

Antecedentes y objetivos

El endotelio hepático es altamente susceptible al daño por isquemia / reperfusión, siendo su correcta preservación un factor decisivo para el éxito del trasplante.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Caracterizar la autofagia – mecanismo de reciclaje intracelular y supervivencia – en el endotelio hepático durante la isquemia fría y la reperfusión en caliente (I/R) y su posible relación con el factor de transcripción vasoprotector KLF2.
- Modular la autofagia endotelial *in vitro* y *ex vivo* y evaluar sus efectos sobre el daño endotelial y la disfunción microvascular asociados a I/R.

Métodos *in vitro*

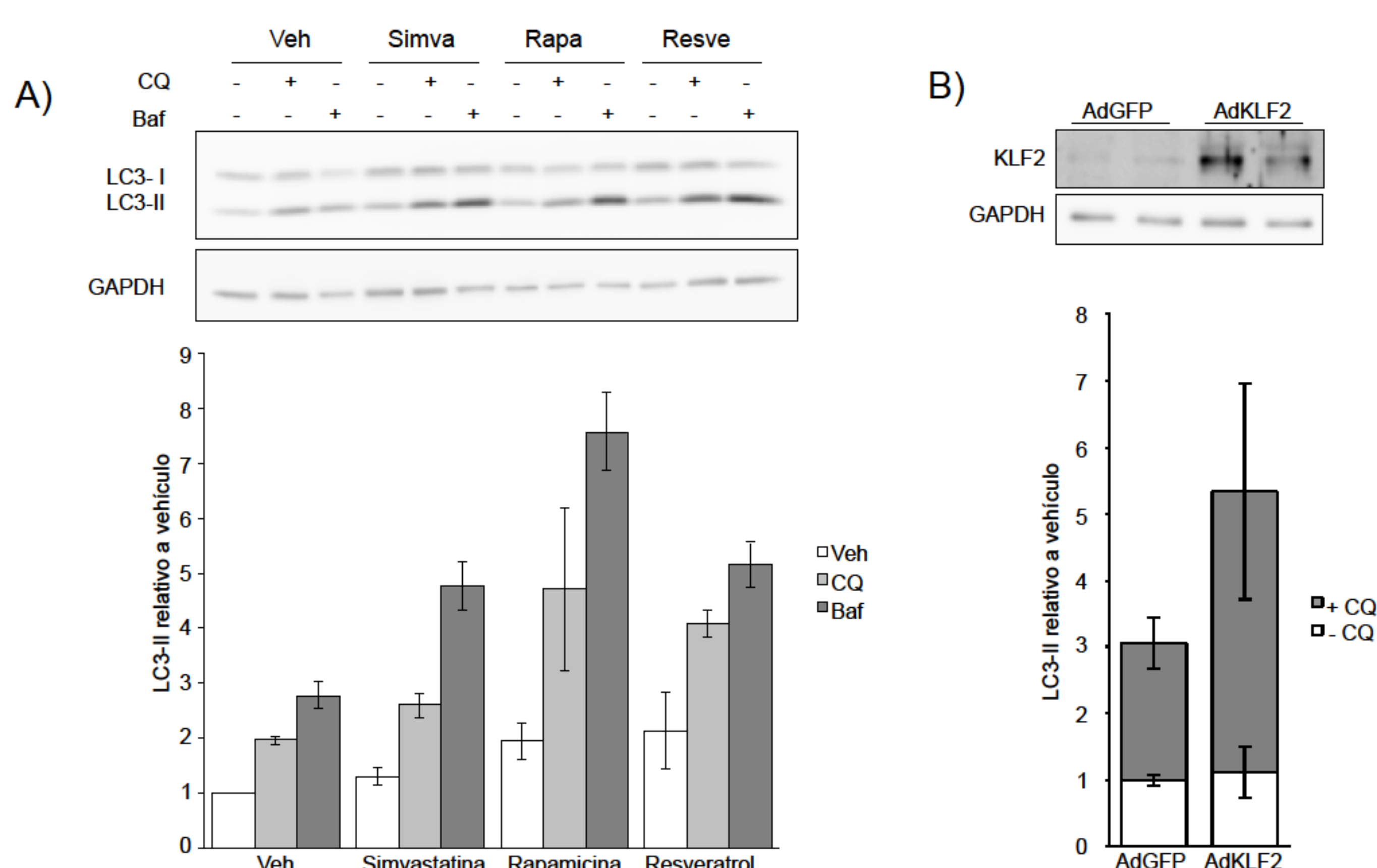
Células endoteliales sinusoidales (CES) aisladas de rata se pre-trataron con simvastatina (activador de KLF2), geranilgeranil pirofosfato (ggpp, inhibidor de KLF2) y/o cloroquina (CQ, inhibidor de AF) y fueron sometidas a un modelo de I/R (6h, 12h o 24h en solución Wisconsin (UWS) o Celsior a 4°C + 2h reperfusión en caliente). (n = 3-5 por experimento).

