



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA.

La interleuquina-17A es un mediador y una potencial diana terapéutica en la hipertensión y en la nefropatía diabética.

Tesis doctoral

Macarena Orejudo del Río.

Madrid 2019.

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

***La interleuquina-17A es un mediador y una potencial
diana terapéutica en la hipertensión y en la nefropatía
diabética.***

***Memoria que presenta la licenciada en Bioquímica
Macarena Orejudo del Río
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid***

**Directores de Tesis: Marta Ruiz-Ortega y Raúl Rodríguez Díez
Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díez
Universidad Autónoma de Madrid**

Doña Marta Ruiz Ortega, Doctora en Ciencias Químicas y Profesora Contratado Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid, y Don Raúl Rodríguez Díez, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Contratado de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña Macarena Orejudo del Río, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “La interleuquina-17A es un mediador y una potencial diana terapéutica en la hipertensión y en la nefropatía diabética” que se presenta como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 4 de Octubre de 2019



Dra Marta Ruiz-Ortega, PhD



Dr Raul Rodriguez Díez, PhD

A mis padres
A mi hermano Jesús

“Optimism is the faith that leads to achievement”

El optimismo es la fe que conduce al éxito

(Helen Keller)

Las personas que más me conocen saben que, durante mucho tiempo, dudé muy seriamente si llegaría a escribir esto. Ahora que ya he repasado las pruebas de imprenta de mi primer artículo como primer autor, creo que es el momento perfecto para agradecer a todas las personas que han ayudado a que esta tesis sea una realidad. Tengo que empezar pidiendo disculpas porque posiblemente me deje a alguien: si estás leyendo estas líneas, me conoces personalmente y no te he nombrado, tienes mi agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis que esto haya sido posible. Marta, gracias por permitirme hacer mi trabajo fin de máster en tu grupo y darme la oportunidad de seguir investigando hasta llegar a realizar este manuscrito. Raúl, tengo tantas cosas que agradecerte, que podría hacer un tomo sólo dedicándote mi tesis. Gracias por enseñarme, por ayudarme con los experimentos, con los análisis, por animarme a que no me viniera abajo en los peores momentos, darme los mejores consejos y vacilarme de vez en cuando...esta tesis puede ser tan tuya como mía. Gracias porque simplemente verte en el laboratorio, enfrente del ordenador y con tus auriculares, hace que piense que ya está todo controlado. Podría seguir, pero necesito dar las gracias a más gente. Gracias infinitas.

Si algo tengo claro, es que no hubiera llegado hasta aquí si no me hubieran metido el gusanillo de la investigación, y eso lo hicieron la gente maravillosa que me encontré en el laboratorio B19 de la Facultad de Medicina de la UAM. Al Dr. Rafael Garesse, gracias por permitir que hiciera el proyecto fin de carrera (o como lo llamábamos en la carrera, la “avanzada”) en tu laboratorio. Durante estos años, he visto desde lejos tu ascenso en la jerarquía de la universidad, y tengo que decir que para mí será un honor que firmes mi título de Doctor. Al Dr. Miguel Fernández: si a Raúl le debo todo en mi tesis, a ti te debo todo en mi avanzada. Gracias por enseñarme que el laboratorio es divertido, la “importancia de saber qué tienes en el tubo”, a mantener un orden estricto en el sitio de trabajo: actualmente, sigo manteniendo trucos que aprendí de ti. Gracias por aconsejarme lo mejor, aunque eso en algún momento implicara dejar el laboratorio, y gracias porque, a día de hoy, después de tantos años, cada vez que te pido algo, tardas nada en ayudarme. Esta tesis es una realidad gracias a ti. Alvarito, Paula, Luci, Vero, Susana, Rosana, Carmen: gracias por todos los buenos momentos vividos dentro y fuera del labo, y por aportarme lo mejor de cada uno de vosotros. A raíz de mi año de avanzada, pude tener mi primer contrato en investigación en el Hospital Puerta de Hierro: Belén, gracias por ofrecerme esa oportunidad y Pablo por hacerla realidad. Esther y Cris, gracias por ayudarme tanto durante ese año con las PCRs. María, gracias por hacer que encontrara mi hueco en ese laboratorio tan vacío de gente y tan lleno de aparatos, y enseñarme a utilizar un poquito el HPLC desnaturalizante. Aprovecho para dar las gracias a la gente que coincidió conmigo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la UAM y del IIB. Fueron 2 (1+1) años de los que guardo un genial recuerdo, y eso es gracias a todos vosotros.

Ahora me toca agradecer a toda la gente con la que he coincidido en mi labo, que no es poca. Empezaré por mi grupo, que son los que más han tenido que aguantarme. Laura M, ha molado mucho ver tu crecimiento en el labo; suerte con tu tesis, seguro que irá bien. Antonio, te paso el honor de ser “la sombra de Raúl”: aprovecha mucho, seguro que aprendes mogollón. Laura S, o como le llamo yo, “Laurita”: creo que no me equivoco en decir que eres lo mejor que nos ha pasado en el labo en estos últimos años, y no me refiero sólo en el terreno laboral. Gracias por no espantarte al ver que la persona más borde del grupo se sentaba al lado tuyo, por ayudarme muchísimo, por aguantarme bastante y dejar que te enseñara un poquito. Javi y Lucia, gracias por vuestro aire fresco, tan necesario sobre todo para mí estos últimos meses. Seguro que os surge una oportunidad genial, porque os la merecéis. Elena, espero que te vaya bien. No quiero dejar este párrafo sin agradecer a los antiguos miembros del grupo. Sandra y Morgui, espero que tengáis mucha suerte con vuestros proyectos. Mati, gracias por enseñarme sobretodo los primeros días en el labo, y por tu disponibilidad para cualquier cosa, siempre manteniendo una sonrisa. Ana, gracias por ayudarme cuando Raúl estaba a tope. Si ya sentía admiración de cómo trabajas, desde que me enseñaste a limpiar las mesentéricas, ese sentimiento ha crecido exponencialmente. Caro, a ti te debo especialmente todo lo que me ayudaste durante la estancia, y esto creo que mi madre te lo agradece también. Raquel, qué pena me dio que te fueras del labo. Recuerdo que una vez me dijiste que se notaba que quería mucho a tu hermano, pero que sepas que a ti también te quiero mucho, y que hubiera estado encantada de que hubieras ocupado su lugar en esta tesis.

Actualmente, el labo de la FJD está separado en pequeños grupos, pero hasta hace un par de años, convivíamos todos juntos en amor y compañía. Belén, gracias por aconsejarme que hablara con Marta para realizar el trabajo fin de máster. Fue un placer compartir contigo y con Carlota, Ainhoa e Icíar, además del labo, el máster y los paseos facultad-FJD durante ese año. Marian, gracias por ser tan buena y dejarme tan ordenado el sitio que me ha pertenecido durante casi todos estos años. Me alegro que te vaya tan bien, creo que te lo mereces. Patri, tienes el honor de ser la compañera que más tiempo ha estado conmigo, y me alegro de que así fuera. Al irte, tu sitio fue el que albergaba al “nuevo del labo”. En uno de estos momentos llegó Mel: te tuve poco, en parte porque te mudaste estando yo de estancia, pero fue genial. Me dio mucha pena que te bajaras a la -1, y mucho más que te fueras a Córdoba, pero imagino que por allí te irá genial. El resto han pasado poco: Abril, Alicia, Cris G, Cris V y Mateo, y seguro que alguno más que se me olvida. Espero que os sintierais a gusto, por lo menos en lo que se refiere a la compañía de al lado. Juanma, me alegro que estuvieras en esta parte del labo, ha sido guay compartir tantos momentos juntos. Jonay, lo mismo digo. Olga, recuerdo cuando nos contábamos nuestras penas porque íbamos a la par, y al final he seguido tus pasos de hacer 7 días a la semana en el labo y sólo pasar por mi casa para dormir; si a partir de ahora me va la mitad de bien que a ti, habrá merecido la pena. Rosario, gracias por haber sido testigo de todo lo que he vivido por allí

desde tu ordenador o tu sitio de trabajo. Fonti, fuiste de este lado del labo por mi culpa, y sé que lo pasaste mal por el calor, pero creo que ha sido de las mejores cosas que he hecho aquí: convencerte que te colocaras cerca de mí. Eres de las mejores personas que he conocido en el labo, y de las que más me ha apoyado, y te agradeceré siempre que me hicieras caso en ese momento.

Hubo un tiempo que, la mayoría de las veces que miraba hacia la izquierda, me encontraba a Ana Melgar en el microtomo. Tienes un corazón enorme y te quiero un montón. Me dio mucha pena que te fueras, pero como ya te dije, no tenemos porqué perder el contacto, y ahí estamos: ahora que estaré más libre, te dedicaré más tiempo, porque me debes un concierto de Izal y me lo pienso cobrar. Posiblemente, gracias a ella me acerqué un poco más a las niñas de Carmen, o como las llamo yo, “las supernenas”. Laura, estuviste un tiempito sola, pero luego aparecieron estas 3 y creo que te hicieron la vida más fácil en el labo: cuídalas mucho. Luna, me encanta que vengas de vez en cuando por las tardes a contarme tus cosas porque no haya bajado a desayunar y me haya perdido la historia de turno. Susana, publicarás ese ansiado artículo, y seguro que muchísimo antes de lo que lo he hecho yo. Gracias a las 4 por todo el cariño que recibo de vuestra parte y por las merendolas a base de crepes. Nacho y Gema, las nuevas incorporaciones del grupo, gracias por estos últimos meses.

El labo actual de mi grupo antes era el famoso “Caramelo”, y allí había gente con la que he vivido muchos momentos. Sebas y Esther, gracias por todos los momentos divertidos en nuestro desaparecido “nofu”. Cristian y Kike, nunca olvidaré el congreso de Viena y esa cena con los japoneses, me lo pasé genial. Alberto, tú sigues en el mismo sitio, y es un placer tenerte tan cerca, eres un encanto. Olha, eres una tía estupenda y me alegro de seguir viéndote de vez en cuando.

Y con todos estos ya casi termino con nefro. Ernesto y Alfonso, os recuerdo en todas las fiestas y como inseparables, gracias por esos años. Diego “Piscinas”, es una pena que pasaras tanto tiempo en el CNIC, hubiera sido muy divertido verte más a menudo por aquí. Leti, me encantó ver estos últimos meses lo creativa que eres. Patri, las personas como tú sólo se merecen que les pasen cosas buenas. A ver si un día me demuestras lo fiestera que eres. Gina, eres la persona más buena y cariñosa del labo. Carmen Herencia, siempre recordaré que un día me dijiste que no me preocupara por los artículos porque posiblemente salieran al final...pues se está cumpliendo. Gracias por tus ánimos. Susana, gracias por ayudarme siempre que te lo he pedido. Y los que me quedan del labo: Diego, Julio, Estrella, Raka, Nerea, Carmencita y Zaza. Gracias a todos porque al final pertenecéis, en mayor o menor medida, a esta parte de mi vida que ha sido mi tesis.

No quiero terminar esta parte de “agradecimientos a nefro” sin nombrar a los jefes del labo: Carmen, José Luis, Luis, Alberto, Ana, Loli, Adrián, Óscar y Juan. Al Dr. Jesús Egido, gracias por permitirme que pudiera realizar la tesis en el labo; fue estupendo encontrarme contigo la semana que coincidimos en Valdivia durante mi estancia.

Lara, ¿ya creías que me olvidaba de ti, eh?. Si me llevo algo del labo en cuanto a personas, esa eres tú. Lo primero que vas a hacer cuando tengas este libro en las manos es buscarte entre estas páginas, como si lo viera... Gracias por acercarte a mi por primera vez, y no separarte nunca, porque en los momentos malos, ahí estabas tú picando piedra. Cerramos etapa pero continuaremos juntas, en algún concierto, en el Samsara o en el Sol y Sombra.

Tengo que dar las gracias también a las personas que nos facilitan las cosas en el labo. Laura, gracias por la inmensa paciencia que tienes con nosotros cuando te complicamos la tarea de los pedidos. Es importante recordar la labor de nuestras auxiliares: Julia y Amelia, gracias por ayudarnos tanto con todas las tareas que hacéis; Pilar e Isabel, fue un placer coincidir con vosotras. Curra, gracias por tu ayuda inmensa con el confocal y por esas conversaciones interminables intentando arreglar el mundo. Gracias a la gente que trabaja en el animalario, por ayudar a que los modelos salgan lo mejor posible. Valentín, me alegro de haber conocido al que hasta hace poco era el bibliotecario del hospital y comprobar que el mundo es un pañuelo al enterarme que eres familiar de gente de mi pueblo; gracias por tu ayuda para conseguir artículos.

Finalmente, me gustaría agradecer a toda la gente de otros laboratorios, que siempre que he necesitado algo, me han ayudado como han podido, en especial de los laboratorios de Reuma, Inmuno y Anatomía Patológica. Van, gracias por aguantar mis penas y por animarme a que “viese la luz al final del túnel” (por fin la veo de verdad!). Arancha, es genial encontrarse con alguien de tu cole por la FJD, el mundo es un pañuelo por segunda vez. Me alegro de haberte conocido personalmente, y no sólo de vernos por los pasillos, eres un encanto. Ruth y Melania, espero que a partir de ahora nos vayamos más veces de fiesta, sois muy majas.

Los últimos 3 meses de 2016, tuve la oportunidad de hacer una estancia en el Servicio de Nefrología de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia. Quiero darles las gracias a toda la gente que conocí esos meses puesto que fueron muy enriquecedores para mí en todos los sentidos. En primer lugar, agradecer al Dr. Sergio Mezzano por darme la oportunidad de hacer la estancia y tener tanta paciencia con los trámites, ya que fue todo muy apresurado. Me encantó el libro de fotos. Alejandra, María Eugenia, Graciela, Paola, Yennifer, Jana, Rubén, Celeste, Dany, Leopoldo Ardiles, Claudio Flores, Daniel Carpio: gracias por dejarme aprender de todos y cada uno de vosotros. Eli, Carito, Paula, Verito, Anita: gracias por hacer que mi estancia fuera tan divertida, por enseñarme distintas zonas del país, por invitarme a carretear, a tomar y a vitrinear con vosotras y por las comidas tan divertidas viendo la teleserie o el programa del momento. Vanessa, espero que estés disfrutando de tu estancia en Madrid. Lucas, he tenido la suerte de estar contigo tanto en Valdivia como en Madrid. Gracias por todo tu apoyo y tu ayuda tanto aquí como allí. Carlos y Caro, gracias por acogerme los primeros días de estancia en vuestra casa y por estar tan pendiente de mí durante los 3 meses. Nora, gracias por dejarme permanecer en tu casa durante el resto de tiempo.

No quiero cerrar esta parte de agradecimientos más “académicos” sin mencionar la financiación que he recibido para realizarla. Pude comenzar esta tesis gracias a que la Fundación Conchita Rábago me concedió una beca durante 3 años. Quiero agradecer además que la Coordinación del Doctorado en Farmacología y Fisiología me concediera la admisión al mismo, y en especial a Concha Peiró por estar tan pendiente de todo y ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al salir del labo, siempre he tenido alguna actividad qué hacer. Quiero agradecer a varios grupos de gente que he conocido en esas actividades durante estos años, por hacerme desconectar del trabajo. Empezando por el Centro Juvenil Savo, que fue mi respiro durante los fines de semana al comienzo de esta tesis. A continuación, las chicas que he conocido en la Escuela Oficial de Idiomas: Vir, que después de tantos años sin estar en clase juntas, me alegra seguir teniendo contacto contigo, y a la gente de That’s English: Mai, MariCruz, Raquel, Lucía, M^a Mar, por las risas que nos echamos en nuestras quedadas. Y finalmente, mis compis de la piscina, que me ayudan a liberar tensión y me han animado mucho con mi tesis.

A partir de ahora me toca dar las gracias a la familia que se elige. Empezaré por mis amigas de la uni: gracias por tragarnos mis penas, es más fácil compartirlas cuando alguien conoce el mundillo de cerca; y por intentar quitarme de la cabeza la idea de dejar esto. Isa, es una pena que te tengamos tan perdida, espero verte más. Pamper, para mí fuiste un gran descubrimiento al terminar la carrera, y eras mi ejemplo a seguir en investigación por la pasión que le ponías: espero que ahora pueda seguir tus pasos. Esther, espero que no vuelvas a desaparecer como lo hiciste hace unos años, te quiero cerquita. Gracias por presentarme a Delia, es una crack. Líber, fuiste otro gran descubrimiento post-BQ; fue genial el viaje a Altea, creo que ahí fue cuando más hemos conectado. Zai, tengo una pregunta: ¿no llevas mucho tiempo en Boston? Vente ya que quiero conocer a Adrian. Julia, eres todo un ejemplo de perseverancia. Eva, mi gran compi de fiestas y aventuras en general, espero retomar esa buena costumbre contigo, a ver si lo hacemos. Natalia, tienes una familia preciosa, y tú has formado una familia más preciosa aún; espero seguir viviendo etapas contigo. Gracias por hacerme sentir tan especial siempre, tú también lo eres para mí. Dejo para el final a la “presi”. Ya te lo he dicho muchas veces y te lo repito: te quiero, María. Gracias por todos los años de carrera y de máster, en los que hemos ido juntas siempre. Y gracias porque, aunque estés a 60 km (que tampoco es tanto), te siento como si vivieras conmigo, casi como mi hermana. Esta tesis es de las dos, por todos los ánimos que me has dado. Finalmente, quiero dar las gracias en general a todos mis compis de BQ: guardo muy buen recuerdo de todos porque esa época fue de las mejores de mi vida, aunque estudié como nunca. Quiero dedicar una mención especial a Carlos: espero que asistas a mi defensa desde dónde estés; con lo inteligente que eras, seguro que me echas una mano.

Ahora toca mencionar a los “Monis a tope”: espero que tengáis fuerzas para muchas fiestas y viajes, que después de una sequía de 3 años, me tenéis para todo. Gema y Sergio, en un año tenemos una gran fiesta protagonizada por vosotros: me alegro que hayáis esperado a que fuera doctora. Paloma, siempre junto a tu hermana, aunque también sabes disfrutar de la vida por ti misma. Antonio y Marta, entrasteis al grupo cuando la tesis se me complicó, a ver si a partir de ahora podemos compartir más momentos juntos. Raquel, tienes que venir a visitarnos más a menudo, se echa de menos tu locura. Tere, eres todo un ejemplo de cómo se tiene que vivir la vida, tengo que aprender de ti al respecto. Quique, gracias por escucharme siempre y por compartir celebraciones de cumple conmigo. Tenemos que preparar el próximo festival. Vero, sabes que para mí eres una más; gracias por esas conversaciones interminables. Víctor y Gus, mi pareja de primos favorita: llevamos tanto tiempo juntos que ya he perdido la cuenta, y espero que no termine nunca. Gracias a todos por los momentos vividos juntos, y los que nos quedan por vivir. Y no puedo hablar de los “winis” sin hablar del resto de mi grupo de confirmación. Alina y Nuri, qué bien lo hicisteis, porque ahí seguimos; gracias por todo vuestro cariño. Iván, me alegra seguir viendote después de tantos años. Jorge, a ti me encantaría verte más a menudo. María, gracias por ese tour que nos hiciste a Marta y a mí por Londres cuando fuimos de congreso. Tamara, en un año estamos celebrando una gran fiesta en la que serás la protagonista. Cris, si me paro a pensar en momentos de mi vida, hay muy pocos en los que tú no estés presente. Gracias por ser testigo y protagonista a la vez. María José, gracias por los días en Santiago, me encantó compartirlos contigo y con Abiel, y hacer que el pobre chupara un limón en Valparaíso (aunque le encantara). Tienes que volver a España ya, llevas mucho tiempo fuera.

Me quedan algunas personitas que me han apoyado durante estos años. Tamara, ¿quién nos iba a decir en el cole que, después de tantos años, seguiríamos juntas? Contigo es muy fácil, eres de las mejores personas que conozco. Angélica, te tenía que haber hecho caso, ahora a ver si hago lo mismo que tú. Tenemos que vernos ya, en el pueblo o en Barcelona. Kike, otro al que también hace mucho que no veo, gracias por seguir ahí, aunque sea al menos para felicitarnos los cumpleaños. Carlos, contigo ya no tengo contacto, pero debo agradecerte lo pendiente que estuviste de mí durante mi estancia, y por eso creo que te merecías unas líneas aquí. Javi, en tu caso tengo que agradecer a Raúl que se casara y te conociera. Tienes más de buena persona que altura, y eso en tu caso es bastante complicado. Gracias por explicarme un poquito cómo maquetar hace unos meses, me ha venido muy bien en este momento, y por todo tu apoyo este último año.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia. A mis tíos Juan Antonio y Lolita, Juan y Gloria, Antonio y María, Fernando y Blanca, Jesús y Montse, Luis e Inma, Gonzalo y Merche; y a todos mis primos: Jorge y Leti, Esther, Alberto, Roberto y Alba, César, Ana, Adrián y Dani. Gracias por vuestro apoyo, sobre todo en estos tres últimos años, en los que he tenido una crisis fuerte. Estoy muy orgullosa de pertenecer a esta familia, de compartir cumpleaños, celebraciones, viajes, fiestas en el pueblo...siempre juntos. Y estoy más orgullosa de la unión que tenemos, sobre todo en estos momentos que están siendo difíciles para todos. Gracias también a los pequeños de la familia: Guillermo, Rodrigo y Carlota, por alegrarnos los días con sus peripecias. Quiero recordar a mis cuatro abuelos: Paulina, Acacio, Matilde e Hilario que, por desgracia, no han visto mi evolución en estos años, pero estoy convencida que desde algún lugar han estado empujándome para conseguir terminar esta etapa.

