

Inmunología

www.elsevier.es/inmunologia



Original

El factor de crecimiento del hepatocito disminuye la expresión vascular de mediadores inflamatorios y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas



Maribel Chávez-Velásquez^a, Mariela Pérez^b, José L. Arcaya^c, Alberto J. García^d, Enrique Talavera^b y Freddy Romero-Vásquez^{b,*}

^a Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Zulia, Venezuela

^b Laboratorio de Señalización Celular y Regulación Génica, Centro de Investigaciones Biomédicas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Zulia, Venezuela

^c Instituto de Investigaciones Clínicas Dr. Américo Negrette, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Zulia, Venezuela

^d Escuela de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de febrero de 2014

Received in revised form

24 de mayo de 2014

Aceptado el 26 de mayo de 2014

On-line el 19 de junio de 2014

Palabras clave:

Factor de crecimiento del hepatocito

Inflamación

Hipertensión

IL-6

MCP-1

RANTES

NF-κB

RESUMEN

Objetivo: Este estudio fue diseñado para examinar el efecto del HGF sobre la inflamación vascular e hipertensión en ratas SHR. Nosotros especulamos que la disminución vascular del HGF puede desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de la hipertensión arterial en SHR, y que el incremento de los niveles de HGF puede producir una disminución en la presión arterial a través de la reducción de la inflamación vascular.

Materiales y métodos: Se utilizaron SHR de 14 semanas de edad, a las cuales se les administró el gen del HGF humano (1 mg/kg) por vía hidrodinámica (SHR-pCMV-HGF, n=6) o el vector vacío (SHR-pcDNA3.1, n=6) por 6 semanas. Los controles fueron WKY (n=6). La presión arterial sistólica fue medida semanalmente. La activación del factor NF-κB fue evaluada en la fracción nuclear mediante Western blot, la expresión de mediadores proinflamatorios mediante RT-qPCR y Western blot.

Resultados: La presión arterial, la activación del NF-κB y la expresión de IL-6, MCP-1 y RANTES fueron significativamente más elevadas en SHR que en WKY. La terapia génica con el HGF normalizó la actividad vascular del NF-κB, suprimió la expresión de los mediadores inflamatorios y redujo la HTA.

Conclusión: Este estudio sugiere que la disminución en la concentración de HGF en la aorta ejerce un papel importante en la activación de mediadores proinflamatorios observados en SHR y sugiere que el HGF puede representar un potencial agente terapéutico en el tratamiento de la HTA.

© 2014 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fromero.vasquez@hotmail.com (F. Romero-Vásquez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.05.002>

0213-9626/© 2014 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

The hepatocyte growth factor reduces vascular inflammatory mediators and hypertension in spontaneously hypertensive rats

A B S T R A C T

Keywords:

Hepatocyte growth factor
Inflammation
Hypertension
IL-6
MCP-1
RANTES
NF- κ B

Objective: This study was designed to examine the effects of hepatocyte growth factor (HGF) gene delivery on vascular inflammation and hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR). We speculated that HGF deficiency could play a key role in the pathogenesis of hypertension in SHR, and that increasing HGF levels will produce prolonged decreases in blood pressure due to reduced vascular inflammation.

Materials and methods: Fifteen-week old male SHRs received weekly hydrodynamic injections of a naked plasmid containing human HGF (pCMV-HGF) (1 mg/kg) or empty vector (pcDNA3.1) for 6 weeks. Two groups of Wistar-Kyoto (WKY) rats were used as controls (n = 6) and treated in the same manner. The activation of NF- κ B was assessed by Western blot and mRNA expression of pro-inflammatory cytokines by real-time PCR and Western blot.

Results: Blood pressure, NF- κ B activation and expression of IL-6, MCP-1 and RANTES were significantly higher in SHR than in the control WKY. The HGF gene therapy normalized NF- κ B activity, pro-inflammatory cytokines expression, and decreased the hypertension in SHR.

Conclusion: These observations suggest that decreased aorta HGF concentration may have a role in the vascular inflammation observed in SHR, and demonstrate that increasing HGF is a potential therapeutic target in the treatment of hypertension.

© 2014 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La inflamación es un proceso coordinado por secreción local de moléculas de adhesión, factores quimiotácticos y citocinas, cuya expresión es el resultado del daño vascular¹. Evidencias experimentales sugieren que mediadores proinflamatorios a nivel vascular participan de manera importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial (HTA)². Otros efectores vasculares, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, parecen contribuir con los mediadores inflamatorios en la etiopatogenia de la HTA³, induciendo la remodelación de la pared del vaso y el desarrollo de aterosclerosis^{4,5}.

La angiotensina II (AII) también es considerada un mediador proinflamatorio que tiene un rol importante en el desarrollo de mecanismos inflamatorios relacionados con complicaciones en la aterosclerosis. El papel de la AII involucra la activación de factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B)⁴, el cual es capaz de aumentar la expresión de numerosos mediadores proinflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión⁴.

Estudios previos han demostrado que la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o antagonistas de los receptores tipo 1 de la AII (AT1) disminuye el daño endotelial y la remodelación vascular en hipertensión clínica y experimental⁶.

De igual forma, se ha asociado el incremento en los niveles de RANTES, un potente agente quimiotáctico miembro de la familia de las quimiocinas CC⁷, al proceso inflamatorio observado en la hipertensión inducida por AII⁸, así como también se han reportado niveles elevados de MCP-1⁹. De igual forma, un estudio reciente demostró un incremento significativo en la expresión de las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α y de las

moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM en la pared vascular de SHR¹⁰.

