey RP, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Strasberg SM. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* 1997 Oct;26(4):922-928.
- (136) Lutterova M, Kukan M, Vajdova K, Kuba D, Mislanova C, Kebis A, et al. Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbecks Arch Surg* 2001 Feb;386(1):31-37.

- (137) Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol. *Ann Transplant* 2004;9(2):35-37.
- (138) Ben M, I, Massip-Salcedo M, Fernandez-Monteiro I, Xaus C, Bartrons R, Boillot O, et al. Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat steatotic livers. *Liver Transpl* 2007 Mar;13(3):410-425.
- (139) Ben M, I, Rosello-Catafau J, fany-Fernandez I, Rimola A, Parellada PP, Mitjavila MT, et al. Addition of carvedilol to University Wisconsin solution improves rat steatotic and nonsteatotic liver preservation. *Liver Transpl* 2010 Feb;16(2):163-171.
- (140) Zaouali MA, Padriisa-Altes S, Ben M, I, fany-Fernandez I, Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, et al. Improved rat steatotic and nonsteatotic liver preservation by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I to University of Wisconsin solution. *Liver Transpl* 2010 Sep;16(9):1098-1111.
- (141) Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem* 2005 Jul 22;280(29):26714-26719.
- (142) Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med* 1968 Mar 14;278(11):608-610.
- (143) Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, Garcia-Cardena G, et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl Int* 2010 Jun;23(6):561-570.
- (144) Monbaliu D, Brassil J. Machine perfusion of the liver: past, present and future. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 Apr;15(2):160-166.
- (145) Brockmann J, Reddy S, Coussios C, Pigott D, Guirriero D, Hughes D, et al. Normothermic perfusion: a new paradigm for organ preservation. *Ann Surg* 2009 Jul;250(1):1-6.
- (146) Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Munoz J, Taura P, Calatayud D, et al. Superior Preservation of DCD Livers With Continuous Normothermic Perfusion. *Ann Surg* 2011 Aug;20.
- (147) Almog Y, Shefer A, Novack V, Maimon N, Barski L, Eizinger M, et al. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation* 2004 Aug 17;110(7):880-885.
- (148) Cheung BM, Cheung GT, Lauder IJ, Lau CP, Kumana CR. Meta-analysis of large outcome trials of angiotensin receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens* 2006 Jan;20(1):37-43.
- (149) Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, et al. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005 Feb 1;45(3):461-464.
- (150) Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005 May 26;352(21):2184-2192.
- (151) Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990 Feb 1;343(6257):425-430.
- (152) Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 1995 Apr 14;268(5208):221-225.
- (153) Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest* 2002 Aug;110(3):285-288.

- (154) Abraldes JG, Rodriguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl(4) cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007 Feb 15;46:1040-1046.
- (155) Abraldes JG, Albillos A, Banares R, Turnes J, Gonzalez R, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2009 May;136(5):1651-1658.
- (156) Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A, Fernandez M, Garcia-Pagan JC, et al. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004 Mar;126(3):749-755.
- (157) Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Martin-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, et al. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res* 2003 Jan;57(1):168-177.
- (158) Lazzerini PE, Lorenzini S, Selvi E, Capecchi PL, Chindamo D, Bisogno S, et al. Simvastatin inhibits cytokine production and nuclear factor-kB activation in interleukin 1beta-stimulated synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2007 Sep;25(5):696-700.
- (159) 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):720-726.
- (160) Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997 Apr;25(4):934-937.
- (161) Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999 Jan;29(1):126-132.
- (162) Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J* 2005 Jul;19(9):1155-1157.
- (163) Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Dec 4;229(1):264-270.
- (164) Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez 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):562-572.
- (165) Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000 Jan 27;69(2):300-303.
- (166) Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Jul;279(1):G163-G171.
- (167) Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2000 May;902:230-9; discussion 239-40:230-239.
- (168) Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004 Apr;39(4):1110-1119.