Métodos *ex vivo*

Ratas Wistar recibieron 1- vehículo; 2- simvastatina, o 3- cloroquina + simvastatina. Los hígados se explantaron, se preservaron 16h en UWS y, tras 2h de reperfusión, se evaluó la función microvascular (incremento en la presión portal en respuesta a dosis crecientes del vasodilatador endotelio-dependiente acetilcolina) y se tomaron muestras de tejido para análisis moleculares. (n = 8 por condición).

Resultados

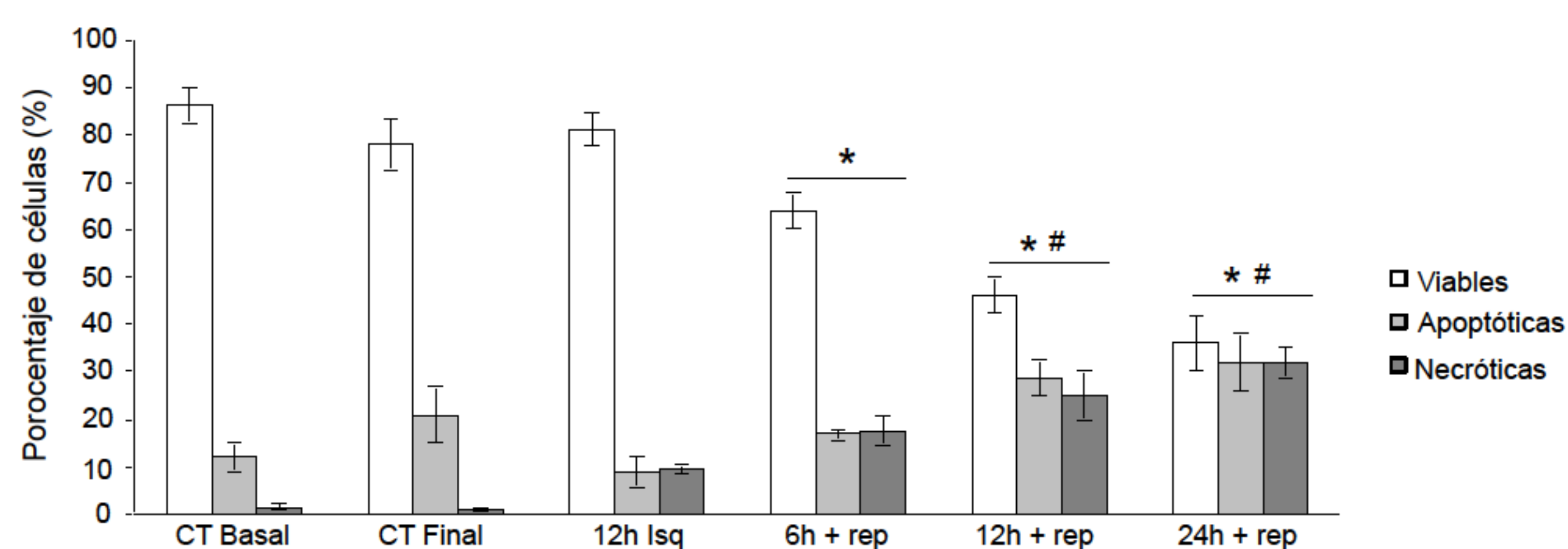
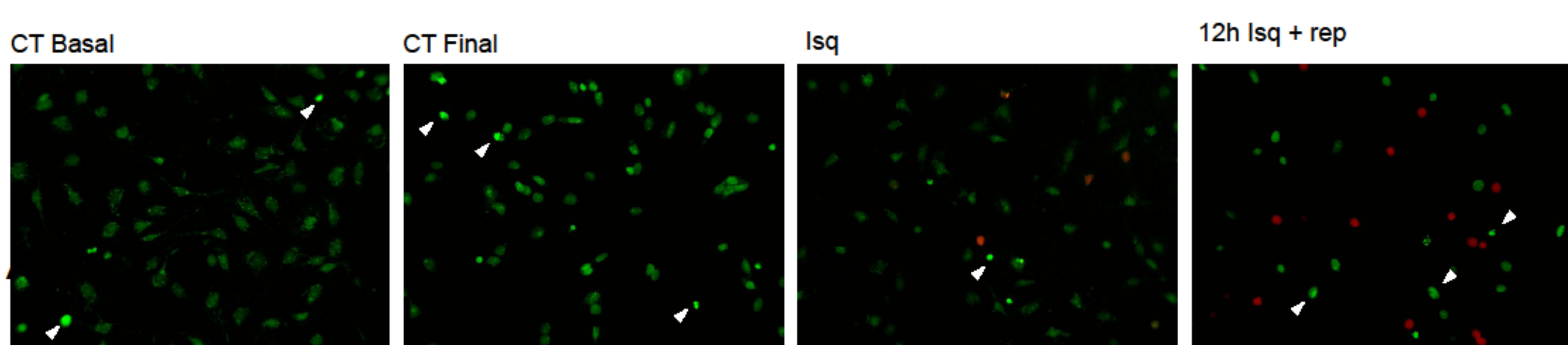
1- Niveles de autofagia en CES tras la activación farmacológica (A) o genética (B) de KLF2