Un evento fundamental en la fisiopatología de la inflamación es la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual controla la expresión de numerosas moléculas proinflamatorias¹¹. Diversos estudios han demostrado que HGF suprime la activación del NF- κ B inducida por TNF- α en células cultivadas¹² y está implicado en la regeneración de la célula endotelial capilar¹³.

El HGF es una citocina pleiotrópica y multifuncional que activa múltiples vías de señalización, a través de las cuales modula una variedad de procesos celulares como efectos mitogénicos y antiapoptóticos¹⁴. El HGF se produce en forma inactiva como una cadena única por fibroblastos, células del mesénquima, células endoteliales, células del hígado¹⁵ y es esencial en la regulación de la proliferación, en la diferenciación y en la supervivencia celular en diversos órganos¹⁶. In vivo el HGF protege contra el daño agudo y crónico en el hígado¹⁷, el intestino⁹ y el riñón¹⁶, y se ha sugerido como mecanismo mediador de esta acción su efecto antiinflamatorio¹².

El HGF inhibe la infiltración de neutrófilos disminuyendo la regulación de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1/E-selectina sobre la superficie de la célula endotelial¹⁵. Asimismo, esta proteína suprime el daño isquémico¹⁸.

Por otra parte, el HGF posee un marcado potencial antifibrótico, ya que inhibe la producción de citocinas fibrogénicas como el TGF- β 1 en tejido cardíaco y miofibroblastos de hámster cultivados¹⁹, y también disminuye la expresión de TGF- β 1 y su receptor en el epitelio tubular en un modelo de fibrosis renal en ratón^{20,21}; además, la acción antifibrótica del HGF exógeno estuvo acompañada por una menor inflamación renal en un modelo de enfermedad renal crónica¹².

Estudios previos demostraron que la expresión de HGF se encuentra disminuida en la aorta de SHR, sin embargo, se desconoce si esta reducción en los niveles locales de HGF desempeña un papel importante en el desarrollo de la HTA en SHR. De esta manera, nosotros evaluamos el efecto de la sobreexpresión del HGF en el desarrollo de hipertensión arterial en SHR. Nuestros resultados demuestran que la administración de HGF exógeno produce una disminución significativa de la presión arterial en este modelo experimental a través de inhibición de expresión de mediadores proinflamatorios como RANTES, MCP-1 e IL-6.

Materiales y métodos

Protocolo experimental

Se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar-Kyoto (WKY), machos, de 14 semanas, proporcionados por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Estado Miranda-Venezuela). Los animales se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada (22 a 24 °C) con libre acceso a comida y agua. Se dividieron en 3 grupos experimentales (n=6 para cada grupo). El primer grupo (SHR-pCMV-HGF), fue tratado con el gen del HGF humano previamente clonado en el sitio BamHI del plásmido pcDNA3.1 (1 mg/kg; Invitrogen). El segundo grupo (SHR-pcDNA3.1), recibió el vector vacío, y el tercer grupo (WKY) fue el grupo control. El tratamiento se administró a través de inyecciones hidrodinámicas en la vena dorsal de la cola durante 6 semanas. La presión arterial de los animales se midió semanalmente en los 3 grupos. El sacrificio se realizó 5 días después de la última aplicación del gen o del vector vacío, posteriormente se practicó laparotomía media y se extrajo la aorta; las secciones de este tejido se conservaron en solución salina fisiológica a 4 °C.

Medición de la presión arterial

La medición de la presión arterial se realizó en ratas conscientes, con métodos electrónicos computarizados para la toma de la presión arterial en ratas (Life Science Instruments. Modelo 229 IITC INC). Los animales fueron aclimatados antes de comenzar cada medición a una temperatura de 28 a 29 °C y se hizo una medición por semana. Este método permite medir la presión y el pulso a través de sensores que detectan pulsaciones en la cola del animal. Se realizaron 3 lecturas de la presión sanguínea de cada animal y se obtuvo una media por animal; al final se obtuvo un promedio por cada grupo experimental.

Preparación del plásmido

La preparación del plásmido se realizó como se ha descrito previamente²¹. Brevemente, el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen) que contiene el gen HGF humano clonado en los sitios BamHI fue generosamente donado por el Dr. Youhua Liu (University of Pittsburgh, School of Medicine, Pennsylvania, EE. UU.). El plásmido fue transformado en bacterias JM-109 y seleccionadas en placas de agar con ampicilina. Los clones positivos fueron amplificados en medio

Luria-Bertani. El plásmido fue purificado usando el kit Pure-Yield Plasmid Maxiprep System (Promega, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. La pureza y concentración del plásmido aislado fue confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa y por espectrofotometría.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se extrajo el ARN total a partir de la aorta utilizando un kit comercial (SV Total ARN isolation system, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y para la producción de ADN complementario se utilizó el kit comercial (Access RT-PCR system, Promega). Los niveles de expresión de MCP-1, RANTES, IL-6 fueron determinados usando los siguientes cebadores específicos sintetizados por Eurogentec: MCP-1 (sentido) 5'-AGC CCA GAA ACC AGC CAA CTC-3' y (anti-sentido) 5'-GCC GAC TCA TTG GGA TCA TCT T-3', RANTES (sentido) 5'-ATG AAG ATC TCT GCA GCT GCA TCC-3' y (anti-sentido) 5'-CTA GCT CAT CTC CAA ATA GTT G-3', IL-6 (sentido) 5'-GAC TGA TGT TGT TGA CAG CCA GTG C-3' (anti-sentido) 5'-TAG CCA CTC CTT CTG TGA CTC TAA CT-3', HGF (sentido) 5'-CCA GCT AGA AAC AAA GAC TTG AAA GA-3' y (anti-sentido) 5'-GAA ATG TTT AAG ATC TGT TTG CGT T-3' y β -actin (sentido) 5'-CAG CTG AGA GGG AAA TCG TG-3' y (anti-sentido) 5'-CGT TGC CAA TAG TGA TGA CC-3', utilizando SYBR green (Bio-Rad Laboratories, Richmond Cal, EE. UU.) en un termociclador IQ5 Multicolor Real time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Richmond Cal, EE. UU.). El gen de referencia a utilizar fue el de la subunidad 18S del ribosoma.