El último párrafo de agradecimientos se lo he reservado a las tres personas que conviven conmigo. Papá y Mamá: gracias por cuidarme, por aconsejarme siempre lo mejor y de forma incondicional, aunque a veces lo que respectaba a este tema os costara entenderlo, y por ser mi sustento económico siempre y especialmente estos 3 últimos años. Jesús, esta tesis empecé a escribirla en la biblioteca contigo, mientras que tú estudiabas tus exámenes de profesor de autoescuela; esos días molaron mucho. Gracias por ser tan cariñoso (demasiado a veces), y aunque seas el “enano” de la familia, actualmente me das lecciones de vida. Gracias a los 3 por ayudarme, sobre todo estos 3 últimos años a que superara mi crisis, a que no me viniera abajo y terminara con esto costara lo que hiciera falta; el saber que os tenía a vosotros para apoyarme siempre, aunque las cosas estuvieran muy torcidas, fue un descanso para mí y me daba fuerzas para continuar. Si el día de mi defensa os sentís orgullosos de mí, esto habrá merecido la pena vivirlo y será la mejor mención que podré recibir. Os quiero mucho!!

Creo que este apartado de la tesis se me ha ido de las manos...La conclusión que me llevo de esta etapa es que creo que he crecido mucho como persona, y después de escribir este libro, supongo que nada se me pondrá por delante. Espero haber aportado un poquito a la ciencia, porque ella sí me ha aportado mucho a mí.

MACA

Índice

RESUMEN	29
SUMMARY	31
ABREVIATURAS.....	35
INTRODUCCIÓN	41
1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: EL PAPEL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	41
2. ESTRUCTURA Y REMODELADO VASCULAR.....	42
3. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	45
4. SISTEMA CARDIO-RENAL	46
5. MEDIADORES CLAVE EN LA PATOLOGÍA CARDIO-RENAL.....	46
5.1. ANGIOTENSINA II.....	46
5.2. CALICREÍNAS.....	48
6. NEFROPATÍA HIPERTENSIVA.....	48
7. NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	51
8. LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	53
8.1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA HIPERTENSIÓN.....	54
8.2. LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	55
9. CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4 ⁺	56
10. RESPUESTA Th17: PAPEL DE LA INTERLEUQUINA IL-17.....	59
10.1. RESPUESTA Th17 EN DIVERSAS PATOLOGÍAS.....	62
10.2. RESPUESTA Th17 EN HIPERTENSION Y DAÑO VASCULAR.....	62
10.3. RESPUESTA Th17 EN DAÑO RENAL.....	63
10.4. RESPUESTA Th17 EN DIABETES.....	64
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
1. MODELOS ANIMALES.....	73
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE MANTENIMIENTO.....	73
1.2. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS.....	73
1.3. EUTANASIA Y TOMA DE MUESTRAS.....	73
1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN RATONES.....	74
1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A EN RATONES TRATADOS CON ANGIOTENSINA II.....	75
1.6. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A EN RATONES BTBR ob/ob.....	75
2. OBTENCIÓN Y CARÁCTERIZACIÓN DE MUESTRAS HISTOPATOLÓGICAS HUMANAS.....	76
3. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA EN RATONES.....	77
4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE Y ORINA.....	77

5.	EVALUACIÓN DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA (AMRs).....	77
5.1.	ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DE LAS ARTERIAS DE RESISTENCIA (AMRs).....	78
5.1.1.	PROCEDIMIENTO.....	78
5.1.2.	OBTENCIÓN DE LOS DATOS.....	78
5.2.	ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN DE LA LÁMINA ELÁSTICA INTERNA.....	79
5.3.	ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN Y EL TAMAÑO DE LOS NÚCLEOS EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLVs).....	80
6.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	80
6.1.	CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLVs) DE RATÓN.....	80
6.2.	EXPERIMENTOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	81
6.3.	ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR POR CIERRE DE HERIDA.....	81
7.	ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS.....	81
7.1.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	81
7.2.	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FIBROSIS. TINCIÓN DE ROJO SIRIO.....	82
8.	ESTUDIOS A NIVEL PROTEICO.....	82
8.1.	EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE DIVERSOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS.....	82
8.2.	ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	84
8.2.1.	INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDO.....	84
8.2.2.	INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	85
8.3.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL WESTERN BLOT. 85	
9.	ESTUDIOS A NIVEL GÉNICO.....	87
9.1.	GENOTIPADO DE LOS RATONES BTBR ob/ob.....	87
9.2.	EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	88
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	89
	RESULTADOS.....	93
1.	ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR y RENAL Y SU RELACIÓN CON HIPERTENSIÓN.....	93
1.1.	EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A AUMENTA LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA EN RATONES.....	93

1.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y SU RELACIÓN CON HIPERTENSIÓN.	94
1.2.1. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A PRODUCE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.	94
1.2.2. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A PRODUCE CAMBIOS ASOCIADOS A HIPERTROFIA EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.	96
1.2.3. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A PRODUCE CAMBIOS EN LA RIGIDEZ DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.	97
1.2.4. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A NO MODIFICA LA ORGANIZACIÓN DE LA LÁMINA ELÁSTICA INTERNA NI LOS NIVELES DE MARCADORES DE FIBROSIS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS.	97
1.2.5. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE UN INFILTRADO DE LINFOCITOS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA EN RATÓN.	98
1.2.6. LA INFUSIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MCP-1 EN AORTA.	99
1.2.7. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) EN AORTA.	99
1.2.8. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE CAMBIOS EN MARCADORES DE FIBROSIS EN AORTA.	100
1.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A A NIVEL RENAL EN RATONES.	100
1.3.1. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO PRODUCE CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS ASOCIADOS A LA FUNCIÓN RENAL.	100
1.3.2. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A REGULA MARCADORES ASOCIADOS A DAÑO RENAL SIN INDUCIR DAÑOS HISTOPATOLÓGICOS.	101
1.3.3. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL.	103
1.3.4. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN DE CALICREÍNA TISULAR A NIVEL RENAL.	105
1.3.5. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A REGULA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR SMAD Y AKT A NIVEL RENAL.	106

1.3.6.	LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE UNA RESPUESTA FIBRÓTICA A NIVEL RENAL.....	106
2.	EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTICUERPO NEUTRALIZANTE DE LA CITOQUINA IL-17A EN UN MODELO DE INFUSIÓN SISTÉMICA DE ANGIOTENSINA II EN RATONES.....	107
2.1.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYÓ LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN DE ANGIOTENSINA II EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS.	107
2.2.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A NO PREVIENE LA ALTERACIÓN DE LOS PARÁMETROS MECÁNICOS INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.	110
2.3.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE EL AUMENTO EN LA EXPRESIÓN RENAL DEL GEN DE N-GAL INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE ANGIOTENSINA II.	111
2.4.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II.	111
2.5.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A NO REGULA DE FORMA SIGNIFICATIVA LA FIBROSIS RENAL PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II.	113
3.	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON IL-17A EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATÓN <i>IN VITRO</i>	114
3.1.	EL TRATAMIENTO CON IL-17A AUMENTA LA VIABILIDAD, LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN CMLVs <i>IN VITRO</i>	114
3.2.	EL TRATAMIENTO CON IL-17A AUMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A INFLAMACIÓN PERO NO DE GENES ASOCIADOS A FIBROSIS EN CMLVs <i>IN VITRO</i>	117
3.3.	LA ESTIMULACIÓN DE CMLVs <i>IN VITRO</i> CON IL-17A NO REGULA LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.	118
4.	LA CITOQUINA IL-17A ESTÁ PRESENTE EN BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES CON NEFROPATÍA HIPERTENSIVA.	119
5.	PAPEL DE IL-17A EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL Y HUMANA.	120
5.1.	LA CITOQUINA IL-17A SE ENCUENTRA PRESENTE A NIVEL RENAL EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob.	120
5.2.	LA CITOQUINA IL-17A SE ENCUENTRA PRESENTE EN BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA.	123
6.	EFFECTO DEL BLOQUEO DE IL-17A EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA DIABÉTICA.	124
6.1.	LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A MEJORA LAS LESIONES RENALES GENERADAS EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob. ...	124

6.2. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob. ...	125
DISCUSIÓN.....	133
1. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 ASOCIADA A HIPERTENSIÓN EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y RENAL.	133
1.1. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN RATÓN AUMENTA LA PRESIÓN ARTERIAL E INDUCE CAMBIOS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA. POSIBLE MECANISMO IMPLICADO EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA.	133
1.2. LA IL-17A INDUCE HIPERTROFIA Y CAMBIOS EN EL FENOTIPO DE LAS CMLVs QUE SON RESPONSABLES DEL REMODELADO VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.	134
1.3. LA IL-17A INDUCE RIGIDEZ PERO NO FIBROSIS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.....	135
1.4. LA IL-17A INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL: MECANISMO CLAVE EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO.....	137
1.5. IL-17A Y FIBROSIS RENAL.....	138
1.6. OTROS POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA PRESIÓN SANGUINEA ACTIVADOS POR IL-17A.	140
1.7. PRESENCIA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-17A EN EL RIÑÓN DE PACIENTES CON NEFROPATÍA HIPERTENSIVA Y EN MODELOS EXPERIMENTALES DE HIPERTENSIÓN	141
2. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 EN LA DIABETES	142
2.1. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 EN LA NEFROPATIA DIABETICA EXPERIMENTAL Y HUMANA.....	143
2.2. EL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DE LA IL-17A MEJORA EL DAÑO RENAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES.	144
3. PERSPECTIVAS	146
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXO	181

RESUMEN

La hipertensión y la diabetes son las causas más comunes de enfermedad renal crónica (ERC). Los actuales tratamientos en estas patologías solo consiguen retardar la progresión de la enfermedad siendo necesarias mejores opciones terapéuticas. Estudios recientes sugieren que el sistema inmune juega un papel clave en la patogenia de las enfermedades renales, y remarcan la implicación de la activación de la respuesta inmune Th17, y de su citoquina efectora interleuquina-17A (IL-17A), en enfermedades inflamatorias crónicas. En pacientes hipertensos y diabéticos se han observado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes. Los pacientes hipertensos presentan un número más elevado de células circulantes T CD4⁺ productoras de IL-17A comparado con individuos normotensos. En pacientes con nefropatía diabética (ND) se han evaluado los niveles de IL-17A circulante o urinaria, pero no hay datos sobre los niveles renales. Los estudios preclínicos realizados hasta la fecha no han investigado los efectos de la modulación de IL-17A en el riñón en condiciones fisiológicas y los resultados obtenidos en nefropatía diabética experimental son contradictorios. En esta tesis se evalúa la hipótesis de que la activación de la respuesta inmune Th17, y por tanto, el aumento de la producción de IL-17A puede contribuir a la progresión del daño renal y vascular asociado a hipertensión y diabetes. El primer objetivo ha sido estudiar la implicación de IL-17A en la patogenia de la hipertensión y en la lesión de órganos diana, como son las arterias mesentéricas de resistencia (AMRs), aorta y el riñón, así como el papel potencial del bloqueo de IL-17A en situaciones de daño renal asociado a hipertensión. Los estudios preclínicos realizados en el modelo murino de administración sistémica de IL-17A, empleando una dosis que se asemeja a los niveles circulantes elevados descritos en pacientes prehipertensos, mostraron un aumento de la presión arterial sistólica después de 2 semanas de tratamiento. A nivel vascular se observó un remodelado hipertrófico interno de las AMRs, presentando las células de músculo liso vascular (CMLVs) cambios en el fenotipo e hipertrofia y aumento de la rigidez arterial, en ausencia de variaciones en los principales componentes de la matriz extracelular, como son la elastina y el colágeno. A nivel renal, se observó un aumento del infiltrado inflamatorio, incluyendo linfocitos CD3⁺ y CD4⁺ y neutrófilos, asociado a inducción de genes proinflamatorios, como MCP-1. Sin embargo, no se encontró ni daño ni fibrosis renal. Además, en estudios in vitro se demostró que la IL-17A tiene efectos directos sobre la regulación del crecimiento celular, y la regulación de mediadores proinflamatorios, sin inducir cambios en la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Posteriormente, en un modelo de infusión sistémica de Angiotensina II (Ang II) se observó que el bloqueo de la IL-17A disminuye las alteraciones en la estructura de las arterias mesentéricas de resistencia, la hipertrofia vascular y el infiltrado inflamatorio renal, sin modificar los niveles de colágeno a nivel vascular o renal. El último objetivo de esta tesis fue evaluar si IL-17A podría ser una diana terapéutica en la nefropatía diabética (ND). Para ello se empleó un modelo de nefropatía diabética experimental en ratones BTBR ob/ob, caracterizado por lesiones que imitan características clave de la ND humana avanzada. Los estudios preclínicos en el modelo BTBR ob/ob mostraron un aumento de IL-17A y una activación en los factores que controlan la diferenciación Th17 en los riñones diabéticos, que se asoció a infiltración de macrófagos y daño renal incipiente. El tratamiento terapéutico con un anticuerpo neutralizante de IL-17A, empezando cuando el daño renal por la diabetes ya ha comenzado, mejoró la función renal y retardó la progresión de la enfermedad. Estos efectos beneficiosos se correlacionan con la disminución de la inflamación renal, proceso este último regulado por la inhibición de la vía NF-κB y de factores proinflamatorios. Estos datos demuestran que IL-17A está implicada en el daño renal experimental mediado por la diabetes y podría ser una diana terapéutica prometedora para mejorar la nefropatía diabética. Como objetivo traslacional se ha evaluado si pacientes con daño renal asociado a hipertensión y diabetes presentan niveles elevados de IL-17A en el riñón, lo que podría confirmar el papel de esta citoquina en la patogenia de ambas enfermedades. En biopsias renales de pacientes con nefroesclerosis hipertensiva se han detectado células que expresan IL-17A, principalmente linfocitos CD4⁺ y γδ. En biopsias renales de pacientes ND con también se observaron células IL-17A⁺.

En conjunto, estos datos experimentales apoyan el papel patogénico de la IL-17A en el daño tisular en hipertensión y diabetes, y sugieren que el bloqueo de IL-17A podría ser una opción terapéutica potencial para estas enfermedades.

SUMMARY

Hypertension and diabetes are the main causes of chronic kidney disease (CKD). The current therapeutic strategies only retard CKD progression and better therapeutic options are needed. Emerging evidences suggest that the novel T cell subset Th17, and its effector cytokine IL-17A, beside its known participation in host defense against infectious diseases, and in different autoimmune pathologies, plays an active role in chronic inflammatory diseases, including hypertension and chronic kidney diseases. Earliest experimental works showed that inflammation participates in hypertension. Later on, several independent human studies have described elevated levels of circulating proinflammatory cytokines in hypertensive patients, and have unraveled the importance of innate, cellular, and humoral immunity in the pathogenesis of this disease. In this thesis, we evaluate the hypothesis of activation of Th17 immune response, and increased local **IL-17A production could contribute to renal and vascular damage progression associated to hypertension and diabetes.**

First, we tested whether IL-17A could regulate blood pressure by direct effects on the vascular system, in particular in small mesenteric artery (SMA). To this aim we developed a mice model of IL-17A systemic administration that resembles elevated circulating IL-17A levels described in hypertensive patients. This preclinical model shows that increased levels of circulating IL-17A raised blood pressure after 2 weeks of treatment and induced inward hypertrophic remodeling of small mesenteric arteries, vascular smooth muscle cell hypertrophy, and arterial stiffness in the absence of extracellular matrix accumulation. Accordingly, in a model of angiotensin II infusion blockade of IL-17A with a neutralizing antibody diminished small mesenteric artery remodeling and hypertrophy. Moreover, *in vitro* studies in vascular smooth muscle cells provide further evidence of the direct effects of IL-17A on cell growth responses. Our experimental data suggest that IL-17A is a key mediator of vascular remodeling of the small arteries, which might contribute at least in part, to blood pressure elevation.

The second aim was to investigate whether chronically elevated circulating IL-17A levels could contribute to kidney damage. Using the murine model of systemic IL-17A administration we found elevated blood pressure associated to inflammatory cells infiltration in the kidney including CD3⁺ and CD4⁺ lymphocytes and neutrophils. Moreover, proinflammatory factors and inflammatory-related intracellular mechanisms were upregulated in kidneys from IL-17A-infused mice. In line with these findings, in the model of Angiotensin II infusion in mice, IL-17A blockade reduced kidney inflammatory cell infiltrates and chemokine overexpression. Previous studies have described that circulating IL-17A-producing CD4⁺ T cells were increased in hypertensive patients compared to normotensive ones. Now, we have found that in kidney biopsies from patients with hypertensive nephrosclerosis IL-17A positive cells, mainly Th17 and $\gamma\delta$ T lymphocytes, were found. Overall, the results support a pathogenic role of IL-17A in hypertensive kidney disease-associated inflammation.

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end stage renal disease. Emerging evidences suggest a role for immune system dysfunction and inflammation in the onset and progression of DN. Our last aim was to evaluate the role of IL-17A in DN. Studies in human diabetes, including in DN patients, have evaluated circulating or urine IL-17A levels but there is no data on kidney in this condition. We found IL-17A⁺ cells in renal biopsies from DN patients and in experimental DN. Although experimental studies have shown the involvement of IL-17A in diabetes-induced tissue damage, contradictory data have emerged. Importantly, in the model of leptin-deficient BTBR ob/ob mouse characterized by lesions that mimic key features of advanced human DN we have observed that treatment with an IL-17A neutralizing antibody administered after renal lesions have developed, reversed the structural abnormalities of DN, diminished renal inflammation and improved renal function, suggesting that IL-17A blockade could be a potential therapeutic option for DN. These data support the potential involvement of IL-17A in the pathogenesis of human DN. In summary, all these data support a **pathogenic role of IL-17A in hypertension and associated-end organ damage** and suggest that **therapeutic approaches targeting IL-17A should be explored to prevent hypertension and diabetic induced kidney injury.**

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ACT1 Activador 1 de NF kappa B

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN complementario

AMR arteria mesentérica de resistencia

ANCA Anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos.

Ang II Angiotensina II

ApoE Ratón deficiente en Apolipoproteína E.

ARN Ácido ribonucleico.

ARNm ARN mensajero

AT1 Receptor tipo 1 de Ang II.

BCA Ácido bicinconínico

BSA Albúmina de suero bovino

BTBR del inglés *Black Tan and Brachyuric*

C/EBP Proteínas potenciadoras de unión a CCAAT

CTGF/CCN2 Factor de crecimiento de tejido conectivo

CCR2 Receptor de MCP-1 (CCL2)

CMLV Célula de músculo liso vascular

Col-1 Colágeno tipo 1

CTLA-8 Antígeno asociado a linfocitos citotóxicos-8.

DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EEM Error estándar de la media

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ERC Enfermedad renal crónica

ERT Enfermedad renal terminal

FN Fibronectina

Foxp3 del inglés: *forkhead box P3*

GAPDH Gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa

GM-CSF Factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos.

HTA Hipertensión arterial

ICAM-1 Molécula de adhesión intercelular-1

IFN- γ Interferón gamma

IL Interleuquina

IL-17R Receptor de interleuquina 17

JAK Quinasa Janus

KHS Solución de Krebs-Henseleit

KLK-1 Calicreína-1

ILC Células innatas linfoides.

MAPK Proteína quinasa activada por mitógenos

MCP-1 CCL2. Proteína quimiotáctica de monocitos-1

MEC Matriz extracelular

MMP Metaloproteínasa

NaF Fluoruro sódico

ND Nefropatía diabética

NF- κ B Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B

NH Nefropatía hipertensiva

NK del inglés *Natural Killer*

PAI-1 Inhibidor de Activador del Plasminógeno 1

PBS Tampón fosfato salino

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PFA Paraformaldehído

PKC Proteína quinasa C

PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RANTES CCL5. Proteína regulada sobre activación: expresada y secretada por células T.

ROR γ t Factor de transcripción de tipo huérfano del receptor de ácido retinoico gamma t.

SDS Dodecilsulfato sódico

SEFIR Dominio de expresión del receptor de IL-17 similar al del receptor FGF

SFB Suero fetal bovino

SRAA Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STAT Proteínas activadoras de la transcripción y transductores de la señal.

