

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

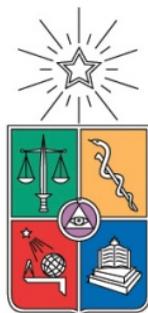
**ACTIVACIÓN DE LA VÍA INTERLEUQUINA 17 COMO
MECANISMO DE LA INFLAMACIÓN Y DAÑO
CARDIOVASCULAR INDUCIDO POR ALDOSTERONA.**

JUAN PEDRO PEÑA MÉNDEZ

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Patología Animal

Santiago - Chile

2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**ACTIVACIÓN DE LA VÍA INTERLEUQUINA 17 COMO
MECANISMO DE LA INFLAMACIÓN Y DAÑO
CARDIOVASCULAR INDUCIDO POR ALDOSTERONA.**

JUAN PEDRO PEÑA MÉNDEZ

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Patología Animal

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS MICHEA A.

Santiago - Chile

2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO.

JUAN PEDRO PEÑA MÉNDEZ.

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN EN PATOLOGÍA EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 13 DE AGOSTO DE 2013.

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS MICHEA A.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DR. GUSTAVO FARÍAS R.

DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ G.

DR. ULISES VERGARA C.

DR. CLAUDIO ZÚÑIGA M.

**Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Fisiología Integrativa, CEMC
ICBM – Facultad de Medicina de la Universidad de Chile
y contó con financiamiento FONDECYT 1090223, 1130550
Instituto Milenio Inmunología e Inmunoterapia P09 / 016F**

BIOGRAFÍA

Juan Pedro Peña Mendez nació en Santiago de Chile, el 28 de Agosto de 1982.

La enseñanza básica y media la realizó en el Colegio De La Salle, La Reina, en la ciudad de Santiago de Chile.

La enseñanza universitaria la realizó en la Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología, en Santiago de Chile, entre los años 2001 a 2005. La tesis de pregrado de Juan Pedro Peña se tituló, “Detección de *Giardia Duodenalis* por inmunocromatografía en caninos menores de 12 meses de la zona sur de Santiago”.

El año 2007 ingresó al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile. Durante la realización de la tesis de Magíster, se presentaron los datos preliminares en congresos nacionales e internacionales de la especialidad: Congreso Conjunto de las Sociedad Chilena de Nefrología, Hipertensión y Trasplante, Puerto Varas, Chile, 2009 y Coquimbo, Chile, 2012; *Anual Meeting of The American Society of Nephrology*, San Diego, California, USA, 2009, Denver, Colorado, USA, 2010; *Meeting of The American Physiological Society*, Denver, Colorado, USA, 2010; Congreso Latinoamericano de Cardiología, Viña del Mar, Chile, 2010. Además fue acreedor de 2 premios por sus trabajos presentados (Mejor Trabajo de Investigación y Joven Investigador, Congreso Conjunto de las Sociedad de Nefrología, Hipertensión y Trasplante, Puerto Varas, 2009 y Coquimbo, 2010 respectivamente).

El año 2010 obtuvo premio otorgado por la Sociedad Chilena de Hipertensión “Beca Novartis de Investigación” para investigar los Canal Epitelial de Sodio (ENaC) en modelo transgénico, viajando al *Centre de Recherche des Cordeliers, CRC, INSERM U872, equipe 1*, a cargo del Dr. Frederic Jaisser, *Faculté de Médecine, Université de Paris V Renne Descartes – Univesité de Paris Marie Curie*, en Paris, Francia.

Desde el año 2011 participa en estudios colaborativos con el Dr. Mauricio González, Director del Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, Universidad de Chile, proyecto “Efecto de la perturbación del tráfico vesicular sobre la homeostasis de cobre en ratones Niemann-Pick tipo C”, de la candidata a doctorado Srta. Graciela Arguello, dirigida por el Dr. Mauricio González (estudio en curso).

El años 2012, mediante dotación de sus pares, se le nombra Vice-Presidente de la Red Mundial de Medicina Critica Veterinaria.

Dedicado a mi hijo, mi familia, mis alumnos y a pequeños pacientes.

*"Nunca es demasiado tarde, para nada, hasta que deje de latir el cansado corazón de
nuestro pequeño paciente."
M. D. Kittleson*

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar agradeciendo a Humberto Peña T., un gran apoyo y potenciador de todas mis aventuras y consejo en territorios inciertos, este grado también es tuyo papá. Pilar Méndez F., una madre ejemplar, siempre conmigo, apoyándome con una palabra, un cafecito, o simplemente una caricia cuando más lo necesitaba. Mis abuelos, que desde el cielo me dieron lo más importante, el amor por el trabajo bien realizado. A mis amigos que me soportaron todos estos años en esta aventura. Dra. Daniela Aguilar a sido amiga, colega y compañera de largas noches de turno, y ahora en una nueva vida con la llegada de nuestro primer hijo, te amo Daniela tenemos un universo por delante.

Me falta por agradecer a mis mentores, aquellas personas que de forma desinteresada creyeron y crearon al profesional que soy ahora. Primero agradezco el tiempo, el cariño y el apoyo que siempre he sentido de mi querida Dra. Patricia Escárte.

En este largo camino, ya 10 años juntos, mi mentor, amigo y jefe, Dr. Cesar Villalta, un cardiólogo espectacular con una calidad humana a toda prueba, me enseñó desde que fui un alumno de 2º año, hasta entregarme la jefatura de la única Unidad de Cuidados Intensivos de Chile y la Dirección de Investigación y Extensión, gracias capitán.

Por ultimo, le agradezco al Dr. Luis Michea A., a la mejor aventura de mi vida. Llegue sin previo aviso a una oficina que jamás había visitado de un piso inexistente y me presentan al doctor más increíble que conozco, que me llevo hacia alturas que jamás espere visitar, y hacerme sentir hoy como un científico, que desea seguir creciendo, por que el cielo es el limite.

En este crecimiento no puedo dejar de agradecer a 4 grandes personas que estuvieron el día a día en el laboratorio celebrando los éxitos y pasando con café los fracasos, la Sra. Magdalena González mi jefa en el laboratorio que me enseñó con cariño de madre todas las artes ocultas detrás de la biología molecular, Dra. Natalia Dünner amiga y compañera, quien me apoyo todos estos años, entre ratones, músculos, corazones, riñones y de maces. Por ultimo mi amigo y compañero de mesón, con quien trabaje codo a codo, día a día, sacando millones de PCRs, westerns y otras cosas, pasando muchas decepciones y grandes alegrías al ganar los premios al trabajo realizado, Dr. Cristian Amador.

A todos los que he nombrado y a los que no, pero que me han acompañado en este proceso, muchas gracias, por que sin ustedes no habría logrado llegar a este momento.

Índice de Contenido

Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas y Figuras	11
RESUMEN	13
SUMMARY.....	15
1. Introducción.	17
2. Revisión Bibliográfica	20
2.1. Mecanismo de acción de aldosterona.....	20
2.2. Respuesta inflamatoria cardiovascular y renal asociada a niveles inapropiados de aldosterona o hiperaldosteronismo.	21
2.3. Mecanismos moleculares del daño cardiovascular inducido por aldosterona: ¿activación del receptor de mineralocorticoides en células del sistema inmune?	23
2.4. Polarización linfocitaria: la nueva vía Th17.....	25
2.5. Posible papel de Th17 en la hipertensión dependiente de mineralocorticoides y sal	27
3. Objetivos.....	29
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. Hipótesis de Trabajo.....	30
5. Material y Método.....	31
5.1. Materiales	31
5.1.1. Animales de experimentación, fármacos y reactivos de laboratorio.	31
5.2. Método.....	32
5.2.1. Caracterización general de grupos experimentales y mantención.....	32
5.2.2. Muestreo experimental <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	34
5.2.2.1 Medición de la presión arterial	34
5.2.2.2. Extracción y determinación de la abundancia de ARNm.....	35

5.2.2.2.1 Extracción de ARN total.....	35
5.2.2.2.2. Electroforesis de ARN	36
5.2.2.2.3. Transcripción reversa.....	36
5.2.2.2.4. qPCR.....	37
5.2.2.3. Extracción y determinación de expresión de proteína.....	39
5.2.2.3.1. Extracción de proteínas.....	39
5.2.2.3.2. Cuantificación de proteínas mediante la reacción de Bradford	39
5.2.2.3.3. SDS-PAGE	39
5.2.2.3.4. Electro transferencia semi-húmeda.....	40
5.2.2.3.5. <i>Western blot</i>	40
5.2.2.4. Inmunohistoquímica.....	41
5.2.2.4.1 Técnica de tinción simple	41
5.2.2.4.2. Técnica de tinción doble.....	42
5.2.2.5 Fisiología Renal	43
5.2.2.5.1 Obtención de Muestra para evaluación renal.....	43
5.2.2.5.2 Medicación de Clearance de Creatinina.....	43
5.2.2.5.3 Medición de la Albuminuria.....	43
5.3. Tamaño muestral y estadística	44
6. Resultados.....	46
6.1. Espironolactona previene el desarrollo de hipertensión arterial en ratas DOCA.....	46
6.2 Espironolactona previene la cardiomegalia e hipertrofia renal en ratas DOCA.....	47
6.3 Datos fisiológicos	49
6.3.1. Velocidad de Filtración glomerular (VFG).....	49
6.3.2 Proteinuria	49
6.4 Expresión del ARNm de RORγt, IL-17A, citoquinas polarizantes Th17 y FoxP3 en células mononucleares sanguíneas (MNSC).....	50
6.5 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17 en MNSC.....	52
6.6 Expresión del ARNm de IL-17A, de citoquinas, factores de transcripción que favorecen la vía Th17 y de FoxP3 a nivel esplénico.....	53
6.7 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17A a nivel esplénico.....	55

6.8 Expresión del ARNm de ROR γ t, IL-17A, citoquinas y de FoxP3 a nivel renal.	56
6.9 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17A a nivel renal.	58
6.10 El tratamiento DOCA induce un infiltrado renal de linfocitos T CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ a los 8 y 16 días.	59
6.11 Expresión del ARNm de IL-17A, de citoquinas y factores de transcripción, favorecen la vía Th17, y de FoxP3 en miocardio.....	60
6.12 El tratamiento DOCA-sal induce la expresión proteica de IL-17A a nivel cardíaco.....	62
6.13 El tratamiento DOCA induce un infiltrado miocárdico de linfocitos T CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ a los 8 y 16 días.	62
6.14 El tratamiento DOCA induce un infiltrado renal y cardíaco de células dendríticas CD11c ⁺ a los 16 días.	64
6.15 Triterapia previene el desarrollo de hipertensión arterial en ratas DOCA.	66
6.16 El tratamiento triterapia no disminuye la expresión de IL-17A ni en corazón ni en riñón a los 16 días de tratamiento.	66
7. Discusión	68
7.1 Validación del modelo experimental.	68
7.2 Activación Th17 en ratas DOCA-sal	68
7.3 Potenciales efectos de la activación de Th17 en ratas DOCA-sal	72
7.4 Papel de la actividad del MR en la respuesta Th17 de las ratas DOCA-sal .	73
7.5 Inhibición de Tregs en ratas DOCA-sal, en forma dependiente de la actividad MR	75
7.6 Linfocitos B productores de IL-17	77
7.7 Comentario final	79
8. Conclusiones	81
9. Bibliografía	82
10. Anexo	102
10.1. Glosario de Abreviaturas.....	102

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1 Esquema de polarización linfocitaria CD4 ⁺ a linajes Th1, Th2 y Th17 con las respectivas vías de señalización.	27
Tabla 1 Lista de partidores utilizados.	38
Figura 2 Presión arterial sistólica en ratas DOCA y en ratas tratadas con espironolactona.	46
Tabla 2 Tabla de datos morfológicos.	47
Figura 3 Morfología de órganos.	48
Figura 4 Velocidad de Filtración Glomerular por Clearance de Creatinina.	49
Figura 5 Proteinuria.	50
Figura 6 Abundancia relativa en MNSP de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.	51
Figura 7 Abundancia de IL-17A y TGF-β1 en MNSC de ratas DOCA.	52
Figura 8 Abundancia relativa esplénica de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.	54
Figura 9 Abundancia de IL-17A y TGF-β1 en bazo de ratas DOCA.	55
Figura 10 Abundancia relativa renal de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.	57
Figura 11 Abundancia de IL-17A y TGFβ1 en riñón de ratas DOCA.	58
Figura 12 Inmunohistoquímica de células CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ en riñón de ratas DOCA.	59
Figura 13 Cuantificación de células CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ en riñón de ratas DOCA.	60
Figura 14 Abundancia relativa cardíaca de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.	61
Figura 15 Abundancia de IL-17A y TGF-β1 en corazón de ratas DOCA-sal.	62
Figura 16 Inmunohistoquímica de células CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ en corazón de ratas DOCA.	63
Figura 17 Cuantificación de células CD4 ⁺ /IL-17A ⁺ en corazón de ratas DOCA.	64

Figura 18 Inmunohistoquímica de células CD11c ⁺ en corazón y riñón de ratas DOCA.	65
Figura 19 Cuantificación de células CD11c ⁺ en riñón de ratas DOCA.	65
Figura 20 Presión arterial sistólica en ratas DOCA y en ratas tratadas con Triterapia	66
Figura 21 Abundancia relativa en corazón y riñón con triterapia de las citoquinas IL-17A y IL-23p19, las que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17.....	67
Figura 22 Esquema propuesto para la activación Th17 en órganos diana.....	80

RESUMEN

Niveles elevados de aldosterona causan hipertensión arterial y un estado inflamatorio moderado en tejido renal y cardiovascular. La evidencia clínica y experimental ha demostrado que el bloqueo del receptor de aldosterona/mineralocorticoides (MR) reduce la inflamación tisular y la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, el perfil y la temporalidad de los fenómenos inflamatorios asociados a la activación del MR son poco conocidos. Estudios recientes han identificado una nueva vía inflamatoria, la vía IL-23/IL-17, que participa en el daño autoinmune en enfermedades inflamatorias del sistema digestivo y el sistema nervioso central. Además, estudios en modelos experimentales de autoinmunidad e hipertensión arterial indican que el desarrollo de inflamación se podría asociar a la disminución de la función de linfocitos reguladores (Treg^{FoxP3+}). En este trabajo estudiamos si la activación del MR mediante el tratamiento con deoxicorticosterona acetato y una dieta rica en sal (DOCA-sal) causa la activación del eje IL-23/IL-17 y/o modifica linfocitos Treg, en células mononucleares sanguíneas, bazo, corazón y en tejido renal.

En una primera serie de experimentos evaluamos la cinética de activación de la vía IL-23/IL17 y el efecto de la activación y bloqueo del MR sobre esta vía inflamatoria. Estudiamos tres grupos de ratas uninefrectomizadas a 4, 8, 16 y 28 días, con los siguientes tratamientos: 1) Vehículo, 2) DOCA (0,5 mg/0,1kg) + 1% NaCl en la bebida (DOCA-sal), y 3) DOCA-sal + espironolactona (50 mg/kg/día). En una segunda serie experimental evaluamos si la activación de la vía IL-17/IL-23 era secundaria a la hipertensión (efecto hemodinámico) y/o la activación del MR, suministrando terapia antihipertensiva (triterapia) a los animales que recibían tratamiento DOCA-sal. Analizamos cuatro grupos experimentales 1) Vehículo, 2) DOCA-sal, 3) DOCA-sal+Triterapia antihipertensiva (Tri; Hidroclorotiazida 4 mg/kg/día, Reserpina 0,32 mg/kg./día, Hidralazina 6,5 mg/kg/día). En ambas series experimentales realizamos estudios fisiológicos, bioquímicos, de biología molecular, e histológicos para evaluar el desarrollo de hipertensión arterial, daño tisular y su correlación con la activación de la vía IL-23/IL-17.

Al cuarto día de tratamiento DOCA-sal, se evidenció hipertensión arterial sistólica (159±8,3 mm Hg vs Vehículo 116±7,1 mm Hg, p<0,001), seguido al octavo día por un aumento de los ARNm de IL-17, TGF-β1 y RORγt (un factor de transcripción que determina la diferenciación Th17) en células mononucleares sanguíneas. Observamos efectos similares en el bazo de ratas DOCA-sal. Posteriormente, al día 16 de tratamiento, aumentó la abundancia renal y cardíaca de los ARNm de citoquinas que favorecen la polarización Th17 (IL-23 e IL-1β), coincidente con la expresión proteica de IL-17 y el infiltrado de linfocitos T CD4⁺/IL-17A⁺. El tratamiento con espironolactona previno el desarrollo de hipertensión arterial en animales tratados con DOCA-sal (117±8

mm Hg vs grupo DOCA-sal, $p < 0,001$), el aumento en la expresión del ARNm de citoquinas pertenecientes al eje IL-23/IL-17 y la infiltración tisular por células T $CD4^+/IL-17A^+$ en tejido renal. Además, espironolactona incrementó a los 8 días la abundancia del ARNm Foxp3.

Al suministrar la triterapia antihipertensiva a ratas DOCA-sal observamos aunque este tratamiento previno efectivamente la hipertensión arterial, no bloqueó la polarización Th17.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento DOCA-sal implica la activación del eje inflamatorio Th17, tanto en células mononucleares sanguíneas como en tejido renal y cardiaco. La activación Th17 es prevenida por antagonista del MR espironolactona y no por el tratamiento anti-hipertensivo. Estos resultados indican que la activación del MR es necesaria para la polarización Th17 que caracteriza la hipertensión DOCA-sal y sugieren que el tratamiento con antagonistas farmacológicos del MR podría ser utilizado en clínica como una estrategia anti-inflamatoria en el tratamiento de la hipertensión arterial.

Palabras Claves: Interleuquina 17, Inflamación, Doca-sal, Hipertensión, Hiperaldosteronismo.

SUMMARY

High levels of aldosterone cause hypertension and moderate inflammatory state in renal and cardiovascular tissue. Clinical and experimental evidence has demonstrated that blocking aldosterone receptor (mineralocorticoid receptor, MR) reduces tissue inflammation and the production of several pro-inflammatory cytokines. However, the profile and timing of the inflammatory phenomena associated with MR activation are poorly understood. Recent studies have identified a new inflammatory axis, the IL-23/IL-17 pathway, which is involved in autoimmune damage in inflammatory diseases of the digestive system and the central nervous system. Furthermore, studies in experimental models of autoimmunity and hypertension indicate that the development of inflammation could be associated with reduced regulatory T lymphocytes (Treg^{FoxP3+}). We studied whether the activation of the MR by the treatment with deoxycorticosterone acetate plus high salt diet (DOCA-salt) causes the activation of the IL-23/IL-17 and/or modifies Treg in blood mononuclear cells, spleen, cardiac and renal tissue.

In a first set of experiments, we evaluated the kinetics of IL-23/IL17 pathway activation, and the activation and effect of pharmacological blockade of the MR on IL-23/IL-17 pathway. We studied three groups of uninephrectomized rats at 4, 8, 16 and 28 days: 1) vehicle, 2) DOCA (0.5 mg/kg 0.1) + 0.9% NaCl in the beverage (DOCA-salt) and 3) DOCA-salt+spironolactone (50 mg/kg/day). In a second set of experiments, we evaluated whether IL-23/ IL-17 pathway activation is secondary to hypertension (hemodynamic effect) and/or activation of MR. We analyzed three experimental groups: 1) vehicle, 2) DOCA / salt, 3) DOCA-salt + antihypertensive tripletherapy (Tri; 4mg/kg/day Hydrochlorothiazide, Reserpine 0.32 mg/kg/day, Hydralazine 6.5 mg/kg/day). In both sets of experiments we evaluated the development of hypertension, tissue damage and its correlation with IL-23/IL-17 pathway activation.

On the fourth day of DOCA-salt treatment, the rats evidenced systolic hypertension (159 ± 8.3 mm Hg vs vehicle 116 ± 7.1 mm Hg, $p < 0.001$). At the eighth day, we observed an increase of IL-17, TGF- β 1 and ROR γ t mRNAs in blood mononuclear cells. Similar results were observed in spleen samples from DOCA-salt rats. At day 16 of treatment, we observed increased abundance of renal and cardiac cytokines mRNAs that favors Th17 polarization (IL-23 and IL-1 β), that was coincident with increased expression of IL-17A protein and the appearance of CD4⁺ / IL-17A⁺ cell infiltrate. The treatment with spironolactone prevented the development of hypertension (117 ± 8 mm Hg vs group DOCA-salt, $p < 0.001$), the increase of cytokines transcripts and the cell infiltration. Furthermore, at 8 days of treatment, spironolactone increased the abundance of Foxp3 mRNA.

The treatment of the DOCA-salt rats with antihypertensive therapy did not prevent the up regulation of IL-23/IL-17 pathway, although the Tri effectively prevented hypertension.

Based on these results, it is concluded that the inflammatory process induced by DOCA-salt involves the activation of IL-23/IL-17 inflammatory axis in blood mononuclear cells, spleen, kidney and heart tissue. IL23/IL17 activation is dependent on the MR activation and independent of hypertension.

These results indicate that activation of the MR is required for the Th17 polarization caused by DOCA-salt treatment, and suggests the pharmacological treatment with MR antagonists (spironolactone, eplerenone) may be used clinically as an anti-inflammatory approach in the treatment of hypertension.

Keywords: Interleukin 17, Inflammation, DOCA-salt, Hypertension, Hyperaldosteronism

1. Introducción.

La hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en Chile y el mundo. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, sigla en inglés) es el principal eje endocrino regulador de la presión arterial, el balance de sodio y la volemia. La activación inadecuada del RAAS representa la segunda causa de hipertensión, con aproximadamente 250 millones de personas que equivalen al 15% del total global de pacientes hipertensos (Gordon *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 1999; Gallay *et al.*, 2001; Stowasser *et al.*, 2003).

Niveles inadecuadamente altos de aldosterona (ALDO) inducen inflamación y fibrosis cardiovascular y renal (Min *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2008). Estudios experimentales de los años ochenta demostraron que las acciones deletéreas de aldosterona se pueden desarrollar en forma independiente de la retención de sodio y la hipertensión arterial secundaria. Esta evidencia, más los estudios que prueban la expresión del receptor de aldosterona (Mineralocorticoid Receptor, MR) en tejidos no epiteliales, han llevado a postular que los efectos deletéreos de aldosterona podrían explicarse por la activación del MR presente en el sistema cardiovascular y/o células del sistema inmune (Gilbert y Brown, 2010; Schiffrin 2012).

Recientemente se ha descrito que la activación del sistema inmune es necesaria para que se produzca hipertensión arterial y daño de tejidos blanco (Guzik *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2007; Rickard *et al.*, 2009). La ausencia de linfocitos en ratones previene el desarrollo de hipertensión y daño renal en animales que reciben la infusión de Angiotensina II (AngII), o tratamiento con Deoxicorticosterona-sal (DOCA, precursor de aldosterona y análogo de aldosterona; Guzik *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la activación de la respuesta inmune adaptativa representa un mecanismo de daño en la hipertensión arterial.