Preparación de la fracción nuclear

Una porción de tejido de la aorta fue cortada en trozos muy pequeños, suspendida en solución tampón A (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 130 mM NaCl and 5 mM KCl), para luego ser homogeneizada. A continuación se centrifugó el homogeneizado a $7.000 \times g$ por 2 min a 4 °C. El sedimento obtenido fue resuspendido y lisado en solución tamponadora B fría (10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM PMSF y 1 mM dithiothreitol [DTT]) durante 20 min en frío. Luego se le agregó 100 μ l de Nonidet P-40 y se agitó vigorosamente en el vórtex para ser luego centrifugado a 12.000 g durante 7 min a 4 °C. Seguidamente se extrajeron los núcleos con 100 μ l de tampón C frío (20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF y 1 mM DTT), se incubó sobre hielo durante 2 h y se centrifugó a $12.000 \times g$ por 7 min a 4 °C.

Western blot

Las corridas se realizaron en minicámaras para electroforesis (Miniprotean III, Bio-Rad Laboratories, Richmond Cal, EE. UU.) utilizando geles de poliacrilamida al 12% y corridos a 80-120 mV. Se empleó como tampón de corrida Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%. Previo a esto las muestras fueron disueltas en la mezcla de disociación, a una concentración final de Tris-HCl 0,012 M, pH 6,8, SDS 0,4%, glicerol 5%, 2-mercaptoetanol 2,88 mM, azul de bromofenol 0,02%. La mezcla fue calentada a 100 °C por 5 min, y se usaron marcadores de peso molecular de amplio rango de Bio-Rad Laboratories. Después de la corrida electroforética el gel de poliacrilamida se equilibraba en el gel en tampón de transferencia (glicina 192 mM, metanol 20%, Tris

25 mM, pH 8,3) a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, el gel y la membrana de nitrocelulosa fueron ensambladas en la celda de electrotransferencia, compatible con la minicámara de electroforesis. Antes de proceder a la reacción con los anticuerpos, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con una solución de albúmina sérica bovina al 5%, *tween* 20 al 0,5% en PBS por 1 h a 24 °C. Luego, la nitrocelulosa fue incubada con la dilución apropiada del anticuerpo primario (anti-MCP-1, anti-RANTES, anti-IL-6 o anti NF- κ B) en solución de bloqueo, por 24 horas a 4 °C, seguidamente las membranas fueron lavadas con *tween* 20 al 0,1% en PBS, 3 veces durante 20 min y después se incubó por 2 h a temperatura ambiente con el respectivo anticuerpo secundario ligado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo. Finalmente, las membranas fueron lavadas 3 veces con *tween* 20 al 0,1% en PBS y se reveladas usando como sustrato DAB (3,3-diaminobenzidina 1 mM, H₂O₂ 0,003% en PBS).

Metodología estadística

Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar de los grupos estudiados. Los resultados fueron comparados por la prueba de ANOVA con posttest de Tukey. Se solicitó y se obtuvo aprobación institucional para la realización de este estudio en animales de experimentación.

Resultados

Expresión del gen del factor de crecimiento del hepatocito humano y de ratas en la aorta de ratas espontáneamente hipertensas

Como se observa en la [figura 1A](#), la terapia génica fue capaz de inducir significativamente los niveles de expresión del gen humano en el grupo SHR-pCMV-HGF, en comparación con las ratas hipertensas no tratadas y con las ratas Wistar. Además, dicha terapia restituyó los niveles de expresión del gen a valores similares a los observados en las ratas controles ([fig. 1B](#)).

2.- La terapia génica con factor de crecimiento del hepatocito disminuye las cifras de presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas

Como se observa en la [tabla 1](#) las ratas WKY mantuvieron valores de presión arterial normal durante todo el experimento. Por otra parte, en las ratas SHR se observaron valores de presión arterial significativamente mayores al inicio del experimento. Tanto en el grupo de ratas SHR no inyectadas, como en el grupo inyectado con el vector vacío, se observó un aumento adicional de la presión arterial durante todo el experimento. En contraste, en el grupo de ratas SHR que recibieron la terapia génica con el HGF disminuyó la presión sistólica en SHR-pCMV-HGF vs SHR-pcADN3.1 ($140 \pm 3,3$ vs $170,3$ mm Hg, $p < 0,01$).