STZ. Streptozotocina

TBS Tampón tris salino

TCR Receptor de células T

TGF- β Factor de crecimiento transformante β

Th1 Respuesta de células T colaboradoras (helper) 1

Th17 Respuesta de células T colaboradoras (helper) 17

Th2 Respuesta de células T colaboradoras (helper) 2

Th9 Respuesta de células T colaboradoras (helper) 9

Thf Respuesta de células T colaboradoras (helper) foliculares

TLR Receptor tipo Toll

TNF- α Factor de necrosis tumoral α

TRAF Factor asociado al receptor de TNF

Treg Respuesta de células T reguladoras

VCAM-1 Molécula de adhesión de células vasculares-1

α -SMA α -actina de músculo liso.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: EL PAPEL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares ocasionan un tercio de las muertes anuales a nivel mundial, siendo aquellas afecciones que cursan con un incremento en la presión arterial promotoras de la mitad de esas muertes (OMS, 2013). Este incremento en la presión arterial, comúnmente conocido como hipertensión, es un desorden prevalente en nuestra sociedad y además se trata de la segunda causa de fallo renal después de la diabetes (Coffman, 2011). La hipertensión arterial (HTA) está definida como el incremento de la presión arterial sostenida a lo largo del tiempo (National Kidney Foundation, 2012; Whelton *et al.*, 2018). En términos generales, la presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre sobre las arterias, de tal forma que las guías actuales consideran una presión arterial elevada o prehipertensión cuando los valores se encuentran entre 120-129 y menor de 80 mm Hg, considerándose hipertensión a partir de 130 y más de 80 mm Hg (National Kidney Foundation, 2012; Whelton *et al.*, 2018). La hipertensión puede causar una gran morbilidad, y aunque a día de hoy los pacientes que siguen un tratamiento farmacológico y/o alimenticio específico para controlar sus niveles de presión arterial consiguen reducir de cierto modo estos niveles, esta bajada no alcanza los parámetros considerados como normales en las guías KDIGO y de las Sociedades Americanas de Cardiología e Hipertensión (National Kidney Foundation, 2012; Whelton *et al.*, 2018). Por todo esto, aún se precisan nuevos estudios que permitan conocer más acerca de la hipertensión y de sus repercusiones con el fin de encontrar posibles tratamientos más efectivos.

Entre los problemas más importantes que presentan los pacientes hipertensos se encuentra el daño generado en los tejidos “diana” asociados a esta patología, como son el sistema cardiovascular o el riñón. Debido a que la hipertensión no tiene sintomatología aparente, pero puede ocasionar numerosas afecciones como ictus, aneurismas aórticos, insuficiencia cardíaca y fallo renal, se describe coloquialmente como una “enfermedad silenciosa” (Flack *et al.*, 2003; O’Shea, Griffin y Fitzgibbon, 2017). Tal y como se ha descrito anteriormente, aunque actualmente se han desarrollado muchos fármacos anti-hipertensivos, todavía no se ha logrado un buen control de la presión sanguínea y, por tanto, una protección efectiva de los órganos diana en los pacientes hipertensos, por lo que siguen siendo necesarios nuevos estudios que permitan mejorar las opciones terapéuticas para esta patología.

2. ESTRUCTURA Y REMODELADO VASCULAR

Uno de los factores que influye mayoritariamente en los cambios en la presión arterial es el estado de los vasos sanguíneos. Si la frecuencia cardíaca se encuentra alterada debido a un proceso patológico, en las paredes de los vasos se puede generar un proceso activo de adaptación, denominado remodelado vascular, consistente en una serie de cambios mecánicos para mantener la presión arterial en los valores normales (Gibbons y Dzau, 1994; Brown *et al.*, 2018). La consecuencia de esta modificación tisular conlleva alteraciones tanto externas como internas del grosor de la pared y del diámetro de los vasos (Carretero, 2005). Entre los mecanismos que han sido identificados en el remodelado vascular asociado a hipertensión se encuentran la proliferación, la apoptosis, la fibrosis y la inflamación (Intengan y Schiffrin, 2001). La importancia de la activación de la respuesta inflamatoria en la patología de la hipertensión arterial fue descrita por primera vez hace más de 50 años (White y Grollman, 1964; Okuda y Grollman, 1967; Olsen, 1972). Posteriormente, varios estudios en pacientes hipertensos han descrito un incremento en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (Dalekos *et al.*, 1997; Rabkin, 2009; Mirhafez *et al.*, 2014). Adicionalmente, la investigación preclínica extensiva ha revisado la importancia de la inmunidad innata, celular y humoral en la patogénesis de la hipertensión (Guzik *et al.*, 2007; Marketou *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2015).

Como se ha descrito anteriormente, el mantenimiento de la homeostasis en la pared vascular de los vasos sanguíneos resulta esencial para prevenir el desarrollo de la hipertensión. Teniendo en cuenta la ley de Ohm de la dinámica de fluidos, la fórmula que determina la presión sanguínea (P) es:

$$P = F \times R$$

siendo F el flujo sanguíneo y R la resistencia que ejercen los vasos. El flujo sanguíneo viene determinado por el volumen y la frecuencia cardíaca por lo que el factor clave en la resistencia que ejercen los vasos es la capacidad contráctil de las arterias pequeñas (Coffman, 2011). Las arterias pequeñas o arteriolas son las encargadas de regular la presión sanguínea. Para poder entender mejor la capacidad contráctil es esencial conocer la estructura de la pared vascular. De este modo, en la pared vascular se pueden encontrar tres capas claramente diferenciadas: la capa íntima, formada principalmente por células endoteliales y que se encuentra en contacto directo con el flujo sanguíneo; la capa media, que alberga las células de músculo liso vascular (CMLVs); y la capa adventicia, que es la capa más exterior y donde residen las células progenitoras. Tanto las arterias como las arterias pequeñas presentan estas tres capas, aunque en las arterias pequeñas estas capas tienen menos grosor. En el caso de las arterias grandes, entre las capas se encuentran las láminas elásticas interna y externa. En cambio, las arterias pequeñas sólo poseen la lámina elástica interna, que separa la íntima de la media (Psaltis y Simari, 2015; Mazurek *et al.*, 2017) (figura 1).

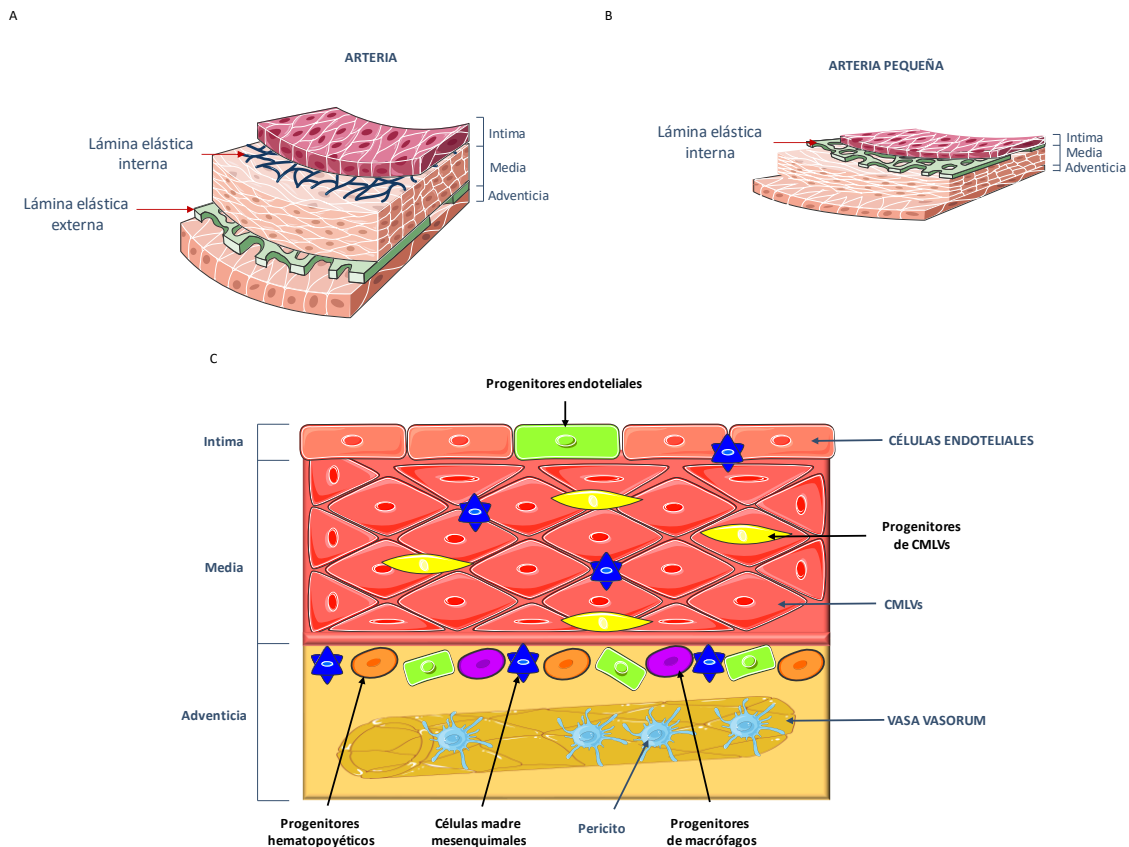


Figura 1. Estructura de la pared vascular. La figura A muestra las partes en las que está dividida una arteria y la B la división estructural de la pared de una arteria pequeña como las arterias mesentéricas de resistencia (AMRs). (Mulvany y Aalkjaer, 1990; Martínez-lemus, 2011). La figura C muestra la distribución de las células progenitoras en la pared vascular. Las células progenitoras endoteliales se encuentran en la íntima y en la adventicia. Esta última región es la que alberga la mayor cantidad de poblaciones diferentes: células progenitoras de macrófagos en ratón, y células madre mesenquimales en humanos. Estas últimas están presentes también en la íntima y la media. En la capa media se encuentran los progenitores con la capacidad de formar CMLVs. Los pericitos están presentes en el Vasa vasorum de la adventicia. Las células progenitoras hematopoyéticas se reclutan a la vasculatura a través de la circulación periférica. Imagen adaptada (Psaltis y Simari, 2015).

Estos nichos celulares son activos por lo que, en respuesta a un daño y con el fin de mantener la homeostasia tisular, las células son capaces de modificar su fenotipo para transformarse en células con características proinflamatorias y profibróticas, o bien adoptar fenotipos de células madre (Nieto *et al.*, 2016). En condiciones normales, la migración y la proliferación de las CMLVs son dos procesos habituales en los vasos sanguíneos para mantener la homeostasis del vaso, aunque, en condiciones patológicas, estas células pueden proliferar y migran al lumen desde la capa media, generando un cambio en el grosor de la capa íntima (Intengan y Schiffrin, 2001). Este tipo de remodelado se denomina “hacia el interior”, y puede ser producido por una vasoconstricción crónica. Por otro lado, existe otro tipo de remodelado conocido como “hacia el exterior”, que consiste en el incremento del diámetro del vaso, el cual puede ser consecuencia de un engrosamiento de la pared hacia la íntima o bien de un aumento del lumen (figura 2).

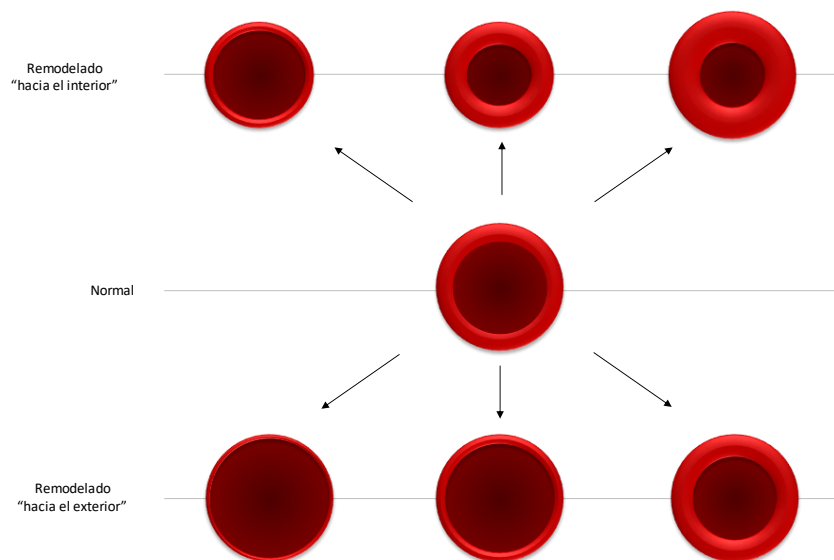


Figura 2. Diferentes estados del vaso, dependiendo del remodelado vascular.

En los diferentes tipos de remodelado vascular, las CMLVs juegan un papel esencial, pudiendo adquirir un fenotipo conocido como sintético en detrimento de su fenotipo contráctil clásico (Hao, Gabbiani y M.-L. Bochaton-Piallat, 2003; Safar *et al.*, 2018). Este fenotipo contráctil es el que se encuentra generalmente en las CMLVs de los vasos sanos y es el encargado de la dilatación y contracción de los vasos. Por el contrario, el fenotipo sintético es el que adquieren normalmente las CMLVs en condiciones patológicas. La diferenciación de un fenotipo a otro está asociada con el incremento o la disminución de la expresión de varias proteínas: en el fenotipo contráctil están aumentadas la α -actina de músculo liso (α -SMA) y la calponina; en el fenotipo sintético se expresan osteopontina, L-caldesmona y la conexina 43, entre otras (Rensen, Doevendans y van Eys, 2007; Sandison, Dempster y McCarron, 2016).

Cada vez existen más evidencias que sugieren que los cambios en las propiedades estructurales y mecánicas tanto en las arterias grandes como las arterias de resistencia, están relacionados directamente con la hipertensión y con los daños generados en los órganos diana de esta patología (Laurent y Boutouyrie, 2015; Brown *et al.*, 2018). De este modo, se ha demostrado que en pacientes con hipertensión existe un remodelado vascular de las arterias pequeñas, mostrado por el incremento en el grosor de la pared y en la relación media/lumen (Rizzoni, Agabiti-Rosei y Agabiti-Rosei, 2017), así como un aumento en la rigidez vascular (Laurent y Boutouyrie, 2015). Estas alteraciones estructurales y mecánicas en los vasos sanguíneos incrementan la resistencia vascular periférica, reduciendo con ello la cantidad de sangre que llega a los órganos diana y contribuyendo a la elevación de la presión sanguínea (Laurent y Boutouyrie, 2015).

3. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La problemática de la enfermedad renal crónica (ERC) se extiende a día de hoy por los diferentes sistemas de salud pública a nivel global, siendo una patología cuya prevalencia se incrementa exponencialmente con la edad de la población (Xie *et al.*, 2018). Un análisis reciente realizado durante 26 años de seguimiento, ha remarcado el dramático aumento en la prevalencia de la ERC a nivel mundial con un aumento del 87% desde el año 1990 hasta 2016 (Xie *et al.*, 2018). En España, la prevalencia actual de la ERC se estima actualmente en torno al 15,1% de la población adulta del país (Gorostidi *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta la previsión demográfica actual que sugiere un incremento en la esperanza de vida progresivo durante los próximos años, se estima que en el año 2030 habrá más de 14 millones de afectados de enfermedad renal terminal (ERT) en el mundo (Bello AK *et al.*, 2019).

La guía clínica internacional del consorcio KDIGO (del inglés *Kidney Disease Improving Global Outcomes*) define la ERC como el conjunto de alteraciones de la estructura y/o función renal (proteinuria, albuminuria, o anormalidades en el sedimento urinario) mantenidos durante al menos 3 meses y con repercusiones negativas para la salud. Concretamente, el criterio diagnóstico para la ERC implica una reducción del filtrado glomerular por debajo de 60 ml/min por 1,73 m² de superficie corporal (National Kidney Foundation, 2012; Gorostidi *et al.*, 2018).

Aunque existen numerosos factores y afecciones que pueden dar lugar al desarrollo de un daño renal, las causas más comunes de la ERC son la hipertensión y la diabetes (Perico y Remuzzi, 2012). Desde el comienzo de la patología, la ERC cursa con un incremento altamente significativo del riesgo de morbimortalidad cardiovascular y de mortalidad total, tanto en la población general como en los grupos de riesgo de enfermedad cardiovascular (Matsushita *et al.*, 2010). Como hecho reafirmante de lo anteriormente expuesto, recientemente se ha descrito, que en los pacientes con ERC el riesgo de muerte es diez veces mayor que su progresión a ERT (Kim *et al.*, 2019).

Desafortunadamente, a día de hoy no se conoce un tratamiento efectivo para la ERC, de tal forma que las principales medidas que se toman para controlarla están destinadas a retardar el avance de la enfermedad, como son el control farmacológico de la presión arterial y la reducción de la proteinuria (Mezzano y Aros, 2005; Gorostidi *et al.*, 2018). Es por ello que la búsqueda de biomarcadores de uso en clínica, que permitan un diagnóstico temprano de la ERC se considera una prioridad sanitaria para poder establecer estrategias de prevención de la progresión de la enfermedad renal a estadios avanzados y para prevenir las complicaciones cardiovasculares asociadas a esta enfermedad. Debido a la dificultad para encontrar estos biomarcadores, la investigación en este campo se considera actualmente una estrategia básica de salud pública (Jha *et al.*, 2013).

4. SISTEMA CARDIO-RENAL

En 1836 Richard Bright observó que pacientes con un estado avanzado de enfermedad renal presentaban un pulso fuerte y cambios estructurales en el corazón (Bright, 1836), postulando por primera vez la existencia de la interacción entre el riñón y el corazón. Actualmente, los nuevos avances han permitido descubrir varios procesos regulados por ambos órganos, como son el control de la presión arterial y el volumen plasmático, el equilibrio de electrolitos y ácido-base o la regulación de algunos sistemas hormonales. De este modo si una enfermedad afecta a uno de estos dos órganos se produce un desajuste en estos procesos, tanto a nivel sistémico como a nivel local, provocando la aparición de lesiones en el otro órgano, lo que contribuye a acelerar la progresión de la patología en el tejido afectado e induce una retroalimentación positiva del daño en ambos (Aréstegui, 2008). La ERC se considera un factor de riesgo cardiovascular independiente, puesto que los pacientes con esta enfermedad presentan tasas de mortalidad más elevadas por infarto de miocardio y muerte súbita que la población sana (Di Lullo *et al.*, 2015). Concretamente, la prevalencia de una enfermedad cardiovascular es 20 veces mayor en pacientes con ERC que en la población sana, siendo los eventos cardiacos la principal causa de muerte en estos pacientes (Keith *et al.*, 2004). En lo que respecta a la ERT, se ha observado que los pacientes que se encuentran en terapias de diálisis presentan mayores índices de aterosclerosis que la población sana (Wanner, Amann y Shoji, 2016), datos que confirman aun más la estrecha relación que existe entre el sistema renal y cardiovascular. Todos estos datos, muestran la necesidad de investigar de manera conjunta en ambos campos, tanto vascular como renal, en pacientes con ERC, con el fin de conocer en profundidad las posibles interacciones entre ambos sistemas e identificar potenciales biomarcadores o dianas terapéuticas.

5. MEDIADORES CLAVE EN LA PATOLOGÍA CARDIO-RENAL.

5.1. ANGIOTENSINA II.

El tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y renales crónicas se ha basado principalmente en el bloqueo del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), ya sea a través de inhibidores de la ECA, bloqueantes del receptor AT1 (ARA2) o agonistas del receptor mineralocorticoide (Perez-Gomez *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2019). La Ang II el principal péptido de este sistema es un octapéptido generado a partir de la proteólisis de la Angiotensina I (Ang I) por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) (Ames, Atkins y Pitt, 2019). Este péptido vasoconstrictor es clave en la regulación de la presión sanguínea y el equilibrio de electrolitos en condiciones fisiológicas, y se ha descrito un aumento de la producción local de Ang II en situaciones patológicas. La Ang II realiza sus acciones mediante la unión a receptores acoplados a proteínas G, hay dos subtipos: AT1 y AT2, que se

diferencian en señales intracelulares y respuestas celulares. El receptor AT1 regula la mayor parte de los procesos fisiopatológicos mediados por la Ang II en el sistema cardiovascular y renal (figura 3).

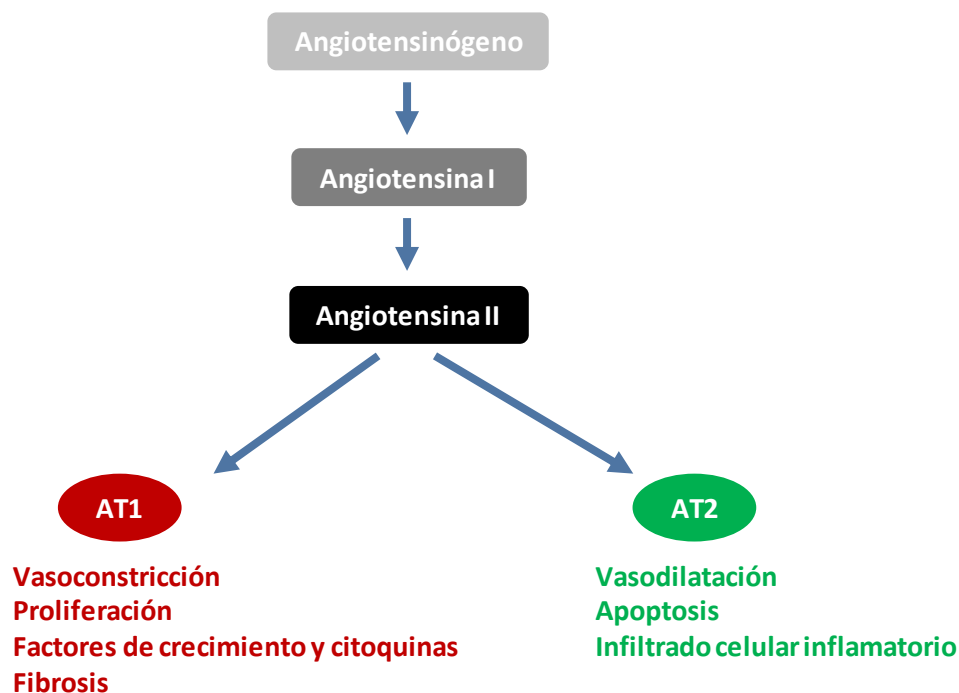


Figura 3. Sistema Renina-Angiotensina y los receptores de Angiotensina II.