La activación de mecanismos inflamatorios y la presencia de infiltrado de células mononucleares peri-vasculares son fenómenos tempranos en el desarrollo de daño tisular por aldosterona (Brown *et al.*, 2008). Niveles inadecuados de ALDO o DOCA, causan la producción de mediadores y citoquinas proinflamatorias como osteopontina, proteína quimioattractante de monocitos tipo 1 (MCP-1), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 1 β (IL-1 β) (Rocha *et al.*, 2002; Ko, Jung *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2006; Brown 2008). En general, la producción de citoquinas proinflamatorias en condiciones de hiperaldosteronismo puede ser prevenida y/o disminuida por los antagonistas farmacológicos del receptor de aldosterona (Greene *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1999; Blasi *et al.*, 2003). Estos resultados indican que la activación del MR es necesaria para que se produzca inflamación en el hiperaldosteronismo. Sin embargo, no se sabe si la activación de MR presente en células del tejido cardiovascular, renal y/o células inmunes participan en la inducción de inflamación.

El patrón de citoquinas inducido en respuesta a aldosterona no corresponde a las clásicas respuestas *T helper 1* (Th1) o *T helper 2* (Th2) y los mecanismos inmunológicos y tejidos que median esta respuesta inflamatoria son desconocidos. En el último tiempo se identificó un nuevo linaje de linfocitos T *Cluster of Differentiation +* (CD4⁺), involucrados en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, los linfocitos Th17, que se caracterizan por secretar IL-17 (Murphy *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2006; Hashmi y Zeng 2006). Estudios recientes han mostrado que IL-17 esta causalmente involucrada en el desarrollo de miocarditis autoinmune experimental y otras enfermedades inflamatorias autoinmunes (Baldeviano *et al.*, 2010). Los niveles plasmáticos de IL-17 se encuentran elevados en pacientes con Síndrome Metabólico e hipertensión arterial (Madhur *et al.*, 2010) y también se ha demostrado la presencia de linfocitos Th17 en biopsias de placas ateromatosas coronaria (Eid *et al.*, 2009). Finalmente, un estudio

realizado en ratones infundidos con angiotensina II mostró aumentos de IL-17 (Madhur *et al.*, 2010). Interesantemente, la ausencia genética de IL-17 (ratones KO IL-17^{-/-}) causa una disminución de la respuesta hipertensiva a angiotensina II (Madhur *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la vía inflamatoria Th17 participaría en la hipertensión arterial y el daño de tejidos blanco secundarios a la activación del RAAS.

La presente tesis de grado busca identificar si el hiperaldosteronismo causa la activación de la vía IL-17. Esta hipótesis se probó en el modelo de hipertensión arterial inducido por DOCA (mineralocorticoide y precursor de ALDO) y sal (NaCl). Se realizaron estudios moleculares e histológicos para analizar la potencial activación de la vía IL-17 en células mononucleares, tejido linfoide, tejido renal y cardíaco, obtenido de los animales de experimentación DOCA+sal y controles. Se evaluó además el efecto protector de un antagonista farmacológico del MR (espironolactona) en la potencial activación de esta vía en ratas DOCA-sal.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. Mecanismo de acción de aldosterona.

ALDO es una hormona esteroidea que ejerce su acción en los tejidos blanco a través de la unión a un receptor citosólico, denominado MR (Min *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2008). En su forma inactiva, el MR se asocia a un complejo multiprotéico formado por diversas chaperonas citosólicas. La unión con la hormona activa el MR, el cual se libera de las proteínas chaperonas, forma un dímero y se transporta al núcleo celular. En el núcleo, el MR activo actúa como un factor de transcripción que modula la expresión de múltiples proteínas. Además de encontrarse en los epitelios, tejidos blanco clásicos de aldosterona, el MR está presente en corazón (cardiomiocitos, fibroblastos; Lombes *et al.*, 1995), vasos sanguíneos (endotelio, músculo liso vascular; Takeda *et al.*, 1997), cerebro (Zhou *et al.*, 2000) y células inmunes (Rickard *et al.*, 2009; Rickard y Young 2009; Herrada *et al.*, 2011), mediando acciones directas de ALDO (Zennaro *et al.*, 1996; Zennaro *et al.*, 1997).

ALDO presenta también acciones rápidas, denominadas no-genómicas, que fueron reconocidas a mediados de los años noventa. Estas se observan luego de 3 a 20 minutos de estimulación hormonal, y son resistentes a la inhibición farmacológica de la transcripción y de la síntesis de proteínas. Los mecanismos moleculares que median estos efectos no se conocen con detalle, aunque se ha logrado identificar diversos mecanismos de transducción que son activados por ALDO, entre los que se encuentran las *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK), aumento de la concentración del calcio intracelular y activación de la fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K). Las acciones no-genómicas de ALDO podrían ser particularmente relevantes en los vasos sanguíneos, modulando el tono vascular y la homeostasis de iones intracelulares (Michea *et al.*, 1998; Alzamora *et al.*, 2000; Alzamora *et al.*, 2003; Michea *et al.*, 2005).

2.2. Respuesta inflamatoria cardiovascular y renal asociada a niveles inapropiados de aldosterona o hiperaldosteronismo.

Numerosos estudios experimentales muestran que la activación del MR tiene un papel central en la producción de daño cardiovascular y renal. En animales de experimentación, ALDO causa aumentos de la presión arterial, lesiones arteriales de tipo inflamatorio, fibrosis vascular, hipertrofia y fibrosis cardiaca, que se desarrollan particularmente rápido cuando se combina con la ingesta de una dieta rica en sal (Brilla y Weber 1992; Sun *et al.*, 1997; Rocha y Funder 2002). Es interesante destacar que en los modelos experimentales de hipertensión secundarios a aumentos de los niveles plasmáticos de angiotensina II (AngII), que a su vez ocasionan aumentos de ALDO, se produce remodelación cardiaca y daño arterial. El daño de tejidos causado por la infusión de AngII se desarrolla en forma independiente del aumento de la presión arterial (Brilla y Weber 1992). Estos efectos deletéreos de AngII son bloqueados por antagonistas de los MR (Rocha *et al.*, 2002). En ratas espontáneamente hipertensas (modelo genético de hipertensión espontánea, SHRSP), la hipertrofia cardiaca es atenuada en forma muy significativa al administrar espironolactona (Takeda *et al.*, 2000)

En pacientes humanos hipertensos, las concentraciones plasmáticas de ALDO correlacionan con la hipertrofia ventricular izquierda, la disminución de la distensibilidad arterial (Duprez *et al.*, 1993a; Duprez *et al.*, 1993b), la insuficiencia cardiaca y la mortalidad derivada de la insuficiencia cardiaca (Swedberg *et al.*, 1990). Pacientes humanos hipertensos con hiperaldosteronismo (AngII suprimida), tienen una alta incidencia de hipertrofia ventricular izquierda acompañada de hipertensión (Takeda *et al.*, 2001).

La evidencia clínica más relevante sobre los efectos nocivos de la activación del MR en el sistema cardiovascular se obtuvo al evaluar el uso de un antagonista de ALDO en pacientes humanos con insuficiencia cardiaca congestiva en el *Randomized Aldactone Evaluation Study, RALES* (Pitt *et al.*, 1999). Este estudio

demonstró que la adición de espironolactona al tratamiento habitual de la insuficiencia cardiaca severa, disminuye significativamente la mortalidad y morbilidad de los pacientes con insuficiencia cardiaca etapa III y IV según la *New York Heart association* (30% y 35% respectivamente; Pitt *et al.*, 1999). De igual modo, en un estudio reciente empleando eplerenona (antagonista del MR) en 6400 pacientes humanos post infarto agudo al miocardio enrolados (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*, EPHECUS), se comprobó la eficacia en la disminución de la morbi-mortalidad con la adición del antagonista del MR a la terapia estándar usada para pacientes con disfunción ventricular izquierda e insuficiencia cardiaca post-infarto (Pitt *et al.*, 2003). En el último de estos estudios (4E), se demostró que el uso de eplerenona combinada con enalapril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I, I-ECA) genera un descenso significativo de la hipertrofia ventricular izquierda y de la relación albúmina/creatinina urinaria, lo que indica que el bloqueo MR es efectivo en la prevención de órganos blanco de la hipertensión arterial.

El hiperaldosteronismo produce un estado inflamatorio, hipertrofia cardiaca y fibrosis ventricular. Diferentes estudios indican que la activación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria en estados de hiperactividad del RAAS y/o niveles inadecuados de ALDO serían claves para el desarrollo de daño en los tejidos (Brilla *et al.*, 1990; Rocha *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2004; Kagiya *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2008). El desarrollo de fibrosis secundaria a hiperactividad del RAAS es antecedido de inflamación coronaria y miocárdica, caracterizada por la infiltración de monocitos, linfocitos y células presentadoras de antígeno (APCs) (Mervaala *et al.*, 1999; Rocha y Funder 2002). El infiltrado inflamatorio se observa junto a la inducción de ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) y de citoquinas proinflamatorias como osteopontina, NF κ B, la proteína quimioattractante de monocitos tipo 1 (MCP-1), la molécula de adhesión intracelular tipo1 (ICAM-1) (Ahokas *et al.*, 2003; Brown, 2008) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

(Miura *et al.*, 2006). Algunos estudios han sugerido que en el tejido cardiovascular existe un RAAS local, con síntesis tisular de AngII y ALDO (Okamura *et al.*, 1999; Jurewicz *et al.*, 2007). La existencia de RAAS local implicaría que el reclutamiento de monocitos, linfocitos y APCs podría verse exacerbado frente a los elevados niveles de AngII y/o ALDO tisular.

Las respuestas proinflamatorias desencadenadas por el RAAS a nivel renal son similares a las descritas en el corazón. Ratones infundidos con AngII presentan una disminución de la velocidad de filtración glomerular y albuminuria, con infiltración de macrófagos, estrés oxidativo y depósito de colágeno a nivel renal (Liao *et al.*, 2008). Por su parte, estudios en ratas tratadas con ALDO y una dieta rica en sal (ALDO-sal), evidenciaron un incremento de osteopontina, MCP-1, interleuquina 6 (IL-6) e IL-1 β en el riñón, los cuales fueron dependientes de la activación del MR (Blasi *et al.*, 2003). Asimismo, el tratamiento DOCA-sal en ratas indujo la infiltración leucocitaria, acompañada de un incremento en la expresión renal de NADPH oxidasa, COX-2, osteopontina y el factor β de crecimiento transformante (TGF- β) (Lam *et al.*, 2006). En general, todas estas alteraciones conducen al daño glomerular y la fibrosis intersticial (Greene *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 1999).

Por tanto, los antecedentes presentados anteriormente permiten concluir que una activación inadecuada del RAAS favorece un mecanismo inflamatorio con infiltrado peri vascular, daño miocárdico y daño renal (Rocha *et al.*, 2000; Blasi *et al.*, 2003; Gerling *et al.*, 2003; Fraccarollo *et al.*, 2008).

2.3. Mecanismos moleculares del daño cardiovascular inducido por aldosterona: ¿activación del receptor de mineralocorticoides en células del sistema inmune?

Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la acción proinflamatoria de ALDO a nivel cardiovascular y renal puede revertirse mediante el uso de bloqueadores del MR. Se ha determinado que espironolactona es capaz de disminuir la

hipertrofia, fibrosis y vasculopatía, durante la hipertensión inducida por AngII o ALDO (Benetos *et al.*, 1997; Fiebeler *et al.*, 2001; Michea *et al.*, 2008). De igual forma, espironolactona disminuye el daño glomerular, la pérdida de capilaridad peritubular en modelos hipertensivos (Iwazu *et al.*, 2008) y la expresión del inhibidor de la activación de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Aldigier *et al.*, 2005). Eplerenona revierte el incremento de la presión arterial, la hipertrofia (Matsui *et al.*, 2004) y la disfunción cardíaca en ratas infundidas con AngII (Wang *et al.*, 2008). En ratas DOCA-sal, eplerenona disminuyó la fibrosis renal, la expresión de COX-2 y de las subunidades de NADPH oxidasa (Lam, 2006). En este mismo sentido, eplerenona es capaz de disminuir la generación de TNF- α , COX-2, IL-1 β e IL-6, en el modelo isquémico de insuficiencia cardíaca (Klanke, 2008).

La evidencia de que el bloqueo del MR antagoniza los efectos proinflamatorios también ha sido descrita en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Espironolactona reduce la generación de TNF- α y MCP-1 en cultivos de PBMC incubados con AngII (Miura *et al.*, 2006) e inhibe la producción de TNF- α , IL-6 e interferón gamma (IFN- γ), cuando las PBMC son expuestas a LPS o fitohemaglutinina-P (Hansen *et al.*, 2004).

El MR está presente en células dendríticas (DC, Herrada *et al.*, 2011), las que también podrían ser blanco de ALDO. Experimentos preliminares de nuestro laboratorio demuestran el aumento en la expresión de la *Serum and Glucocorticoid Activated Kinase 1* (SGK1) en células mononucleares de sangre, en respuesta a la activación del MR (Datos no Publicados, Tesis Doctoral Srta. Jessica Díaz-Elizondo). Además, las respuestas no genómicas a ALDO fueron reconocidas por primera vez en células linfoides humanas y estudios de nuestro laboratorio encuentran activación por mecanismos no genómicos de la enzima ERK1/2, quinasa miembro de la familia de las MAPK (Poster presentado a Congreso de la Sociedad de Nefrología de Chile, 2008). Estos resultados preliminares muestran que ALDO tiene efectos directos en el

sistema inmune. Los resultados en los modelos experimentales *in vivo* de hiperactividad RAAS y la acción protectora de daño que posee el bloqueo del MR con los antagonistas farmacológicos, sugieren que la producción de citoquinas proinflamatorias en estados de activación del RAAS y/o hiperaldosteronismo (Christ y Martin, 1999) podrían ser secundarias a la activación del MR de células del sistema inmune.

2.4. Polarización linfocitaria: la nueva vía Th17.

La polarización linfocitaria permite dar especificidad a la activación inmune y depende de la liberación de diversas combinaciones de mediadores llamados citoquinas. En general, se reconocen tres linajes característicos de linfocitos: Th1, Th2, y más recientemente, el linaje Th17. Las subpoblaciones de Th1, Th2 y Th17 se originan a partir de los mismos precursores, que son los linfocitos T CD4⁺ vírgenes.

La polarización Th1 es una respuesta a infecciones microbianas o a la activación de macrófagos, siendo IL-12 e IFN- γ moléculas características de este tipo de polarización (Romagnani, 1997).

La polarización Th2 es en respuesta a parásitos y alérgenos, lo que genera una estimulación crónica de los linfocitos T, sin respuesta inflamatoria innata o reacción de macrófagos significativa. La polarización Th2 es dependiente de IL-4, que actúa mediante el factor de transcripción STAT6 (Romagnani, 1997)

Recientemente se identificó un nuevo linaje de linfocitos efectores CD4⁺, productores de IL-17 (Harrington *et al.*, 2005; Hashmi y Zeng, 2006), conocidos como Th17. A la fecha se han identificado 6 isoformas de IL-17 (A-F) y 5 receptores para IL-17 (IL17R A-E). La isoforma de IL-17 más estudiada es la IL-17A (nos referiremos a ella como IL-17) y su receptor IL-17RA. Los Th17 también secretan otras citoquinas como IL-21 (ayuda a la diferenciación) e IL-22 (efectora; Hashimi y Zeng, 2006).

Las células Th17 tienen un papel en la defensa contra infecciones microbianas, colaborando en el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares. Además, la activación de Th17 se ha relacionado con diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, como la Encefalitis Autoinmune, la Artritis Autoinmune y la Colitis Crónica (Murphy *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2006). Se ha reportado correlación positiva entre los niveles plasmáticos y tisulares de IL-17 y la severidad de la Artritis Reumatoide, Esclerosis Múltiple y enfermedades intestinales inflamatorias (Chabaud *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002; Fujino *et al.*, 2003). Recientemente se describió la expresión de IL-17 and IFN- γ en plasma y biopsias de arterias coronarias afectadas con enfermedad Arterioesclerótica, indicado que la vía IL-17 tendría un rol en la producción de daño cardiovascular. Así mismo se ha descrito la acción reguladora de los linfocitos T reguladores (Treg) o linfocitos T supresores son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa suprimiendo la activación del sistema inmunitario (Ivanov *et al.* 2007), manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo la tolerancia hacia auto antígenos, en caso de activación del eje IL23/IL17. La actividad de los Treg ha sido estimada mediante la cuantificación de la abundancia del factor de transcripción FoxP3, que es necesario y suficiente para producir la polarización de los linfocitos T *naïve* hacia fenotipo Treg (*Forkhead Box P3*; Eid *et al.*, 2009).

Para la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a Th17 se requiere la presencia de TGF- β 1 más IL-6 y/o IL-23 (Wilson *et al.*, 2007). Además, IL-1 β junto a IL-6 serían necesarias para promover el compromiso de las células CD4 vírgenes a la diferenciación Th17 (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007). Finalmente, IL-23 se requiere para que se mantenga la diferenciación Th17 (Hashmi y Zeng, 2006). A nivel celular, el compromiso y diferenciación Th17 implican la expresión del factor de transcripción ROR γ t (*Retinoid Acid Related Orphan Receptor Gamma T*; Takeda *et al.*, 2000; Figura 1).

Estudios con cultivos celulares mostraron que IFN- γ e IL-12 suprimen la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a linaje Th17 (Christ y Martin, 1999; Pitt *et al.*, 2000), resultado que sugiere que la diferenciación Th1 y Th17 son mutuamente excluyentes. Sin embargo, no está claro que esto sea del todo correcto, ya que cultivos de células humanas indican que en determinadas poblaciones linfocitarias podrían coexistir las citoquinas IL-17 e IFN- γ (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007).

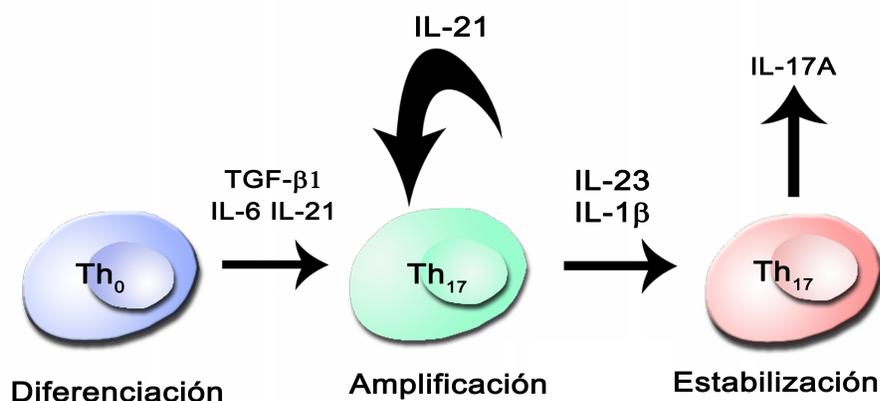


Figura 1 Esquema de polarización linfocitaria CD4⁺ a linajes Th1, Th2 y Th17 con las respectivas vías de señalización.

(Modificado de Iwakura y Ishigame, 2006)

2.5. Posible papel de Th17 en la hipertensión dependiente de mineralocorticoides y sal

El hiperaldosteronismo experimental se asocia a inducción en la producción de TGF- β 1 y la activación de IL-1 e IL-6 (Nagase *et al.*, 2006; Nagase y Fujita 2007; Onozato *et al.*, 2007; Brown, 2008; Karatas *et al.*, 2008). El bloqueo farmacológico del MR bloquea la producción de TGF- β 1 en diversos modelos

de hipertensión arterial (Chun *et al.*, 2008) y espironolactona bloquea la producción de IL-6 e IL-1 en células mononucleares sanguíneas *in vitro* (Søren *et al.*, 2006).

Sobre la base de los antecedentes expuestos y estudios preliminares sobre la activación de citoquinas inflamatorias relacionadas al daño cardiovascular y renal producido por ALDO, en esta tesis se analizó en ratas DOCA-sal el daño inflamatorio en tejido renal y cardiovascular. Así mismo, buscamos la presencia de estas células en sangre y en el bazo. Realizamos estudios a los 4, 8 16 y 28 días en células sanguíneas, bazo, riñón y corazón, para determinar la temporalidad de los fenómenos inflamatorios gatillados por ALDO. En particular, estudiamos si el tratamiento DOCA-sal activa la vía IL-17.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar si el tratamiento con deoxicorticosterona (DOCA) y sal (NaCl) activa la vía IL-17 en forma dependiente de la activación del MR.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar el curso temporal de los potenciales cambios en la expresión de transcritos (ARNm) codificantes para IL-17A, IL-1 β , IL-23p19, ROR γ t, FoxP3 y TGF- β 1 en corazón, riñón, células mononucleares de sangre y bazo en animales DOCA-sal.

Evaluar el curso temporal de los potenciales cambios de la abundancia de las proteínas IL-17A y TGF- β 1 en corazón, riñón, células mononucleares de sangre y bazo de animales DOCA-sal

Localizar las células productoras de IL-17A y CD4⁺ en corazón y riñón en los grupos experimentales, de acuerdo al curso temporal de los cambios causados en tejido diana de ALDO por el tratamiento DOCA-sal.

Determinar la efectividad del antagonista farmacológico del receptor MR, espironolactona, como tratamiento preventivo de los cambios en la expresión de las citoquinas, infiltrado celular, hipertrofia y fibrosis en corazón y riñón de ratas DOCA-sal.

Determinar si la activación de la vía IL-17 en respuesta al tratamiento DOCA-sal depende del desarrollo de hipertensión arterial (efecto hemodinámico).

4. Hipótesis de Trabajo

La activación del MR causa la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a linaje Th17 en ratas DOCA-sal, fenómeno que precede el desarrollo de daño cardiovascular y renal en este modelo experimental.

5. Material y Método

5.1. Materiales

5.1.1. Animales de experimentación, fármacos y reactivos de laboratorio.

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) machos de la cepa Sprague Dawley, de peso inicial de 150-180 grs, producidas por el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los animales fueron mantenidos según las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de experimentación de la *Guide For The Use of Laboratory Animals, NIH* y las recomendaciones de Conicyt. Este estudio cuenta con la autorización del protocolo experimental por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Nº de protocolo CBA-0263).

Se utilizó Acetato de Deoxicorticosterona (Sigma-Aldrich-Aldrich, St. Luis, MO, USA), etanol absoluto (Merck Darmstadt, Alemania) y aceite vegetal (Canepa, Chile) para preparar la suspensión inyectable de DOCA.

Se utilizó NaCl (Winkler, México) para suplementar agua de bebida.

Para el tratamiento con espironolactona se utilizó espironolactona (Mintlab, Chile). Para el tratamiento triterapia se utilizó, Hidroclorotiazida clorhidrato (Andrómaco, Chile), Reserpina (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) Hidralazina, (Andrómaco, Chile).

Para el lavado de tejidos se utilizó solución tampón fosfato de sodio (PBS), 136mM NaCl (Wincler, Chile), 10mM Na₂HPO₄ (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), 15mM KH₂HPO₄ (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania).