La terapia génica con factor de crecimiento del hepatocito disminuye la expresión de factores proinflamatorios en aorta de ratas espontáneamente hipertensas

Previamente se ha demostrado que el HGF es capaz de ejercer un efecto antiinflamatorio al interferir los mecanismos

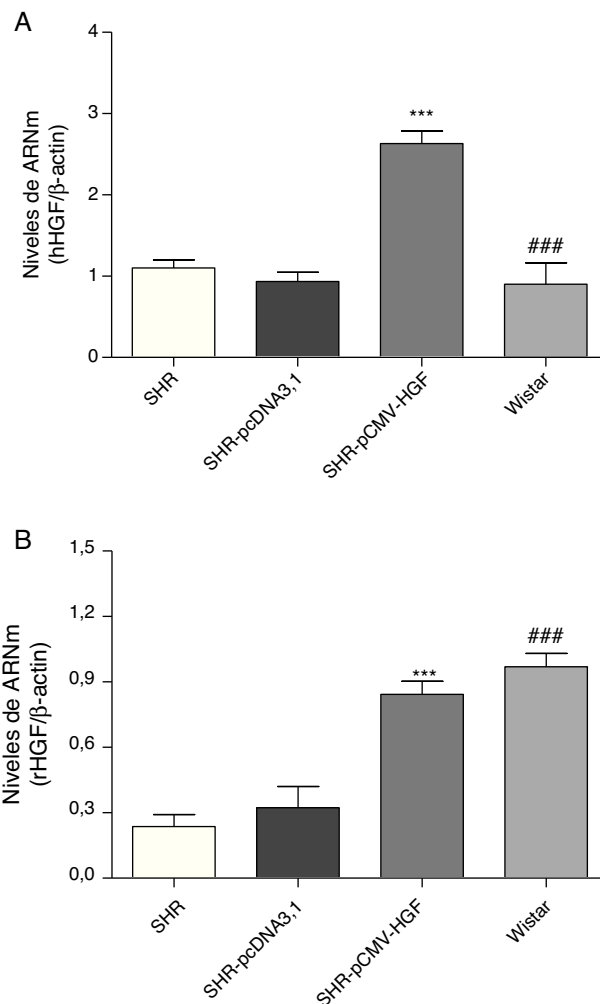


Figura 1 – Expresión del HGF en SHR tratadas y no tratadas con hHGF y en ratas WKY.

A. Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana; se determinó la expresión del gen del HGF de humano (hHGF) por RT-qPCR. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

B. Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana; se determinó la expresión del gen del HGF de rata (rHGF) por RT-qPCR. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

*** $p < 0,01$ comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

$p < 0,01$ comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y Wistar.

de señalización mediados por el factor de transcripción NF- κ B posterior al daño²². En este estudio se analizó el efecto de la terapia génica con el HGF en la expresión de las citocinas proinflamatorias, IL-6, MCP-1 y RANTES ([figs. 2–4](#) respectivamente) en aorta de ratas SHR y WKY. El análisis por RT-qPCR

Tabla 1 – Valores de peso corporal, presión arterial y creatinina plasmática en SHR tratadas y no tratadas con HGF y en ratas WKY

Grupos	WKY (n=6)	SHR (n=6)	SHR-pcDNA3.1 (n=6)	SHR-pCMV-HGF (n=6)
<i>Peso corporal</i>				
Pre	280 ± 13	278 ± 11	269 ± 23	282 ± 10
Post	353 ± 40	371 ± 18	361 ± 35	368 ± 15
<i>PAS (mm Hg)</i>				
Pre	120 ± 2,7	156,2 ± 7,08	152,2 ± 7,67	149,6 ± 1,67
Post	121 ± 6,8	174 ± 4,3*	177 ± 3,9	138 ± 3,2**
<i>P_{cr} (mg/dl)</i>				
Pre	0,43 ± 0,2	0,42 ± 0,12	0,39 ± 0,09	0,43 ± 0,11
Post	0,41 ± 0,1	0,42 ± 0,09	0,40 ± 0,14	0,34 ± 0,12

* p < 0,01 comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

** p < 0,01 comparación entre los grupos SHR y Wistar.

y Western blot demostró una disminución significativa de la expresión de IL-6, a nivel de ARNm y proteico en la aorta de las ratas SHR inyectadas con el plásmido pCMV-HGF, al compararlas con el grupo SHR-pcDNA3.1 (figs. 2A y B). Del mismo modo, la expresión proteica y del ARNm de MCP-1 estuvo disminuida en la aorta en el grupo tratado con el gen del HGF en relación con el grupo tratado con el vector vacío ($p < 0,01$) (figs. 3A y B). La expresión de RANTES disminuyó significativamente en la aorta en el grupo SHR-pCMV-HGF, al compararlas con el grupo SHR-pcDNA3.1. ($p < 0,01$) (figs. 4A y B). En conjunto, la expresión de las citocinas proinflamatorias no fue diferente entre los grupos SHR-pCMV-HGF y el grupo control.

Efecto de la terapia génica con factor de crecimiento del hepatocito sobre la activación del factor de transcripción factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)

Como se observa en la figura 5, la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B se encontró aumentada en la fracción nuclear de las ratas hipertensas no tratadas y en el grupo inyectado con el vector vacío. Por otra parte, la terapia génica con HGF impidió el aumento de la localización nuclear del mencionado factor de transcripción.

Discusión

Existe una creciente evidencia que indica que los mecanismos inflamatorios tienen un rol fundamental en la fisiopatología de la HTA². Por otra parte, estudios recientes sugieren que el HGF suprime la inflamación aguda y crónica en una variedad de órganos y sistemas en modelos animales¹². En el presente estudio se utilizó un esquema de terapia génica con el gen del factor de crecimiento de los hepatocitos en SHR. Se demostraron niveles de expresión significativos de dicho gen en la aorta de las ratas tratadas, asociado con una disminución de la expresión de mediadores proinflamatorios y de la activación del factor nuclear NF- κ B, así como una reducción de la HTA en comparación con el grupo control. Estudios previos han demostrado que las concentraciones séricas del HGF en SHR son significativamente más altas que en las ratas normotensas Wistar Kyoto. Por el contrario, en tejidos como el corazón, la aorta y el riñón la expresión del

HGF se encontró disminuida en comparación con la cepa WKY²³. Por otra parte, varios estudios han relacionado la HTA con inflamación en modelos experimentales como las ratas Dahl, SHR y el modelo de infusión de Ang II²⁴⁻²⁶. Estudios previos sugieren un papel importante del estrés oxidativo vascular en SHR²⁷, lo cual podría contribuir a aumentar la señalización intracelular como consecuencia de la activación del NF- κ B²⁸. De hecho, el bloqueo de la señalización del NF- κ B y la producción de ROS tiene un efecto antiinflamatorio acompañado de disminución de la presión arterial²⁹.