La Ang II participa en diversos procesos patológicos como la activación de la respuesta inmune, el remodelado vascular, la disfunción endotelial, y el daño podocitario (Sanz *et al.*, 2019). En este tema nuestro grupo ha demostrado que la Ang II regula el reclutamiento de células inflamatorias, mecanismo relevante en la aterosclerosis (Hernandez-Presa *et al.*, 1997) y del daño renal (Ruiz-Ortega *et al.*, 1998). Este péptido actuando en células residentes, incluidas células endoteliales, CMLVs, y renales, promoviendo la expresión de mediadores proinflamatorios, como son citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2019). El principal mecanismo implicado en la respuesta inflamatoria implica la activación del factor de transcripción NF- κ B, proceso mediado por la activación de los AT1 y AT2 (Ruiz-Ortega *et al.*, 2000; M Ruiz-Ortega, Lorenzo, Ruperez, Suzuki, *et al.*, 2001; Marta Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). Además, las células del sistema inmune pueden sintetizar Ang II en condiciones patológicas (Hoch *et al.*, 2009), como describimos en nefropatía diabética humana, donde observamos que las células infiltrantes expresaban Ang II (Mezzano *et al.*, 2003).

La Ang II puede contribuir a la fibrosis tisular, al ser capaz de regular la expresión génica de factores profibróticos y de proteínas de MEC (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2019). Nuestros

estudios *in vitro* demostraron que en fibroblastos renales y células mesangiales la Ang II produce TGF- β , fibronectina y colágenos (Gomez-Garre *et al.*, 1996; Ruiz-Ortega y Egido, 1997), así como otros factores profibróticos como CTGF (Ruperez, Lorenzo, *et al.*, 2003; Ruperez, Ruiz-Ortega, *et al.*, 2003; Rayego-Mateos *et al.*, 2018). Cabe destacar que Ang II activa directamente la vía de Smad, principal ruta de señalización de TGF- β , regulando la fibrosis renal y vascular (Rodríguez-Vita *et al.*, 2005). Múltiples estudios han investigado las rutas de señalización de Ang II, mostrando la gran complejidad de respuestas activadas por este péptido, que incluyen activación de procesos redox, factores de transcripción, proteínas quinasas, proteínas G pequeñas, y mecanismos epigenéticos, entre otros (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2019). Los fármacos que bloquean el SRAA han demostrado efectos beneficiosos en el control de la presión arterial y en la protección del órgano diana. Estos efectos se atribuyen al bloqueo de las acciones de Ang II, al actuar inhibiendo mecanismos claves en la respuesta inflamatoria, como la activación de la vía de NF- κ B, o en la fibrosis tisular, bloqueando rutas como la vía TGF- β /Smad (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006, 2007).

5.2. CALICREÍNAS.

El sistema calicreína-cinina regula la presión arterial induciendo vasodilatación. Las calicreínas son serín proteasas encargadas de romper los cininógenos formando cininas, conocidas como bradiquinina y calidina (Hillmeister y Persson, 2012). Los ratones que carecen de calicreína tisular son incapaces de generar niveles significativos de cininas y desarrollan anomalías en adultos a pesar de mantener una presión arterial normal (Meneton *et al.*, 2001). Se ha observado en un modelo de daño renal agudo provocado por el veneno de *Lonomia Obliqua*, un aumento de la expresión de calicreína 1 (KLK-1), y la inhibición de esta proteína reduce el daño glomerular, la tasa de filtración glomerular, inhibe la generación de las especies reactivas de oxígeno y la migración de CMLVs (Berger *et al.*, 2019).

6. NEFROPATÍA HIPERTENSIVA

Uno de los principales órganos diana asociados con la hipertensión arterial es el riñón de tal forma que la patología renal asociada con un proceso hipertensivo crónico se ha denominado nefropatía hipertensiva (NH) o nefroangioesclerosis. Las manifestaciones del daño renal en la NH se caracterizan por alteraciones en las distintas regiones que conforman el riñón. El riñón está formado por numerosas nefronas, y éstas son consideradas la unidad básica funcional del mismo (figura 4). Cada nefrona se compone a su vez de un corpúsculo renal y de un túbulo renal. El corpúsculo renal, donde se encuentran la cápsula de Bowman y el glomérulo, es la parte que se encarga de filtrar el plasma sanguíneo que llega a través de la arteriola aferente. El túbulo renal está formado por el túbulo proximal, el Asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector. En el túbulo se produce la reabsorción y la secreción de sustancias (Kriz, 2004).

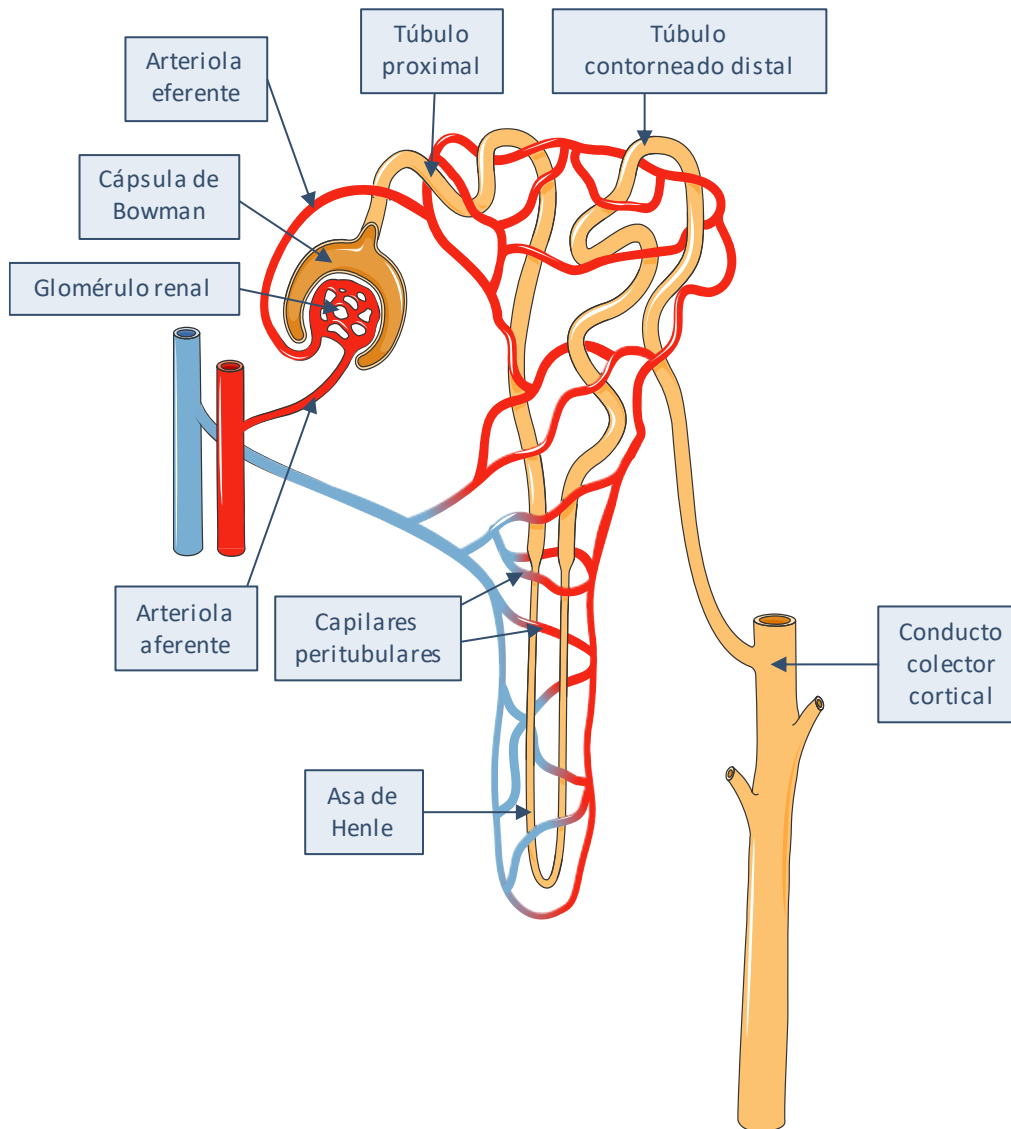


Figura 4. La nefrona, unidad básica y funcional del riñón, con sus partes.

De este modo, en la NH, se produce engrosamiento hacia el exterior en las arteriolas renales, asociado a un incremento en la producción de colágeno, provocando un estrechamiento de la luz del vaso y contribuyendo a aumentar la rigidez arterial y a disminuir el flujo sanguíneo que llega al riñón (Meyrier, 2015). A nivel glomerular, el daño comienza al producirse el cierre de los capilares debido a la hialinosis. La hialinosis consiste en la acumulación de material hialino, que se genera a partir de las proteínas plasmáticas liberadas por el endotelio junto con las proteínas de matriz extracelular producidas por las CMLVs (Mencke *et al.*, 2019). La formación de este material ocasiona una isquemia que conduce a pérdida de podocitos. Si el daño es menor y se observa un colapso (acumulación de colágeno en el espacio de Bowman), da lugar a una disminución de la filtración y a lo que se conoce como glomeruloesclerosis focal y segmentaria (Seccia *et al.*, 2019). Sin embargo, si esta isquemia perdura en el tiempo, puede dar lugar a un compromiso global del glomérulo. En lo que respecta al

daño generado en los túbulos en la NH, juegan un papel muy importante las células que lo conforman ya que pueden sufrir diferentes cambios como dilatación, atrofia y/o apoptosis. En los túbulos se puede producir infiltración celular ocasionando fibrosis túbulo-intersticial (Hill, 2008). También se producen alteraciones en los podocitos, incluidos los cambios en el fenotipo, como son la pérdida de nefrina y otras proteínas del diáfragma de filtración, proceso mediado por la hipoxia. Todos estos cambios conducen finalmente al desprendimiento de los podocitos de la membrana basal glomerular y a la generación de proteinuria (Yu *et al.*, 2005). Adicionalmente, en la NH, las células epiteliales pueden sufrir cambios de fenotipo, perdiendo las propiedades de epitelio polarizado e induciéndose un fenotipo senescente, siendo este proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) parcial (Lovisa, Zeisberg y Kalluri, 2016; Seccia *et al.*, 2019) (figura 5).

Existen varios factores implicados en la progresión de la NH, entre los que se encuentran una actividad descontrolada del sistema nervioso simpático, la activación del SRAA, la desregulación de la liberación de agua y sal por el riñón, la susceptibilidad genética y el incremento de la rigidez arterial y procesos isquémicos (Klahr, 2001; Hart y Bakris, 2010; Ahmad *et al.*, 2018).

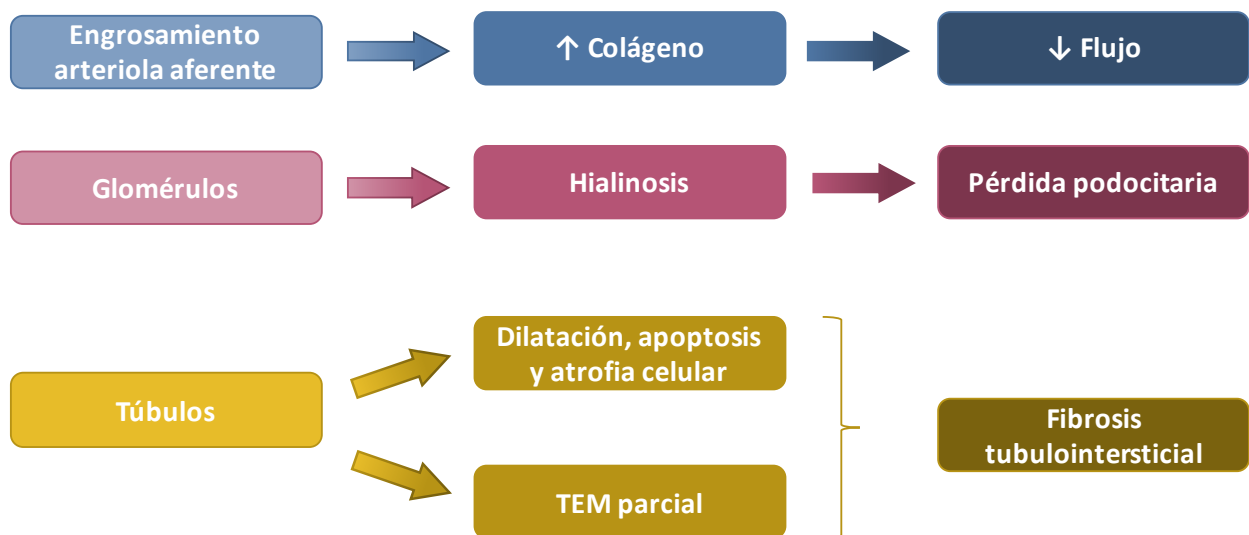


Figura 5. Procesos clave en la nefropatía hipertensiva.

Actualmente, no existe un tratamiento específico para la NH, aparte de los propiamente utilizados para el control de la hipertensión arterial. Desafortunadamente, no todos los fármacos anti-hipertensivos protegen al riñón de la misma forma ya que, mientras que los inhibidores del SRAA mejoran la función renal reduciendo la albuminuria, los bloqueantes de los canales de calcio como el amlodipino y el nifedipino ejercen un efecto vasodilatador mayor en la arteriola aferente que en la eferente, pero por esta razón pueden aumentar la proteinuria (Rodrigo Tagle, 2010; Meyrier, 2015).

Debido a los numerosos factores y procesos que participan en el desarrollo de la NH, son necesarios nuevos estudios que permitan obtener una comprensión más global de las vías de

señalización implicadas en los procesos que desembocan en esta afectación, y que faciliten el diseño de abordajes terapéuticos para el tratamiento y la prevención del daño renal asociado a la hipertensión arterial (Sun, 2019).

7. NEFROPATÍA DIABÉTICA.

La diabetes mellitus es un claro ejemplo de una patología asociada al sistema cardio-renal. Se trata de una enfermedad sistémica en la que se manifiestan lesiones tanto macro como microvasculares, siendo una de las complicaciones microvasculares más prevalentes en la nefropatía diabética (ND) (Nguyen, Shaw y Grant, 2012; Sharma *et al.*, 2017). Actualmente, la ND lidera la lista mundial de las diferentes complicaciones que pueden desembocar en ERT (Alicic, Rooney y Tuttle, 2017) siendo una enfermedad que afecta aproximadamente al 30-40% de los pacientes diabéticos, tanto de tipo 1 como de tipo 2 (Reutens, 2013). Desafortunadamente, al igual que para la hipertensión arterial, actualmente no se conoce un tratamiento efectivo para la ND.

Aunque existen varios factores de riesgo que pueden participar en el desarrollo de esta patología, los más prevalentes son el aumento en los niveles de azúcar en sangre, conocido como hiperglicemia, y la hipertensión (Alicic, Rooney y Tuttle, 2017). Las alteraciones ocasionadas por la hiperglicemia se pueden frenar si se mantienen controlados los niveles de glucosa en sangre (Tonna *et al.*, 2010; Kato y Natarajan, 2019); sin embargo, en el caso de la hipertensión se ha observado que un incremento de 10 mm Hg en la presión sistólica aumenta hasta un 15 % la probabilidad de padecer alteraciones en la función renal y albuminuria (Sternlicht y Bakris, 2016).

Actualmente, se entiende la ND como una patología multifactorial en la que tanto factores genéticos como ambientales pueden influir en la patofisiología de esta enfermedad (Navarro-González *et al.*, 2011). En lo que respecta a la aparición y el desarrollo de la ND, se diferencian cinco etapas clasificadas en función de la tasa de filtración glomerular y la excreción urinaria de albúmina. La primera etapa del daño renal es una consecuencia directa de la hiperglicemia, la cual induce una hiperfiltración glomerular. La segunda etapa está definida por cambios histológicos en la estructura del glomérulo, como el engrosamiento de la membrana basal glomerular y la expansión de la matriz mesangial. La tercera etapa se caracteriza por la aparición de microalbuminuria urinaria (30-300 mg/día), mientras que niveles superiores a 300 mg/día de albúmina en orina y la aparición de creatinuria indican un paso a la cuarta etapa de la patología. La quinta y última etapa se corresponde con un fallo renal terminal que hace necesario el comienzo de un tratamiento de diálisis o un trasplante de riñón (Keri *et al.*, 2018).

A nivel histológico, la ND cursa con diversos cambios en la estructura renal los cuales pueden diferir en parte entre los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 (Toth-Manikowski y Atta, 2015). En este sentido, en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, el primer cambio observable es el

engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular y de los capilares, el cuál es seguido por una pérdida de podocitos, de fenestras endoteliales y una expansión de la matriz mesangial. Debido al avance de la diabetes, se producen microaneurismas en las arteriolas renales y en los capilares, provocando disrupción de la matriz mesangial (mesangiolisis), y nódulos de Kimmelstiel-Wilson en el glomérulo, que son formaciones esféricas acelulares de composición hialina. Además, se acumulan proteínas plasmáticas en las arterias, arteriolas y capilares glomerulares, pudiendo desencadenar en nefroarteriosclerosis hialina. Este tipo de depósitos proteicos también se pueden observar en la cápsula de Bowman y en túbulos renales proximales. Cuando la diabetes está muy avanzada, se produce esclerosis segmental y global (Fioretto y Mauer, 2007).

Por el contrario, las anomalías histológicas encontradas en los riñones de pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 son similares pero a su vez más heterogéneas y están menos asociadas con los cambios clínicos. De este modo, se ha descrito que en los pacientes con diabetes de tipo 2 que presentan nefropatía diabética pueden existir desde mínimos cambios a nivel renal hasta glomeruloesclerosis independientemente del grado de proteinuria y albuminuria que presentan los pacientes. De hecho, a día de hoy se estima que existe una prevalencia de la ND menor al 10% en pacientes con hiperglicemia y albuminuria sin afectación en la estructura del riñón (Vestra *et al.*, 2009). En pacientes con diabetes de tipo 2 con glomerulopatía que presentan tasas de excreción de albumina anormales, se producen cambios a nivel renal en la estructura de los túbulos, en el intersticio, en las arteriolas y en los podocitos. Esta diversidad entre la relación del daño renal y las tasas de excreción de albuminuria y de filtración glomerular en estos pacientes, hacen que, actualmente, no exista un buen biomarcador de daño renal asociado a la ND.

Aunque tradicionalmente la ND ha sido considerada como una enfermedad no-inmune, actualmente existen evidencias que sugieren que, tanto las respuestas inflamatorias sistémicas como locales, pueden participar de forma activa en la progresión de la enfermedad a través de la regulación de moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento, quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias (Nguyen, Shaw y Grant, 2012; Imig y Ryan, 2013; Turkmen, 2016; Tesch, 2017).

Debido al aumento en la prevalencia de la ND en la sociedad, los estudios para intentar mejorar el conocimiento sobre esta patología están aumentando en los últimos años en el campo de la investigación farmacológica. Desafortunadamente, los resultados obtenidos hasta hoy son poco alentadores. Entre los fármacos que se están testando actualmente para combatir el progreso de la ND se encuentran se encuentran diferentes antioxidantes (Jun, 2013), un inhibidor de la quinasa PKC (ruboxistaurina), (Ishii *et al.*, 1996; Tuttle *et al.*, 2005), un inhibidor de la formación de los productos de glicación avanzada (Piridoxamina), (Lewis *et al.*, 2012), un inhibidor de la producción de TGF- β (Pirfenidona) (Sharma *et al.*, 2011), anticuerpos monoclonales anti-CTGF (Adler *et al.*, 2010), un derivado de la metil-xantina inhibidor de la enzima 3',5'-fosfodiesterasa (Pentoxifilina) (Chen *et al.*,

2004), un anticuerpo neutralizante de TNF- α (Infliximab) (Navarro-González *et al.*, 2009), un inhibidor de la vía JAK1/2 (LY3009104), (NCT0 1683409) y un bloqueante del receptor A de endotelina (Atrasentan) (Alicic y Tuttle, 2014; Moreno *et al.*, 2018).

8. LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

Actualmente, la implicación de la respuesta inflamatoria en el desarrollo y la progresión tanto de la hipertensión como la diabetes está altamente establecida (Guzik y Touyz, 2017; Tesch, 2017; Rodriguez-Iturbe, 2019). La respuesta inflamatoria, es uno de los primeros procesos que se generan en cualquier tejido frente a un daño con el fin de intentar repararlo y consta de diferentes pasos. Inicialmente, cuando hay una afección en un tejido, las células que han sufrido directamente el daño liberan, entre otras, señales en forma de quimioquinas, citoquinas o moléculas de adhesión, las cuales activan a las células endoteliales, provocando modificaciones en la vasculatura que incrementan el diámetro y el flujo vascular, para incrementar el flujo sanguíneo en la zona dañada. Paralelamente a este proceso inflamatorio, se genera una respuesta oxidativa que aumenta los niveles de las especies reactivas de oxígeno, las cuales regulan la permeabilidad endotelial favoreciendo el paso y la oxidación de lipoproteínas en el interior del endotelio, y retroalimentando positivamente los mecanismos asociados a la inflamación (Mack, 2018). Los factores liberados por las células afectadas, atraen hacia el foco del daño células implicadas en la respuesta inmune, siendo las primeras en actuar los neutrófilos que comenzarán a fagocitar los cuerpos apoptóticos generados tras el daño. Posteriormente se infiltrarán los macrófagos y, una vez dentro, comienza el reclutamiento de los linfocitos T y B (Netea *et al.*, 2017). Las células liberarán citoquinas y factores que inducirán mecanismos asociados a inflamación, apoptosis y fibrosis, haciendo que acudan más células infiltrantes al lugar donde se ha generado el daño incrementando la respuesta inflamatoria.