La extracción de proteínas se realizó en un buffer de homogenización que contiene 50mM de Trizma® ácido (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) pH 7,4, 1,2mM de EGTA (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), 2,5mM de MgCl₂ 6H₂O (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), 250 mM de Sacarosa (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), en presencia de un *cocktail* de inhibidores de proteasas

(*Complete Mini*®, Roche, Mannheim, Alemania). Se homogenizó los tejidos con un homogenizador mecánico con vástago de acero inoxidable (PRO 200, Pro Scientific, Oxford, USA).

Para la extracción de ARN se utilizó como medio de homogenización TRIzol® (Invitrogen, USA). Para la precipitación y posterior resuspensión de los ácidos nucleicos se usó isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), etanol (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) y agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA).

Para la recuperación antigénica en las secciones de tejido para inmunohistoquímica se utilizó el tampón citrato: 10mM ácido cítrico (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), 0,05% Tween 20 (Winkler, México), pH=6,0.

Toda sal y/o reactivos no individualizados son de Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA, o Merk KGaA, Darmstadt, Alemania.

5.2. Método

5.2.1. Caracterización general de grupos experimentales y mantención.

Las ratas fueron mantenidas en el vivero del laboratorio de Fisiología Integrativa, el cual cuenta con ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas, a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad controlada de 40-50%.

Se utilizaron cuatro grupos experimentales de ratas con diferentes tratamientos, los estudios se realizaron a los 4, 8, 16 y 28 días según el experimento o determinación a realizar.

1.- Grupo Uninefrectomizados (**UNX**).

2.- Grupo UNX con tratamiento de DOCA y suplementado con sal en el agua de bebida (**DOCA**).

3.- Grupo UNX con tratamiento de DOCA y espironolactona en el alimento con suplementación de sal en el agua de bebida (**ESPIRO**).

4.- Grupo UNX con tratamiento de DOCA y Hidroclorotiazida 4 mg/kg/día, Reserpina 0,32 mg/kg/día, Hidralazina 6,5 mg/kg/día y sal en el agua de bebida (TRI).

El grupo TRI solo se utilizó para confirmar el papel causal de la hipertensión como inductor Th17 (efecto hemodinámico) *versus* la activación del MR.

No se utilizó un grupo control libre de uninefrectomía puesto que el objetivo de este estudio es determinar los fenómenos asociados a la hipertensión inducida por ALDO. La UNX permite la reducción de la masa nefronal y acelera el desarrollo de la hipertensión. Además, se desestimó la utilización del grupo control sano, puesto de la intervención quirúrgica causa activación de múltiples vías inflamatorias que pudiesen sesgar los resultados del tratamiento DOCA-sal.

La técnica anestésica utilizada en la neuroleptoanalgesia, contiene una mezcla de Ketamina 10% (Agroland, Chile) y Xilazina 2% (Agroland, Chile) 80 mg/kg y 2,9 mg/kg respectivamente, administrada por vía intraperitoneal.

La uninefrectomía se realizó mediante una incisión por el flanco izquierdo, decapsulación del riñón izquierdo, ligadura vascular y ureteral con sección posterior. Se utilizó nudo cirujano transfixiante, con sutura Vicryl® 5-0 (Ethicon inc. Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). La capa muscular se suturó con punto simple discontinuo con sutura Vicryl® 5-0 (Ethicon inc. Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). La piel se suturó con punto U horizontal con material de sutura lino trenzado 3-0 (Ethicon inc. Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). Luego de la cirugía los animales se mantuvieron en reposo durante 6 días en jaulas individuales.

Se utilizó una solución de Acetato de Deoxicorticosterona diluido en etanol absoluto (20 mg/mL con 2,25 mL de aceite vegetal). La suspensión se

suministró vía intramuscular en una dosis semanal de 30 mg/kg/semana dividido en 2 inyecciones por semana, con una jeringa de 1 mL (aguja 25G), en el músculo semimembranoso derecho e izquierdo, se distribuyó entre ambos músculos la dosis a inocular, para disminuir el daño. Para beber, los animales recibieron solución de 1% NaCl *ad libitum*.

A través del alimento se administró 2 tipos de dietas elaboradas en el laboratorio, una con espironolactona 50 mg/kg/día más la base nutricional y otra únicamente con la base nutricional. El alimento contiene carbohidratos, proteína, lípidos, minerales y vitaminas estándares para roedores, para los grupos UNX y DOCA se alimentaron solo con alimento base, el grupo ESPIRO fueron alimentados con la dieta suplementada con espironolactona.

El grupo TRI, fue administrada los antihipertensivos por vía oral por medio del agua de bebida, donde se administró Reserpina 0,32 mg/kg/día, Hidralazina 6,5 mg/kg/día y Hidroclorotiazida 4 mg/kg/día.

5.2.2. Muestreo experimental *in vivo* y *ex vivo*

5.2.2.1 Medición de la presión arterial

Se realizaron mediciones cada 48 horas de la presión arterial por método de manga barométrica en la cola, en animales conscientes, previamente entrenados. Las mediciones fueron registrados en un sistema Power Lab 4/2ST y luego analizados con el *software* Power Lab Chart 5 (Australia).

La eutanasia se realizó a los 8, 16 ó 28 días, mediante sobredosis anestésica. Inmediatamente se colectaron tejidos y fluidos para estudio, de acuerdo al siguiente orden de extracción:

- Sangre
- Bazo
- Riñón
- Corazón (ventrículos)

Para la extracción de ácidos nucleicos y proteínas, las muestras obtenidas se limpiaron completamente de sangre en PBS 1X, se pesaron y limpiaron para luego continuar con la extracción ARN y proteínas.

Para extracción de proteínas totales, se utilizó 200 a 250 mg del tejido y para las extracciones de ARN total, entre 15 a 20 mg.

5.2.2.2. Extracción y determinación de la abundancia de ARNm

5.2.2.2.1 Extracción de ARN total

Se extrajo ARN de muestras de corazón, riñón y bazo. La extracción de ARN en tejidos de ratas se realizó a partir de 15-20 mg de tejido, se homogenizó 8 veces por 15 seg. en 1 mL de Trizol (Gibco BRL-Life Technologies) a 0°C, en homogeneizador Pro 200 (PRO Scientific Inc). El lisado obtenido de tejido fue traspasado a un tubo de 1,5 mL, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 0,2 mL de cloroformo, se mezclaron 20 veces por inversión y 20 segundos en *vortex*, se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugaron a 11200g durante 15 minutos a 4°C en microcentrífuga 5403 (Eppendorf). Luego de centrifugar se formaron dos fases, la fase superior acuosa se traspasó a un nuevo tubo de 1,5 mL agregando 500 µL de isopropanol 75% frío y agitado en *vortex* durante 20 seg. La muestra se guardó a -20°C por media hora, luego se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para precipitar el ARN total. Este precipitado que se resuspendió en 40 µL agua libre de nucleasas. Cada una de las muestras fue tratada con 4 µL de 10X *DNase I Buffer* (DNA-free Kit, Ambion, AM1906) con 1 µL de *DNase I* (2U/µL) por 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 5 µL de *DNase I Inactivation Reagent* por 2 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 10000g por 2 minutos, a temperatura ambiente luego se removió el sobrenadante y se guardó el ARN a -80°C.

5.2.2.2. Electroforesis de ARN

Para verificar que las muestras de ARN no presentan degradación o contaminación por ADN genómico, se utilizó el método de electroforesis horizontal denaturante en gel de agarosa 1,2%(p/v)-formaldehído 6%(v/v) en tampón MOPS 1 x (ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico 20mM, acetato de sodio 8mM, EDTA 1mM, pH=7,2). Las muestras se cargaron en el gel con la solución tampón de carga 1x (formamida 50% (v/v), glicerol 25% (v/v), azul de bromofenol 0,12% (p/v), bromuro de etidio 0,1 µg/uL, formaldehído 20%). La electroforesis se realizó a 90 voltios utilizando una fuente poder PS 3002 (GibcoBRL-Life Technologies). Para la visualización de las bandas, el gel se expuso a luz ultravioleta obteniendo la imagen digital. La imagen digital fue luego analizada con el programa Adobe Photoshop® Cs5 PRO™., para determinar la abundancia relativa de las bandas de 18S y 28S, con el fin de determinar la calidad del ARN, siendo un valor aceptable aquellas muestras que presentan una razón superior a 2,0 entre las bandas 18S y 28S.

5.2.2.3. Transcripción reversa.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR *Improm-II™ Reverse Transcription System* (Promega Corporation, WIS, USA). Se utilizó 0,2 µg de ARN total junto a 0,5 µL de *random primers* 500 µg/mL, luego la mezcla se llevó a un volumen de 5 µL con DEPC-H₂O a 65°C, por 5 minutos y luego a 4°C por otros 5 minutos. Simultáneamente se preparó una mezcla de reacción que incluye: 5,75 µL de DEPC-H₂O, 4 µL de 5 x RT *Buffer Improm-II* (tampón de reacción), 3µL de MgCl₂ 25mM, 0,75 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL de ARNsin y 1,0 µL de *Improm-II* RVT, completando un volumen final de 15 µL. Se incubó por 5 minutos a 25°C, luego 60 minutos a 42°C y por último 15 minutos a 70°C. El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

5.2.2.2.4. qPCR

El uso de esta metodología permite estimar la abundancia de producto de PCR, basado en la medición de fluorescencia emitida por una molécula llamada *SYBR Green*.

La abundancia de ARNms específicos se determinó por técnica de qPCR en un termociclador de tiempo real (Mx 3000P, QPCR System, Stratagene, CA, USA). El análisis de datos se realizó con el *software* del equipo. Se estandarizó la cuantificación de las diversas especies de mRNA corrigiéndolas en abundancia por un gen control, 18S ribosomal, que fue medido en todas las muestras bajo las mismas condiciones, lo que incluyó: Agua libre de nucleasas; Tampón de PCR; MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; Taq 2 μM (Kit Taq Polimerasa, Fermentas); Sentido 0,5 μM; Antisentido 0,5 μM; SYBR Green 1/20000 (Molecular Probes, Invitrogen, CA). Para cada grupo de reacciones se utilizó 2 μL de ADNc templado para la curva estándar (diluciones 6 órdenes de magnitud) y 2 μL de ADNc templado proveniente de la RT realizada para cada muestra.

El programa seleccionado para las curvas 18S consistió en un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 1 minuto, luego 21 ciclos de amplificación que consisten en denaturación a 93°C por 30 segundos, apareamiento a 60°C por 18 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos. La fluorescencia fue entonces adquirida al final de la fase de extensión y la lectura se realiza a 85°C al final de cada ciclo. Posteriormente se realizó una curva de denaturación, desde 78°C hasta 95°C, donde se realiza la lectura de la fluorescencia, dejando las muestras a una temperatura final de 25°C. Además, se realizaron cuantificaciones para transcritos rIL-17, rIL-23, RORγt (factor de transcripción MR), rIL-1β, FoxP3 (marcador Treg), CD11c (marcador DC), TGF-β y 18s mediante qRT-PCR con partidores específicos diseñados en el laboratorio

(Tabla 1) a partir de las secuencias del mRNA (GEN BANK, NLM/NIH) y el software "Primer3" (Rozen y Skaletsky, 2000). La especificidad de los partidores se comprobó realizando un Blast (Basic Local Alignment Search Tool; NLM/NIH, 2006). Los partidores fueron sintetizados por *Integrated Device Technology* (San José, CA, USA).

r-TGF- β 1 sentido	5' GAC CTG ATA GCT TC 3'
r-TGF- β 1 anti sentido	5' GGG TCT CCC AAG GAA AGG AT 3'
r-IL-6 sentido	5' AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA 3'
r-IL-6 anti sentido	5' ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC 3'
r-IL17 sentido	5' CTT CAC CTT GGA CTC TGA GC 3'
r-IL17 anti sentido	5' TGG CGG ACA ATA GAG GAA AC 3'
r-IL-23 sub unidad p19 sentido	5' CAG GTT CCC ATG GCT ACA GT 3'
r-IL-23 sub unidad p19 anti sentido	5' TCT GGG GTT TGT TGC TTT TC 3'
r-IL-1 β sentido	5' CTG TGA CTC GTG GGA TGA TG 3'
r-IL-1 β anti sentido	5' GGG ATT TTG TCG TTG CTT GT 3'
r-18s sentido	5' CGA CGA CCC ATT CGA ACG TCT 3'
r-18s anti sentido	5' GCT ATT GGA GCA TGG ATT TAC CG 3'
r-FoxP3 sentido	5' AGG CAC TTC AGG CAC GA 3'
r-FoxP3 anti sentido	5' CTG GAC ACC CAT TCC AGA CT 3'
r-CD11c sentido	5' GCT GTG ATG AGC CAA CTT CA 3'
r-CD11c anti sentido	5' TGA TAG CCG AGG CTG TTC TT 3'
r-ROR γ t sentido	5' GCC TAC AAT GCC AAC AAC CAC ACA 3'
r-ROR γ t anti sentido	5' TGA TGA GAA CCA AGG CCG TGT AGA 3'

Tabla 1 Lista de partidores utilizados.

Los resultados son presentados en abundancia relativa del transcrito de interés versus el control interno de carga 18S.

5.2.2.3. Extracción y determinación de expresión de proteína.

5.2.2.3.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó en buffer de homogenización Tris-Sacarosa con homogeneizador mecánico (Polytron Pro 200, PRO Scientific Inc.). El homogenizado se centrifugó a 800g por 10 minutos a 4°C para eliminar *debris* y el sobrenadante se almacenó -80°C, hasta realizar determinación de concentración de proteínas y estudios de *Western blot*.

5.2.2.3.2. Cuantificación de proteínas mediante la reacción de Bradford

Luego de aplicación de reactivo de Bradford (Thermo Scientific), se determinó la absorbancia a 525nm en espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Para las muestras MNSC, se determinó la concentración de proteínas mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 10%, empleando BSA como curva estándar. Para la cuantificación se utilizó Adobe Photoshop® Cs5 PRO™.

5.2.2.3.3. SDS-PAGE

Se preparó geles denaturantes de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio en gradiente (16% - 8%). Se cargaron 40 µg de proteínas en cada bolsillo del gel. La separación electroforética se realizó a 200V por 5 minutos y después a 150V por 90 minutos. Para estimar el peso molecular de las proteínas separadas por SDS-PAGE, se utilizó mezcla de proteínas estándar de peso molecular conocido y preteñidas (Fermentas, cat SM1811).

5.2.2.3.4. Electro transferencia semi-húmeda

Se realizó una transferencia semi-húmeda en cámara BioRad, a membrana PVDF (Pierce). La electrotransferencia se realizó aplicando campo con corriente constante (115 mA) y voltaje menor a 25V.

5.2.2.3.5. Western blot

El *Western blot* se realizó en 3 etapas:

Anticuerpo Primario.

Se utilizando anticuerpos policlonal de conejo Anti-IL17A de ratón (cat SC-7927, Santa Cruz Biotechnology Inc., Sta. Cruz, CA, USA), dilución de 1:500 en BSA al 4% a 4°C, incubado por toda la noche en agitación. También se realizó al incubación con Anti- β -Actina (cat A5441, Sigma-Aldrich-Aldrich, St. Luis, MO, USA) a una dilución de 1:2000 en leche descremada a 4% a 4°C toda la noche en agitación en una segunda utilización de la membrana.

Anticuerpo Secundario.

Como anticuerpos secundarios se usaron *Donkey Anti-Rabbit ECL IgG-HRP* (cat NA934, Amersham) a una dilución de 1:2000, en BSA 4% a temperatura ambiente por 2 horas en agitación y *Goat Anti-Mouse IgG, H&L Peroxidase Conjugate* (cat 401215, Calbiochem, MA, USA) a una dilución de 1:2000 en leche 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación respectivamente.

Revelado.

Se utilizó el reactivo quimiolumincente *ECL Western blot Subs* (Pierce, cat 32106), placa radiográfica (Kodak, CA, USA), la densitometría se realizó con el programa Adobe Photoshop® Cs5 PRO™.

5.2.2.4. Inmunohistoquímica.

La mantención de los tejidos se realizó mediante la inclusión en parafina.

La fijación fue en base a etanol 50°, con pasajes sucesivos hasta etanol absoluto y xilol.

La inclusión en parafina se realizó en pasajes seriados de parafina líquida (55° en la estufa) en bloque para generar los tacos o cubos con la muestra incluida .

La conservación de los bloques fue a 4°C .La sección de los tejidos se realizó en un micrótopo sobre portaobjetos silanizados (DAKO a3003).

Se realizaron 2 tipos de inmunohistoquímica: tinción simple y con doble tinción. Para ambas técnicas se montaron cortes en parafina de riñón y corazón de 5 micrómetros de espesor.

5.2.2.4.1 Técnica de tinción simple

La hidratación se realizó en agua destilada y para la recuperación antigénica se utilizó el tampón citrato, el bloqueo se hizo con caseína y se incubó con el anticuerpo primario, a 4°C toda la noche. Luego del lavado se colocó el anticuerpo secundario (unido a la enzima *horseradish peroxidase* y streptavidina) por 30 minutos, se colocó el cromógeno diaminobenzidina (DAB; Vector Lab. UK, ImmPACT™ DAB SUBSTRATE, SK-4105) el tiempo de reacción de DAB fue 30 a 60 segundos. La eliminación del exceso de tinción se realizó con agua destilada. Para el marcaje de los núcleos se utilizó hematoxilina (Vector Lab. UK, VECTOR Hematoxylin, H-3401) en la técnica de tinción con una sola marca, finalmente se deshidrató, aclaró y montó el un cubreobjetos. Esta técnica fue utilizada para la tinción CD11c.

5.2.2.4.2. Técnica de tinción doble

La técnica de doble tinción contempla el bloqueo de las proteínas con caseína, e incubación a 4°C toda la noche con un anticuerpo biotinilado (primer anticuerpo primario), se lavó y se bloqueó la fosfatasa alcalina endógena con levamisol, se tiñó con el cromógeno BCIP/NBP (Vector Lab. UK, BCIP/NBT AP Substrate Kit, SK-5400). El proceso de tinción se detuvo con agua corriente, luego se realizó el protocolo de tinción simple con DAB como cromógeno señalado anteriormente. Para el control de núcleo se utilizó *Methyl Green* (color verde; Vector Lab. UK, VECTOR Methyl Green, H-3402) para no confundir los colores y lograr un buen contraste versus la coloración de los cromógenos unidos a anticuerpos (café y azul). Se deshidrató y montó en un cubreobjetos. Técnica utilizada para las tinciones de CD4/IL17A (Amodio y Gregori 2012).

Los anticuerpos primarios para el Inmunohistoquímica fueron:

Anticuerpo monoclonal ratón Anti-CD4-rata (Invitrogen, CA, MR5100) 1:1000.

Anticuerpo policlonal conejo Anti-IL17A-rata (Santa Cruz Biotechnology, Sta. Cruz, CA, SC-7927) 1:500.

Anticuerpo monoclonal ratón Anti-CD11c-humano (Adcam, Cambridge, MA, ab11029) 1:500.

Los anticuerpos secundarios para el Inmunohistoquímica fueron:

Anticuerpo policlonal cabra Anti-IgG (H+L) conejo biotinilado (Vector Lab. UK, BA-1000) 1:500. Anticuerpo policlonal cabra Anti-IgG (H+L) ratón biotinilado (Vector Lab. UK, BA-9200) 1:500.

Los portaobjetos se fotografiaron para documentación y cuantificación del número de células positivas a la marca específica. Se analizaron campos visuales documentados con magnificación 40x. Para cada portaobjetos se analizaron 20 campos, cuantificando el número de células con tinción (marca +)

y se calculó el promedio y error estándar de los resultados obtenidos para el tejido de cada animal perteneciente a los diferentes grupos experimentales (n=5 animales por grupo).

5.2.2.5 Fisiología Renal

5.2.2.5.1 Obtención de Muestra para evaluación renal.

La obtención de muestra de orina para evaluar la función renal, se realizó en jaula metabólica (cat. 01-287-6A, Tecniplast-Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) durante 24 horas, de forma individual para determinación de la concentración de creatinina y presencia de albúmina.

Además, al fin del periodo de recolección de orina, se obtuvo plasma para el análisis de la concentración de creatinina.

5.2.2.5.2 Medicación de Clearance de Creatinina.

El método empleado para las muestras de orina y plasma se basa en una determinación colorimétrica por métodos enzimáticos de la creatinina (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA cat. TR35401). El resultado fue medido por absorbancia mediante electrofotometría (Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). A una absorbancia de 550nm.

5.2.2.5.3 Medición de la Albuminuria

Se utilizó método turbidimétrico. La albúmina presente en la muestra de orina provoca la aglutinación de las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-albúmina. La aglutinación de las partículas de látex es proporcional a la concentración de albúmina y puede ser cuantificada midiendo turbidez de la

solución (absorbancia a 550nm; BioSystems BA, España, Cat. 31924; Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

5.3. Tamaño muestral y estadística

Se estimó un tamaño muestral de 40 animales, los que se distribuyen en grupos de 4 animales por tratamiento/tiempo para los experimentos propuestos.

Para la estimación del tamaño de cada grupo se aplicó la ecuación estadística:

$$n = \frac{\log \beta}{\log \rho}$$

Donde:

$1-\beta$ = Poder estadístico utilizado ($\beta = 0,2$)

ρ = Proporción de animales que desarrollan hipertensión arterial (modelo clásico DOCA-sal; 0,96)

Se esperaba encontrar diferencias estadísticamente significativas en base a la hipótesis planteada, asumiendo una variabilidad de las determinaciones menor al 5%, distribución normal de las variables a analizar y un nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

El uso de 40 animales contempló 12 animales para los grupos UNX, DOCA y ESPIRO (sacrificio a los 8, 16 y 28 días de tratamiento), y 4 animales para grupo TRI (16 días de tratamiento)

Los resultados se expresaron como media aritmética \pm error estándar.

Para el análisis de variables continuas se realizó por Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, con test posterior de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$ (5%).

En los estudios semicuantitativos independientes (comparaciones de membranas de *Western blot* a 8 días vs membranas de *Western blot* a 16 días)

no es posible realizar comparaciones estadísticas, debido a que se realizó estudios independientes, en membranas en que se cargaron muestras de 8 o de 16 días (muestras de experimentos independientes, procesadas de acuerdo a su serie temporal por separado).

6. Resultados

6.1. Espironolactona previene el desarrollo de hipertensión arterial en ratas DOCA.

Al cuarto día de iniciado el tratamiento, observamos un aumento significativo de la presión arterial sistólica de ratas DOCA (5 mg/kg DOCA – 1% NaCl), con respecto al grupo uninefrectomizado que recibió sólo vehículo ($159 \pm 8,3$ mm Hg vs $116 \pm 7,1$ mm Hg, $p < 0,001$; Figura 2). Esta diferencia se mantuvo a lo largo del período de estudio. El tratamiento con espironolactona (50 mg/kg/día) previno el desarrollo de hipertensión arterial ($117 \pm 8,0$ mm Hg vs $159 \pm 8,3$ mm Hg, día 28, $p < 0,001$).