En esta investigación se demostró que el HGF disminuye la expresión del ARNm IL-6, MCP-1, RANTES y la activación del NF- κ B. La disminución del ARNm de IL-6 demostrada en estos animales podría sugerir, al menos en parte, que la acción del HGF sobre esta citocina se realiza ejerciendo un doble efecto: 1) al disminuir la expresión de IL-6 se reduce la activación del NF- κ B, como se demostró en estudios previos, donde este factor activa genes mediadores de la inflamación y ha sido asociado al proceso inflamatorio vascular, renal y cardiaco³⁰. Similarmente, el NF- κ B ha sido involucrado en la acción proinflamatoria de la Ang II en otros modelos de hipertensión en ratas³¹, demostrándose además que su inhibición disminuye la inflamación vascular inducida por Ang II en ratas³²; y 2) se ha relacionado la disminución de la IL-6 con reducción en la expresión del gen del receptor AT1 en tejido vascular, con un menor desarrollo y progresión del daño endotelial, similar a lo reportado con la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina³³. Los resultados de este estudio mostraron disminución de la IL-6 en el grupo SHR-pCMV-HGF, asociada a menor inflamación en la pared de la aorta, lo que probablemente podría estar relacionado con la menor actividad del NF- κ B, quizás por un mecanismo involucrado con disminución del receptor AT1. En observaciones previas se asoció la HTA de SHR a procesos inflamatorios de la pared vascular³⁴. Varios marcadores de la inflamación como ICAM-1, VCAM, MCP-1 e IL-6 se encontraron aumentados en la pared vascular de ratas hipertensas²⁸, así como el incremento en la circulación de marcadores proinflamatorios en SHR³⁵ y en pacientes hipertensos³⁶. En conjunto, estos estudios demuestran el papel del proceso inflamatorio en la progresión del daño vascular asociado a hipertensión⁵, sugiriendo a su vez que la HTA está asociada con procesos inflamatorios generalizados mediados por la producción de

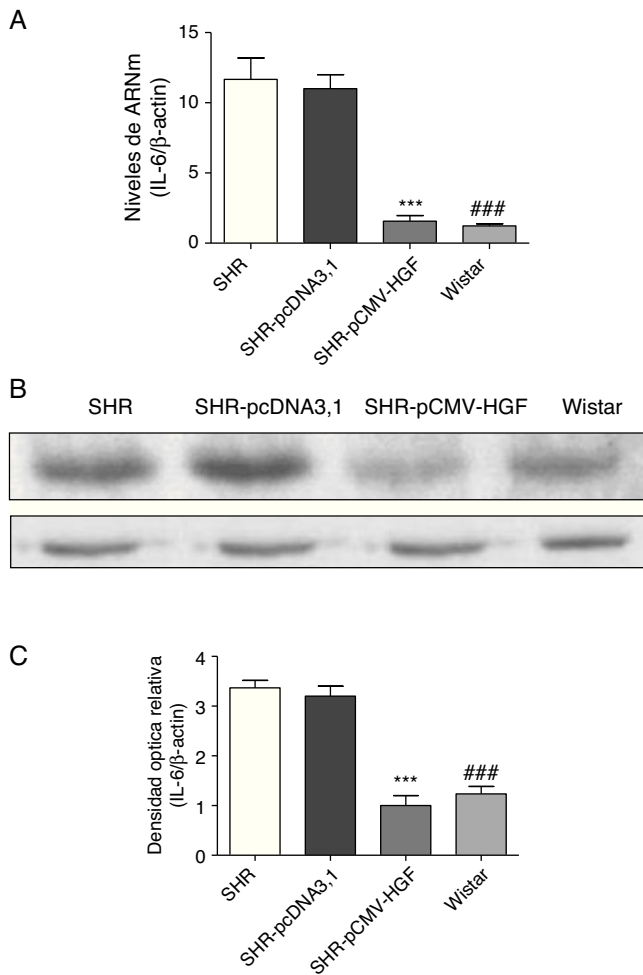


Figura 2 – Expresión de IL-6 en aorta de ratas SHR tratadas y no tratadas con HGF.

Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana. **A.** Se determinó la expresión de ARNm de IL-6 en aorta por RT-qPCR. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

B. Representa la expresión de IL-6 determinada por Western blot en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF and Wistar, n = 6 en cada grupo.

C. Representa la densidad óptica relativa de la expresión de IL-6 en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF y Wistar, n = 6 en cada grupo.