Estas células y los factores que liberen harán que se repare el daño regenerando la zona afectada. Si este mecanismo inflamatorio continúa de forma crónica, puede llegar a producir una reparación anómala del tejido generando una fibrosis (Cooke, 2019) (figura 6). Este proceso de cicatrización puede provocar una pérdida parcial o incluso completa de la funcionalidad del órgano dañado.

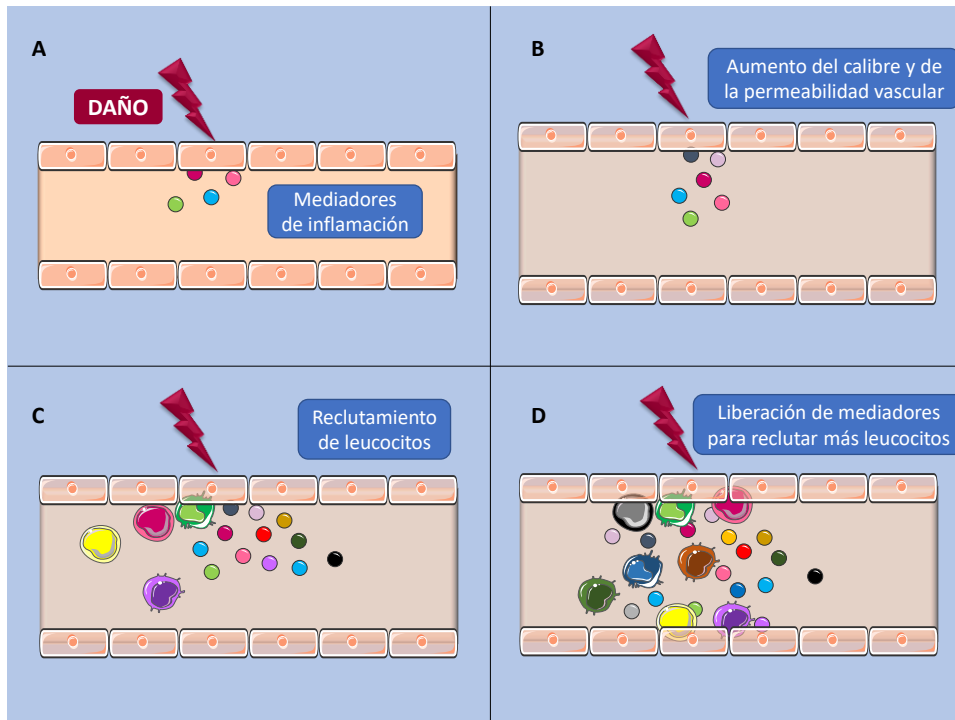


Figura 6. Proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria se puede dividir en varios pasos. A) Al producirse el daño sobre el tejido, las células afectadas liberan mediadores. B) A consecuencia de ello, aumenta el calibre del vaso y la permeabilidad vascular. C) Se produce el reclutamiento, la adhesión y la extravasación de los leucocitos. D) Estos leucocitos liberan más citoquinas para atraer más células a la zona dañada.

8.1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA HIPERTENSIÓN.

A día de hoy, son varios los estudios que han demostrado la presencia de niveles circulantes elevados de citoquinas proinflamatorias en la sangre de pacientes hipertensos (Peeters *et al.*, 2001; Barbaro y Harrison, 2019). Entre ellos, un estudio reciente realizado en pacientes con insuficiencia renal asociada a hipertensión ha descrito la presencia de niveles elevados del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y de IL-6 (Chen *et al.*, 2019). Este aumento en los niveles de ciertas citoquinas, como TNF- α e interferón- γ (IFN- γ), induce una activación de la respuesta oxidante en las células endoteliales y las CMLVs contribuyendo a la activación de los mecanismos asociados al desarrollo de la hipertensión (Guzik y Touyz, 2017). Una de las vías más importantes activadas por la respuesta oxidativa es la del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B). NF- κ B pertenece a la familia de proteínas NF- κ B/Rel que se fijan a las proteínas κ B del ADN. Se presenta como forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (I- κ B) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo. La forma activa puede ser un hetero/homodímero de 8 monómeros distintos que pertenecen a dos clases. El heterodímero más conocido es el p50/p65 en complejo con I- κ B α . Los distintos dímeros de NF- κ B presentan diferentes actividades transcripcionales, por eso las subunidades de NF- κ B pueden regular la expresión de distintos genes (Sanz *et al.*, 2010). En la ruta clásica, diversos factores promueven la activación de quinasas específicas (IKKs), las cuales fosforilan I- κ B α y liberan las subunidades p50/p65. Este complejo

una vez activado se transloca al núcleo y regula la expresión de genes diana que codifican proteínas implicadas en el proceso inflamatorio. A nivel hipertensivo, se ha demostrado que existe un aumento en la activación de la ruta de NF- κ B en modelos experimentales de hipertensión y que el uso de inhibidores de esta ruta tiene efectos protectores (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). Otros estudios realizados también en modelos experimentales de hipertensión han demostrado que los linfocitos T efectores se infiltran tanto en el riñón o en la aorta, liberando moléculas inflamatorias como IFN- γ y TNF- α que pueden alterar la función renal y vascular y promover finalmente el daño terminal (Madhur *et al.*, 2010; Marko *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). Otro estudio que avala la estrecha relación entre la respuesta inflamatoria y la hipertensión es el realizado en ratones deficientes en linfocitos T y B (ratones RAG1 -/-), el cual describe la resistencia de estos ratones a desarrollar hipertensión en respuesta a la administración sistémica de Ang II, y como la administración exógena de linfocitos T, recupera la respuesta hipertensiva (Guzik *et al.*, 2007).

8.2. LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.

Al igual que sucede con la hipertensión, los pacientes con ND incipiente presentan niveles séricos elevados de ciertos factores proinflamatorios como son TNF- α , IL-6, IL-1 y MCP-1 (Perlman *et al.*, 2015), así como de diversas moléculas de adhesión entre las que se encuentran ICAM-1 y VCAM-1 (Clausen *et al.*, 2000). En estos pacientes también se han descrito niveles elevados de MCP-1 en orina en pacientes que cursan tanto con microalbuminuria como con macroalbuminuria, lo cual hace que este factor se haya postulado como un posible biomarcador de la patología (Shoukry, Bdeer y El-Sokkary, 2015). Resultados similares se han observado a nivel tisular, de tal forma que en biopsias renales de pacientes con ND se han detectado niveles elevados de MCP-1 y RANTES así como una activación de la ruta de NF- κ B, principalmente localizados en las células tubuloepiteliales (Mezzano *et al.*, 2004). Todos estos datos indican un aumento en respuesta proinflamatoria en estos pacientes lo cual contribuye a aumentar la progresión de la enfermedad (Perlman *et al.*, 2015).

A nivel experimental se ha observado también que en numerosos modelos animales de ND existe una activación sostenida de la inflamación a nivel renal generada por un incremento del infiltrado inflamatorio y por la sobreexpresión de citoquinas y moléculas de adhesión (Tesch, 2017). En los ratones NOD (del inglés *non-obese diabetic*), los cuales presentan alteraciones renales similares a las encontradas en los pacientes diabéticos de tipo 1, se ha detectado la presencia de focos de infiltrado inflamatorio a nivel glomerular (Xiao *et al.*, 2009). Otro modelo experimental de diabetes por estreptozotocina (STZ) realizado en ratas ha mostrado un aumento en la excreción urinaria de TNF- α previa al inicio de la microalbuminuria (Kalantarinia, Awad y Siragy, 2003). Por otro lado, en un modelo de diabetes experimental inducida por administración de STZ realizado en ratones deficientes para MCP-1 se observó un menor infiltrado de macrófagos, una disminución de las lesiones renales y una

mejora de la función renal (Chow *et al.*, 2006). Todos estos estudios hacen pensar que las estrategias terapéuticas centradas en reducir o bloquear la respuesta inflamatoria pueden ser prometedoras para frenar la progresión de esta enfermedad (Moreno *et al.*, 2018).

9. CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4⁺.

Entre los numerosos tipos celulares que participan en la respuesta inflamatoria, uno de los que está cobrando una mayor relevancia en el campo de la investigación durante los últimos años es el formado por los linfocitos CD4⁺, también conocidos como linfocitos T *helper* o colaboradores (linfocitos Th). Este tipo celular participa activamente en la respuesta inmune adaptativa y, al igual que ocurre con el resto de linfocitos T, se originan y se diferencian en el timo y cuentan con el receptor de antígeno T (TCR) de tal forma que cada célula T que abandona el timo tiene una especificidad para reconocer un antígeno en concreto (Chitnis, 2007). Estas células reciben el nombre de "colaboradoras" debido a su función en la respuesta inmune, que consiste en activar a otras células que participan en la respuesta inmune, como los linfocitos B o los macrófagos.

Las células Th juegan un papel crítico en la orquestación de la respuesta inmune, ya que, dependiendo del antígeno que sea presentado y de las citoquinas que estén presentes en el entorno, los linfocitos Th pueden diferenciarse a varios subtipos (figura 7); hecho que fue descrito por primera vez en 1986 y en el que la clasificación de los subtipos de linfocitos Th que se basaba principalmente en las distintas citoquinas que liberaban estas células una vez diferenciadas (Mosmann *et al.*, 1986).

Actualmente, este concepto se ha actualizado de tal forma que se han establecido seis subtipos bien definidos: células Th1, Th2, Th9, Th17, Th foliculares (Thf) y linfocitos T reguladores (Treg) y cada uno tiene su propio patrón de producción de citoquinas y su propia función (Dupage y Bluestone, 2016). De este modo, las células T CD4⁺ se diferencian al subtipo Th1 gracias a la acción de las citoquinas IFN- γ e IL-12, mientras que el subtipo Th2 aparece cuando interviene la Interleuquina IL-4. Las células Th9 se generan por la activación de las citoquinas IL-4 y TGF- β , las células Th17 lo hacen por la acción principal de IL-6 y TGF- β , y las células Thf se inducen gracias a las citoquinas IL-6 e IL-21. Por último, los linfocitos Treg por generan por la acción única de TGF- β . La diferenciación de cada uno de estos linajes celulares implica la activación de una serie de factores de transcripción que darán lugar a la síntesis de las citoquinas efectoras particulares de cada subtipo Th (Figura 7).

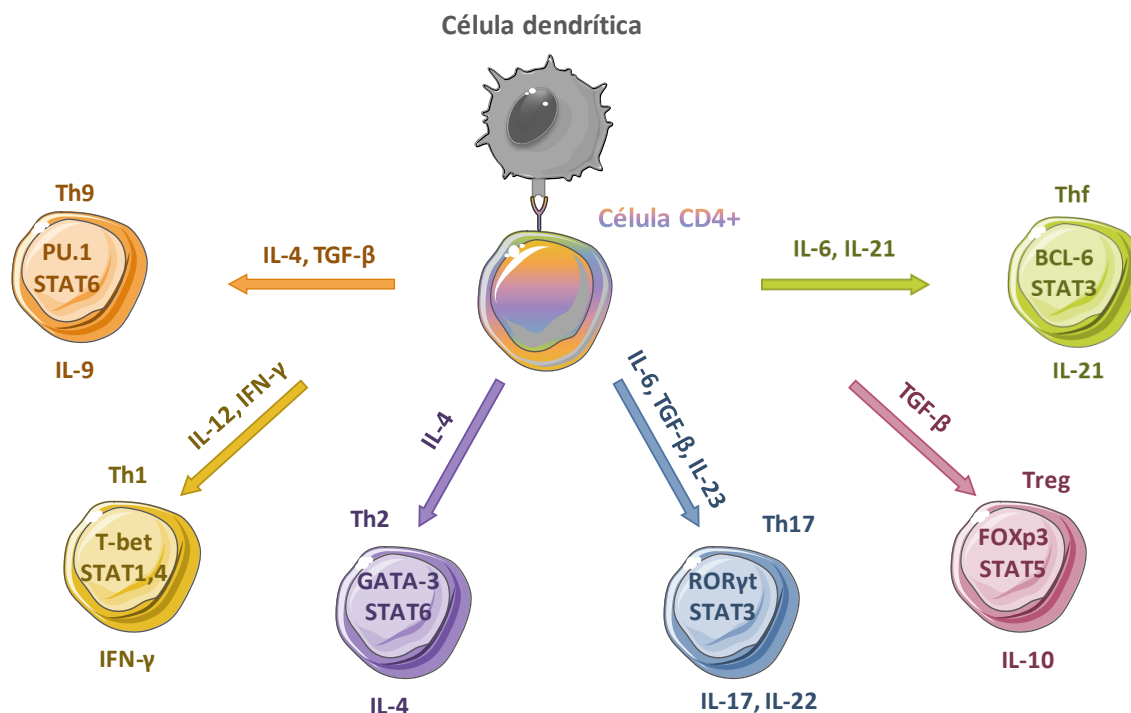


Figura 7. Subtipos de linfocitos CD4⁺. Las citoquinas implicadas en la diferenciación de cada linfocito en concreto se encuentran situadas en las flechas, mientras que las citoquinas efectoras se indican debajo de cada célula.

De este modo, cuando una célula presentadora de antígeno interacciona con un linfocito T CD4⁺ sin diferenciar y en presencia de TGF- β e IL-6, se activan los factores de transcripción ROR γ t y STAT-3, promoviendo la diferenciación celular hacia el fenotipo Th17, que es capaz de expresar las citoquinas efectoras IL-17 e IL-22 (Robert y Miossec, 2017). La citoquina IL-6 activa una señalización intracelular que desemboca en la expresión del factor de transcripción STAT-3 mientras que, a su vez, TGF- β , activa su vía canónica de señalización, que incluye los factores de transcripción Smad 2 y 3, conduciendo a la expresión de ROR γ t (Jetten, 2009). Por tanto, la diferenciación de los linfocitos T en el subtipo Th17 se podría dividir en tres pasos bien definidos. En primer lugar, se produce la diferenciación propiamente dicha, que ocurre cuando las células CD4⁺ se encuentran en presencia de TGF- β e IL-6 y se activan las cascadas intracelulares que dan lugar al nuevo fenotipo. El segundo paso, conduce a la proliferación de la estirpe celular, debido a la presencia de IL-21 producida por las mismas células y finalmente, el tercer paso conduce la estabilización de estos linfocitos gracias a la presencia de IL-23 (Robert y Miossec, 2017).

A diferencia de las células implicadas en la respuesta Th17, los linfocitos Treg tienen como principal función activar procesos antiinflamatorios, de tal manera que mantienen la autotolerancia y ejercen un papel protector. En el caso de células Treg, los factores de transcripción que se activan son STAT-3 y FOXP3, siendo IL-10 la citoquina efectora que expresan (Noack y Miossec, 2014).

A pesar de esto, existe una plasticidad celular dependiente de la concentración de diferentes citoquinas que pueden dar lugar a cambios fenotípicos en las células CD4+ una vez están diferenciadas (Figura 8). De este modo TGF- β , aunque también puede aumentar la expresión de ROR γ t, de manera predominante induce la expresión de Foxp3 llevando el balance de la diferenciación de los linfocitos CD4 hacia células Treg. Sin embargo, si existe un aumento en los niveles de IL-6 en el medio celular, se induce una represión en la expresión de Foxp3 y un aumento en la expresión del factor ROR γ t produciéndose un cambio en el balance de la diferenciación de los linfocitos CD4 hacia células Th17. Debido a esta capacidad, las células Treg pueden diferenciarse a células Th17 si existe un aumento en los niveles de IL-6 en el medio, siendo esencial un cambio en el balance de la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y Foxp3 (Ichiyama *et al.*, 2008).

Otras citoquinas clave en este proceso de plasticidad celular a favor de las células Th17 son las citoquinas IL-21 e IL-23. La presencia de estas citoquinas, unida a la expresión de IL-6 contribuyen a un aumento en la expresión de STAT-3, acompañada e una inhibición en la expresión de Foxp3 y, por tanto, contribuyendo a la diferenciación de los linfocitos CD4+ hacia células Th17 (Jetten, 2009).

Por el contrario, la presencia de otra serie de citoquinas en el medio celular como son IL-12, IL-23 e IL-1 β , pueden inducir la diferenciación de los linfocitos Th17 hacia un fenotipo intermedio Th1/Th17, el cual es capaz de expresar las citoquinas efectoras de ambos linajes. Estas células Th1/Th17 pueden polarizarse a Th1 en presencia de IL-12, del mismo modo que los propios linfocitos Th1 pueden diferenciarse de nuevo a células Th17 en ausencia de ácido retinoico, o bien retornar al linaje Th1/Th17 en presencia de TGF- β e IL-6 (Omenetti y Pizarro, 2015). Sin embargo, en este último caso, juega un papel muy importante la expresión del factor de transcripción t-bet ya que tiene la capacidad de inhibir la acción de ROR γ t y, por tanto, potenciar la diferenciación hacia Th1 (Dupage y Bluestone, 2016).

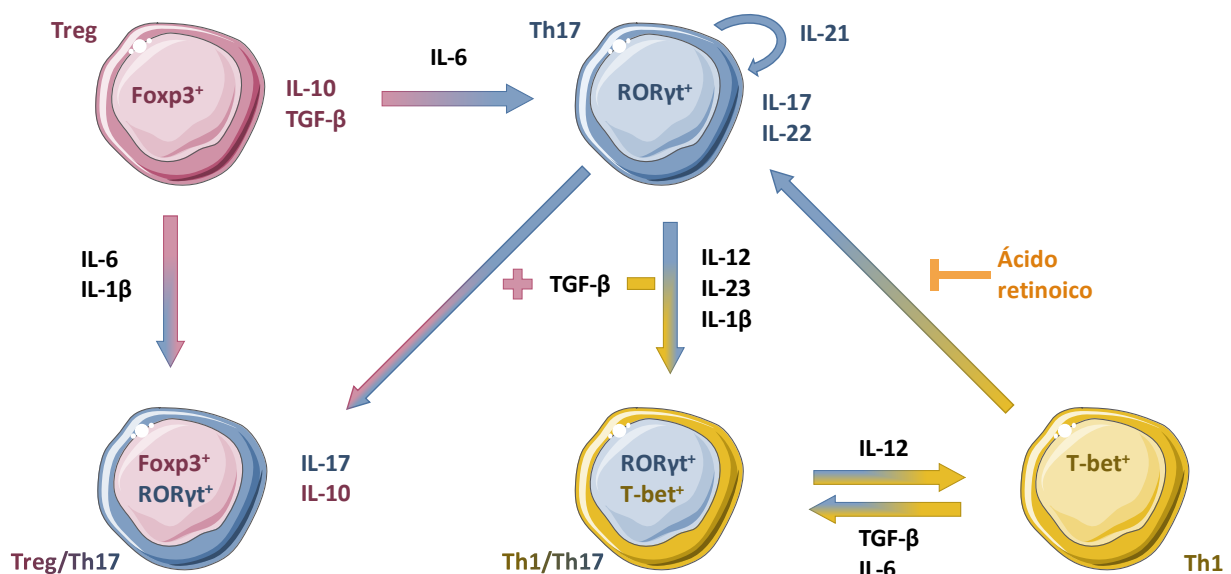


Figura 8. Las citoquinas presentes en el entorno dirigen la plasticidad entre los linfocitos Treg, Th17 y Th1. Figura adaptada (Omenetti y Pizarro, 2015).

10. RESPUESTA Th17: PAPEL DE LA INTERLEUQUINA IL-17.

La Interleuquina-17 (IL-17), conocida inicialmente como un antígeno citotóxico humano asociado a linfocitos T-8 (CTLA-8), fue aislada por primera vez de un hibridoma de células T donde el análisis de su ADNc demostró que presenta cierta homología con un gen de Herpesvirus samiri (Rouvier *et al.*, 1993). Posteriormente, la presencia de una secuencia inestable rica en adenilato-uridilato en la región 3' UTR y la capacidad de inducir la secreción de citoquinas en sus células diana, hizo que esta proteína se clasificara como citoquina (Rouvier *et al.*, 1993).

La familia de citoquinas IL-17 está compuesta por 6 miembros incluyendo desde IL-17A hasta IL-17F, siendo IL-17A el primer miembro descrito y actualmente el que más atención ha recibido en investigación. A nivel molecular, IL-17A es una glicoproteína de 155 aminoácidos y 35 Kda que está formada, por lo general, por dos monómeros iguales, u homodímeros, unidos entre sí por un puente disulfuro (Kolls y Lindén, 2004; Liu *et al.*, 2013). Las secuencias de estas citoquinas están muy conservadas dentro del grupo de los mamíferos, de tal forma que, por ejemplo, la homología de las secuencias entre las isoformas de IL-17 en humano y en ratón se encuentra entre el 62-88% (Kolls y Lindén, 2004). Todos los miembros de esta familia de citoquinas están implicados en la respuesta inflamatoria, en la respuesta autoinmune, o en las respuestas frente a parásitos como es el caso de IL-17E. Los 2 miembros de la familia con mayor homología entre sí son IL-17A e IL-17F de tal manera que pueden formar heterodímeros IL-17A/F (McGeachy, Cua y Gaffen, 2019).