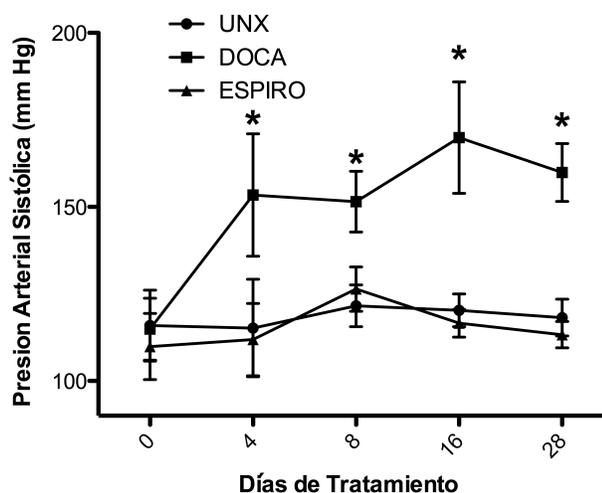


Figura 2 Presión arterial sistólica en ratas DOCA y en ratas tratadas con espironolactona.

Se midió la presión arterial en la cola de los animales comprendidos en el estudio, en los días 0, 4, 8, 16 y 28 de tratamiento. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=5 por grupo) * $p < 0,001$ vs valores basales del grupo uninefrectomizado.

6.2 Espironolactona previene la cardiomegalia e hipertrofia renal en ratas DOCA.

El riñón presenta hipertrofia a los 16 y a los 28 días de tratamiento en el grupo DOCA, lo que fue prevenido por espironolactona. El corazón presentó cardiomegalia a los 28 días de tratamiento, la que fue prevenida por espironolactona. (Tabla 2 y Figura 3)

			UNX		DOCA		ESPIRO		
4 días de tratamiento	PVI/PCF	mg/gr	0,3	± 0,3	1	± 0	0,6	± 0,2	
	PR/PCF	mg/gr	5,3	± 0	5,9	± 0,5	5,5	± 0,7	
	PE/PCF	mg/gr	3,2	± 0,2	3,8	± 0,9	2,9	± 0,6	
	PCF	gr	231	± 11,3	222	± 18,8	206,8	± 2	
	PAS	mmHg	115,2	± 14	153,4	± 27,8	* 111,9	± 20,4	#
8 días de tratamiento	PVI/PCF	mg/gr	2,3	± 0,1	2,7	± 0,2	2,3	± 0,1	
	PR/PCF	mg/gr	5,2	± 0,1	6,1	± 0,5	5,1	± 0,1	
	PE/PCF	mg/gr	2,9	± 0,1	4,2	± 0,3	2,7	± 0,3	
	PCF	gr	289,8	± 29,8	279,3	± 25,1	278,8	± 14,4	
	PAS	mmHg	121,6	± 6	151,5	± 8,7	* 126,4	± 6,3	#
16 días de tratamiento	PVI/PCF	mg/gr	0,7	± 0,1	0,7	± 0,1	0,7	± 0	
	PR/PCF	mg/gr	5,1	± 0	6,3	± 0	* 5,1	± 0,1	#
	PE/PCF	mg/gr	3,1	± 0,1	4,2	± 0,1	2,4	± 0,1	
	PCF	gr	289,8	± 29,8	265,4	± 25,1	280,1	± 14,4	
	PAS	mmHg	120,3	± 4,7	169,6	± 16	* 116,6	± 4	#
28 días de tratamiento	PVI/PCF	mg/gr	0,4	± 0,1	0,8	± 0,1	* 0,6	± 0,04	#
	PR/PCF	mg/gr	5,2	± 0,1	6,4	± 0,2	* 5	± 0,9	#
	PE/PCF	mg/gr	3,1	± 0,4	4,5	± 0,3	2,5	± 0,6	
	PCF	gr	300,2	± 27,3	264,5	± 30,1	286,5	± 27,3	
	PAS	mmHg	118,2	± 5,3	159,3	± 8,3	* 103,3	± 3,8	#

Tabla 2 Tabla de datos morfológicos.

Muestras extraídas posterior al sacrificio a los 4, 8, 16 y 28 días de tratamiento. PCF: peso corporal final; PVI: Peso Ventricular Izquierdo; PR: Peso del Riñón; PE: Peso del Bazo; PAS: Presión Arterial Sistólica. Los pesos de los tejidos son expresado promedio ± EE en mg de peso del órgano por gr de peso corporal del animal *p<0,05 vs UNX; #p<0,05 vs DOCA; n=5 por grupo experimental en cada uno de los tiempos estudiados.

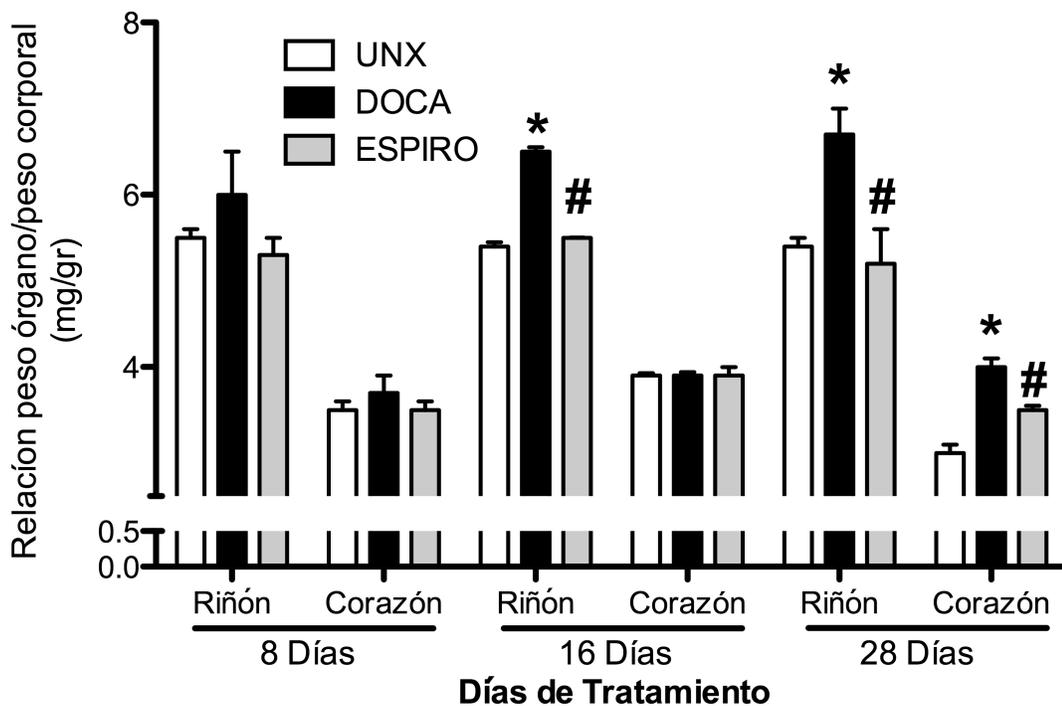


Figura 3 Morfología de órganos.

En el caso del corazón, el peso señalado corresponde solamente los ventrículos excluyendo las aurículas, los cuales fueron disecados previo a la medición. Los pesos están expresados en mg de peso del órgano por gr de peso del animal vivo. Las barras representan el valor promedio \pm EE, * $p < 0,05$ vs UNX, # $p < 0,05$ vs DOCA, $n = 5$ en cada grupo.

6.3 Datos fisiológicos

6.3.1. Velocidad de Filtración glomerular (VFG).

Se estimó la VFG mediante el *clearance* de Creatinina. Los animales DOCA mostraron una disminución de la VFG desde los 8 días de tratamiento. El tratamiento con espironolactona logró bloquear la caída de VFG (Figura 4).

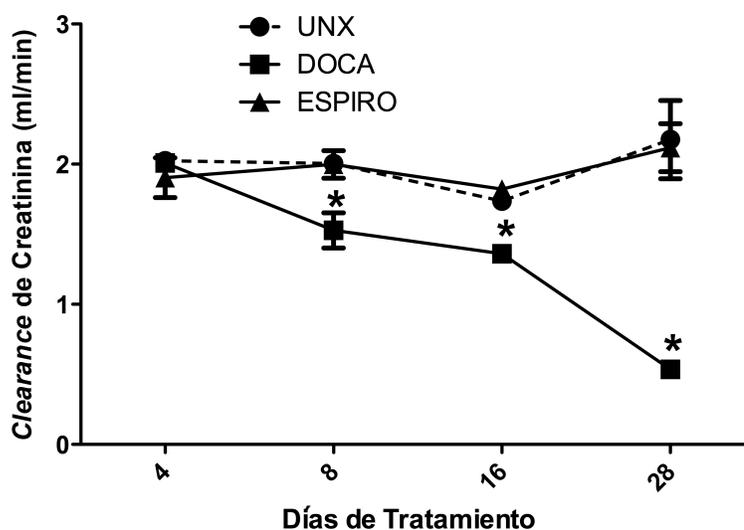


Figura 4 Velocidad de Filtración Glomerular por *Clearance* de Creatinina.

La orina de 24hrs fue recolectada en jaulas metabólicas. Los puntos representan el valor promedio \pm EE, * $p < 0,05$ vs UNX, $n=5$ por grupo.

6.3.2 Proteinuria

La micro albuminuria (proteinuria) es un indicador de daño de la barrera de filtración glomerular. En los animales DOCA observamos proteinuria desde los 8 días, la cual fue prevenida completamente por el tratamiento con espironolactona (Figura 5).

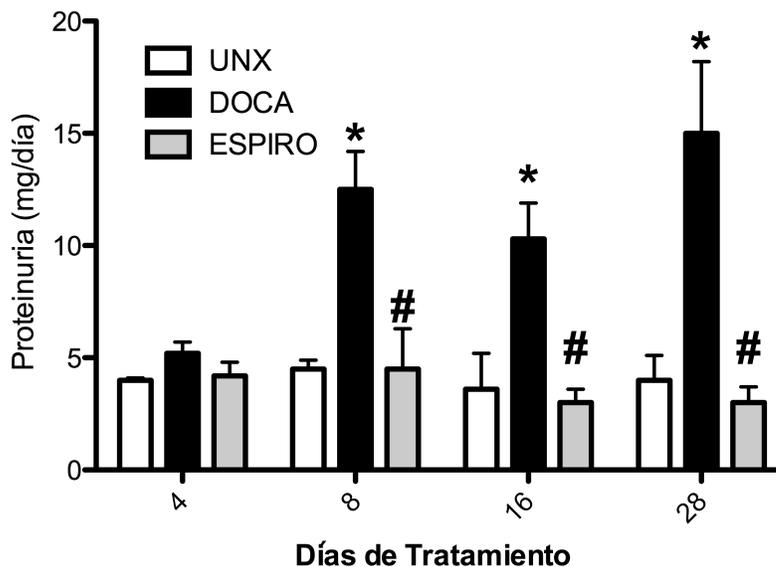


Figura 5 Proteinuria.

Las barras representan el valor promedio \pm EE, * $p < 0,05$ vs UNX, # $p < 0,05$ vs DOCA, $n = 5$ por grupo.

6.4 Expresión del ARNm de ROR γ t, IL-17A, citoquinas polarizantes Th17 y FoxP3 en células mononucleares sanguíneas (MNSC).

Al día 8 de iniciado el estudio, observamos un aumento significativo de la abundancia de los ARNm para IL-17 en las MNSC de ratas sometidas al tratamiento DOCA-sal, con respecto al grupo control uninefrectomizado (Figura 6B). Asimismo, encontramos aumentos en la abundancia del ARNm del factor nuclear ROR γ t (Figura 6A). Los cambios en la abundancia del ARNm de la citoquina responsable de la polarización Th17, TGF- β 1 mostró cambios similares (Figura 6C). En cuanto a las citoquinas que favorecen el mantenimiento del fenotipo IL-17 en los linfocitos T CD4⁺, IL-1 β e IL-23p19, no hubo mayores diferencias a los 8 días de estudio (Figuras 6D y 6E). Además, el aumento en la expresión de IL-17 en MNSC se acompañó por una disminución del ARNm de FoxP3 (Figura 6E), un factor de transcripción que se expresa en

linfocitos Treg CD4⁺. El tratamiento con espironolactona previno parcialmente el aumento de TGFβ1 e IL-17 inducido por DOCA, aumentando los niveles basales para FoxP3 en los MNSC. Los cambios en la abundancia de los ARNm evaluados para las distintas citoquinas del perfil Th17, también sugirieron un aumento en las MNSC de ratas DOCA con respecto al grupo uninefrectomizado al día 16 del estudio. Sin embargo, sólo la diferencia en la expresión de IL-1β fue estadísticamente significativa (Figura 6D). Espironolactona previno parcialmente el aumento de IL-1β, manteniendo los niveles versus el control para FoxP3 en los MNSC (Figura 6E).

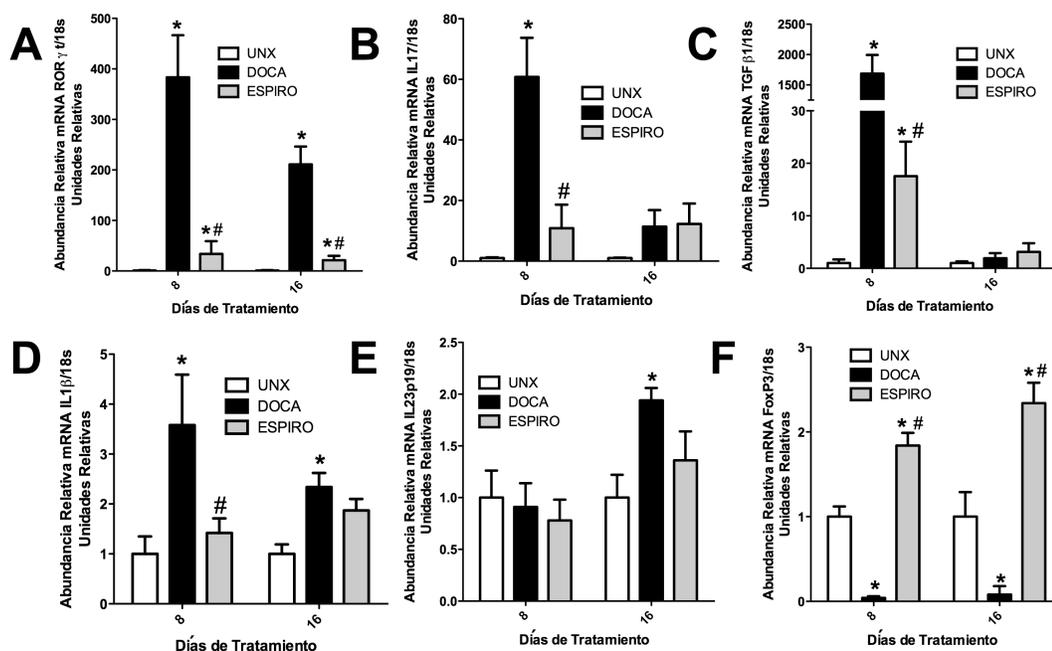


Figura 6 Abundancia relativa en MNSC de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.

Se obtuvo ARN total para transcripción reversa de MNSC. Con el ADNc de cada muestra se realizó PCR en tiempo real para: RORγt (A), IL-17 (B), TGF-β1 (C), IL-1β (D), IL-23 (subunidad p19) (E) y FoxP3 (F), a los 8 y 16 días. Como estándar interno se utilizó producto 18S (constitutivo), expresando la abundancia de cada mensajero como la razón relativa con 18S. Los valores corresponden al promedio ± EE (n=5 por grupo) *p< 0,05 vs valor basal, #p< 0,05 vs DOCA.

6.5 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17 en MNSC.

El aumento de la abundancia de los ARNm para IL-17 en las MNSC observado a los 8 días y su caída posterior a los 16 días de iniciado el tratamiento DOCA (Figura 7A). Se midió la expresión de la proteína IL-17 que aumentó aproximadamente ocho veces sobre la situación control (Figura 7A). Este incremento fue prevenidos por espironolactona. El tratamiento con DOCA indujo el aumento de la abundancia de TGF- β 1, siendo prevenido con el tratamiento con espironolactona (Figura 7B).

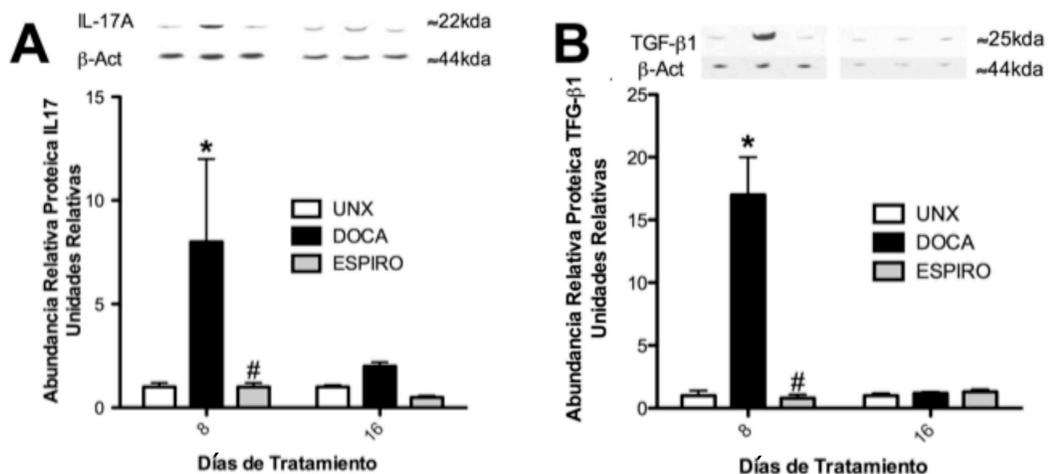


Figura 7 Abundancia de IL-17A y TGF- β 1 en MNSC de ratas DOCA.

Se cargaron 40 μ g de homogenados de proteína obtenida a partir de MNSC de ratas DOCA, a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. Los gráficos corresponden a la relación IL-17/ β -actina (control de carga), expresada como abundancia relativa para cada una de las condiciones. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4) *p< 0,05 vs valor basal, y #p< 0,05 vs DOCA.

6.6 Expresión del ARNm de IL-17A, de citoquinas, factores de transcripción que favorecen la vía Th17 y de FoxP3 a nivel esplénico.

La activación de la respuesta inmune adaptativa Th17 podría requerir de la presentación antigénica y activación de Th17 en órganos linfoides periféricos. Por ello decidimos evaluar la expresión de citoquinas polarizantes IL-17 en el bazo. En el día 8, el tratamiento DOCA indujo un aumento significativo tanto de la abundancia de los ARNm para las citoquinas que participan en la polarización y mantenimiento de la vía Th17 (Figuras 8C, 8D y 8E) y en la expresión de IL-17 en el bazo (Figura 8B). Espironolactona previno la sobreexpresión de TGF- β 1, ROR γ T, IL-1 β e IL-23p19. La disminución en la expresión esplénica de las distintas citoquinas se acompañó por un aumento significativo del ARNm de FoxP3 (Figura 8E).

Al día 16 del estudio, observamos un aumento significativo de la abundancia esplénica de IL-1 β y IL-23p19 en ratas sometidas al tratamiento DOCA. IL-17 también tiene un aumento significativo de la abundancia del transcrito, pero menor que a los 8 días. Asimismo el aumento de ROR γ T y la disminución de FoxP3 renal en el grupo DOCA fueron prevenidas por el bloqueo con espironolactona (Figura 8A y 8E). Tanto a los 8 como a los 16 días de estudio, espironolactona previno el aumento de las distintas citoquinas inducido por DOCA, excepto IL-1 β , que mostró solamente una prevención parcial.

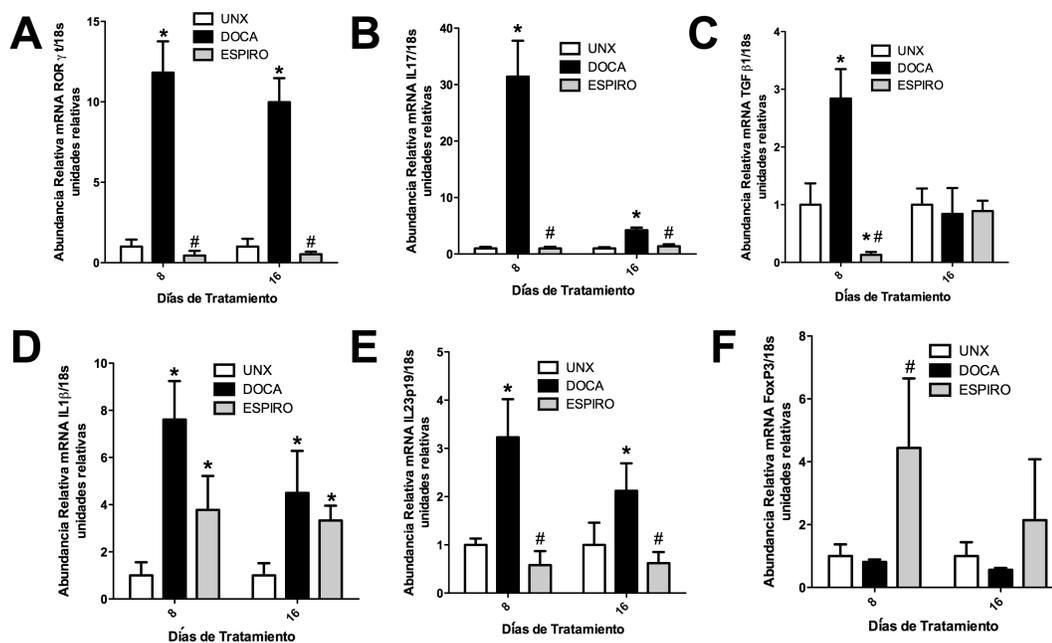


Figura 8 Abundancia relativa esplénica de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.

Se obtuvo ARN total para transcripción reversa de bazo. Con el ADNc de cada muestra se realizó un PCR en tiempo real para: ROR γ t (A), IL-17 (B), TGF- β 1 (C), IL-1 β (D), IL-23 (subunidad p19) (E) y FoxP3 (F), a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. Como estándar interno se utilizó producto 18S (constitutivo), expresando la abundancia de cada citoquina como la razón relativa con 18S. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4) *p< 0,05 vs valor basal, y #p< 0,05 vs DOCA.

6.7 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17A a nivel esplénico.

El aumento de la abundancia de los ARNm para IL-17 a nivel esplénico a los 8 días y su caída posterior a los 16 días de iniciado el tratamiento DOCA (Figura 9A), se asoció a un perfil de cambio similar en los niveles de la proteína IL-17, los cuales aumentaron aproximadamente once veces sobre la situación control (Figura 9A). Similar situación experimentó TGF- β 1 con un de siete veces (Figura 9B). Estos incrementos fueron prevenidos por espironolactona en el bazo, a los 8 y 16 días.