***p < 0,01 comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

###p < 0,01 comparación entre los grupos SHR y Wistar.

factores proinflamatorios generados tanto en la pared vascular como a nivel extravascular⁹. En la actualidad el concepto de inflamación sistémica desempeña un papel central en el desarrollo de enfermedades vasculares, pues ha evolucionado en muy variadas direcciones, para explicar múltiples circunstancias en las que se ha comprobado la alteración histológica y funcional⁵. La relación entre la hipertensión y la inflamación

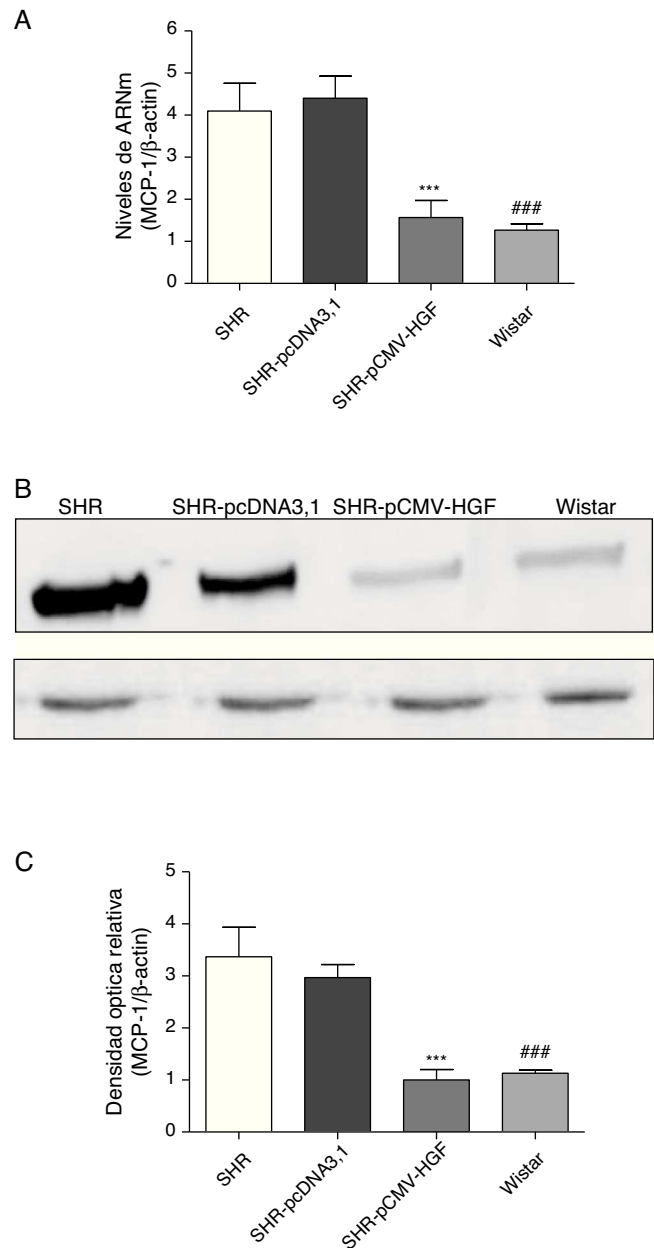


Figura 3 – Expresión de MCP-1 en aorta de ratas SHR tratadas y no tratadas con HGF.

Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana.

A. Se determinó la expresión de ARNm de MCP-1 en aorta por RT-qPCR. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

B. Representa la expresión de MCP-1 determinada por Western blot en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF and Wistar, n = 6 en cada grupo.

C. Representa la densidad óptica relativa de la expresión de MCP-1 en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF y Wistar, n = 6 en cada grupo.

***p < 0,01 comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

###p < 0,01 comparación entre los grupos SHR y Wistar.

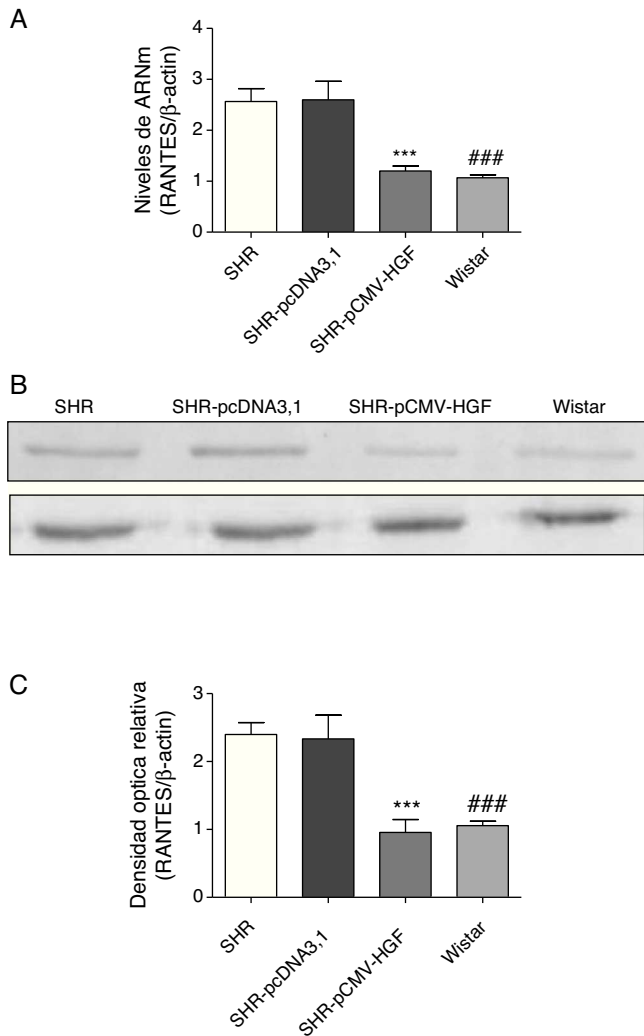


Figura 4 – Expresión de RANTES en aorta de ratas SHR tratadas y no tratadas con HGF.

A. Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana. Se determinó la expresión de ARNm de RANTES en aorta por RT-qPCR. Los valores representan el promedio + la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

B. Representa la expresión de RANTES determinada por Western blot en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF and Wistar, n = 6 en cada grupo.

C. Representa la densidad óptica relativa de la expresión de RANTES en SHR, SHR-pcDNA3.1, SHR-HGF y Wistar, n = 6 en cada grupo.