- (169) Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc* 2006 Dec;38(10):3351-3357.
- (170) Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de GH. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 1999 Jan;13(1):155-168.
- (171) Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993 Oct;92(4):1795-1804.
- (172) Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Oct 12;101(41):14871-14876.
- (173) Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007 May;46(5):927-934.
- (174) Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997 Mar;25(3):664-671.
- (175) Rauen U, de GH. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 2004 Jul;52(5):299-309.
- (176) Kawanami D, Mahabeleshwar GH, Lin Z, Atkins GB, Hamik A, Haldar SM, et al. Kruppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function in the endothelium. *J Biol Chem* 2009 Jul 31;284(31):20522-20530.
- (177) Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, et al. Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem* 2009 Feb 27;284(9):5592-5601.
- (178) Dach K, Zovko J, Hogardt M, Koch I, van EK, Heesemann J, et al. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor klf2 via inactivation of RhoA and RhoGTPase 1. *Infect Immun* 2009 Dec;77(12):5583-5592.
- (179) Tanaka M, Wanless IR. Pathology of the liver in Budd-Chiari syndrome: portal vein thrombosis and the histogenesis of veno-centric cirrhosis, veno-portal cirrhosis, and large regenerative nodules. *Hepatology* 1998 Feb;27(2):488-496.
- (180) Shah V, Garcia-Cardena G, Sessa WC, Groszmann RJ. The hepatic circulation in health and disease: report of a single-topic symposium. *Hepatology* 1998 Jan;27(1):279-288.
- (181) 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 Jul;46(1):242-253.
- (182) Gracia-Sancho J, Russo L, Garcia-Caldero H, Garcia-Pagan JC, Garcia-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;60(4):517-524.
- (183) Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, et al. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1997 Jul;3(4):407-415.
- (184) Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007 May 27;83(10):1289-1298.
- (185) Vos IH, Briscoe DM. Endothelial injury: cause and effect of alloimmune inflammation. *Transpl Infect Dis* 2002 Sep;4(3):152-159.

- (186) Bachmann S, Peng XX, Currin RT, Thurman RG, Lemasters JJ. Glycine in Carolina rinse solution reduces reperfusion injury, improves graft function, and increases graft survival after rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1995 Feb;27(1):741-742.
- (187) Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989 Feb 3;261(5):711-714.
- (188) Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Duckworth RM, Markin RS, Marujo W, et al. The impact of extended preservation on clinical liver transplantation. *Transplantation* 1990 Sep;50(3):438-443.
- (189) Dai G, Vaughn S, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. 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):723-733.
- (190) Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998 Mar 31;97(12):1129-1135.

Agradecimientos

Parece que haya llegado la parte más complicada de la tesis: encontrar las palabras para dar las gracias a todos los que en estos cuatro años se han cruzado en mi camino y han hecho que mi “proyecto” de trabajo y de vida aquí en Barcelona se concretara.

Primero de todo a Jaime, por guiarme en este tiempo y, sobretodo, por creer en mi y haberme dado la posibilidad de entrar en la gran familia de la Hemodinámica Hepática. Gracias Jaime por todas las veces que me has ayudado a solucionar problemas de cualquier tipo.

A Jordi, mi mentor y amigo, por su constante presencia desde el primer día que llegué al laboratorio, incluso desde la distancia. Gracias Jordi por tus enseñanzas, por tu inmensa paciencia, por tu apoyo, tu capacidad de escuchar y dar siempre buenos consejos. No olvidaré nunca todos los momentos que hemos pasado juntos, desde el día que viniste a mi casa con un taladro, hasta los que me has abierto las puertas de la tuya.

A Aina, por acogerme como a una hija y compartir conmigo mucho más que ciencia: todas nuestras charlas sobre los “valores de la vida” se quedaran grabadas en mi corazón.

A Juan, Juan Carlos y Mercedes por sus consejos y los conocimientos que siempre han estado dispuestos a compartir.

Gracias a todos los compañeros de la Hemodinámica Hepática, muchos de los cuales se han convertido en grandes amigos con los que he compartido muchas horas de poyata y muchos cafés/comidas en el comedor del Clínico y del CEK, en la Facultad, en el office... pero también tardes de cervezas o de compras, sesiones de cine, cenas, conciertos, obras de teatro, fiestas locas y escapadas de fin de semana.