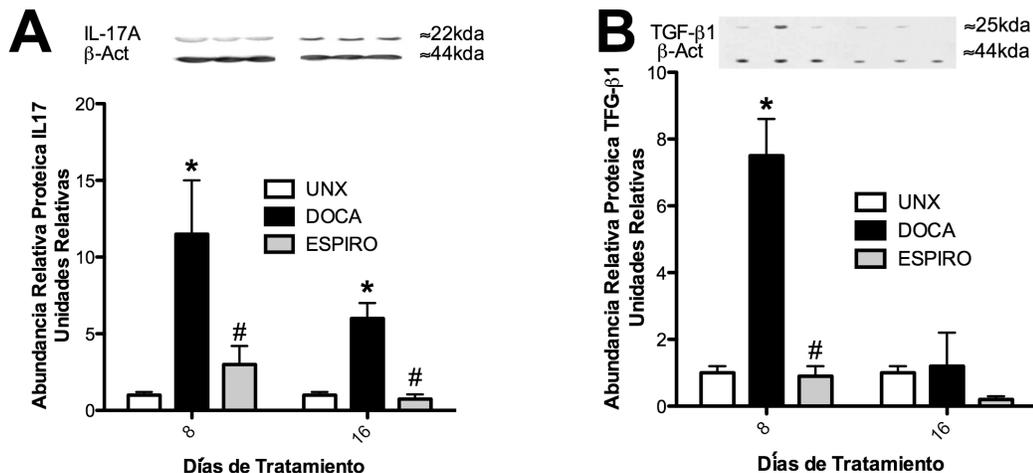


Figura 9 Abundancia de IL-17A y TGF- β 1 en bazo de ratas DOCA.

Se cargaron 40 μ g de homogenado de proteínas del bazo de ratas sometidas al tratamiento DOCA-sal, a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. Los paneles superiores muestran *Western blot* representativos. Los gráficos corresponden a la relación IL-17/ β -actina (control de carga) (A) y a la relación TGF- β 1/ β -actina (control de carga) (B), expresada como abundancia relativa para cada una de las condiciones. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4 por grupo) *p< 0,05 vs valor basal.

6.8 Expresión del ARNm de ROR γ t, IL-17A, citoquinas y de FoxP3 a nivel renal.

En el día 8, el tratamiento DOCA indujo un aumento significativo de la abundancia de los ARNm para las citoquinas que participan en la polarización y mantenimiento de la vía Th17 (Figuras 10A, 10B, 10C y 10D), con respecto al grupo control uninefrectomizado. Se detectaron cambios considerables en la expresión de IL-17 en el riñón total de los animales DOCA (Figura 10A). Espironolactona previno la sobreexpresión de IL-17, TGF- β 1, ROR γ t, IL-1 β e IL-23p19. Sin embargo la expresión de Foxp3 fue incrementada por el tratamiento ESPIRO en este tiempo (Figura 10F).

Al día 16 del estudio, observamos un aumento significativo de la abundancia renal de IL-17 en ratas sometidas al tratamiento DOCA respecto al grupo uninefrectomizado, (Figura 10A), lo cual coincidió con el aumento de TGF- β 1, IL-1 β e IL-23p19 (Figuras 10B, 10C y 10D). Los aumentos de las citoquinas proinflamatorias e IL-17 a nivel renal se acompañaron por la disminución del ARNm FoxP3 en el grupo DOCA (Figura 10E). En este período de estudio, espironolactona previno el aumento inducido por DOCA de las distintas citoquinas, aumentando significativamente los niveles de ARNm FoxP3 (Figura 10E).

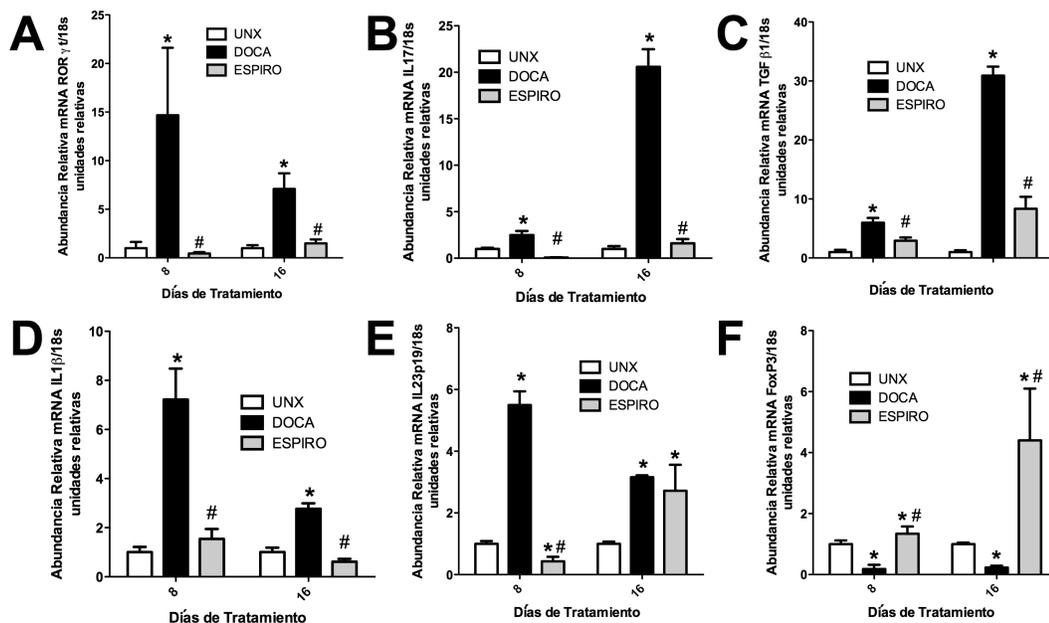


Figura 10 Abundancia relativa renal de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.

Se analizó la abundancia de mRNAs como se indicó previamente (A), IL-17 (B), TGF- β 1 (C), IL-1 β (D), IL-23 (subunidad p19) (E) y FoxP3 (F). Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4 por grupo) *p< 0,05 vs valor basal, y #p< 0,05 vs DOCA.

6.9 El tratamiento DOCA induce la expresión proteica de IL-17A a nivel renal.

Dado el aumento de la abundancia de los ARNm para IL-17 a nivel renal ya antes observado a los 8 días y su caída posterior a los 16 días de iniciado el tratamiento DOCA (Figura 11A), se asocio a los 16 días con los niveles de expresión proteica en riñón total de IL-17 los cuales aumentaron aproximadamente nueve veces sobre la situación control (Figura 11A). Estos incrementos fueron prevenidos por espironolactona en riñón, a los 16 días.

Los niveles de expresión de TGF- β 1 aumentaron en ratas DOCA y son concordantes con los descritos en la figura 10B; el tratamiento con espironolactona previno completamente la inducción de TGF- β 1 tanto a los 8 como a los 16 días de tratamiento (Figura 11B).

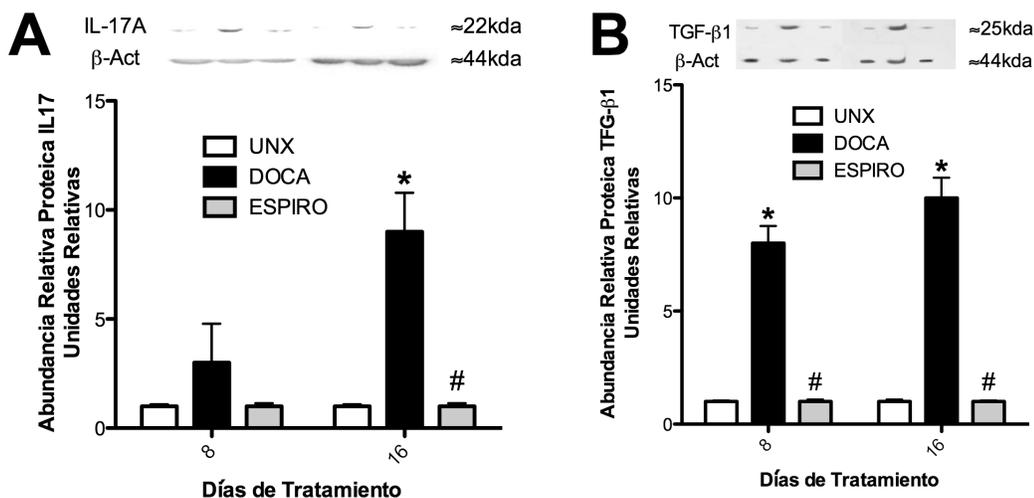


Figura 11 Abundancia de IL-17A y TGFβ1 en riñón de ratas DOCA.

Se cargaron 40 μ g de homogenado de proteína renal de ratas sometidas al tratamiento, a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. Los paneles superiores son estudios de *Western blot* representativos. Los gráficos corresponden a la relación IL-17A/ β -actina (control de carga), expresada como abundancia relativa para cada una de las condiciones. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4 por grupo) * p < 0,05 vs valor basal, y # p < 0,05 vs DOCA.

6.10 El tratamiento DOCA induce un infiltrado renal de linfocitos T CD4⁺/IL-17A⁺ a los 8 y 16 días.

El aumento de la expresión proteica de IL-17 renal observada por *Western blot* (Figura 11A y 11B), se asocio con un aumento del infiltrado renal de linfocitos T CD4⁺ y de células Th17 a los 8 días en el glomérulo (Figura 12A). Sin embargo, en la médula renal no se observó infiltrado (dato no mostrado). A los 16 días de tratamiento se observa un aumento de la infiltración en médula renal (Figura 12B). Este aumento fue de aproximadamente 90 veces para CD4⁺ y 40 veces para IL-17⁺ en riñón de ratas DOCA con respecto a la condición control (Figura 13A y 13B).

Acorde con los resultados anteriores, el uso de espironolactona previno la infiltración renal de linfocitos T CD4⁺/Th17⁺ a los 8 y 16 días de tratamiento.

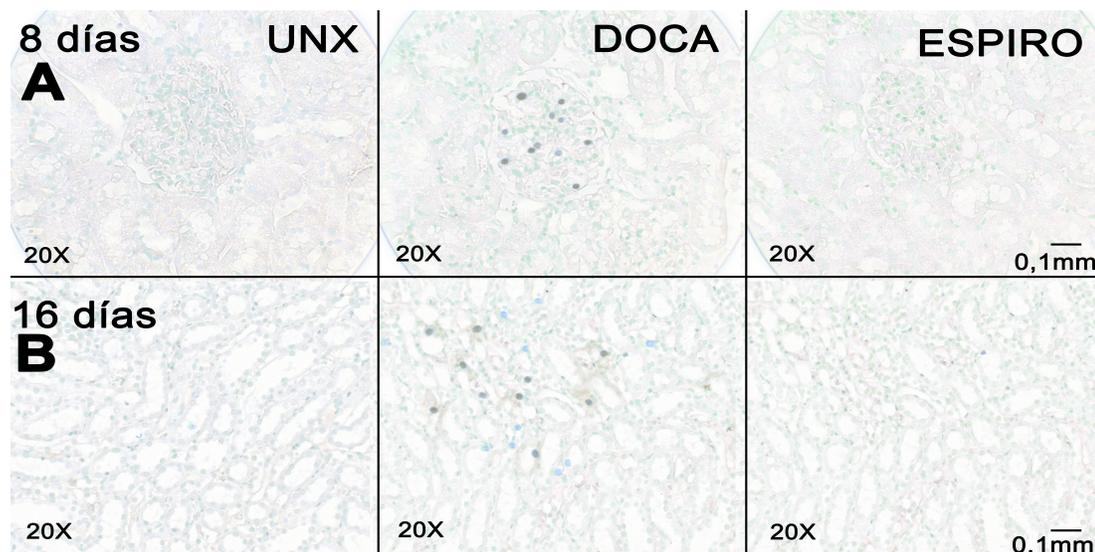


Figura 12 Inmunohistoquímica de células CD4⁺/IL-17A⁺ en riñón de ratas DOCA.

Cortes renales incluidos en parafina fueron fijados con formalina al 10% e incubados con doble anticuerpos específicos para la detección de CD4 (azul), IL-17A (café) y control de núcleos (verde), en ratas DOCA al día 8 en corteza renal (A) y 16 días en médula renal (B).

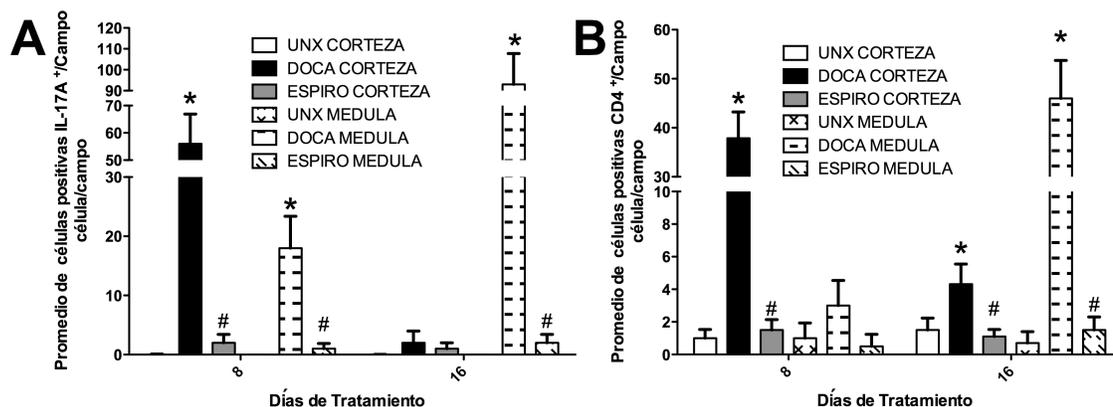


Figura 13 Cuantificación de células CD4⁺/IL-17A⁺ en riñón de ratas DOCA.

Los gráficos corresponden a una cuantificación de nefronas por campo en cuanto a la presencia de marca para CD4 (A) e IL-17 (B), expresada como el promedio para cada una de las condiciones. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4) * $p < 0,05$ vs valor basal, y # $p < 0,05$ vs DOCA.

6.11 Expresión del ARNm de IL-17A, de citoquinas y factores de transcripción, favorecen la vía Th17, y de FoxP3 en miocardio.

En el día 8, el tratamiento DOCA indujo un aumento significativo de la abundancia del factor de transcripción ROR γ t y de la citoquina IL-23p19 (Figuras 14A y 14E), con respecto al grupo control uninefrectomizado. A pesar de ello, no se detectaron cambios en la expresión de IL-17 en el corazón de los animales DOCA (Figura 14B). La expresión de FoxP3 no fue modificada significativamente ni tampoco TGF- β 1 y IL-1 β (Figura 14C y 14D). Espironolactona previno la sobreexpresión de IL-23p19 e indujo la sobreexpresión del FoxP3 y de ROR γ t (Figura 14A y 14F).

Al día 16 del estudio, observamos un aumento significativo de la abundancia cardíaca de IL-17 en ratas DOCA (Figura 14A), lo cual coincidió con el aumento de TGF- β 1, IL-1 β e IL-23p19 (Figuras 14C, 14D y 14E).

En este período de estudio, espironolactona previno el aumento inducido por DOCA de las distintas citoquinas, aumentando significativamente los niveles de FoxP3 (Figura 14C y 14D). Al compararse con lo observado en animales

controles y en los DOCA (Figura 14F). El factor de transcripción ROR γ t se mantuvo inducido en el grupo DOCA (Figura 14A).

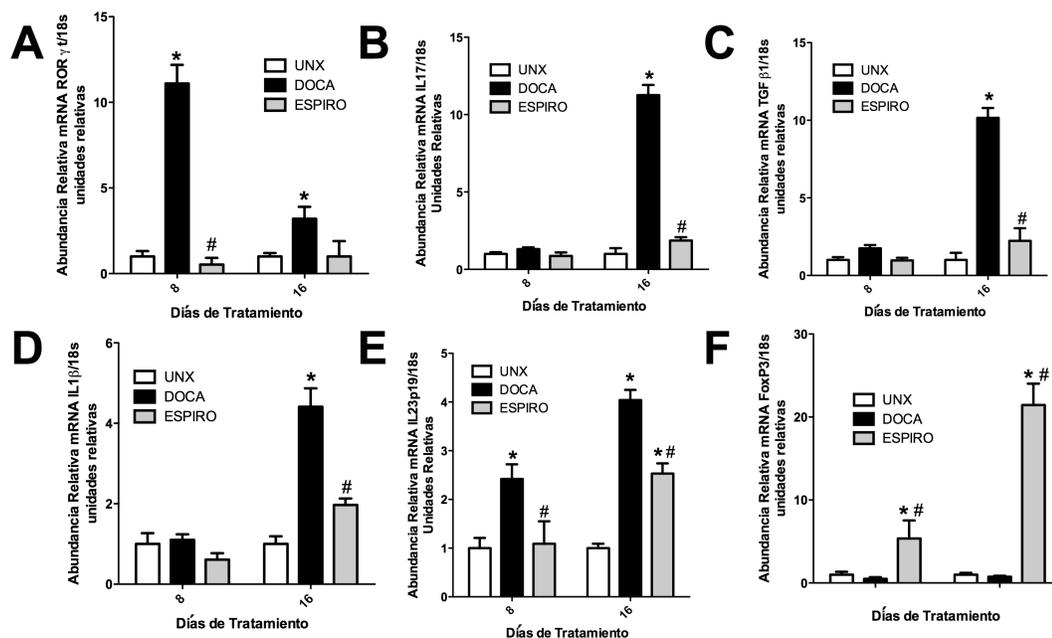


Figura 14 Abundancia relativa cardíaca de IL-17A, de citoquinas que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17, y de FoxP3.

Se obtuvo ARN total para transcripción reversa de corazón. Con el ADNc de cada muestra se realizó un PCR en tiempo real para: ROR γ t (A), IL-17 (B), TGF- β 1 (C), IL-1 β (D), IL-23 (subunidad p19) (E) y FoxP3 (F), a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. Como estándar interno se utilizó producto 18S (constitutivo), expresando la abundancia de cada citoquina como la razón relativa con 18S. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4 por grupo) *p < 0,05 vs valor basal, y #p < 0,05 vs DOCA.

6.12 El tratamiento DOCA-sal induce la expresión proteica de IL-17A a nivel cardíaco.

A los 16 días observamos un aumento de la abundancia de IL-17 cardíaca en el grupo DOCA. Por otra parte, TGF- β 1 aumentó a los 16 días. Estos incrementos fueron bloqueado completamente por espironolactona.

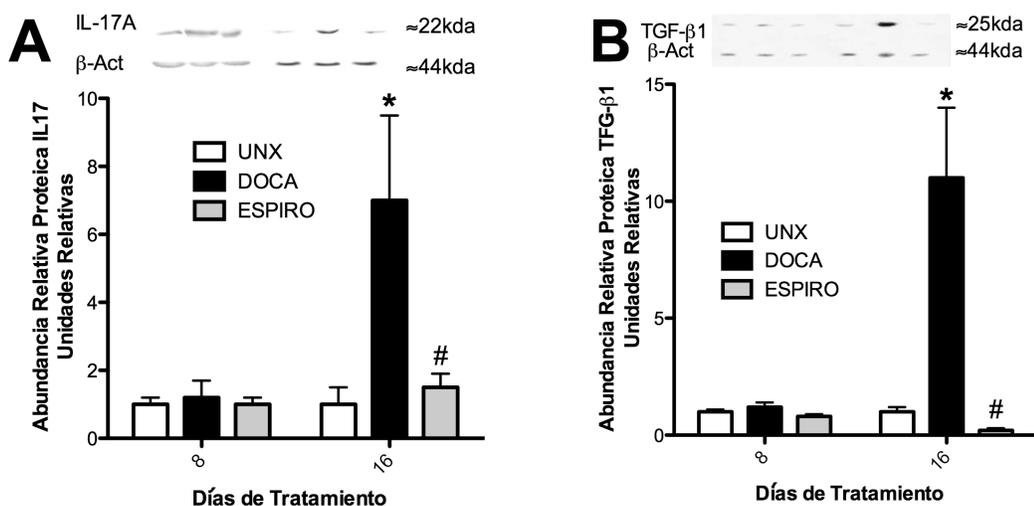


Figura 15 Abundancia de IL-17A y TGF- β 1 en corazón de ratas DOCA-sal.

Se cargaron 40 μ g de homogenado de proteína de corazón de ratas sometidas al tratamiento, a los 8 y 16 días después de iniciado el estudio. El panel superior muestra estudios representativos (*Western blot*). Los gráficos corresponden a la relación IL-17A/ β -actina (14A) y TGF- β 1/ β -actina (14B), expresada como abundancia relativa para cada una de las condiciones. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=4 por grupo) *p < 0,05 vs valor basal, y #p < 0,05 vs DOCA-sal.

6.13 El tratamiento DOCA induce un infiltrado miocárdico de linfocitos T CD4⁺/IL-17A⁺ a los 8 y 16 días.

En las secciones de tejido cardíaco de los animales tratados con DOCA (8 días) se observó, infiltración de células linfocitarias CD4⁺/IL-17A⁺ con localización perivascular (18,32 células CD4⁺/campo, 47,2 células IL-17A⁺/campo). Sin embargo, algunas células IL-17⁺ no presentaron marcaje CD4 (28,8 células IL-17A⁺ sin CD4⁺/campo). Además se observa marcaje IL-17A en endotelio. La

infiltración IL-17A⁺/CD4⁺ del grupo ESPIRO fue similar al la del grupo UNX (4,2 células CD4⁺/campo, 12,2 células IL-17A⁺/campo) (Figura 16A, 17A y 17B).

A los 16 días, el grupo DOCA también mostró infiltración de células linfocitarias CD4⁺/IL-17A⁺ con localización perivascular (31,75 células CD4⁺/campo, 91,0 células IL-17A⁺/campo), algunas células IL-17⁺ sin marcaje CD4 (59,25 células IL-17A⁺ sin CD4⁺/campo) y aumento en el marcaje endotelial. La de infiltración IL-17A⁺/CD4⁺ fue prevenida con el tratamiento ESPIRO (9,2 células CD4⁺/campo, 1 célula IL-17A⁺/campo) (Figura 16B, 17A y 17B).