En lo que respecta a IL-17F, se ha descrito que está implicada en respuestas frente a infecciones por patógenos, en enfermedades autoinmunes, en enfermedades respiratorias como el asma y en enfermedades intestinales como la enfermedad de Crohn (Chang y Dong, 2009). Sin embargo, esta citoquina tiene la peculiaridad de que, aunque su mayor fuente de producción son los linfocitos Th17, puede ser expresada también por muchos otros tipos celulares pertenecientes a la respuesta inmune innata o adaptativa, como linfocitos $\gamma\delta$, células citotóxicas naturales (células NK), células T citotóxicas naturales invariantes (iNKT), células innatas linfoides (ILC) y linfocitos T CD8⁺ (Beringer, Noack y Miossec, 2016; McGeachy, Cua y Gaffen, 2019).

Los receptores de esta familia de moléculas están formados por 2 subunidades pertenecientes a su vez a una subfamilia que engloba desde IL-17RA hasta IL-17RE, siendo IL-17RA una de las subunidades presentes en la mayoría de ellos (Monin y Gaffen, 2017) (figura 9). En el caso de IL-17A e IL-17F, tanto los homodímeros como los heterodímeros, interactúan con el complejo formado por las subunidades IL-17RA e IL-17RC (McGeachy, Cua y Gaffen, 2019). La subunidad IL-17RA está expresada en multitud de tipos celulares, mientras que el resto de subunidades se expresan en una serie de tipos celulares concretos en cada caso, explicando así la especificidad de sus respectivos ligandos.

Aunque, tal y como se ha descrito anteriormente, IL-17A e IL-17F comparten receptor, IL-17A se une con mayor afinidad a IL-17RA mientras que IL-17RC tiene mayor afinidad por IL-17F (Wright *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Además, también se ha descrito que la subunidad IL-17RA está más expresada en células de la respuesta inmune mientras que, por el contrario, la subunidad IL-17RC está más expresada en células no inmunes (Monin y Gaffen, 2017). Estas diferencias en cuanto a la afinidad y la expresión de los receptores, puede explicar las diferencias que existen respecto a la intensidad de la respuesta inducida por ambas citoquinas, de manera que IL-17A activa una respuesta mucho más intensa que IL-17F.

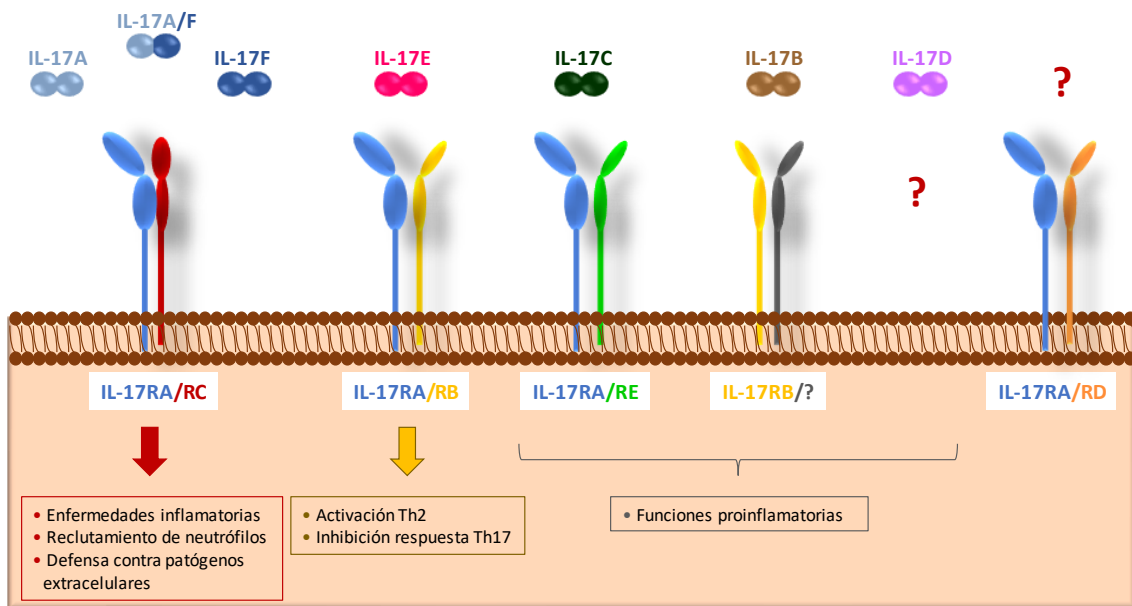


Figura 9. Proteínas de la familia de IL-17, con sus receptores. Figura adaptada (Beringer, Noack y Miossec, 2016; Monin y Gaffen, 2017).

A nivel estructural, cada subunidad que conforma los receptores está formada por una región extracelular donde se unen a la citoquina correspondiente, y una región intracelular, formada por una región denominada SEFIR (del inglés *Similar Expression to Fibroblast growth factor Interleukin-17 Receptor*), que se une a la proteína adaptadora Act1. Una vez activada, Act1 poliubiquitina al factor asociado al receptor de necrosis tumoral-6 (TRAF6), liberando la quinasa TAK1 y desencadenando la activación de la vía del factor NF- κ B, de la vía de señalización de MAPK así como de las proteínas potenciadoras de unión a la secuencia génica CCAAT (C/EBPs), y dando lugar a la transcripción de los genes proinflamatorios correspondientes (Swaidani *et al.*, 2019) (Figura 10).

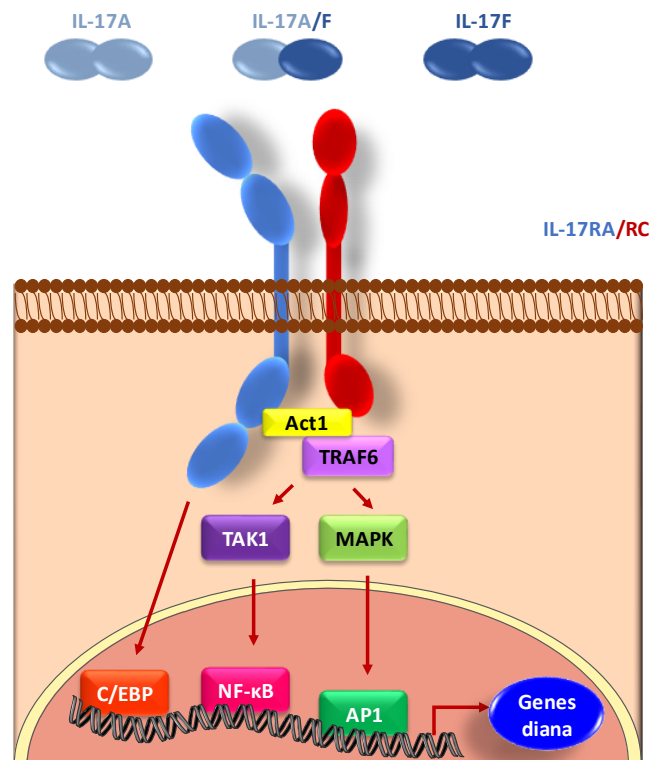


Figura 10. Respuestas intracelulares activadas a través del receptor IL-17RA/IL-17RC.

Aunque tal y como se ha descrito anteriormente IL-17RA está expresada en todos los tejidos, la señalización más documentada acerca de los receptores de IL-17 ocurre en células no hematopoyéticas, particularmente en fibroblastos y células endoteliales (Shen y Gaffen, 2008). Una de las primeras demostraciones de la implicación de IL-17 en la respuesta inflamatorio se realizó en células de sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide, donde la citoquina IL-17A activaba la producción de IL-6 e IL-8 (Fossiez *et al.*, 1996). A nivel vascular, se ha descrito que en células endoteliales IL-17A induce una respuesta proliferativa y promueve la secreción de GM-CSF y IL-8 (Yuan *et al.*, 2015). Del mismo modo, en CMLVs, IL-17A promueve la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y quimioquinas como MCP-1 e IL-8, incrementa la expresión de moléculas de adhesión como ICAM o VCAM-1 y de las metaloproteasas MMP1 y MMP9 e induce un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (Erbel *et al.*, 2009). Además, en este mismo tipo celular, la combinación de IL-17A con IFN- γ mostro una activación en la expresión de IL-6, CXCL8 y CXCL10 (Eid *et al.*, 2009).

A nivel renal, se ha observado que IL-17A es capaz de estimular la producción de diversas citoquinas y quimioquinas como IL-6, IL-8 y MCP-1 en células tubuloepiteliales humanas *in vitro* (Van Kooten *et al.*, 1998). Además, en células mesangiales murinas, también se ha se ha descrito que IL-17A induce la producción de citoquinas proinflamatorias y moléculas quimioattractantes de macrófagos, neutrófilos y células T (Iyoda *et al.*, 2010).

10.1. RESPUESTA Th17 EN DIVERSAS PATOLOGÍAS.

Aunque tradicionalmente la presencia de linfocitos Th17 se asociaba exclusivamente a enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico o la esclerosis múltiple (Yang *et al.*, 2014; Noack y Miossec, 2017; Yago *et al.*, 2017) recientemente su participación también se ha extendido a enfermedades que cursan con una respuesta inflamatoria crónica como son la aterosclerosis o la hipertensión.

10.2. RESPUESTA Th17 EN HIPERTENSION Y DAÑO VASCULAR.

La importancia de la respuesta Th17 en la hipertensión queda refrendada en diversos estudios en los que se han encontrado niveles circulantes elevados de IL-17A tanto en pacientes hipertensos como en patologías que cursan con hipertensión asociada a enfermedades autoinmunes, incluyendo lupus eritematoso sistémico, preeclampsia y rechazo crónico del trasplante (Loverre *et al.*, 2011; McMaster *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2015; Beringer, Noack y Miossec, 2016; Chehimi, Vidal y Eljaafari, 2017).

Además, en pacientes hipertensos, también se ha observado que el número de células T CD4⁺ circulantes productoras de IL-17A se encuentra elevado (Itani *et al.*, 2016). Por otro lado, existen numerosos datos experimentales que apoyan el papel de las células Th17 y su citoquina efectora IL-17A en la patogénesis de la hipertensión (McMaster *et al.*, 2015). En este sentido, un estudio realizado en ratones deficientes en linfocitos T y B a los que se les indujo una respuesta hipertensiva mediante la administración sistémica de Ang II, demostró que estos ratones no presentaban un incremento de la presión arterial ni mostraban cambios vasculares en respuesta a Ang II, mientras que mediante la transferencia de células T a estos ratones se restauraba la susceptibilidad a los efectos inducidos por Ang II (Guzik *et al.*, 2007). Posteriormente, otros estudios experimentales en los que se inhibió la expresión de IL-17A bien en ratones genéticamente modificados o utilizando anticuerpos neutralizantes contra IL-17A, apoyaron aun más la participación de esta citoquina en la patogénesis de la hipertensión y la disfunción vascular/renal, demostrando que la ausencia de esta citoquina rebaja los valores de presión arterial en diversos modelos de hipertensión experimental (Madhur *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Saleh, Norlander y Madhur, 2016; Guzik y Touyz, 2017) y disminuye el remodelado y la rigidez aórtica inducida por Ang II (Wu *et al.*, 2014).

Otros estudios experimentales han demostrado que la sobreexpresión de IL-17A ya sea por su sobreexpresión en queratinocitos en un ratón transgénico o bien por su administración intraperitoneal a una dosis de 1 µg/día produce un incremento en la presión arterial e induce un aumento del estrés oxidativo a través de la fosforilación del residuo de treonina 495 de eNOS dependiente de Rho-quinasa que conduce a la generación de una disfunción endotelial (Nguyen *et al.*, 2013; Karbach *et al.*, 2014).

En la patología aterosclerótica, se ha descrito que la ausencia de IL-17A reduce el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de aterosclerosis experimental realizado en ratones IL-17A/ApoE lo cual podría contribuir a estabilizar la placa de ateroma (Madhur *et al.*, 2011). Sin embargo, el papel de esta citoquina en esta enfermedad parece tener una función ambigua dependiendo del estadio en el que se encuentre tal y como describieron Liuzzo y cols. en una elegante revisión (Liuzzo, Trotta y Pedicino, 2013).

A pesar de estos datos, a día siguen existiendo dudas acerca de los efectos directos que tiene IL-17A sobre el remodelado vascular y, más aún sobre las arterias de pequeño calibre.

10.3. RESPUESTA Th17 EN DAÑO RENAL.

La importancia de la respuesta Th17 en el daño renal se puso se manifiesto por primera vez en 1998 cuando se detectó la expresión génica de IL-17A en biopsias de pacientes con rechazo de aloinjertos renales (Van Kooten *et al.*, 1998). Desde entonces, han sido varios los estudios realizados en modelos experimentales de daño renal autoinmune, como glomerulonefritis anti-membrana basal o nefritis lúpica (Hunemorder *et al.*, 2015; Pacheco-Lugo *et al.*, 2019) y en modelos no inmunes, como el modelo de obstrucción unilateral del uréter y de nefropatía diabética, donde se ha demostrado la presencia de células Th17 y niveles elevados de IL-17A en riñón asociados a una respuesta inflamatoria renal (Dong *et al.*, 2008; Pindjakova *et al.*, 2012; Rodrigues-Diez *et al.*, 2013; Ramani *et al.*, 2018).

A nivel clínico, se ha descrito la presencia de IL-17A a nivel glomerular en pacientes con nefritis lúpica (Crispín *et al.*, 2008), y también a nivel sérico y renal en algunos pacientes con vasculitis y glomerulonefritis asociada a ANCA (Nogueira *et al.*, 2010; Velden *et al.*, 2012). Además, en pacientes con ERC, se observó que la uremia y los líquidos utilizados en diálisis peritoneal estaban asociados con una respuesta inmune alterada, un desbalance entre Th1/Th2, una respuesta inflamatoria sostenida y una activación de la respuesta inmune Th17 (Libetta *et al.*, 2011; Rodrigues-Diez *et al.*, 2014; Stenvinkel *et al.*, 2016).

Debido a estas investigaciones, IL-17A se ha postulado como un importante mediador proinflamatorio implicado en la patogénesis de enfermedades inflamatorias inmunes y crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y varias glomerulonefritis mediadas por la respuesta inmune (Cortvrindt *et al.*, 2017; Krebs *et al.*, 2017; Robert y Miossec, 2017), lo que ha servido para que sea propuesta como una potencial diana terapéutica.

10.4. RESPUESTA Th17 EN DIABETES.

En pacientes diabéticos de tipo I, también se ha descrito un desajuste en el eje Treg/Th17 (Ryba-Stanislawowska *et al.*, 2013), así como en los niveles séricos de IL-17A y de otras citoquinas relacionadas con la respuesta Th17, como IL-21, en comparación con individuos sanos (Baharlou *et al.*, 2016; Marwaha *et al.*, 2017). Dado que la diabetes de tipo I está ocasionada por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas productoras de insulina, resulta interesante el hecho de que los pacientes diabéticos de tipo 1 con función residual de las células β presenten a largo plazo un número menor de células IL-17A⁺ con respecto a células Treg, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, demostrando la posible plasticidad de estas células hacia el subtipo Th1 en esta patología (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, otro estudio en el que se evaluaron los niveles séricos de IL-17A e IL-23 tanto en pacientes diabéticos de tipo 1 como de tipo 2, no mostró diferencias significativas en los niveles de ambas citoquinas con respecto a los niveles séricos encontrados en individuos sanos, demostrando que estas citoquinas no participan directamente en la patogenia de la enfermedad (Roohi *et al.*, 2014). En cuanto a pacientes diabéticos de tipo 2 que cursan con y sin ND, se ha observado que el número de células circulantes Th17 así como de su citoquina efectora IL-17A está disminuido con respecto a individuos sanos, mientras que el número de células Th foliculares se encuentra aumentado (von Scholten *et al.*, 2016, Vasanthakumar *et al.*, 2015). Por otro lado, un trabajo realizado posteriormente ha descrito que los niveles de IL-17A en orina de pacientes con ND avanzada son inferiores a los encontrados en pacientes diabéticos con daño renal leve (Mohamed *et al.*, 2016). Contrariamente, en pacientes diabéticos de tipo 2 que presentan una cirrosis provocada por infección del virus de la hepatitis C, se detectaron niveles séricos de IL-17A más elevados que en pacientes no diabéticos (Hetta *et al.*, 2017).

Todos estos datos, ponen de manifiesto el papel relevante que juegan tanto la respuesta inflamatoria como la activación del sistema inmune en la diabetes y en sus complicaciones diversas complicaciones asociadas, incluida la ND.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En esta tesis se evalúa la hipótesis de que la activación de la respuesta inmune Th17, y por tanto, el aumento de la producción de IL-17A, podría contribuir a la progresión del daño renal y vascular asociado a hipertensión y diabetes.

Objetivos:

1. Evaluar el efecto de la administración sistémica de IL-17A en ratones sobre la tensión arterial y en la lesión en órganos diana (arterias mesentéricas de resistencia, aorta y riñón).
2. Estudiar si el bloqueo de IL17A disminuye el daño vascular y renal asociado a hipertensión, utilizando para ello el modelo de administración sistémica de Angiotensina II y anticuerpos neutralizantes frente a IL-17A.
3. Investigar *in vitro* si IL-17A regula procesos claves en el daño como proliferación, migración, inflamación y fibrosis, estudiando células de músculo liso vascular de ratón.
4. Determinar la presencia renal de IL-17A en pacientes con daño renal por hipertensión (nefroesclerosis hipertensiva).
5. Evaluar la activación de la respuesta Th17 nefropatía diabética experimental y humana.
6. Estudiar si el tratamiento terapéutico con anticuerpos neutralizantes de IL-17A disminuye el daño renal en un modelo experimental de nefropatía diabética.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES.

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE MANTENIMIENTO.

Todos los procedimientos realizados en animales se a cabo bajo el marco de la normativa legal vigente (BOE Núm. 280, Real Decreto 1386/2018, Ley 32/2007) y contaron con la aprobación de los comités éticos de experimentación animal de las instituciones en las que fueron realizados (Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid o Universidad Austral de Chile). Todos los animales fueron aislados al llegar a los estabularios durante un período de cuarentena siendo posteriormente alojados en jaulas ventiladas para evitar lo máximo posible la exposición a agentes patógenos.

1.2. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS.

Los modelos murinos de administración sistémica de IL-17A y Ang II fueron realizados con ratones macho de la cepa C57BL/6 de entre 9-12 semanas de edad (Charles River, Barcelona) con un rango de peso de entre 20-25 gr. Los estudios experimentales en ratones diabéticos fueron realizados en ratones de la cepa *Black Tan and Brachyuric* (BTBR) deficientes del gen de leptina (ob⁻ob), (Jackson, Bar Harbor; Maine, Estados Unidos). Este último grupo de ratones (BTBR ob/ob) fue obtenido mediante el apareamiento cruzado de ratones BTBR heterocigotos para el gen de leptina (BTBR ob⁺/-). Para diseñar el grupo control de ratones se utilizaron los ratones homocigotos BTBR ob⁻/ob⁻. La elección del ratón BTBR ob/ob está basada en que las anomalías encontradas en estos ratones se asemejan a los síntomas encontrados en pacientes con nefropatía diabética. La cepa de ratones BTBR ob/ob tiene la capacidad de desarrollar diabetes tipo 2 severa, hipercolesterolemia, triglicéridos elevados y resistencia a la insulina, lo que hace que, a nivel renal, presenten hipertrofia glomerular, acumulación de matriz mesangial, así como una proteinuria progresiva. (Hudkins *et al.*, 2010).

1.3. EUTANASIA Y TOMA DE MUESTRAS.

En todos los modelos se tomaron medidas del peso corporal, y se recogieron muestras de orina en los tiempos seleccionados. Previo a la eutanasia, se recogieron alícuotas de sangre de cada ratón. En el momento de la eutanasia, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Xilacina (Rompun, 5 mg/kg; Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y Ketamina (Ketolar, 35 mg/kg; Pfizer, Nueva York, Estados Unidos). Tras la eutanasia, se extrajeron los riñones, la aorta y/o las arterias mesentéricas de resistencia (AMRs) dependiendo del modelo experimental realizado. En los modelos en los que no se extrajo las aortas y las AMRs, los ratones fueron perfundidos por vía intracardiaca con una solución de suero salino al 0,9%. Se tomaron secciones de aorta y riñón y se fijaron en una solución salina de paraformaldehído

(PFA) al 4% para posteriormente incluirlas en parafina y realizar estudios histológicos. El resto del tejido aórtico y renal fue congelado en nitrógeno líquido para su posterior procesado y estudio de los niveles de expresión génicos y proteicos. Un segmento de la segunda rama de la AMRs fue utilizado para realizar estudios estructurales y mecánicos y otro segmento fue incluido en medio de criopreservación (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Spain, Barcelona) para realizar estudios de inmunofluorescencia.

1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN RATONES.