Gracias a Giusi, excelente compañera de trabajo, de piso y amiga especial, por estar a mi lado durante estos años, compartiendo alegrías y felicidad pero también

frustraciones. Non cambiare mai, ti voglio un casino di bene! A Eugenio, por su optimismo contagioso y su fuerza interior que han sido indispensables en los días más duros. Espero que te acompañen siempre! A Marcos, por todo lo que hemos compartido durante estos años, su ayuda inestimable y su gran corazón. Grazie per esserci sempre e comunque! A Maeva por su entusiasmo y energía positiva y por haber roto el estereotipo francés integrándose en el grupo en tan poco tiempo. Merci beaucoup! A Héctor y Montse, porque sin ellos no habría existido este trabajo. A Diana, por su risa contagiosa y por los momentos en los que me ha hecho volver jovencita. A Vincenzo, por las “charlas filosóficas” y por ser mi “médico personal”. Grazie per aver sopportato tutte le mie lagne e malattie immaginarie, per tutti i consigli e per la passione incondizionata e contagiosa che hai nei confronti del tuo lavoro. Spero che tu riesca ad arrivare dove voglia e che la tua carriera sia una maratona senza fine! A Marco, por ser como es (e ho detto tutto!). A Federica, porque detrás de su aspecto de chica dura siempre se esconde una palabra bonita y una buena amiga.

Gracias a todos los compañeros de planta, de escalera o de pasillo, por la ayuda prestada y por compartir conmigo vuestros conocimientos. Gracias a Silvia y Oriol, por los ratos agradables que hemos pasado juntos, y a Milica, por su comprensión y sus mimos (y por ser la mejor compañera para salir de fiesta jejeje!).

Mil gracias a todas mis ex-compañeras de piso, Sabine, Lucia, Lily, Ranka, Paola, Giusi y Silvia, por ser mi familia en estos años. Llevaré siempre en mi corazón todos los momentos que hemos compartido entre las paredes de nuestro piso, desayunos, cenas, cumpleaños, sesiones de cine, risas y llantos. Gracias a Juan Manuel, mi actual compañero de piso, por toda la ayuda en estos últimos meses.

Un grazie speciale alla mia famiglia, la famiglia migliore che si possa desiderare, mio punto di riferimento anche a 1.545 Km di distanza. Grazie mamma, grazie papà, per aver sempre capito e accettato le mie scelte, anche se a malincuore, e per avermi fatto arrivare sin qui il vostro calore e il vostro sostegno ogni singolo giorno. Grazie per le ore passate a telefono e per tutte le volte che vi siete messi in viaggio, anche solo per un abbraccio. Vi amo a dismisura! Grazie Francesco per essere il fratello che sei, non ti cambierei con nessun altro! Grazie alle mie nonne, a tutti i miei zii e cugini, ai cugini acquisiti e ai piccoli “nuovi arrivi”, che sono sempre capaci di strapparmi un sorriso. Un ringraziamento speciale a Pina, cugina e amica, per il supporto e l’affetto dimostratomi durante questi 4 anni.

Grazie alle amiche di sempre, che mi hanno dimostrato che l’amicizia, quella vera, supera ogni confine. A Celeste (in ordine di apparizione), perché sin da bambine ha saputo cogliere e apprezzare la parte più vera di me e per la sua capacità di farmi sempre sbellicare dalle risate. A Chiara, per la sua dolcezza e per le parole di conforto che sono arrivate sempre al momento giusto. Col pancione sei ancora più bella! A Valeria, per avermi capita e appoggiata sempre, ma soprattutto per avermi aperto il suo cuore. Sei una persona speciale, so che ci sei stata anche nei giorni di silenzio! A Viviana, per essere in grado di capire il mio stato d’animo anche in chat e per essere così diversa da me, tanto da rappresentare la mia perfetta metà. Peccato che non mi piacciono le donne!

Grazie al fantastico corso di catalano, per avermi fatto conoscere Maria, Elisa, Federico e Guglielmo proprio nella fase più critica di questa esperienza. Non vi ringrazierò mai abbastanza per tutti i momenti indimenticabili passati insieme, per il tempo e la

dedizione investiti nel nostro rapporto, per aver fatto venir fuori la parte migliore di me anche qui. Vi voglio bene!

Grazie a tutti gli altri “italiani a Barcellona”, che anche solo con un sorriso hanno reso questa esperienza meno dura riducendo le distanze con il nostro Paese.

Grazie a tutti quelli che hanno condiviso con me questo percorso e che per motivi di spazio non posso menzionare, per le vostre scappatine qui a Barcellona, le rimpatriate, l'affetto e il supporto in questi anni.

Per ultimo due ringraziamenti un tantino speciali: el primero a la salsa cubana y a todos los compañeros de baile porque han hecho posible que escribiera la tesis sin estrés; il secondo alla musica dei Coldplay che mi ha accompagnata e ispirata durante tutta la stesura.