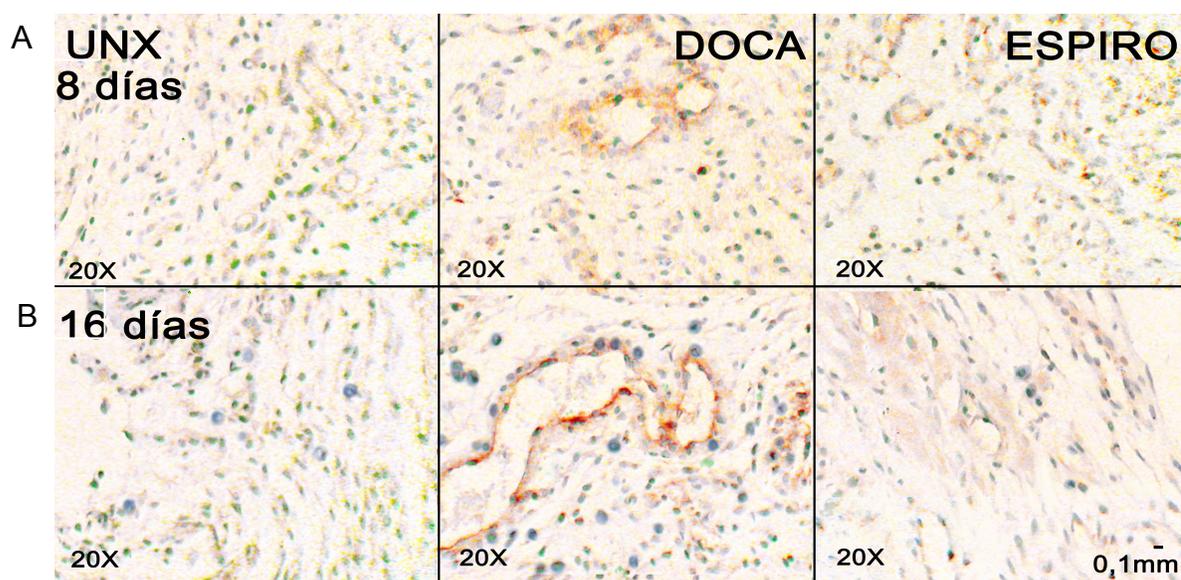


Figura 16 Inmunohistoquímica de células CD4⁺/IL-17A⁺ en corazón de ratas DOCA.

Ventrículos fueron fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina. Secciones de 5 micrómetros fueron incubadas con anticuerpos específicos para la detección de CD4 (Color Azul) y IL-17A (Color Café). Además se utilizó marcador nuclear (Color Verde). El panel muestra fotografías representativas de cortes histológicos de animales de los diferentes grupos experimentales (indicados en cada panel) a 8 (A) y 16 días (B).

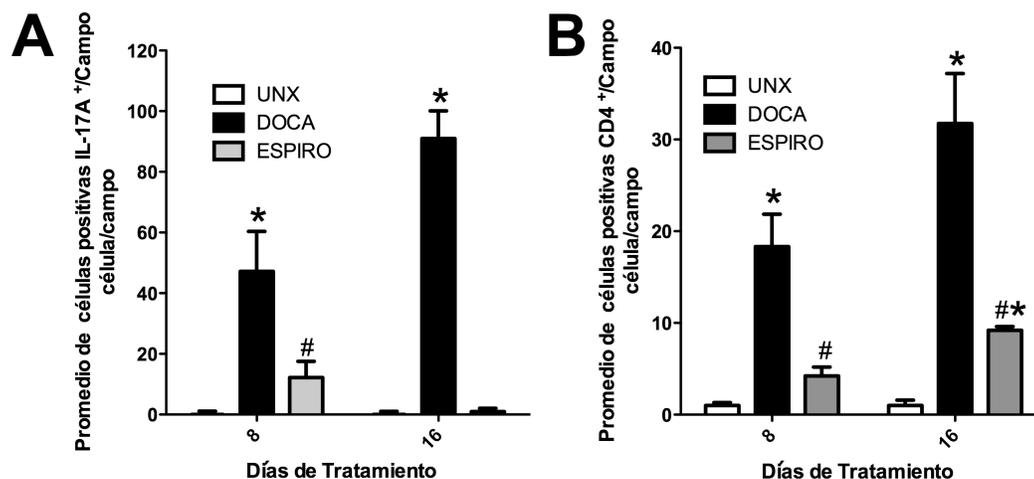


Figura 17 Cuantificación de células CD4⁺/IL-17A⁺ en corazón de ratas DOCA.

Los gráficos corresponden a una cuantificación de células positivas para la marcación IL-17 (A) y CD4(B), expresada como el promedio para cada una de las condiciones (misma magnificación). Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=10) *p< 0,05 vs valor basal, y #p< 0,05 vs DOCA.

6.14 El tratamiento DOCA induce un infiltrado renal y cardíaco de células dendríticas CD11c⁺ a los 16 días.

A los 16 días se observó una infiltración de células dendríticas (CD11c⁺) entre los cardiomiocitos y en la medula renal, no evidenciando una localización en particular. Este fenómeno fue prevenido por el uso del tratamiento de espironolactona (Figura 18A,18B y 19).

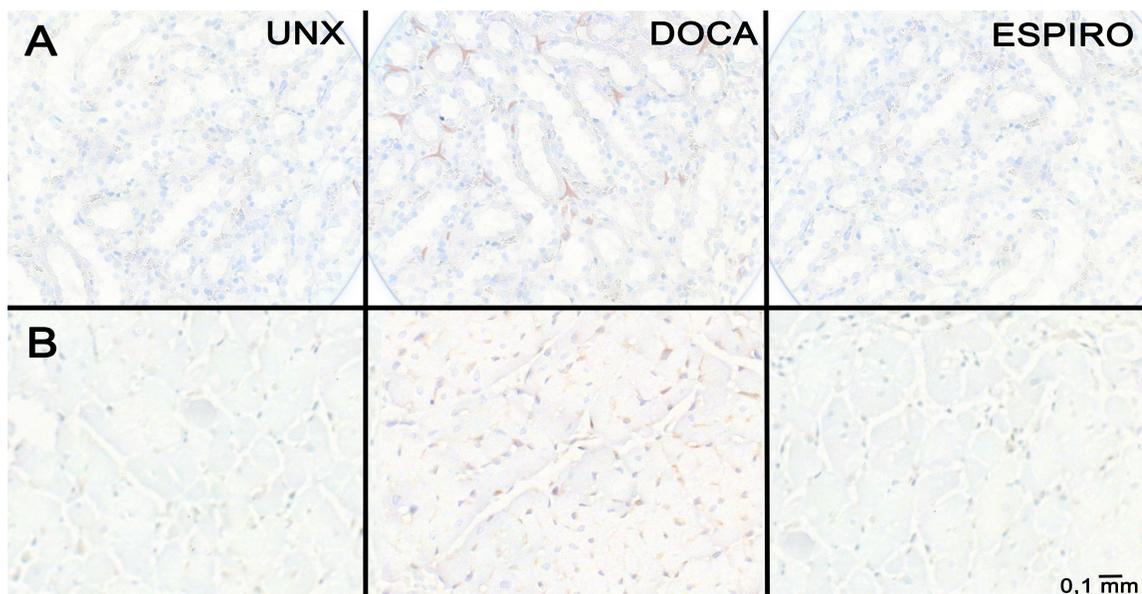


Figura 18 Inmunohistoquímica de células $CD11c^+$ en corazón y riñón de ratas DOCA.

(A) Cortes de ventrículo incluidos en parafina fueron fijados en formalina al 10% e incubados con anticuerpos específicos para la detección de CD11c (color café) en corazón 10X (panel superior 18A) y (B) Corte de medula renal 20X (panel inferior 18B), en ratas DOCA al día 16 y marcador nuclear (color violeta).

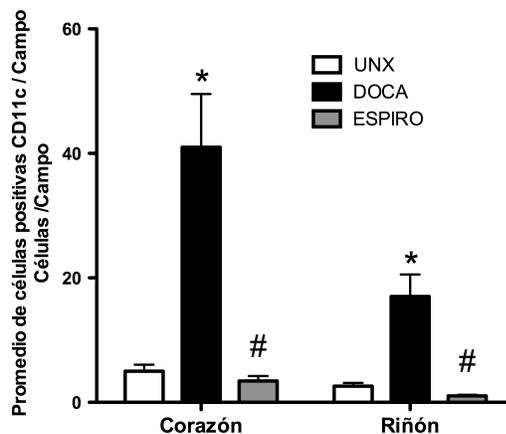


Figura 19 Cuantificación de células $CD11c^+$ en riñón de ratas DOCA.

El gráfico representa el promedio \pm EE de la cuantificación de células $CD11c^+$ en Corazón y Riñón, para cada una de las condiciones experimentales (n=4 por grupo) * $p < 0,05$ vs valor basal, y # $p < 0,05$ vs DOCA.

6.15 Triterapia previene el desarrollo de hipertensión arterial en ratas DOCA

Al cuarto día de iniciado el tratamiento, observamos aumento significativo de la presión arterial sistólica de ratas DOCA (0,5 mg/0,1kg DOCA – 1% NaCl), respecto al grupo uninefrectomizado que recibió sólo vehículo (116,06 ± 5,5 mm Hg vs 96,6 ± 1,1 mm Hg, $p < 0,001$) (Figura 20). Esta diferencia se mantuvo a lo largo del período de estudio. El tratamiento con Triterapia (Hidroclorotiazida 4 mg/kg/día, Reserpina 0,32 mg/kg/día, Hidralazina 6,5 mg/kg/día) previno el desarrollo de hipertensión arterial (96,0 ± 5,1 mm Hg vs 116,06 ± 5,5 mm Hg, $p < 0,001$).

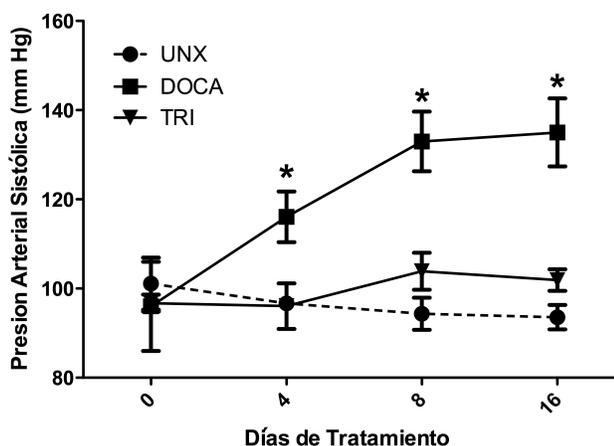


Figura 20 Presión arterial sistólica en ratas DOCA y en ratas tratadas con Triterapia

Los valores corresponden al promedio ± EE (n=5 por grupo). El asterisco indica $p < 0,001$ vs valores basales del grupo UNX.

6.16 El tratamiento triterapia no disminuye la expresión de IL-17A ni en corazón ni en riñón a los 16 días de tratamiento.

La activación de la vía Th17 en corazón y riñón podría depender de factores hemodinámicos que eventualmente podrían activar esta vía inflamatoria. Para

evaluar esta hipótesis evaluamos un grupo de animales DOC que además recibió triterapia anti-hipertensiva, no bloqueante de MR (Figura 20).

En estos animales a los 16 días de tratamiento se logró la disminución de la presión arterial, pese al tratamiento DOCA y la dieta rica en sal. Como se muestra en la figura 21, en el día 16, la triterapia no previno la inducción de la IL-17A en corazón (Figura 21A) y riñón (Figura 21C). La abundancia de citoquina de mantención IL-23p19 en riñón y corazón, al igual que la IL-17A no presentaron disminuciones significativas en la expresión con la triterapia (Figura 21B y 21D). Por lo tanto, el tratamiento hipotensor por vías no asociadas al bloqueo del receptor MR, no previno la inducción de IL-17A o de IL-23p19.

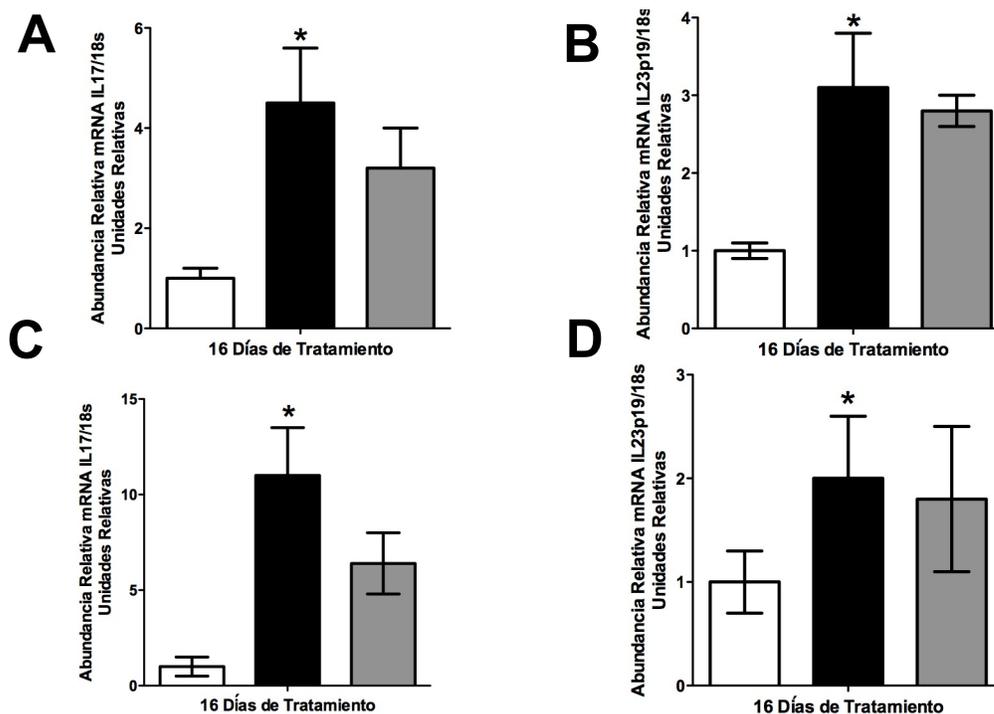


Figura 21 Abundancia relativa en corazón y riñón con triterapia de las citoquinas IL-17A y IL-23p19, las que favorecen la polarización y el mantenimiento de la vía Th17.

RT-PCR en tiempo real para: IL-17A de corazón (A), : IL-17A de riñón (C), : IL-23p19 de corazón (B), : IL-23p19 de riñón (D), a los 16 días después de iniciado el estudio. Como estándar interno se utilizó producto 18S (constitutivo), expresando la abundancia de cada mensajero como la razón relativa con 18S. Los valores corresponden al promedio \pm EE (n=8 por grupo) *p< 0,05 vs valor basal.

7. Discusión

El objetivo del presente estudio fue probar si la inflamación que caracteriza la hipertensión arterial por DOCA-sal produce activación Th17 en forma dependiente de la actividad del MR.

7.1 Validación del modelo experimental.

Un primer grupo de estudios estuvo orientado a la validación del modelo DOCA-sal. Nuestros resultados muestran que las ratas uninefrectomizadas sometidas al tratamiento experimental desarrollaron rápidamente hipertensión arterial, la que fue significativa ya a partir de los 4 días de tratamiento y que se estabiliza posterior a los 8-16 días de tratamiento (Figura 2, Tabla 2). De acuerdo a lo esperado, observamos que el bloqueo farmacológico del MR con espironolactona previno el desarrollo de hipertensión. Más aun, la hipertrofia cardíaca y renal (Figura 3), así como también el deterioro de la función renal, estimada a través de los cambios en el clearance de creatinina y desarrollo de proteinuria (Figuras 4 y 5), también fueron prevenidos por el tratamiento con espironolactona. Este resultado es concordante con estudios previos de la literatura (Christ y Martin 1999; Takeda *et al.*, 200 y 2001; Liao 2008) y validan nuestra metodología. Además, indican que el desarrollo de hipertensión arterial, daño renal y cardíaco son dependientes de la actividad del MR en el modelo DOCA-sal.

7.2 Activación Th17 en ratas DOCA-sal

El desarrollo de inflamación en modelos experimentales hiperaldosteronémicos y/o con hiperactividad del RAAS es conocido desde hace muchos años. Sin embargo, nuestro trabajo muestra por primera vez la activación Th17, en ratas DOCA-sal y en forma dependiente de la activación del MR. Los estudios que

realizamos en células mononucleares sanguíneas mostraron que ya a los 8 días de tratamiento se observa inducción muy significativa del ARNm ROR γ t, un factor de transcripción que controla y es necesario para la polarización Th17 (Figura 6A). Este resultado se acompañó de la inducción en la abundancia del transcrito IL-17 y aumentos de la abundancia de la proteína IL-17 (Figuras 6B y 7). Todos estos resultados son consistentes con la hipótesis de la generación de Th17 en respuesta al tratamiento DOCA-sal.

El análisis de los MNSC de ratas DOCA-sal mostró que tanto la inducción de ROR γ t, así como la inducción de la expresión de IL-17 presentan valores mas altos o significativos a los 8 días de tratamiento (Figuras 6 a 9). Este resultado sugiere que tempranamente (8 días) existe un aumento en el número de Th17 CD4⁺-IL17⁺) circulantes. Sin embargo, estudios recientes de la literatura han demostrado la expresión de IL-17 en tipos celulares distintos a linfocitos T CD4⁺: polimorfonucleares (Li *et al.*, 2010), linfocitos T γ δ (Roark *et al.*, 2008, Martin *et al.*, 2009, Sutton *et al.*, 2009), NKT (Reynolds *et al.*, 2010) y otras células linfoideas poco caracterizadas (Turner *et al.*, 2012). Al momento de la realización de este trabajo de tesis no existían reactivos para realizar estudios de marcaje de MNSC de rata y citometría de flujo, buscando la identificación de células IL-17⁺. Sin embargo, actualmente nuestro laboratorio cuenta con estos reactivos, y estudios preliminares han demostrado aumento de Th17 en MNSC de ratas DOCA-sal de 8 días. En estos experimentos también observamos la presencia de células sanguíneas IL-17⁺ que no presentan marcaje CD4, las que darían cuenta de aproximadamente el 50% de la población que es inducida por el tratamiento DOCA-sal. Estos resultados indican que además de Th17 es posible que el tratamiento DOCA-sal genere linfocitos T γ δ . Datos recientes de la literatura muestran que en el caso de la glomerulonefritis experimental en ratones, en que el daño autoinmune es dependiente de IL-17, células T γ δ son productoras tempranas de IL-17A en el riñón, las que se activan antes de la llegada de Th17 al riñón (Turner *et al.*,

2012). Se ha propuesto que los linfocitos $T\gamma\delta$ tienen funciones inmunomodulatorias en la respuesta innata y adaptativa, y han sido asociados a la producción de IL-17A en diversas enfermedades autoinmunes (Shibata 2012; D'Acquisto y Crompton 2012). Además, estudios recientes muestran que los $LT\gamma\delta$ promueven el rechazo del injerto cardíaco y la producción de IL-17 (Kimura *et al.*, 2012). En animales adultos, los $LT\gamma\delta$ se encuentra en órganos linfoides secundarios y en tejidos epiteliales como el riñón (Shibata 2012; Turner *et al.*, 2012). En contraste a las células Th1, Th2 o Th17, las células $T\gamma\delta$ tendrían la capacidad de producir IL-17A en un estado “antigen naive”, podrían ser activadas por moléculas no-peptídicas, y podrían participar en la maduración inflamatoria de las células dendríticas (Casetti y Martino 2008; Shibata 2012; D'Acquisto y Crompton 2012). Por lo tanto, aunque aun no hemos estudiado específicamente si en las ratas DOCA-sal se encuentra linfocitos $T\gamma\delta$, estos podrían representar una primera respuesta inflamatoria tipo IL-17A, y su detección en sangre podría reflejar su generación en los órganos linfoides secundarios.

Otra alternativa que deberá ser explorada es la presencia de células NKT (Reynolds *et al* 2010), las cuales tienen como determinante antigénico ser $IL17^+$, $CD4^-$ y $CD138^+$. Resultados de recientes estudios (Vidlak y Kielian, 2012; Vietinghoff y Ley, 2010; Raifer *et al.*, 2012) han asociado la vía IL-17 a células NKT. De este modo, pudiera ser que NKT también contribuyan al desarrollo de respuesta IL-17 en ratas DOCA-sal.

Los resultados de los estudios de determinación de abundancia del ARNm y proteína IL17 en el bazo de ratas DOCA-sal también muestra un aumento máximo a los 8 días, el que es acompañado del aumento de los transcritos codificantes para IL-1 β y TGF- β 1. Estos resultados son consistentes con un modelo general de activación de la respuesta inmune adaptativa inflamatoria, en respuesta al tratamiento DOCA-sal, en la que tempranamente ocurre presentación antigénica en órganos linfoides secundarios, en los cuales se

produce la polarización de linfocitos T naive a fenotipo Th17. En el modelo de glomerulonefritis experimental en el ratón, la aparición de Th17 en el riñón ocurre 6-10 posterior a la inyección del suero nefrotóxico (Turner *et al.*, 2012). Además, estudios del curso temporal de la activación de IL-17 y Th17 en otras enfermedades autoinmunes, e infecciones parasíticas muestran un aumento temprano en el bazo, seguido por los incrementos de IL-17 en órganos periféricos donde se establece inflamación crónica.

Nuestros estudios de inmunohistoquímica en tejido renal y cardíaco mostraron una asociación entre la presencia de células CD4⁺ e IL17⁺ (Figuras 12 y 16). Esto es sugerente de la presencia de Th17 como parte del infiltrado inflamatorio causado por el tratamiento DOCA-sal. Consistente con esta hipótesis, encontramos que la inducción de ROR γ t, IL-17 y las citoquinas polarizantes a fenotipo Th17 en corazón y riñón de ratas DOCA-sal alcanza su valor máximo a los 16 días de tratamiento (Figuras 10 y 14). Resultados similares, la aparición de Th17 en el tejido inflamado, han sido reportados en el modelo murino de rechazo de alotransplante cardíaco (Kimura *et al.*, 2012) y en modelos de isquemia-reperfusión-sobrecarga de presión, en los que junto con producción de IL-17A por cardiomiocitos se observa la aparición de células mononucleares en el intersticio, productoras de IL-17 (Baban *et al.*, 2013).

Además del patrón temporal en la inducción de IL-17A, bazo-MNSC y luego riñón y corazón, en el caso del riñón observamos la presencia de células CD4⁺ e IL17⁺ a nivel de corteza a los ocho días, mientras que a los dieciséis días la infiltración aumenta, y la mayor parte de células CD4⁺ e IL17⁺ se encuentra en la médula renal (Figuras 12 y 13). Este resultados es sugerente de un cambio en la zona de producción del estímulo antigénico principal y/o las células presentadoras de antígeno, responsable de la localización renal de las Th17.

7.3 Potenciales efectos de la activación de Th17 en ratas DOCA-sal

Independientemente de las células responsables de la producción de IL-17A, su inducción podría tener un importante rol patogénico en el daño de tejidos blanco de la hipertensión DOCA-sal.

IL-17 activa células inflamatorias, células endoteliales y células epiteliales, induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión (Reynolds *et al.*, 2010; Miosec y Kuchroo 2009). Madhur y colaboradores (2010) mostraron que la infusión de angiotensina II a animales KO IL-17 (IL-17^{-/-}) produce una respuesta hipertensiva aguda, pero que a diferencia de lo observado en animales fenotipo silvestre, no logra mantenerse en el tiempo; a los 3 meses de infusión de angiotensina II los animales IL-17^{-/-} son normotensos. Este resultados sugiere que IL-17 es necesaria para la hipertensión secundaria a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y que podría tener un papel parecido en el caso de la hipertensión por DOCA-sal en la rata. Futuros estudios, utilizando anticuerpos específicos para el bloqueo de IL-17A podrán evaluar el papel de la citoquina en la hipertensión de ratas DOCA-sal.