La activación de KLF2 conlleva un incremento en el flujo autofágico en las CES.

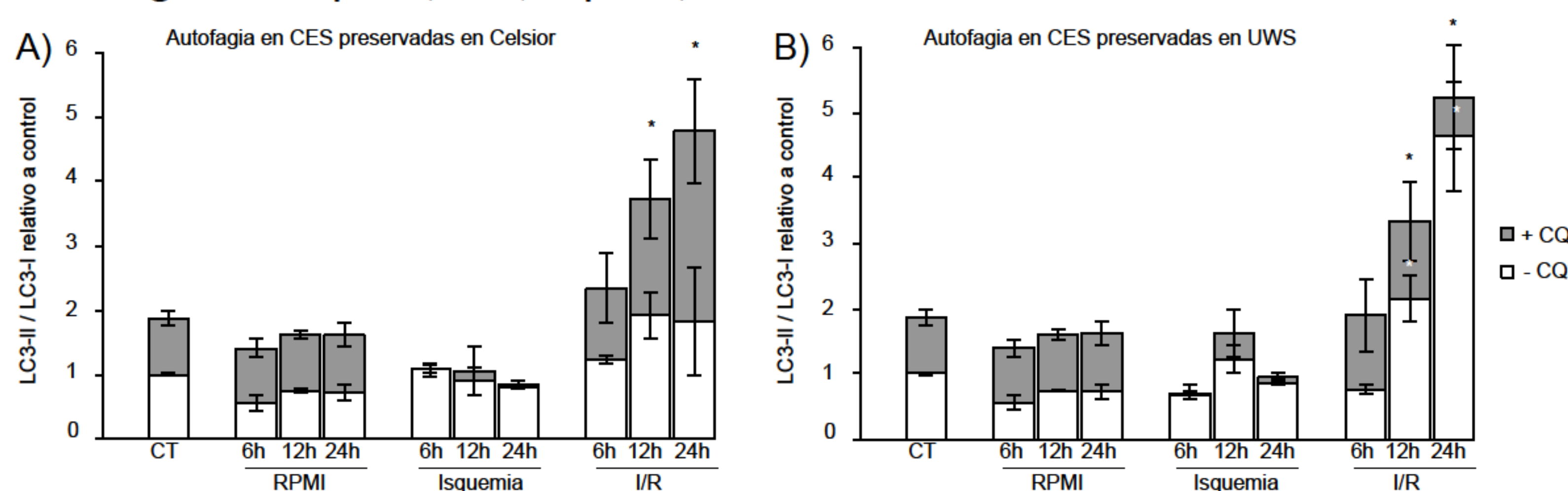
2- Viabilidad celular de las CES sometidas a I/R evaluada por doble tinción con naranja de acridina (núcleo verde punteado, apoptosis – flecha) y yoduro de propidio (rojo, células necróticas).