*** p < 0,01 comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

p < 0,01 comparación entre los grupos SHR y Wistar.

sistémica representa una nueva área de investigación³. Evidencias recientes demuestran una compleja conexión entre la inflamación sistémica, la activación de las células vasculares y los cambios estructurales en las arterias. La inflamación y la hipertensión pueden interactuar la una con la otra de una manera bidireccional, determinando el desarrollo de

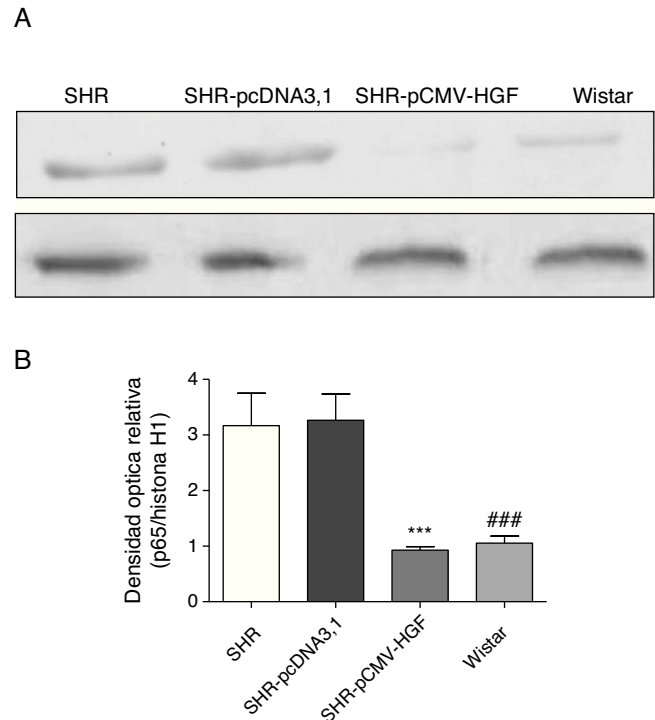


Figura 5 – Expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B en aorta de ratas SHR tratadas y no tratadas con HGF.

A. Biopsias de ratas del grupo SHR-pCMV-HGF (n = 6), del grupo SHR-pcDNA3.1 (n = 6) y grupo control que fueron sacrificadas al final de la sexta semana. Se determinó la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B. Los valores representan la media + la desviación estándar de las ratas evaluadas por grupo. Se evaluó cada muestra por triplicado, por rata.

B. Representa la densidad óptica relativa de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B en los grupos estudiados.

*** p < 0,01 comparación entre los grupos SHR-pCMV-HGF y SHR-pcDNA3.1.

p < 0,01 comparación entre los grupos SHR y Wistar.

ateroesclerosis y futuras complicaciones cardiovasculares⁴. Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos demuestran que la presencia de un estatus de baja inflamación crónica puede anticipar el desarrollo futuro de hipertensión¹. Esta observación sugiere que el incremento en los niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios observados en pacientes hipertensos no puede ser atribuido solamente al daño vascular inducido por la alta presión arterial. Nuevas líneas de investigación estudian la posibilidad de un efecto patogénico directo de los mediadores inflamatorios en alterar los mecanismos regulatorios del tono vascular que induce el desarrollo de HTA. Desde este punto de vista, la HTA puede considerarse como la resultante de un proceso inflamatorio con remodelación y engrosamiento de las paredes vasculares, al que se asocia una repuesta inmunológica. De esta forma, se describe a lo largo de los vasos sanguíneos arteriales y venosos

la concurrencia de células inflamatorias, que involucran la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa².

El HGF reduce la inflamación del intestino, atribuible a una acción antiinflamatoria directa⁹. Extensas investigaciones sobre el proceso inflamatorio destacan la complejidad de las interacciones entre mediadores solubles y moléculas de membranas en la célula endotelial, donde las citocinas con funciones quimotácticas desempeñan una función clave en la inmunomodulación, generando señales direccionales que ejercen un efecto directo en la migración de los leucocitos²⁹. La quimiocina MCP-1 se encuentra aumentada en la pared vascular de conejos en un modelo de aterosclerosis, donde es capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de IL-6, esta última implicada en la patogénesis de la aterosclerosis³⁷. Previamente se demostró en el riñón de ratas con HTA que la lesión del tejido está relacionada con el rol quimiotáctico del MCP-1, apoyando la relación que indica que los mecanismos inflamatorios contribuyen al daño en diferentes formas de hipertensión³⁸. Esta afirmación se basa en estudios en los cuales tratamientos que disminuyen las concentraciones séricas de ARNm de marcadores inflamatorios se acompañaron de disminución de la presión arterial³³.

Evidencias previas sugieren que el HGF suprime la activación del NF- κ B, y la señalización implicada en el control de la expresión de varias citocinas proinflamatorias⁸. Recientemente se ha sugerido que la enzima glucógeno sintetasa cinasa (GSK-3 β) está relacionada de manera importante en la transducción de la señalización del NF- κ B y es esencial en su activación a través de un mecanismo dependiente de la vía de la PI 3-cinasa. El HGF, al suprimir la activación del NF- κ B, bloquea la secuencia de eventos proinflamatorios e induce la inhibición de la activación de la GSK-3 β . Algunos autores sugieren que la GSK-3 β controla la activación del NF- κ B por expresión directa del gen y que la inhibición de la GSK-3 β suprime la expresión de algunas moléculas proinflamatorias que son inducidas por el NF- κ B, incluyendo RANTES, MCP-1, IL-8 y la IL-6³⁹. Este mecanismo podría estar relacionado con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual se demostró disminución de la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, MCP-1 y RANTES en la aorta de los animales a los cuales se les administró terapia génica con HGF; estos resultados evidencian que la disminución del proceso inflamatorio en la pared de la aorta podría contribuir a una menor resistencia vascular en la misma. Todos estos efectos asociados, la disminución de las citocinas proinflamatorias y de la activación del NF- κ B inducen una reducción de la inflamación en la arteria, y probablemente en los vasos sanguíneos de forma generalizada, con la consecuente disminución del daño tisular y quizás una menor resistencia vascular. En conjunto, estos mecanismos podrían explicar las cifras de presión arterial más bajas observadas en ratas SHR a las que se les administró terapia génica con HGF, sugiriendo que el efecto antiinflamatorio de este factor puede ejercer un efecto antihipertensivo.