Un segundo efecto nocivo de la inducción de Th17 podría ser la generación de estrés oxidativo. Estudios de los últimos 15 años han demostrado que la activación del MR causa la producción de especies radicalarias del oxígeno (ROS) vía inducción de la actividad de la NADPH oxidasa (Brown 2008; Michea *et al.*, 2008). La incubación de células de músculo liso vascular o células endoteliales en presencia de IL-17A induce la producción de ROS (Pietrowski *et al.*, 2011; Huppert *et al.*, 2010). Este efecto es bloqueado por la inhibición farmacológica de la NADPH oxidasa, así como también por anticuerpos anti-IL-17A (Pietrowski *et al.*, 2011; Huppert *et al.*, 2010). Estudios previos del laboratorio han demostrado que espironolactona inhibe la producción de ROS en el corazón y la inducción de NADPH oxidasa en ratas nefrectomizadas

hipertensas, incluso en dosis bajas que no disminuyen la presión arterial (Michea *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que en el caso de ratas DOCA-sal, el bloqueo del MR podría disminuir la generación de ROS, en parte debido a la prevención de la activación de la NADPH oxidasa por IL-17A en los tejidos blanco de daño hipertensivo.

Finalmente, la inducción de IL-17A podría tener un efecto profibrótico directo en los tejidos. Es conocido que la dieta rica en sal y mineralocorticoides causan fibrosis cardiovascular y renal, y que estos efectos se pueden prevenir mediante el tratamiento con antagonistas farmacológicos del MR. Los mecanismos responsables de la fibrosis no se han dilucidado aun, pero se ha caracterizado que implica la inducción en la expresión de colágeno tipo1 y la regulación positiva del *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF; Brown 2008). En el presente estudio observamos que la inducción de IL-17A correlaciona con la fibrosis y remodelación de los tejidos. Estudios in vivo han demostrado que IL-17A es una proteína pro-fibrótica en la miocarditis experimental autoinmune, y es un agente causal de la remodelación y la progresión de la miocardiopatía dilatada experimental (Baldeviano *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). La disminución de la expresión del receptor de IL-17A en corazones de ratas espontáneamente hipertensas reduce la síntesis de colágeno tipo1 y el entrecruzamiento de las fibras colágenas de la matriz extracelular miocárdica (Liu *et al.*, 2011). Por lo tanto, es probable que el aumento de IL-17A en los tejidos renal y cardíaco, inducido por el tratamiento DOCA-sal, sea uno de los mecanismos profibróticos presentes en el daño de tejidos blanco secundario a la hipertensión por mineralocorticoides-sal.

7.4 Papel de la actividad del MR en la respuesta Th17 de las ratas DOCA-sal

Un tercer grupo de resultados muy relevante de nuestros estudios, es la observación de que la inducción de ROR γ t, IL17A y de la expresión de las

citoquinas polarizantes a fenotipo Th17, son prevenidos por el tratamiento de con espironolactona. Además, espironolactona previno la hipertensión arterial. El efecto antiinflamatorio de espironolactona es conocido no sólo en los modelos experimentales, sino que también en pacientes humanos (Søren *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha no es claro si se debe a mecanismos directamente dependientes de la actividad del MR y/o a un efecto hemodinámico deletéreo de la hipertensión arterial, actuando sobre riñón y/o corazón.

Por ello, evaluamos si la triterapia antihipertensiva era efectiva en la prevención de la inducción Th17. Observamos que el tratamiento DOCA-sal indujo esta vía proinflamatoria, aun cuando el tratamiento antihipertensivo permitió prevenir completamente el aumento de presión arterial sistólica (Figuras 20 y 21). Concluimos que el efecto de DOCA-sal no depende de un factor hemodinámico, y que sí depende de la actividad del MR. Este resultado muestra una respuesta diferencial en relación a lo que ha sido recientemente observado en el corazón de ratones sometidos a sobrecarga de presión (coartación aórtica) e isquemia/reperfusión, en los que la inducción de IL-17 es dependiente de la sobrecarga hemodinámica (Baban *et al.*, 2013). Esta aparente discordancia puede reflejar diferencias interespecies y/o de los modelos experimentales.

La existencia de un mecanismo MR-dependiente para la inducción Th17 en las ratas DOCA-sal, plantea la pregunta de cual(es) es(son) la(s) célula(s) o tejidos necesarios para la inducción de la respuesta inflamatoria. Nuestros estudios colaborativos previos (Herrada *et al.*, 2011), demostraron la presencia del MR en células dendríticas, mientras que en linfocitos la proteína no fue detectable. Este resultado sugiere que la inducción de IL-17 no depende directamente de la actividad del MR en linfocitos; es posible que el MR presente en las DCs tenga una acción inmunomoduladora proinflamatoria. El papel de las DCs en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias es complejo, y es poco conocido debido a la existencia de diversos fenotipos de DCs. La hipótesis

general más aceptada es que en la enfermedad autoinmune actúan como células presentadoras de autoantígenos, con un fenotipo maduro proinflamatorio, perdiendo parte de su función inmunomoduladora/tolerogénica fisiológica (Hawinger *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la maduración de células dendríticas a fenotipo proinflamatorio vs tolerogénico puede ser modulada por receptores para hormonas esteroidales, como el ácido retinoico, la vitamina D y los glucocorticoides. En general, los glucocorticoides, presumiblemente mediante la activación del receptor de glucocorticoides citosólico (GR), inducen el fenotipo tolerogénico. GR y MR comparten los mismos elementos reguladores en el genoma, los *Glucocorticoid Response Elements*, por lo que proponemos que la activación del MR puede resultar en la modulación de la maduración de las DCs. A favor de esta hipótesis, nuestros estudios previos (Herrada *et al.*, 2011) mostraron que el tratamiento de DCs con aldosterona y su posterior co-cultivo con linfocitos naive resulta en la polarización a fenotipo Th17 y en la producción de citoquinas propias de la vía. Sin embargo, estudios posteriores permitirán probar esta hipótesis, idealmente con DCs carentes de MR in vitro o animales de experimentación que expresen DCs carentes del MR.

7.5 Inhibición de Tregs en ratas DOCA-sal, en forma dependiente de la actividad MR

Un cuarto grupo de resultados a analizar es la observación de la disminución de la expresión del factor de transcripción *Forkhead box P3* (FoxP3) en la sangre y tejidos de ratas DOCA-sal. FoxP3 es el factor que controla la polarización de linfocitos T naive a fenotipo Tregulador (Treg; Ichiyama *et al.*, 2008; Zhou L *et al.*, 2008). Los Treg son inhibitorios de Th17 y es sabido que la expresión y actividad de ROR γ t vs FoxP3 son mutuamente excluyentes, ya que producen una retroalimentación negativa mutua (Ichiyama *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 2007), determinando la producción de linfocitos T *helper* proinflamatorios (Th17)

vs linfocitos T reguladores (inmunomoduladores/antiinflamatorios; Treg). Nuestros resultados muestran disminución de la expresión de FoxP3 durante la estimulación con DOCA-sal (Figuras 6E, 8E, 10E y 14E). Este resultado es consistente con el desarrollo de la respuesta Th17. Adicionalmente, observamos que el tratamiento con espironolactona permitió un aumento en la expresión de FoxP3 en MNSC y tejidos, que fue significativamente mayor a la que presentaban los tejidos y células de los animales control. Estos resultados indican que en la patogenia de la inflamación que caracteriza al modelo DOCA-sal no sólo hay aumento de Th proinflamatorios, sino que también hay una disminución de los Treg, que resultaría en un desbalance de la función de los linfocitos Th en favor de inflamación, como ha sido postulado para otras enfermedades inflamatorias-autoinmunes (Ivanov *et al.*, 2007). Además, los niveles de expresión de FoxP3 parecen estar inversamente relacionados con la actividad del MR. Aunque durante el desarrollo de esta tesis no fue evaluada por citometría de flujo la presencia de Tregs en sangre y/o tejidos, estudios en desarrollo en nuestro laboratorio han confirmado tanto la disminución de linfocitos Treg en MNSC de ratas DOCA-sal a los 8 días, como también su regulación positiva por el tratamiento con espironolactona.

La importancia en la disminución de Tregs en el desarrollo de hipertensión arterial en ratones que reciben angiotensina II o aldosterona ha sido recientemente comunicada. La transferencia adoptiva de Tregs previa al tratamiento DOCA-sal en ratones previno la infiltración de macrófagos y linfocitos T en la aorta y el riñón (Kasal *et al.*, 2012). En ratones que recibieron angiotensina II, la transferencia adoptiva de Tregs previa a la infusión del péptido vasoconstrictor, previno el aumento de la presión arterial, el estrés oxidativo y la remodelación aórtica (Barhoumi *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que uno de los mecanismos protectores de espironolactona es el aumento de los Treg, sugiriendo una nueva acción de los antagonistas farmacológicos del MR. Estudios posteriores permitirán comparar si esta acción

es compartida por otros bloqueadores MR (eplerenona), que en combinación con estudios en los cuales se logre bloquear la expresión del MR en células inmunes, permitan probar el papel de la actividad MR en el balance de función de los linfocitos Th en la inflamación de la hipertensión arterial.

Modulación de DCs por tratamiento DOCA-sal

Otra observación de nuestro estudio fue que con el tratamiento DOCA-sal se producía aumento de las DCs presentes en corazón y riñón de ratas DOCA-sal. Este resultado sugiere que puede existir reclutamiento de DCs a los tejidos. Estudios en modelos experimentales de daño renal autoinmune por Lupus, indican que en este caso específico, las DCs son necesarias para la expansión y diferenciación de células T en el riñón inflamado, pero sorprendentemente no son necesarias para la iniciación del daño renal inflamatorio (Teichmann *et al.*, 2010). Estudios con animales en los que es posible la eliminación de DCs (inyección de toxina DC-específica) y la transferencia adoptiva de DCs que expresan proteína fluorescente para su rastreo (Anzai *et al.*, 2012), determinaron que en la cicatrización del infarto cardíaco experimental ocurre la llegada al tejido inflamado de DCs mieloides, que controlan el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Anzai *et al.*, 2012). Estudios utilizando este tipo de estrategia nos podrán permitir evaluar la cinética, origen y función de las DCs implicadas en la inflamación presente en la hipertensión arterial MR-dependiente.

7.6 Linfocitos B productores de IL-17

Estudios recientes han demostrado la presencia de linfocitos B productores de interleuquina 17. Al estimular un cultivo celular de linfocitos B CD19⁺ con *T. Cruzi* (Tripomastigote; forma infectante del *Trypanosoma cruzi*) se observa un incremento en la abundancia del transcrito IL-17A y además se observa un incremento del número de LB positivas a IL-17A. Esta expresión se presenta

tanto como resultado de la infección directa con *Trypanosoma cruzi* así como con la incubación de LB en presencia de la enzima trans-sialidasa de este parásito (Bermejo *et al.*, 2013). Esta enzima remueve ácido siálico de las glicoproteínas de membrana (tirosina fosfatasa CD45, las quinasas Src y de BTK-Tec). Esto favorece la formación de agregados proteicos entre proteínas de membrana (*clustering*), lo que estimula a través del *clustering* del TCR de los LB la expresión de interleuquina 17A e Interleuquina 17F tanto en linfocitos B humanas como de ratón. Además el cultivo de LB KO para ROR γ t (ROR γ t^{-/-}) estimulado con *T. Cruzi* mantiene la respuesta de inducción en la expresión de IL-17A. Por lo tanto, la respuesta a la infección por *T. Cruzi* mediante la polarización de LB IL-17 es independiente de ROR γ t. Por otra parte, nuestro estudio muestra la presencia de infiltrado inflamatorio IL-17A+ que no corresponde a células CD4+. Es posible que estas células infiltrativas sean LB IL-17A. Sin embargo, nuestro estudio demostró una muy significativa inducción del transcrito ROR γ t, tanto en células inmunes como en los tejidos. Por lo tanto, nuestro resultado es compatible con la activación de Th17. Para evaluar la eventual presencia de LB IL-17 se deberán realizar estudios de marcación con CD3/IL-17, tanto en células sanguíneas como en los tejidos. Resultados preliminares de estudios de citometría de flujo en células sanguíneas y esplénicas (resultados de C. Amador, no publicados) confirmaron la presencia de Th17, asociada a un *pool* de células IL-17+ que no presenta marcaje CD4⁺. La activación de LB IL-17 en los animales con DOCA-sal podría ser secundaria a la inducción de la proteína Galectina 3, una β -galactosidasa de unión a lectina. Las galectinas actúan como quimioatrayentes para las células inmunes y activan la secreción de citoquinas inflamatorias. Galectina 3 permite el *clustering* de los TCR, uniendo a los azúcares de estas glicoproteínas de superficie, promoviendo su polarización. Estudios recientes han demostrado que Galectina 3 se encuentra aumentada en fibrosis renal y cardíaca (André *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009). Además, ratones KO de

galectina 3 son resistentes a la fibrosis cardiaca. Aldosterona aumenta la abundancia del transcrito y de la proteína Galectina 3, en células musculares lisas de la pared vascular en cultivo e *in vivo* en ratones (Min *et al.*, 2007). Estudios futuros podrán evaluar la potencial inducción de Galectina 3 en ratas DOCA (André *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; de Boer *et al.*, 2010; Drickamer y Taylor 2011; O'Seaghdha *et al.*, 2013)

7.7 Comentario final

A continuación proponemos un modelo del mecanismo que llevaría a la activación Th17 en ratas DOCA-sal. (Figura 22). La activación del MR en células dendríticas potenciaría el desarrollo de la respuesta Th17, disminuyendo al mismo tiempo la polarización Treg. En este modelo, la activación del MR de las DCs jugaría un papel determinante en favorecer el desarrollo de maduración proinflamatoria, en desmedro del fenotipo inmunomodulador/tolerogénico. El primer paso de la polarización a diferentes linajes Th ocurriría en órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos). Es probable que en estos tejidos las DCs realicen la presentación antigénica. La estimulación de clones con TCRs que reconozcan a los antígenos presentados por las DCs permitiría que, luego de los 8 días, la respuesta inflamatoria se localice en los órganos blanco de la hipertensión (corazón y riñón). Este modelo no excluye que además de la inducción de Th17, el tratamiento DOCA-sal produzca la activación de otras células productoras de IL-17 en los tejidos (como linfocitos $\gamma\delta$ o NKT).

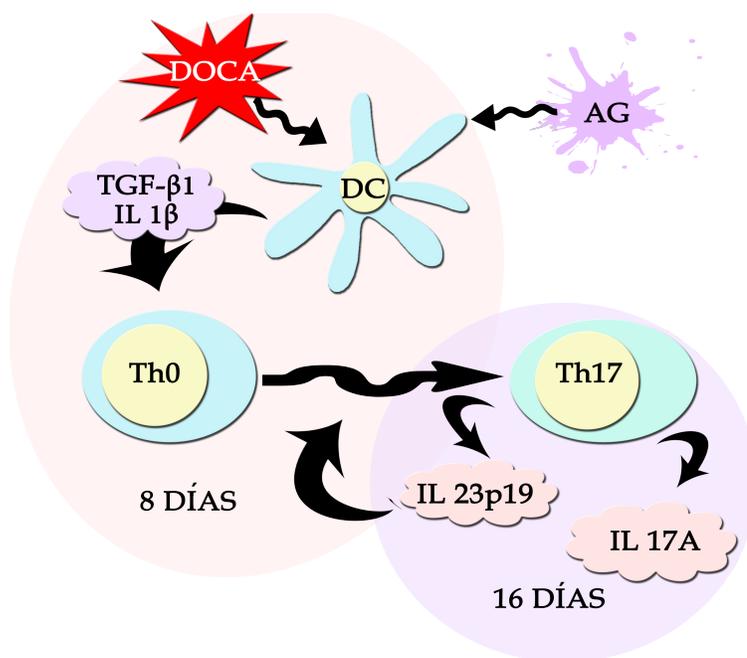


Figura 22 Esquema propuesto para la activación Th17 en órganos diana.

Proponemos que la presentación de un antígeno (AG) y la activación del MR de la DC por el mineralocorticoide (DOCA) activa la polarización Th17. La activación del MR es necesaria para la activación Th17, ya que el bloqueo farmacológico del MR la previene. Proponemos que la activación Th17 es un evento temprano (8 días), postulándose que a los 16 días las células Th17 se encuentran en los tejidos diana del daño hipertensivo.

8. Conclusiones

El tratamiento DOCA-sal en ratas uninefrectomizadas activa la vía Th17.

La estimulación del MR induce la expresión de transcritos (ARNm) codificantes para citoquinas de la vía Th17 en células mononucleares de sangre, bazo, riñón y corazón de animales DOCA-sal.

La activación Th17 ocurre tempranamente (8 días) en células mononucleares y bazo, para observarse luego en riñón y corazón (16 días).

La estimulación del MR induce el incremento de la abundancia de las proteínas de la vía Th17 en células mononucleares de sangre, bazo, riñón y corazón de animales DOCA-sal, con una cinética similar al aumento de los ARNm.

La estimulación del MR indujo la infiltración de células IL-17A⁺ y CD4⁺ en riñón a los 8 y 16 días y en corazón a los 16 días.

La inducción de la vía Th17 en ratas DOCA-sal es dependiente de la actividad del MR.

La inducción de la vía Th17 es independiente del efecto hemodinámico (hipertensión arterial *per se*).

La activación del MR produce la regulación negativa del transcrito FoxP3, sugiriendo disminución de células Treg.

El tratamiento DOCA-sal produce aumento de las DCs en riñón y corazón, en forma dependiente de la actividad MR.

9. Bibliografía

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.SALLUSTO, F. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8: 942-949.

AHOKAS, R.; WARRINGTON, K.; GERLING, I.; SUN, Y.; WODI, L.; HERRING, P.; LU, L.; BHATTACHARYA, S.; POSTLETHWAITE, A.WEBER, K. 2003. Aldosteronism and peripheral bloodpro mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface. *Circ Res* 93: 124-135.

ALDIGIER, J.; KANJANBUCH, T.; MA, L.; BROWN, N.FOGO, A. 2005. Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*. 16: 3306-3314.

ALZAMORA, R.; MARUSIC, E.; GONZALEZ, M.MICHEA, L. 2003. Nongenomic effect of aldosterone on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology* 144: 1266-1272.

ALZAMORA, R.; MICHEA, L.MARUSIC, E. 2000. Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 35: 1099-1104.

AMODIO, G.; GREGORI, S. 2012. Dendritic cells: a double-edge sword in autoimmune responses. *Front Immunol*. 1-9.

ANZAI, A.; ANZAI, T.; NAGAI, S.; MAEKAWA, Y.; NAITO, K. 2012. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*.125: 1234-1245.

BABAN, B.; LIU, JY.; MOZAFFARI, MS. 2013. Pressure Overload Regulates Expression of Cytokines, gH2AX, and Growth Arrest- and DNA-Damage Inducible Protein 153 via Glycogen Synthase Kinase-3b in Ischemic-Reperfused Hearts. *Hypertension*. 61: 95–104.

BARHOUMI, T.; KASAL, DA.; L.; SHBAT, L.; LAURANT, P.; NEVES, M.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. 2011. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 57: 469–476.

BENETOS, A.; LACOLLEY, P.; SAFAR, M. 1997. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17: 1152-1156.

BERMEJO, DA; JACKSON, SW; GOROSITO-SERRAN, M; ACOSTA-RODRIGUEZ, EV; AMEZCUA-VESELY, MC; SATHER, BD, SINGH, AK; KHIM, S; MUCCI, J; LIGGITT, D; CAMPETELLA, O; OUKKA, M; GRUPPI, A; RAWLINGS, DJ. 2013. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol*. 14(5):514-522.

BLASI, E.; ROCHA, R.; RUDOLPH, A.; BLOMME, E.; POLLY, M.MCMAHON, E. 2003. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 62: 1791-1800.

BRILLA, C.; PICK, R.; TAN, L.; JANICKI, J.WEBER, K. 1990. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 67: 1355-1364.

BRILLA, C.; WEBER, K. 1992. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res* 26: 671-677.

BROWN, N. 2008. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension* 51: 161-167.

CASETTI, R.; MARTINO, A. 2008. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 5: 161–170.

CHABAUD, M.; DURAND, J.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.MIOSSEC, P. 1999. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 42: 963-970.

CHRIST, M.; MARTIN, W. 1999. Rapid actions of aldosterone: Lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 64: 35-41.

CHUN, T.; CHANDER, P.; KIM, J.; PRATT, H.; STIER, C. 2008. Aldosterone, but not Angiotensin II, Increased Profibrotic Factors in the Kidney of Adrenalectomized Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Physio Endo Metab.* 295: E305-E312.

D'ACQUISTO, F.; CROMPTON, T. 2011 CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response?, *Biochem Pharmacol.* 82: 333–340.

DE BOER, RA; YU, L; VAN VELDHUISEN, DJ. 2010 Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 7: 1–8.

DING H, YANG J, DING J, CHEN P, ZHU P. 2012. Interleukin -17 contributes to cardiovascular disease. *Mol Biol Rep.* 39: 7473-7478.

DRICKAMER, K; TAYLOR, M. 2011. Chapter 9: Carbohydrate recognition in cell adhesion and signalling. **In:** *Introduction to Glycobiology* 3rd ed. Oxford University Press. New York. USA. pp 128-150.

DUPREZ, D.; BAUWENS, F.; BUYZERE, M.; BACKER, T.; KAUFMAN, J.; HOECKE, J.; VERMEULEN, A.; CLEMENT, D. 1993a. Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol.* 71: 17A-20A.

DUPREZ, D.; BUYZERE, M. D.; BACKER, T. D.; KAUFMAN, J.; HOECKE, M. V.; VERMEULEN, A.; CEMENT, D. 1993b. Influence of systemic arterial blood pressure and nonhemodynamic factors on the brachial artery pulsatility index in mild to moderate essential hypertension. *Am J Cardiol* 71: 350-353.

EID, R.; RAO, D.; ZHOU, J.; LO, S.; RANJBARAN, H.; GALLO, A.; SOKOL, S.; PFAU, S.; POBER, J.; TELLIDES, G. 2009. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 119: 1424-1432.

FIEBELER, A.; SCHMIDT, F.; MÜLLER, D.; PARK, J.; DECHEND, R.; BIERINGER, M.; SHAGDARSUREN, E.; BREU, V.; HALLER, H.LUFT, F. 2001. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappab activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 37: 787-793.

FRACCAROLLO, D.; GALUPPO, P.; SCHRAUT, S.; KNEITZ, S.; VAN ROOIJEN, N.; ERTL, G.BAUERSACHS, J. 2008. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 51: 905-914.

FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.

GALLAY, B.; AHMAD, S.; XU, L. 2001. Screening for primary aldosteronism without discontinuing hypertensive medications: plasma aldosterone-renin ratio. *Am J Kidney Dis* 37: 699-705.