* p < 0,05 vs CT Basal; # p < 0,05 vs 6h + rep



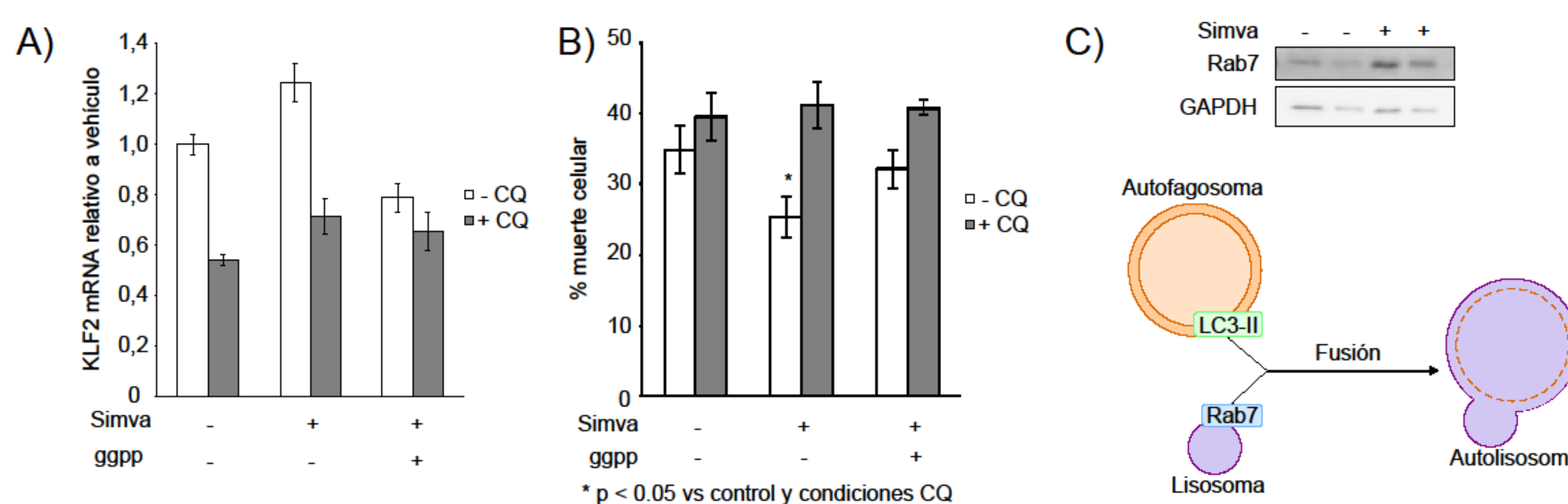
El daño endotelial ocurre durante la reperfusión y su severidad depende del tiempo de isquemia.