Conclusión

En conclusión, nuestros resultados indican que la reducción vascular del HGF en SHR promueve la activación de

mediadores proinflamatorios y el desarrollo de HTA. Adicionalmente, este estudio demuestra que la terapia génica con HGF atenúa el desarrollo de HTA a través de la disminución en la expresión de IL-6, MCP-1 y RANTES vía inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC-Zulia, Venezuela).

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo declaramos que no existe conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos el aporte de la Dirección de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86:211-8.
2. Sun L, Gao YH, Tian DK, Zheng JP, Zhu CY, Ke Y, et al. Inflammation of different tissues in spontaneously hypertensive rats. *Acta Phys Sin.* 2006;58:318-23.
3. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Res.* 2011;34:665-73.
4. Lemarie CA, Esposito B, Tedgui A, Lehoux S. Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: Role in cell survival. *Circ Res.* 2003;93:207-12.
5. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res.* 2001;89:763-841.
6. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002;3:221-7.
7. Rodrigo E, Maeso R, Muñoz-García R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, et al. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Consequences of chronic

- treatment with losartan or captopril. *J Hypertens*. 1997;15:613-8.
8. Krensky AM, Ahn YT. Mechanisms of disease: Regulation of RANTES CCL5 in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3:164-70.
 9. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, et al. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 1997;100:1047-58.
 10. Hilgers K, Hartner A, Porst M, Mai M, Wittmann M, Hugo C, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage infiltration in hypertensive kidney injury. *Kidney Int*. 2000;58:2408-19.
 11. Diep QN, El Mabrouk M, Chn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation*. 2002;105:2296-302.
 12. Baeuerle P. I κ B-NF- κ B structures at the interface of inflammation control. *Cell*. 1998;95:729-31.
 13. Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: Targeting the inflamed vascular endothelium. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2464-73.
 14. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa U, Sasayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation*. 1997;95:2552-8.
 15. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Molecular structure and implications for a central role in liver regeneration. *Gastroenterol Hepatol*. 1991;6:509-19.
 16. Stuart KA, Riordan SM, Lidder S, Crostella L, Williams R, Skouteris GG. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:17-30.
 17. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: Therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol*. 2004;287:F7-16.
 18. Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol*. 2005;166:1895-905.
 19. Makiuchi A, Yamaura K, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T, Amano J, et al. Hepatocyte growth factor prevents pulmonary ischemia-reperfusion injury in mice. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:935-43.
 20. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:96-107.
 21. Yang J, Dai C, Liu Y. Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. *Gene Therapy*. 2001;8:1470-9.
 22. Myrto G, Chunsun D, Xiaoyue T, Xiaoyue W, George K, Michalopoulos, et al. Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor- κ B signaling. *Am J Pathol*. 2008;173:30-41.
 23. Nobuaki N, Atsushi M, Ryuichi M, Iwao K, Naruya T, Kunio M, et al. Role of angiotensin II in the regulation of a novel vascular modulator hepatocyte growth factor (HGF), in experimental hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1448-54.
 24. Zhou MS, Adan AG, Jaimes EA, Raji L. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. *Hypertension*. 2003;42:945-51.
 25. Zhou MS, Hernandez Schukman I, Pagano PJ, Jaimes EA, Raji L. Reduced NAD(P)H oxidase in low rennin hypertension: link among angiotensin II atherogenesis and blood pressure. *Hypertension*. 2006;47:81-6.
 26. Zhou MS, Kosaka H, Tian RX, Abe Y, Chen QH, Yoneyama H, et al. L-arginine improves endothelial function in renal artery of hypertensive Dahl rats. *J Hypertens*. 2001;19:421-9.
 27. Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P, Esteban V, Osende J, Mezzano S, et al. Long-term blood pressure control prevents oxidative renal injury. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1285-93.
 28. Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor NF- κ B. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1317-27.
 29. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chavez M, Herrera-Acosta J, et al. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F191-201.
 30. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84:695-703.
 31. Gonzalez Bosc LV, Kurnjek ML, Muller A, Terragno NA, Basso N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on nitric oxide synthase in the normal rat during aging. *J Hypertens*. 2001;19:1403-9.
 32. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996;94:258-65.
 33. Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél EDE, Heras LAS, Vegazo N, Jimenez OF J. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: Role of NF- κ B/I κ B system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H111-5.
 34. Haller H, Park JK, Dragun D, Lippoldt A, Luft FC. Leukocyte infiltration and ICAM-1 expression in two-kidney one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12:899-903.
 35. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21:1231-7.
 36. Peeters AC, Netea MG, Janssen MC, Kullberg BJ, Meer JW, Van der Thien T. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:31-6.
 37. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:327-32.
 38. Jayasankar V, Woo J, Bish LT, Piroli TJ, Chatterjee S, Berry MF, et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor attenuates postinfarction heart failure. *Circulation*. 2003;108 Suppl II. II-230.
 39. Arthur LG, Schwartz M, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Surg*. 2004;39:139-43.