GERLING, I.; SUN, Y.; AHOKAS, R.; WODI, L.; BHATTACHARYA, S.; WARRINGTON, K.; POSTLETHWAITE, A.; WEBER, K. 2003. Aldosteronism: an immunostimulatory state precedes proinflammatory / fibrogenic cardiac phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: 813-821.

GILBERT, K.; BROWN, N. 2010. Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*;17: 199-204.

GORDON, R.; ZIEZAK, M.; TUNNY, T.; STOWASSER, M.KLEMM, S. 1993. Evidence that primary aldosteronism may not be uncommon twelve percent

incidence among antihypertensive drug trial volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20: 296-298.

GREENE, E.; KREN, S.HOSTETTER, T. 1996. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 98: 1063-1068.

GUZIK, T.J.; HOCH N.; BROWN, K.; MCCANN, L.; RAHMAN, A; DIKALOV, S.; GORONZY, J.; WEYAND, C.; HARRISON, D. 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.*; 204: 2449-2460.

HANSEN, P.; RIENECK, K.BENDTZEN, K. 2004. Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines by human mononuclear cells. *Immun Lett.* 91: 87-91.

HARRINGTON, L.; HATTON, R.; MANGAN, P.; TURNER, H.; MURPHY, T.; MURPHY, K.; WEAVER, C. 2005. Interleukin 17-producing CD4. *Nat Immunol.* 6: 1123–1132.

HARRISON D.; MARVAR P.; TITZE J. 2012. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol* 3: 1-8.

HASHMI, S.; ZENG, Q.T. 2006. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* 17: 699-706.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, J.V.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. 2001. Dendritic

cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194: 769–779.

HERRADA, A.; CAMPINO, C.; AMADOR, C.; MICHEA, L.; FARDELLA, C.; KALERGIS, A. 2011 Aldosterone as a modulator of immunity. *Journal of Hypertension*, 29: 1684–1692.

HSU, D; CHEN, H; LIU, F. 2009. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev.* 230:114–127.

HUPPERT, J.; CLOSHEN, D.; CROXFORD, A.; WHITE, R.; KULIG, P.; PIETROWSKI, E.; BECHMANN, I.; BECHER B, LUHMANN HJ, WAISMAN A, KUHLMANN CRW. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 24: 1023–1034.

ICHIYAMA, K.; YOSHIDA, H.; WAKABAYASHI, Y.; CHINEN, T.; SAEKI K.; NAKAYA M.; TAKAESU G.; HORI S.; YOSHIMURA, A.; KOBAYASHI, T. 2008. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 17003–17008.

IVANOV, I.; ZHOU, L.; LITTMAN, D. 2007. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology* 19: 409–417.

IWAKURA, Y. ISHIGAME, H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116: 1218-1222.

IWAZU, Y.; MUTO, S.; FUJISAWA, G.; NAKAZAWA, E.; OKADA, K.; ISHIBASHI, S.; KUSANO, E. 2008. Spironolactone suppresses peritubular

capillary loss and prevents deoxycorticosterone acetate/salt-induced tubulointerstitial fibrosis. *Hypertension* 3: 749-754.

JUREWICZ, M.; MCDERMOTT, D.; SECHLER, J.; TINCKAM, K.; TAKAKURA, A.; CARPENTER, C.; MILFORD, E.ABDI, R. 2007. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *Am Soc Nephrol*. 18: 1093-1102.

KASAL, DA.; BARHOUMI, T.; LI, MW.; YAMAMOTO, N.; ZDANOVICH, E.; REHMAN, A.; NEVES, MF.; LAURANT, P.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN EL. 2012. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 59: 324–330.

KAGIYAMA, S.; MATSUMURA, K.; FUKUHARA, M.; SAKAGAMI, K.; FUJII, K.; IIDA, M. 2007. Aldosterone-and-salt-induced cardiac fibrosis is independent from angiotensin II type 1a receptor signalling in mice. *Hypertens Res*. 10: 979-989.

KANG, S. A., CHO, M. K., PARK, M.-K., KIM, D.-H., HONG, Y. C., LEE, Y. S., CHA, H.J.; OCK, M.S.; YU, H.S. 2012. Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection. *Veterinary Parasitology*, 186: 319–327.

KARATAS, A.; HEGNER, B.; DE WINDT, L.J.; LUFT, F.C.; SCHUBERT, C.; GROSS, V.; AKASHI, Y.J.; GURGEN, D.; KINTSCHER, U.; DA COSTA GONCALVES, A.C.; REGITZ-ZAGROSEK, V.; DRAGUN, D. 2008. Deoxycorticosterone Acetate-Salt Mice Exhibit Blood Pressure-Independent Sexual Dimorphism. *Hypertension* 51: 1177-1183.

KASAL, D.; BARHOUMI, T.; LI, M.; YAMAMOTO, N.; ZDANOVICH, E.; REHMAN, A.; NEVES, M.; LAURANT, P.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E.; 2012. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 59: 324–330.

KIMURA, N.; NAKAE, S.; ITOH, S.; MERK, DR.; WANG, X.; GONG, Y.; OKAMURA, H.; CHANG, PA.; ADACHI, H.; ROBBINS, RC.; FISCHBEIN, MP. 2012. Potential role of $\gamma\delta$ T cell-derived IL-17 in acute cardiac allograft rejection. *Ann. Thorac. Surg.* 94: 542–548.

KLanke, B.; CORDASIC, N.; HARTNER, A.; SCHMIEDER, R.; VEELKEN, R.; HILGERS, K. 2008. Blood pressure versus direct mineralocorticoid effects on kidney inflammation and fibrosis in DOCA-salt hypertension. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23: 3456–3463.

KO, Y.; JUNG, J.; PARK, S.; CHOI, E.; JOUNG, B.; HWANG, JONG-WON, K.; CHOI, H.; JANG, Y.; CHUNG, N.; SHIM, W.; CHO H. 2006. Inflammatory and vasoactive factors in the aspirate from the culprit coronary artery of patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 112: 6–16.

KO, E.; AMIRI F.; PANDEY, N.; JAVESHGHANI, D.; LEIBOVITZ, E.; TOUYZ, R.; SCHIFFRIN, E. 2007. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 292: H1789-95.

LAM, E.; FUNDER, J.; NIKOLIC-PATERSON, D.; FULLER, P.; YOUNG, M. 2006. Mineralocorticoid receptor blockade but not steroid withdrawal reverses renal fibrosis in deoxycorticosterone/salt rats. *Endocrinology* 147: 3623-3629.

LI, L.; HUANG, L.; VERGIS, AL.; YE, H.; BAJWA, A.; NARAYAN, V.; STRIETER, RM.; ROSIN, DL.; OKUSA, MD. 2010. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 120: 331–342.

LIAO, T.; YANG, X.; LIU, Y.; SHESELY, E.; CAVASIN, M.; KUZIEL, W.; PAGANO, P.; CARRETERO, O. 2008. Role of Inflammation in the Development of Renal Damage and Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension*. 52: 256-263.

LIM, P.; BRENNAN, G.; SHIELS, P. 1999. Raised aldosterone to renin ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study. *Br J Clin Pharmacol*. 48: 756–760.

LIU, YH; D'AMBROSIO, M; LIAO, TD; PENG, H; RHALEB, NE; SHARMA, U; ANDRÉ, S; GABIUS, HJ; CARRETERO, OA. 2009. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H404–H412.

LIU, Y.; ZHU, H.; SU, Z.; SUN, C.; YIN, J.; YUAN, H.; SANDOGHCHIAN, S.; JIAO, Z.; WANG, S.; XU, H. 2012. IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKC /Erk1/2/NF- κ B-dependent signaling pathway. *Int Immunol*. 24: 605–612.

LIU, W.; WANG, X.; FENG, W.; LI, S.; TIAN, W.; XU, T.; SONG, Y.; ZHANG, Z. 2011. Lentivirus mediated IL-17R blockade improves diastolic cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Exp Mol Pathol*. 91: 362–367.

LOCK, C.; HERMANS, G.; PEDOTTI, R.; BRENDOLAN, A.; SCHADT, E.; GARREN, H.; LANGER-GOULD, A.; STROBER, S.; CANNELLA, B.; ALLARD, J.; KLONOWSKI, P.; AUSTIN, A.; LAD, N.; KAMINSKI, N.; GALLI, S.; OKSENBERG, J.; RAINE, C.; HELLER, R.; STEINMAN, L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8: 500-508.

LOMBES, M.; ALFAIDY, N.; EUGENE, E.; LESSANA, A.; FARMAN, N.; BONVALET, J. 1995. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 92: 175-182.

MADHUR, M.; LOB.; MCCANN, L.; IWAKURA, Y.; BLINDER, Y.; GUZIK, T.; HARRISON, D. 2010. Interleukin 17 promotes angiotensin II - induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 55: 500–507.

MARTIN, B.; HIROTA, K.; CUA, DJ.; STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M. 2009. Interleukin-17- producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31: 321–330.

MATSUI, Y.; JIA, N.; OKAMOTO, H.; KON, S.; ONOZUKA, H.; AKINO, M.; LIU, L.; MORIMOTO, J.; RITTLING, S.; DENHARDT, D.; KITABATAKE, A.; UEDE, T. 2004. Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 43: 1195-1201.

MERVAALA, E.; MULLER, D.; PARK, J.; SCHMIDT, F.; LOHN, M.; BREU, V.; DRAGUN, D.; GANTEN, D.; HALLER, H.; LUFT, C. 1999. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 33: 389-395.

MICHEA, L.; DELPIANO, A.; HITSCHFELD, C.; LOBOS, L.; LAVANDERO, S.; MARUSIC, E. 2005. Effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* 146: 973-980.

MICHEA, L.; VALENZUELA, V.; BRAVO, I.; SCHUSTER, A.; MARUSIC, E. 1998. Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase in aorta. *Am J Physiol* 275: E1072-E1081.

MICHEA, L.; VILLAGRÁN, A.; URZÚA, A.; KUNTSMANN, S.; VENEGAS, P.; CARRASCO, L.; GONZÁLEZ, M.; MARUSIC, E. 2008. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertension* 52: 1-6.

MIN, L.; MOGI, M.; LI, J.; IWANAMI, J.; IWAI, M.; HORIUCHI, M. 2005. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 97: 434-442.

MIN, L.; MOGI, M.; LI, J.; IWANAMI, J.; MEI, L.; SAKATA, A.; FUJITA, T.; TSUKUDA, K.; IWAI, M.; HORIUCHI, M. 2007. Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Circ Res.* 76: 506–516.

MIURA, R.; NAKAMURA, K.; MIURA, D.; MIURA, A.; HISAMATSU, K.; KAJIYA, M.; HASHIMOTO, K.; NAGASE, S.; MORITA, H.; FUKUSHIMA, K.; EMORI, T.; ISHIHARA, K.; OHE, T. 2006. Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci.* 102: 553-558.

MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361: 888–898.

MURPHY, C.; LANGRISH, C.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R.; SEDGWICK, J.; CUA, D. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp Med.* 198: 1951-1957.

NAGASE, M.; FUJITA, T. 2007. Aldosterone and glomerular podocyte injury. *Clin Exp Nephrol* 12: 233–242.

NAGASE, M.; SHIBATA, S.; YOSHIDA, S.; NAGASE, T.; GOTODA, T.; FUJITA, T. 2006. Podocyte Injury Underlies the Glomerulopathy of Dahl Salt-Hypertensive Rats and Is Reversed by Aldosterone Blocker. *Hypertension* 47: 1084-1093.

NLM/NIH. 2004. Entrez Nucleotide database. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>> [consulta: 1-3-2008]

NLM/NIH. 2006. Blast. [en línea] <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [consulta: 1-3-2008]

O'SEAGHDHA, CM; HWANG, S-J; HO, JE; VASAN, RS; LEVY, D; FOX, CS. 2013. Elevated Galectin-3 Precedes the Development of CKD. *J Am Soc Nephrol Epub ahead of print.*

OKAMURA, A.; RAKUGI, H.; OHISHI, M.; YANAGITANI, Y.; TAKIUCHI, S.; MORIGUCHI, K.; FENNESSY, P.; HIGAKI, J.; OGIHARA, T. 1999. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17: 537-545.

ONOZATO, M. L.; TOJO, A.; KOBAYASHI, N.; GOTO, A.; MATSUOKA, H.; FUJITA, T. 2007. Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF- β and NADPH oxidase in the hypertensive kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22: 1314-1322.

PIETROWSKI, E.; BENDER, B.; HUPPERT, J.; WHITE, R.; LUHMANN, HJ.; KUHLMANN, CRW. 2011. Pro-Inflammatory Effects of Interleukin-17A on Vascular Smooth Muscle Cells Involve NAD(P)H- Oxidase Derived Reactive Oxygen Species. *J Vasc Res.* 48: 52–58.

PITT, B.; REMME, W.; ZANNAD, F.; NEATON, J.; MARTINEZ, F.; RONIKER, B.; BITTMAN, R.; HURLEY, S.; KLEIMAN, J.; GATLIN, M. 2003. Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309-1321.

PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W. 2000. The efector of spironolactone on morbidity and mortality in pacients with severe heart failure: Randomizer Aldactone Evaluation study in investigator. *N Engl J Med.* 432: 204-212.

PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A.; PALENSKY, J.; WITTES, J. 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-717.

RAIFER, H.; MAHINY, A.; BOLLIG N.; PETERMANN, F.; HELLHUND A.; KELLNER, K.; GURALNIK A.; REINHARD, K.; BOTHUR, E.; HUBER M.; BAUER, S.; LÖHNING, M.; KISS E.; GANAL S.; DIEFENBACH A.; KORN T.; LOHOFF M. 2012 Unlike $\alpha\beta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells, LTi cells and NKT cells do not require IRF4 for the production of IL-17A and IL-22. *Eur. J. Immunol* 42: 1–13.

REYNOLDS, J.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. 2010. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 413–423.

RICKARD, A, MORGAN, J.; TESCH, G.; FUNDER, J.; FULLER, P.; YOUNG, M. 2009. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt- induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension* 54: 537-543.

RICKARD, A.; YOUNG, M. 2009. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *J Mol Endocrinol* 42: 449–459.

ROARK, C.; FRENCH, J.; TAYLOR, M.; BENDELE, A.; BORN, W.; O'BRIEN R. 2007. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* 179: 5576–5583.

ROCHA, R.; CHANDER, P.; ZUCKERMAN, A.; STIER, C. 1999. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 33: 232–237.

ROCHA, R.; FUNDER, J. 2002. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann NY Acad Sci.* 970: 89-100.

ROCHA, R.; RUDOLPH, A.; FRIERDICH, G.; NACHOWIAK, D.; KEKEC, B.; BLOMME, E.; MCMAHON, E.; DELYANI, J. 2002. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1802-H1810.

ROCHA, R.; STIER, C.; KIFOR, I.; OCHOA, M.; RENNKE, H.; WILLIAMS, G.; ADLER, G. 2000. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 141: 3871-3878.

ROMAGNANI, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today* 18: 263-267.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.. **In:** *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp 365-386.

SCHIFFRIN, T. 2012. Lymphocytes: a role in hypertension?. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 19 :181-186.

SHARMA, UC; POKHAREL, S; VAN BRAKEL, TJ; VAN BERLO, JH; CLEUTJENS, JP; SCHROEN, B; ANDRÉ, S; CRIJNS, HJ; GABIUS, HJ;

MAESSEN, J; PINTO, YM. 2004. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 110: 3121– 3128.

SHIBATA K. 2012. Close link between development and function of gamma-delta T cells. *Microbiol. Immunol.* 56: 217–227.

SØREN, S.; MARIANNE, M.; KLAUS, R.; CHRIS JUUL, H.; KLAUS, B. 2006. Effects of spironolactone on human blood mononuclear cells: mineralocorticoid receptor independent effects on gene expression and late apoptosis induction. *Br J Clin Pharmacol.* 148: 46-53.

STOWASSER, M.; GORDON, R.; GUNASEKERA, T.; COWLEY, D.; WARD, G.; ARCHIBALD, C. 2003. High rate of detection of primary aldosteronism, including surgically treatable forms, after 'non-selective' screening of hypertensive patients. *Hypertension*, 21 :2149-2157.

SUN, Y.; RAMIRES, F.; WEBER, K. 1997. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res.* 35: 138-147.

SUTTON, CE.; LALOR, SJ.; SWEENEY, CM.; BRERETON, CF.; LAVELLE, EC.; MILLS, KH. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gamma- delta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31: 331–341.

SWEDBERG, K.; ENEROTH, P.; KJEKSHUS, J.; WILHELMSEN, L. 1990. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive

heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. .
Circulation 82: 1730-1736.

TAKEDA, Y.; MIYAMORI, I.; INABA, S.; FURUKAWA, K.; HATAKEYAMA, H.; YONEDA, T.; MABUCHI, H.; TAKEDA, R. 1997. Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 29: 45–48.

TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; DEMURA, M.; FURUKAWA, K.; MIYAMORI, I.; MABUCHI, H. 2001. Effects of high sodium intake on cardiovascular aldosterone synthesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19 :635-639.

TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; DEMURA, M.; MIYAMORI, I.; MABUCHI, H. 2000. Cardiac Aldosterone Production in Genetically Hypertensive Rats. *Hypertension* 36: 495-500.

TEICHMANN, LL.; OLS, ML.; KASHGARIAN, M.; REIZIS, B.; KAPLAN, DH.; SHLOMCHIK, MJ. 2010. Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity*. 33: 967–978.

TURNER, J.; KREBS, C.; TITTEL, A.; PAUST, H.; MEYER-SCHWESINGER, C.; BENNSTEIN, S.; STEINMETZ, O.; PRINZ, I.; MAGNUS, T.; KORN, T.; STAHL, RAK.; KURTS, C.; PANZER, U. 2012. IL-17A Production by Renal g δ T Cells Promotes Kidney Injury in Crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*. 23: 1486-95.

TURNER, J.; PAUS, H.; STEINMETZ, O.; PANZER, U. 2010. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney International* 77: 1070-1075.

VIEL, E.; LEMARIÉ, C.; BENKIRANE, K.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. 2012. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 298: H938-944

VIDLAK, D.; KIELIAN, T. 2012. Differential effects of interleukin-17 receptor signaling on innate and adaptive immunity during central nervous system bacterial infection. *Journal of Neuroinflammation* 9: 128-140.

VIETINGHOFF, S.; LEY, K. 2010. Interleukin 17 in vascular inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 463–469.

WANG, H.; SHIMOSAWA, T.; MATSUI, H.; KANEKO, T.; OGURA, S.; UETAKE, Y.; TAKENAKA, K.; YATOMI, Y.; FUJITA, T. 2008. Paradoxical mineralocorticoid receptor activation and left ventricular diastolic dysfunction under high oxidative stress conditions. *J Hypertens* 7: 1453-1462.

WILSON, N.J.; BONIFACE, K.; CHAN, J.R.; MCKENZIE, B.S.; BLUMENSCHN, W.M.; MATTSON, J.D.; BASHAM, B.; SMITH, K.; CHEN, T.; MOREL, F.; LECRON, J.C.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J.; MCCLANAHAN, T.K.; BOWMAN, E.P.; DE WAAL MALEFYT, R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8: 950-957.

YANG, M.; DENG, J.; LIU, Y.; KO, K. H.; WANG, X.; JIAO, Z.; WANG, S.; HUA, Z.; SUN, L.; SRIVASTAVA, G.; LAU, C.S.; CAO, X.; LU, L. 2012. IL-10–Producing Regulatory B10 Cells Ameliorate Collagen-Induced Arthritis via Suppressing Th17 Cell Generation. *J Pathol*. 180: 1–11.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; MCCLANAHAN, T.; MCKENZIE, B.; KLEINSCHKE, M. A.; OWYANG, A.; MATTSON, J.; BLUMENSCHNEIN, W.; MURPHY, E.; SATHE, M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A.; RENNICK, D. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116: 1310-1316.

ZENNARO, M.; FARMAN, N.; BONVALET, J.; LOMBES, M. 1997. Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1345-1352.

ZENNARO, M.; LE MENUET, D.; LOMBES, M. 1996. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol* 10: 1549-1560.

ZHOU, L.; LOPES, J.; CHONG, M. 2008. TGF-beta- induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*.: 453: 236-240.

ZHOU, M.; GOMEZ-SANCHEZ, C.; GOMEZ-SANCHEZ, E. 2000. An alternatively spliced rat mineralocorticoid receptor mRNA causing truncation of the steroid binding domain. *Mol Cell Endocrinol* 159: 125-131.

10. Anexo

10.1. Glosario de Abreviaturas

ALDO	Aldosterona
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Hebra complementaria de Ácido Desoxirribonucleico
ADNasa	Enzima Digestora de ADN
ANGII	Angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Enzima digestora de ARN
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCIP/NBP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato/Tetrazolium Nitro Azul
BSA	Suero Fetal Bovino
DC	Célula Dendrítica
CD(#)	Patrón de Diferenciación
COX-2	Ciclo Oxigenasa 2
DAB	Di-Amino Bencidina
dNTP	Mezcla de Nucleótidos Trifosfatados
DOCA	Deoxicorticoesterona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido Tetra acético de Etilenglicol
FOXp3	Forkhead box p3
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intracelular Tipo 1
IL	Interleuquina
IL-(#)r	Receptor de la Interleukina
INF- γ	Interferón gamma
IP3K	Fosfo indol kinasa 3
KCL	Cloruro de Potasio

LPS	Lipopolisacarido
Linfocito T $\gamma\delta$	Linfocito T gamma delta
MAPK	Kinasa Activadora de Proteína Mitógena
MCP-1	Proteína Quimiotractante de Monocito 1
Melting	Temperatura de separación de las Hebras de ADN
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MNSC	Células Mononucleares de Sangre Central
MOPS	Ácido 3-(N-Morpholino) Propanosulfónico
MR	Receptor mineralocorticoides
Na ₂ HPO ₄	Fosfato di sódico
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaH ₂ PO ₄	Fosfato dihidrógeno sódico.
NF κ B	Factor nuclear κ b
NKT	Células Natural Killer T
OK	Animal genéticamente modificado con delección de uno o más genes
PAI-1	Activador del plasminógeno tipo 1
PBMC	Polimorfo nuclear de sangre periférica (sinónimo mnsC)
PBS	Tampón fosfato
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
Primer	Partidor específico
QPCR	Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona
Rattus novergicus	Rata café o alcantarilla
ROS	Especies Reactivas a Oxígeno
ROR γ t	Receptor huérfano relacionado con receptor retinoico, timo específico gamma

RT-PCR	Transcriptasa reversa
SDS - PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SGK-1	Kinasas activadora de suero y glucomineralocorticoides 1
SHRSP	Modelo genéticamente modificado, espontáneamente hipertenso
STAT	Proteína señal de transducción y activación para transcripción
Taq	Enzima taq polimerasa
TBS	Tampón salino de tris
TGF- β	Factor β de crecimiento transformante
Th	Linfocito T ayudador
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	Linfocito T regulador
Uninefrectomía	Extracción de un riñón completo
Ureterectomía	Sección de uréter
VFG	Velocidad de Filtración Glomerular
Venectomía	Sección de vena