3- Autofagia en CES sometidas a isquemia en Celsior (A) o UWS (B) y reperfusión mediante WB de LC3B. El flujo autofágico corresponde a las barras grises. * p < 0,001; # p < 0,05 vs CT



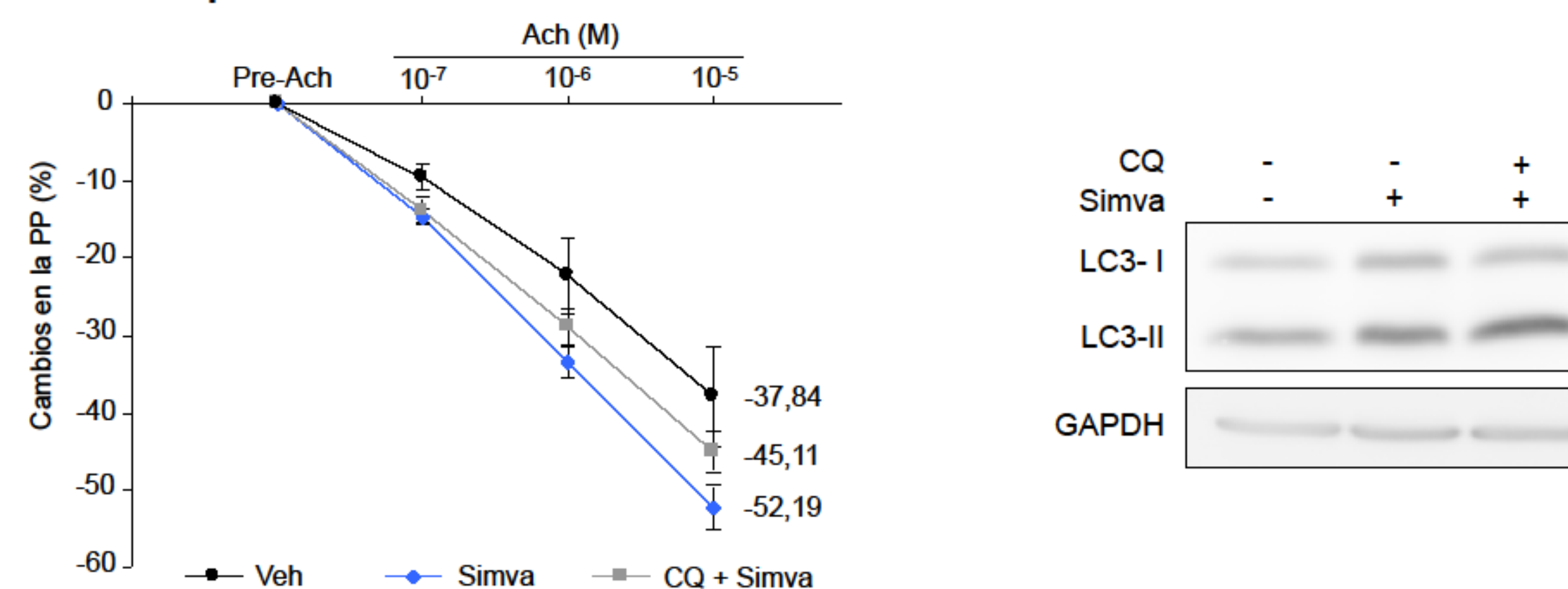
La autofagia se activa durante la reperfusión cuando se ha usado Celsior, pero no con UWS.

4- Niveles de KLF2 (A) y muerte celular (B) tras I/R con preincubación con simvastatina. (C) Inducción de Rab7 mediante simvastatina (12h).



La preincubación con simvastatina mantiene elevados los niveles de KLF2 durante la isquemia en UWS, previniendo la muerte endotelial debido a la reactivación de la autofagia, seguramente mediante Rab7.

5- Función microvascular (A) y niveles de autofagia (B) en un modelo de I/R *ex vivo* empleando UWS.



La protección microvascular conferida por simvastatina depende, en parte, de la activación de la autofagia también *ex vivo*.

Conclusiones

Se describe por primera vez la relación entre la activación de la autofagia y la expresión de KLF2. Tras la I/R, las CES preservadas en UWS presentan una inhibición en la formación del autolisosoma. Simvastatina mejora el fenotipo y la supervivencia del endotelio hepático durante la I/R al mantener los niveles de KLF2 y también reactivando la autofagia durante la preservación en UWS y reperfusión en caliente. Estos efectos podrían ser mediados por el incremento en la proteína *small GTPasa* Rab7.