Los ratones fueron separados en 2 grupos de 10 animales. Un grupo fue tratado con IL-17A (0,035 ng/kg/min, disuelto en suero salino; Peprotech, Londres, Reino Unido), utilizando para ello una minibomba osmótica de liberación sistémica (Modelo 2002; Alza Corp., Palo Alto, California, Estados Unidos) implantada subcutáneamente en la zona dorsal de los ratones durante 14 días (figura 11). La dosis de IL-17A administrada fue calculada teniendo en cuenta estudios experimentales previos, con el fin de obtener unos niveles séricos de IL-17A similares a los observados en pacientes prehipertensos (Madhur *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2015). Se recogieron muestras de orina y se tomaron medidas de la presión sanguínea en ambos grupos a los días 0, 7 y 14. Transcurridos 14 días, los animales fueron eutanasiados y se recogieron muestras de sangre, aorta, riñón y AMRs para realizar los estudios correspondientes, según se ha descrito anteriormente.

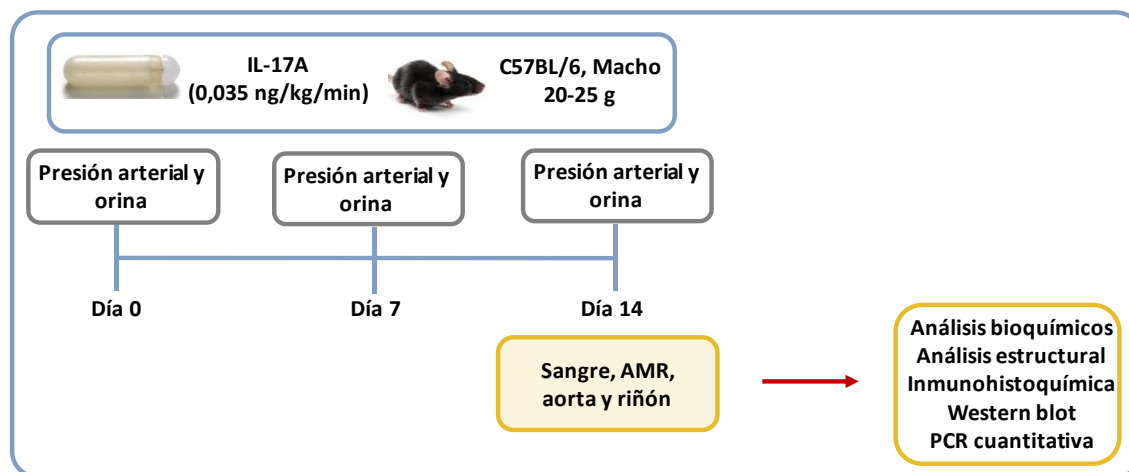


Figura 11. Esquema del modelo de administración sistémica de IL-17A en ratón.

1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A EN RATONES TRATADOS CON ANGIOTENSINA II.

Para realizar este modelo, los animales fueron separados en tres grupos de 8 ratones. Un grupo fue tratado con Ang II mediante la implantación de una minibomba osmótica de liberación sistémica (1000 ng/kg/día en salino). Otro grupo fue tratado conjuntamente con la misma dosis de Ang II y con 3 dosis de un anticuerpo neutralizante de la citoquina IL-17A (100 µg/ratón, eBioMM17F3, eBioscience, San Diego, California, Estados Unidos) administrado por vía intraperitoneal un día antes de comenzar el tratamiento con Ang II y los días 4 y 9 del estudio (figura 12). Para el cálculo de la dosis de anticuerpo neutralizante de IL-17A a utilizar, se tuvieron en cuenta estudios previos (Rodriguez-Diez *et al.*, 2014). El tercer grupo no recibió ningún tratamiento y fue utilizado como grupo control del modelo experimental. Tras 14 días, todos los animales fueron eutanasiados y se tomaron muestras de aorta, riñón y AMRs para su posterior estudio.

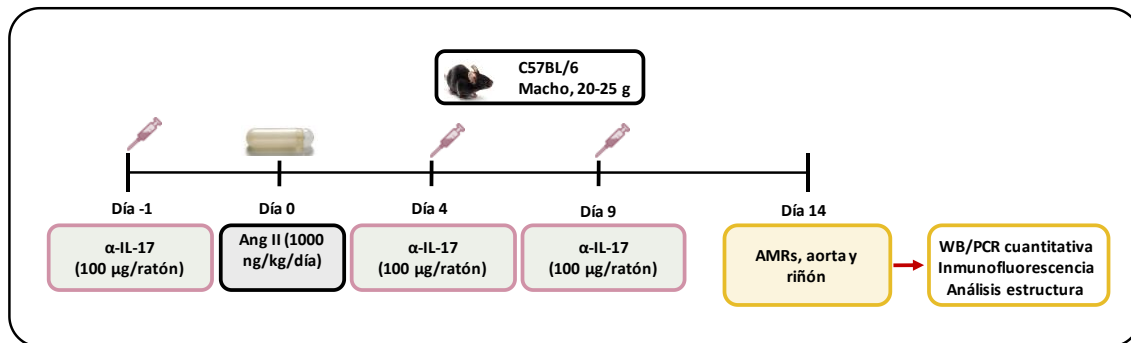


Figura 12. Esquema del modelo de neutralización de IL-17A en ratones tratados con Angiotensina II.

1.6. MODELO EXPERIMENTAL DE NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A EN RATONES BTBR ob/ob.

Para llevar a cabo este modelo experimental, se realizaron 4 grupos de estudio constituidos por 6-8 ratones. Un grupo de ratones BTBR ob/ob (diabéticos) fue tratado con un anticuerpo neutralizante de la citoquina IL-17A (50 mg/kg/día). Un segundo grupo de ratones BTBR ob/ob fue tratado con la misma dosis de un anticuerpo IgG1-k para ser utilizado como grupo control del tratamiento con el anticuerpo neutralizante de IL-17A. La administración de los anticuerpos en ambos grupos se llevó a cabo utilizando minibombas osmóticas de liberación sistémica alojadas en la zona dorsal de los ratones. La implantación de las minibombas se realizó a las 15 semanas de edad, siendo un tratamiento terapéutico puesto que los ratones a partir de la semana 14 desarrollan las lesiones de nefropatía diabética (ND), y el tratamiento se extendió hasta que los ratones fueron eutanasiados a las 20 semanas de

edad (figura 13). El tercer grupo lo conformaron ratones BTBR ob/ob sin ningún tratamiento, mientras que en el cuarto grupo se incluyeron ratones BTBR ob-/ob- (wt, sin obesidad ni diabetes) para ser utilizados como grupo control del estudio.

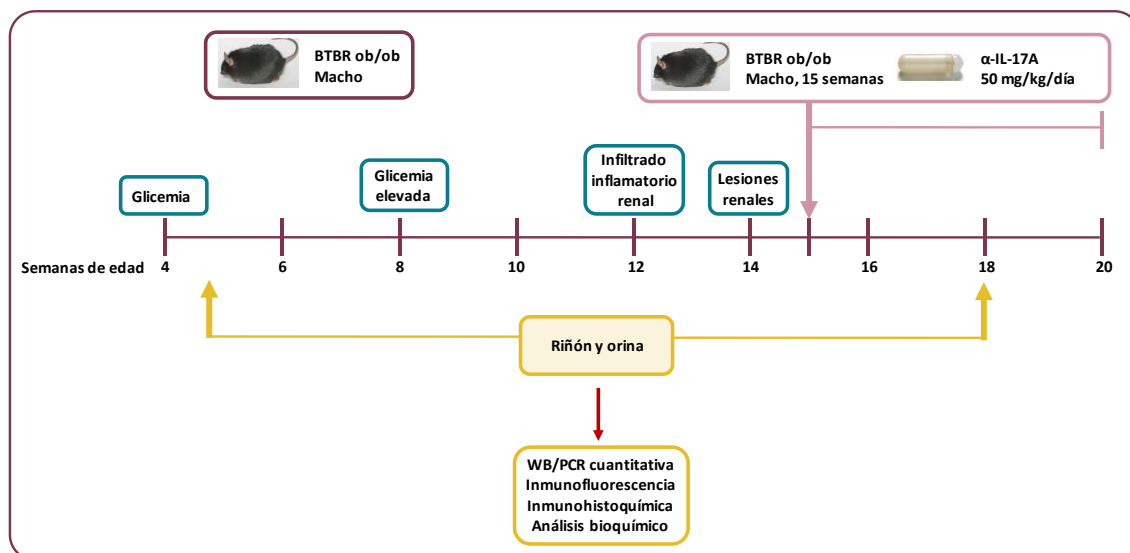


Figura 13. Esquema del modelo BTBR ob/ob y evolución de la diabetes y el daño renal.

2. OBTENCIÓN Y CARÁCTERIZACIÓN DE MUESTRAS HISTOPATOLÓGICAS HUMANAS.

Previo obtención de las biopsias renales utilizadas en este trabajo, los pacientes firmaron un formulario de consentimiento informado aprobado por el comité ético de investigación clínica de cada Hospital participante. Todos los estudios que se realizaron cumplen la normativa de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2013: Séptima actualización, 64^º Asamblea General, Fortaleza, Brasil). Para el diagnóstico de todos los casos estudiados, la morfología de cada biopsia fue evaluada utilizando las tinciones de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y ácido peryódico de Schiff (PAS) y evaluadas por patólogos cualificados.

Las biopsias renales de los pacientes diagnosticados con nefroangioesclerosis hipertensiva (NH) fueron facilitadas por el Servicio de Nefrología de la Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile). Los pacientes diagnosticados con NH supusieron un 2% de todas las biopsias analizadas (n=20, edad 56,7 ± 17,1 años; relación hombres/mujeres: 8/12). La toma de biopsias se llevó a cabo en aquellos pacientes que presentaban hipertensión y presencia de proteinuria en orina y/o una disminución de la función renal. Los valores medios de proteinuria fueron de 200 ± 130 mg/dL y la creatinina sérica de 2,0 mg ± 1,3 mg/dL. El criterio de inclusión clave de estas muestras en el estudio, fue el diagnóstico histopatológico de nefroangioesclerosis atribuida a la hipertensión en ausencia de evidencias de otras

enfermedades renales independientes evaluadas por técnicas de inmunofluorescencia y con microscopía electrónica negativa para depósitos inmunes.

Las biopsias renales de los pacientes diagnosticados con nefropatía diabética (ND) se obtuvieron por biopsia renal percutánea de pacientes sometidos a evaluación diagnóstica de dos hospitales diferentes: Servicio de Nefrología de la Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile: n=10) y Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (Santa Cruz de Tenerife: n=8).

3. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA EN RATONES.

Para registrar las medidas de la presión arterial se utilizó el sistema no invasivo de adquisición LE5001 (Panlab, Harvard Apparatus, Massachusetts, Estados Unidos) y el manguito y el transductor adecuados para ratón (76-0432; Panlab Harvard Apparatus). Las medidas de la presión arterial se tomaron en una sala con la temperatura regulada (22°C). Antes de medir este parámetro, la temperatura corporal de los ratones se elevó hasta 37°C durante 10 min y se mantuvo a 35°C durante el tiempo de medición. El manguito de oclusión se colocó en la base de la cola y el transductor fue ubicado adyacente al manguito de oclusión. Se recogieron entre 10 y 15 medidas por cada animal durante cada sesión siendo las 5 primeras medias excluidas del estudio. Los ratones fueron habituados a la toma de medidas de presión sanguínea al menos 3 días antes del comienzo de los experimentos. La presión arterial sistólica fue expresada como la media de 5-10 medidas por día.

4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE Y ORINA.

Las muestras de orina fueron recogidas en viales de 1,5 ml, centrifugadas a 2500 r.p.m. y posteriormente el sobrenadante fue recolectado para evaluar los niveles de albúmina utilizando un ELISA comercial (ab108792, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca en el momento de la eutanasia y recolectada en tubos comerciales para extracción de suero (Serum Tubes Clot Activator Vacuette España, Madrid, España). Los tubos fueron centrifugados a 2500 r.p.m durante 15 min y el suero obtenido almacenado a -80°C para realizar determinaciones bioquímicas de los niveles de urea y creatinina sanguínea. Las medidas sanguíneas fueron realizadas por el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

5. EVALUACIÓN DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA (AMRs).

Para realizar los experimentos en las AMRs, se utilizó la primera rama de la arteria mesentérica superior. A partir del lecho mesentérico de los ratones, se separó la arteria de la vena que se encuentra junto a ella y se limpió de tejido adiposo en una solución de Krebs.

5.1. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y MECÁNICAS DE LAS ARTERIAS DE RESISTENCIA (AMRs).

5.1.1. PROCEDIMIENTO.

Para realizar este estudio, los segmentos aislados de las AMRs fueron colocados en dos microcánulas de cristal e incubados en una solución de Krebs (KHS: 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 11,1 mM glucosa y 0,01 mM Na₂EDTA) dentro de un baño de perfusión para vasos pequeños acoplado a un miógrafo de presión (Danish MyoTech, Model P100, J.P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). Los extremos del segmento arterial se unieron a las microcánulas utilizando suturas quirúrgicas de nylon, material con el cual también fueron ocluidas las ramas vasculares pequeñas. Las paredes del vaso se ajustaron de tal forma que quedaran paralelas a las microcánulas, posteriormente se elevó la presión intraluminal hasta 120 mm Hg y por último se volvió a ajustar la pared vascular de los segmentos para que quedaran en paralelo. Una vez ajustado, el segmento se llevó hasta una presión de 45 mmHg y se equilibró durante 60 min a 37°C en un baño con KHS libre de calcio (0Ca²⁺; añadiendo 1 mM EGTA y perfundido de forma extravascular e intravascular. Transcurridos 60 min, la presión intraluminal se redujo hasta 3 mm Hg. Posteriormente, se tomaron medidas del diámetro externo e interno de los segmentos vasculares a la presión inicial (3 mm Hg), a 20 mm Hg y en cada aumento de 20 mm Hg hasta llegar a 120 mm Hg. Finalmente, las arterias se ajustaron a 45 mm Hg en 0Ca²⁺-KHS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (0,2 M, pH 7,2–7,4) a 37°C durante 60 min y se guardaron a 4°C para realizar los estudios de microscopía confocal.

5.1.2. OBTENCIÓN DE LOS DATOS.

Para la obtención de los diámetros interno y externo de los vasos se realizaron medidas en condiciones pasivas (D_{i0Ca} , D_{e0Ca} , medidas tomadas en solución de Krebs libre de Calcio) durante 2 min para cada presión intraluminal utilizada. El valor final usado fue la media de las medidas tomadas durante los últimos 30 segundos, una vez que las medidas estaban estabilizadas. Las medidas obtenidas fueron utilizadas para calcular diferentes parámetros estructurales y mecánicos:

- Grosor de la pared = $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})/2$.

-Área de la sección transversal = $(\pi/4) \times (D_{e0Ca}^2 - D_{i0Ca}^2)$.

-Relación pared/lúmen = $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})/2D_{i0Ca}$.

-La distensibilidad incremental representa el cambio en el porcentaje en el diámetro interno de la arteria para cada cambio de mmHg en la presión intraluminal y se calculó de acuerdo a la fórmula: Distensibilidad incremental = $\Delta D_{i0Ca}/(D_{i0Ca} \times \Delta P) \times 100$.

-Tensión de la pared circunferencial (ϵ) = $(D_{i0Ca} - D_{00Ca})/D_{00Ca}$, dónde D_{00Ca} es el diámetro interno a 3 mmHg y D_{i0Ca} es el diámetro interno observado para una presión intravascular dada, con ambas medidas en medio $0Ca^{2+}$.

-Estrés circunferencial de la pared (σ) = $(P \times D_{i0Ca})/(2 \times \text{Grosor de la pared})$, dónde P es la presión intraluminal (1 mmHg = $1,334 \times 10^3$ dinas/cm²).

-La rigidez arterial independiente de la geometría se determina por el módulo de elasticidad de Young ($E = \text{estrés}/\text{tensión}$). La relación estrés-tensión no es lineal; por tanto, es más apropiado obtener el módulo de elasticidad tangencial o incremental (E_{inc}) determinando la pendiente de la curva estrés-tensión ($E_{inc} = \delta\sigma/\delta\epsilon$). E_{inc} se obtuvo adecuando los datos de estrés-tensión de cada animal a una curva exponencial usando la ecuación $\sigma = \sigma_{orig} \exp \beta \epsilon$, dónde σ_{orig} es el estrés al diámetro original (diámetro a 3 mmHg). Tomando derivadas en la ecuación, se ve que $E_{inc} = \beta \sigma$. Para un valor σ dado, E_{inc} es directamente proporcional a β . Un incremento en β implica un aumento en E_{inc} , que significa un incremento en rigidez.

5.2. ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN DE LA LÁMINA ELÁSTICA INTERNA.

La organización de la elastina dentro de la lámina elástica interna en los segmentos de las AMRs fue evaluada mediante microscopía confocal de fluorescencia, teniendo en cuenta las propiedades autofluorescentes que presenta la elastina (longitud de onda de excitación: 488 nm; longitud de onda de emisión: 500–560 nm) (Briones *et al.*, 2003). Los experimentos se realizaron en los segmentos que han sido utilizados en el miógrafo de presión, fijados en condiciones pasivas, utilizando el sistema confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se captaron imágenes seriadas en el eje z de las distintas capas de la pared vascular desde la adventicia hasta el lumen utilizando un objetivo 40X (Zoom 4), con una distancia entre planos de 0,5 μm utilizando una longitud de onda de excitación de 488nm. El análisis cuantitativo de la lámina elástica interna se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes Metamorph (Universal Imaging, Molecular Devices Corp., Downingtown, Pensilvania, Estados Unidos), que permite obtener una proyección bidimensional del tejido de estudio. Las proyecciones de la lámina elástica interna se reconstruyeron con cada grupo de imágenes y con ello se cuantificó el número y el área media de los poros (fenestras), lo cual está directamente relacionado con las propiedades mecánicas del vaso.

5.3. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN Y EL TAMAÑO DE LOS NÚCLEOS EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLVs).

La distribución y el tamaño de los núcleos de las CMLVs se cuantificó en los segmentos mesentéricos previamente fijados en condiciones pasivas. Los segmentos arteriales fueron incubados con el marcador nuclear Hoechst 33342 (0,01 mg/ml, Sigma Chemical Co.; St Louis, Misuri, Estados Unidos) y se visualizaron con el sistema confocal Leica TCS SP2. Se captaron imágenes seriadas en el eje z de las distintas capas de la pared vascular con un objetivo 63X (zoom 2) con una distancia entre planos de 0,5 μm . Para la medida del grosor de las distintas capas se utilizó como primera imagen de cada una de las capas aquellas en la que aparece el primer núcleo de una célula de esa capa. De la misma forma, se tomó como referencia de última imagen de cada capa aquella en la que aparecía la última célula de esa capa. Para la cuantificación y el análisis de las células y el área de los núcleos se utilizó el programa de análisis de imágenes Metamorph. La comparación entre los diferentes grupos se realizó utilizando los siguientes cálculos basados en segmentos de 1 mm de longitud:

- volumen arterial (mm^3) = Área de la sección transversal (mm^2) \times 1 mm
- número de células = n de núcleos por plano \times n de planos por volumen arterial
- área de superficie luminal = $2\pi \times \text{diámetro (mm)}/2$

6. ESTUDIOS *IN VITRO*.

6.1. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR (CMLVs) DE RATÓN.

Para realizar los estudios *in vitro* se utilizó una línea celular comercial de células de músculo liso vascular de ratón (MOVAS, ATCC CRL-2797; Barcelona). Las células se crecieron en Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), un 2% de L-glutamina 200 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina y un 0,4% de gentamicina (G-418). Para realizar los experimentos se utilizaron células de pases entre 2 y 10 en un estado de confluencia del 80%. Previamente, las células en subconfluencia fueron deplecionadas durante 24 horas con DMEM sin SFB. Los experimentos fueron realizados incubando las células con dosis crecientes (5-100 ng/ml) de la citoquina recombinante murina IL-17A (PeproTech EC Ltd., Londres, Reino Unido).

6.2. EXPERIMENTOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

La proliferación celular fue evaluada utilizando el sustrato MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*), y el reactivo comercial CellTiter 96 (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madrid) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. El MTS es bio-reducido por enzimas deshidrogenasas convirtiéndose en un producto coloreado de formazán que es soluble en los medios de cultivo por lo que, a mayor proliferación celular, mayor será la cantidad de sales de formazán que producirán las células. Para realizar el estudio, se utilizaron placas de 96 pocillos sembradas con aproximadamente 5000 CMLVs en un volumen de 100 μ l de DMEM al 10% de SFB por pocillo. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de IL-17A (5, 10, 50 y 100 ng/ml). Transcurridas 48 horas desde la estimulación, se añadieron 20 μ l de CellTiter 96 en cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 37°C. La medida indirecta de la proliferación celular se determinó evaluando la absorbancia a 490 nm de cada pocillo de estudio utilizando un luminómetro TECAN Infinite F200 (Tecan Ltd, Männedorf, Suiza).

6.3. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR POR CIERRE DE HERIDA.

Para los ensayos de cierre de herida, las CMLVs en cultivo fueron crecidas en monocapa en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 90%. Las células se deplecionaron y, utilizando una punta de pipeta de 20 μ l, se realizaron diferentes surcos o heridas en la monocapa celular y se realizaron varias fotos por pocillo a tiempo 0 ($t=0$) utilizando un microscopio invertido (Leica DMI3000 B). Una vez realizada la herida, las células fueron estimuladas con IL-17A (50, 100 ng/mL) o TGF- β (10 ng/mL) manteniendo un pocillo sin estimular que fue utilizado como basal. Transcurridas 24 horas de estimulación ($t=24$) se tomaron 2 fotos de nuevo de la zona de la herida. La cuantificación del porcentaje de cierre del área de la herida se midió utilizando el programa ImagePro-Plus (Media Cybernetics, Washington, Estados Unidos).

7. ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS.

7.1. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Para determinar el daño histopatológico en secciones renales incluidas en parafina de 5 μ m de grosor se realizó la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS). Para ello, en se desparafinan las muestras y se añade ácido periódico al 0,5% durante 10 min. Posteriormente, se lavan los cortes con H₂O destilada, y se añade el Reactivo de Schiff durante 30 min. El análisis histopatológico fue evaluado de forma ciega por un patólogo experimentado utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Europe B.V., Badhoevedorp, Países Bajos). La determinación del daño renal fue estudiada realizando una puntuación semi-cuantitativa: grado 0, normal; grado 1, lesión segmental <25%; grado 2, 25%–50%;

grado 3, 50%–75%; grado 4, 75%–100%, teniendo en cuenta diversos parámetros evaluados por aproximación visual (Shen *et al.*, 2018). Se evaluó la proliferación mesangial (parámetro de daño glomerular); regeneración, atrofia y dilatación tubular (parámetros tubulares); fibrosis; e infiltrado inflamatorio peritubular y perivascular (parámetros del intersticio). El daño total renal se determinó sumando los diferentes valores obtenidos para cada parámetro. Cada grupo de estudio fue evaluado realizando un análisis de al menos 20 glomérulos por muestra.

7.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FIBROSIS. TINCIÓN DE ROJO SIRIO.

Para evaluar los niveles de colágeno presentes en las muestras de estudio y determinar el índice de fibrosis tubulointersticial, se realizó la tinción de Rojo Sirio en cortes de riñón incluidos tanto en parafina como en OCT de 5 µm de grosor. El área de fibrosis intersticial fue evaluado utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Europe B.V.) y evaluando al azar 10 campos teñidos con un objetivo de 40X (magnificación 400x). Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc. Rockville, Maryland, Estados Unidos) y determinando el porcentaje de área teñida con respecto al área total en cada sección (promedio de 5 campos elegidos al azar). Los resultados se expresaron como n-veces con respecto a los niveles obtenidos en el grupo control. Adicionalmente, las secciones teñidas también se visualizaron utilizando un microscopio con luz polarizada Leica DMD108 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), para diferenciar por rango de color las fibras de colágeno Tipo I (naranja-rojiza) y Colágeno Tipo III (verde-amarillo verdoso).

8. ESTUDIOS A NIVEL PROTEICO.

8.1. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE DIVERSOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS.

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron cortes de las muestras de AMRs criopreservadas en OCT de 5 µm de grosor, realizados en un criostato Leica LM 1900, y de riñones incluidos en parafina de 3 µm de grosor, realizados en un microtomo. Los cortes se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-Lisina. En primer lugar, las muestras fueron incubadas con una solución de recuperación antigénica (10 mM de solución de citrato sódico a pH 6 o 10 mM de solución de EDTA a pH 9, según corresponda) utilizando el sistema PTlink (Dako, Diagnósticos S.A.; Barcelona). Se hicieron lavados con PBS y posteriormente, la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las muestras con H₂O₂ al 3% y a continuación las uniones inespecíficas fueron bloqueadas incubando las muestras con una solución de PBS al 4% de BSA y al 8% del suero de la especie animal donde se hubiera obtenido el anticuerpo primario (Tabla 1) durante 1 hora. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso (Tabla 1) a 4°C durante toda la noche. Transcurrido

este tiempo, se lavaron las muestras con PBS y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina. Se hicieron lavados con PBS y se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC system; Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido) (Tabla 1). Las muestras fueron reveladas con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 20 μ l/ml) para mostrar un color marrón. Finalmente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina y montadas con DPX (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las imágenes de cada tinción fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 y cuantificadas con el software Image Pro-Plus.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Bloqueo uniones inespecíficas	Anticuerpo secundario
Colágeno-1, 1:500 (AB765P; Millipore)	pH = 9	4% BSA/8% suero de oveja	1/250 Anti-conejo (hecho en cabra)
IL-17A, 1:250 (ab9565; Abcam)	pH = 6	4% BSA/8% suero de oveja	1/250 Anti-conejo (hecho en cabra)
F4/80, 1:70 (MCA497; Bio-Rad)	pH = 6	4% BSA/10% suero de conejo	1/200 Anti-rata (hecho en conejo)
CD3, 1:150 (A0452; Dako)	pH = 9	Power block (DAKO)	Envision FLEX/HRP
CD4, prediluido (IS649; Dako)	pH = 9	Power block (DAKO)	Envision FLEX/HRP
TCR- $\gamma\delta$, 1:250 (331201; Biolegend)	pH = 6	4% BSA/8% suero de oveja	1/250 Anti-ratón (hecho en cabra)
MPO, 1:1000 (A0398; Dako)	pH = 9	Power block (DAKO)	Envision FLEX/HRP
Triptasa, prediluido (IR640; Dako)	pH = 9	Power block (DAKO)	Envision FLEX/HRP
Calicreína-1, 1:100 (420308; Calbiochem)	pH = 6	Power block (DAKO)	Envision FLEX/HRP

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica de esta tesis.

8.2. ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

8.2.1. INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDO.

Para los estudios de inmunofluorescencia en tejido se utilizaron cortes de las muestras de AMRs criopreservadas en OCT de 5 μm de grosor y de riñones y aortas incluidos en parafina de 3 μm de grosor. Las muestras de AMRs criopreservadas en OCT se fijaron con una solución salina de PFA al 4% durante 10 min antes de realizar los estudios. En las secciones provenientes de riñones y aortas incluidas en parafina, el desenmascaramiento antigénico fue realizado utilizando el sistema PTlink y la autofluorescencia del tejido fue eliminada incubando las muestras con una solución de NH_4Cl (50 mM; 10 min). Posteriormente, ambos tipos de muestras fueron lavadas con PBS y bloqueadas con PBS al 10% de suero de la especie animal donde se hubiera obtenido el anticuerpo primario y al 4% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C (Tabla 2). Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor-488 o Alexa Fluor-633 (Tabla 2). Finalmente, los núcleos se contrastaron incubando los tejidos con DAPI (1/10000 en H_2O destilada; 10 min) y las muestras se montaron utilizando el reactivo Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation). Las imágenes de todas las muestras fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Leica DM-IRB.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Anticuerpo secundario
Calponina; 1/200 (ab46794, Abcam)	pH = 9	1/200 Alexa633-Anti-conejo
PCNA; 1/100 (sc-7907, Santa CruzBiotechnology)	pH = 6	1/200 Alexa633-Anti-conejo
IL-17A, 1:250 (ab9565; Abcam)	pH = 6	1/250 Alexa633-Anti-conejo
CD4, prediluido (IS649; Dako)	pH = 6	1/250 Alexa488-Anti-ratón
TCR- $\gamma\delta$, 1:250 (331201; Biolegend)	pH = 6	1/250 Alexa488-Anti-ratón

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia en tejido.

8.2.2. INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

Para estudiar la localización celular del marcador de proliferación celular PCNA, las CMLVs fueron crecidas en cubreobjetos de vidrio colocados en placas de cultivo de 24 pocillos con 100 µl de DMEM al 10% de SFB. Cuando alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente el 80% las células fueron mantenidas en DMEM sin SFB durante 24 horas. Finalmente, se estimularon las células con IL-17A a la dosis de 100 ng/ml durante 24 horas. Transcurrido el tiempo del experimento, se retiró el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados con TBS, se fijaron con una solución salina de PFA al 4% y se incubaron durante 10 min con Glicina 100 mM (0,5% en TBS) para retirar los restos de PFA. Las células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (0,2% en TBS; 10 min), lavadas con TBS (3 lavados de 10 min), bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) (4% en TBS; 30 min) y lavadas de nuevo con TBS (3 lavados de 10 min). Posteriormente, Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a 4 °C durante la noche (PCNA; 1:100, sc-7907, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), lavadas con TBS (3 lavados de 10 min), incubadas con el anticuerpo secundario ALEXA Fluor 488 (1:300; Invitrogen, Life Technologies Corporation, Groningen, Países Bajos) durante 1 hora a RT y lavadas con TBS (3 lavados de 10 min). Finalmente, las células fueron incubadas durante 10 min con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:10000 en H₂O destilada; Sigma-Aldrich, Madrid), para contrastar los núcleos, y fueron montadas en portaobjetos utilizando el reactivo Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Groningen, Países Bajos). Para el análisis de las células se utilizó un microscopio confocal láser Leica DM-IRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

8.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL WESTERN BLOT.

Para obtener las proteínas totales, las secciones de riñón y las CMLVs fueron procesadas utilizando el mismo tampón de lisis (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Tritón X-100; 0,3% NP-40; 10 µl/ml de cóctel de inhibidores de proteasas; 10 µl/ml ortovanadato; 1 µl/ml DTT; 1 µl/ml PMSF; 2 mg/ml NaF). Los tejidos fueron procesados con barillas y transferidos a tubos de 1,5 ml con el buffer de lisis. Las células fueron procesadas escurriendo las placas con el buffer de lisis y fueron transferidas el buffer con las células a tubos de 1,5 ml. A partir de este punto, tanto los tejidos como las CMLVs fueron procesados del mismo modo para extraer y cuantificar las proteínas totales. Los tubos de 1,5 ml fueron sometidos a varios ciclos de incubación en hielo y agitación en vortex durante 15 segundos previa centrifugación a 12.000 r.p.m. en una centrífuga refrigerada durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo y las proteínas fueron conservadas a -80 °C hasta ser evaluadas. Para el estudio de proteínas secretables al medio en CMLVs, se recogió 1 ml del medio de cultivo de cada pocillo de estudio una vez finalizado el experimento y se

consevó a -80 °C hasta ser evaluadas. Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo del ácido bicinonínico (BCA) (ThermoScientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las proteínas totales extraídas y los sobrenadantes de las CMLVs fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS (8-12 %) en condiciones reductoras. Una vez separadas, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para comprobar que la transferencia se ha realizado correctamente, y para obtener una referencia de la carga en los experimentos con proteínas solubles, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (Sigma Aldrich, Madrid). Posteriormente, se lavan las membranas con tampón TBS (0,005 M Tris-HCl; 0,015 M NaCl) al 0,1% de Tween 20 (TBS-T) y se bloquean durante 1 hora con tampón TBS-T al 8% de leche desnatada a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes a 4 °C durante toda la noche (Tabla 3). A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa (Tabla 3) durante 1 hora a RT. Finalmente, las membranas fueron lavadas con TBS-T (3 lavados de 10 min) y reveladas por quimioluminiscencia utilizando el reactivo Luminata™ Crescendo Western HRP substrate (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). El revelado de las imágenes se realizó utilizando el sistema LAS 4000 (GEHealthcare, Madrid) y la cuantificación se llevó a cabo con el programa QuantityOne® (Bio-Rad, Madrid).

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario
PCNA (sc-7907, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	1/2500 Anti-conejo peroxidasa
Fibronectina (AB2033, Millipore).	1:5000	1/2500 Anti-conejo peroxidasa
p-AKT1/2/3 (sc-271966, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	1/2500 Anti-ratón peroxidasa
p-Smad2/3 (sc-11769, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	1/2500 Anti-cabra peroxidasa
IL-17A (ab9565, Abcam)	1:500	1/2500 Anti-conejo peroxidasa
RORγt (#14-6981, eBioscience)	1:500	1/2500 Anti-rata peroxidasa
p-Stat3 (#9131, Cell Signaling)	1:500	1/2500 Anti-conejo peroxidasa
p-IκB (sc-8404, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	1/2500 Anti-ratón peroxidasa
p-p65 (#3033, Cell Signaling)	1:500	1/2500 Anti-conejo peroxidasa
GAPDH (MAB374, Millipore)	1:5000	1/2500 Anti-ratón peroxidasa
β-actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology).	1:5000	1/2500 Anti-ratón peroxidasa

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en esta tesis para los experimentos de western blot.

9. ESTUDIOS A NIVEL GÉNICO.

9.1. GENOTIPADO DE LOS RATONES BTBR ob/ob.

Para realizar este proceso, se extrajo un fragmento de la porción terminal de la cola de animales de entre 7 y 10 días de edad en tubos de 1,5 ml. Los fragmentos de cola fueron incubados en agitación (800 r.p.m.) con 500 µL de una solución TEL (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl, 0,5% SDS) conteniendo 10 µl de proteinasa K y a una temperatura de 55 °C durante toda la noche. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 12000 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue retirado a un nuevo tubo de 1,5 ml y centrifugado a 12000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante fue desechado y se realizó un lavado del pellet obtenido con 500 µl de una solución de etanol al 75% centrifugando los tubos a 12000 r.p.m. durante 5 min. Finalmente, el pellet obtenido conteniendo el ADN a estudiar, se dejó secar por evaporación y fue resuspendido en 150 µL de una solución TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

Para determinar el genotipo de los animales, se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen a estudiar en el ADN obtenido, utilizando un kit comercial y siguiendo sus indicaciones (Sappihire Amp Fast Master Mix, Takara Kusatsu, Japón). La secuencia de las sondas utilizadas para amplificar la región de estudio fue la siguiente: 5'-TGT CCA AGA TGG ACC AGA CTC-3' y 5'-ACT GGT CTG AGG CAG GGA GCA-3' y la cantidad de ADN utilizado fue 2 µg por muestra. La temperatura y número de ciclos utilizados para realizar la PCR fue la siguiente: 1 ciclo de 10 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 63 °C, 45 segundos a 72 °C; 1 ciclo de 2 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en el termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Massachusetts, Estados Unidos).

Una vez amplificado el ADN, se realizó un ensayo de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), utilizando el enzima de restricción Ddel. Para ello, las muestras de ADN amplificado fueron incubadas con la enzima Ddel (10 U/µL) en una solución con *Multi-Core* 10x, BSA acetilado 10 µg/µL y H₂O libre de nucleasas (Kit Enzima Ddel, Promega Madrid) durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó la inactivación de la enzima incubando las muestras a 65 °C durante 15 min. Posteriormente, el producto total del ensayo de restricción fue cargado en un gel de agarosa al 2,5% teñido con *MaestroSafe Nucleid Acid Prestained* (Maestrogen, Hsinchu City, Taiwán) en tampón TAE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) para realizar una electroforesis durante 60 min a 90 voltios. Transcurrido este tiempo, el gel fue expuesto en un transiluminador ultravioleta y el tamaño de las bandas de ADN obtenidas fue utilizado para determinar con cuál de los tres genotipos posibles se correspondía cada ratón. De este modo, una única banda de 155 pb se correspondía con un genotipo

WT, una banda de 100 pb y otra banda de 55 pb con un genotipo ob+/ob+ y la presencia de tres bandas de 155, 100 y 55 pb determinaba un genotipo ob+/ob-.

9.2. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA.

La obtención del ARN total, tanto del tejido como de las CMLVs, fue realizada utilizando el método del Trizol (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ADNc se obtuvo utilizando un Kit de síntesis de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) a partir de 2 µg del ARN extraído y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los niveles de ADNc de cada gen a estudiar fueron determinados utilizando el sistema de PCR a tiempo real y el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). Se realizaron estudios multiplex utilizando sondas fluorogénicas MGB prediseñadas y marcadas con el fluoróforo FAM para cada gen a estudiar, y con el fluoróforo VIC para el gen de la GAPDH, el cual fue utilizado como gen de normalización de datos (Tabla 4) (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). La temperatura y número de ciclos utilizados para realizar la PCR fue la siguiente: 1 ciclo de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 95°C de 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min; siendo en este último paso donde se tomaron las mediciones. Las medidas fueron realizadas por duplicado para cada muestra. El número de copias de ARNm se determinó utilizando el programa ABI Prism 7500 Fast a partir del valor Ct (ciclo umbral) obtenido y los resultados fueron normalizados con su correspondiente valor de GAPDH.

Gen	Fluoróforo/especie	Número identificador
<i>Ccl2</i> (MCP-1)	FAM/ratón	Mm00441242_m1
<i>Col1a2</i> (Colágeno tipo 1)	FAM/ratón	Mm00483888_m1
<i>Fn1</i> (Fibronectina 1)	FAM/ratón	Mm01256744_m1
<i>Pai-1</i>	FAM/ratón	Mm00435860_m1
<i>Havcr1</i> (Kim1)	FAM/ratón	Mm00506686_m1
<i>Lcn2</i> (Ngal)	FAM/ratón	Mm01324470_m1
<i>Ccl5</i> (RANTES)	FAM/ratón	Mm01302428_m1
<i>IL23r</i>	FAM/ratón	Mm00519943_m1
<i>Klk-1</i> (Calicreína-1)	FAM/ratón	Mm00834006_g1

<i>IL6</i>	FAM/ratón	Mm00446190_m1
<i>Icam1</i>	FAM/ratón	Mm00516023_m1
<i>Vcam1</i>	FAM/ratón	Mm01320970_m1
<i>Tnfa</i>	FAM/ratón	Mm00443258_m1
<i>IL1β</i>	FAM/ratón	Mm00434228_m1
<i>Tlr4</i>	FAM/ratón	Mm01302428_m1
<i>IL17a</i>	VIC/ratón	Mm00439619_m1
<i>Gapdh</i>	VIC/ratón	Mm99999915_g1

Tabla 4. Sondas TaqMan utilizadas en los experimentos de este trabajo.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en las medidas de presión arterial, los experimentos de reactividad y estructura vascular y los parámetros bioquímicos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los resultados de los análisis de niveles de proteína, cierre de herida y proliferación realizados se expresaron como incremento de n-veces respecto al control y están representados como la media \pm EEM. La cuantificación de las inmunohistoquímicas se mostró como el porcentaje del área teñida para cada marcador respecto al área total evaluada en cada muestra, y fue representada como la media \pm EEM de los datos obtenidos en tres mediciones independientes para los animales de cada grupo. Los datos obtenidos en los estudios de los niveles de expresión génica se expresaron como el número de copias en las muestras tratadas con respecto a las copias obtenidas en las muestras control, después de haber corregido los datos con los niveles de ARN m de GAPDH.

Para determinar el poder estadístico de los resultados obtenidos, se realizaron las pruebas de t-Student y el test de Mann-Whitney según correspondía, después de analizar la normalidad de las muestras mediante el test de Shapiro-Wilk. La estructura y la mecánica vascular fue analizada mediante un ANOVA de dos vías seguido por un test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Estos cálculos se realizaron usando el programa estadístico Graphpad Prism 7.02. (GrahPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

Resultados

RESULTADOS

1. ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y RENAL Y SU RELACIÓN CON HIPERTENSIÓN.

1.1. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A AUMENTA LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA EN RATONES.

La curva de medida de presiones arteriales sistólicas realizada a diferentes tiempos durante el tratamiento con IL-17A, reflejó a mitad del tratamiento una tendencia a aumentar en el grupo de ratones tratados con IL-17A comparados con el grupo control. Esta tendencia se hizo significativa transcurridos 14 días de tratamiento con IL-17A, mostrando valores de $116,69 \pm 4,43$ mm Hg frente a los $88,20 \pm 3,59$ mm Hg obtenidos tanto en el grupo control como en el propio grupo de ratones tratados con IL-17A a día 0 (figura 14).

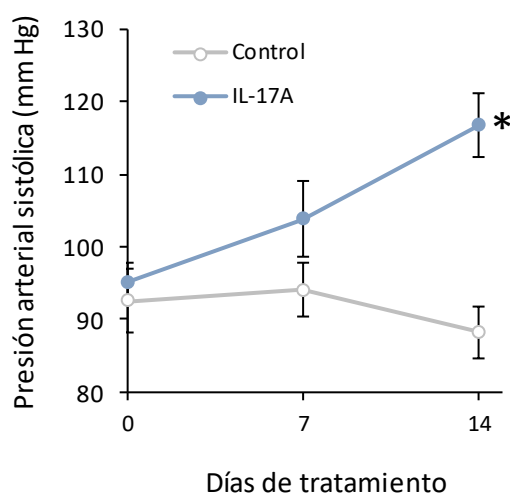


Figura 14. La administración sistémica de IL-17A aumentó la presión arterial en ratones. Se realizó un modelo de administración sistémica de IL-17A a la dosis de 0,035 ng/kg/min mediante la implantación subcutánea de bombas osmóticas en ratones C57BL/6. Como control se utilizó un grupo no tratado. Se midió la presión arterial en tres periodos de tiempo: antes del tratamiento (t=0), a los 7 días del comienzo del modelo y antes de la eutanasia (14 días). La presión arterial fue medida en ratones conscientes y previamente preentrenados mediante un sistema no invasivo de medida basado en el empleo de esfigmomanómetro y un manguito para cola de ratón. El gráfico muestra los niveles de presión sanguínea frente a los días de tratamiento. La figura muestra los datos como media \pm EEM de 9-10 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$ vs ratón control.

1.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y SU RELACIÓN CON HIPERTENSIÓN.

1.2.1. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A PRODUCE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

El estudio de la estructura de las arterias mesentéricas realizado mediante miografía de presión, determinó una reducción del diámetro del lumen vascular en las arterias de los ratones tratados con IL-17A comparadas con las arterias del grupo control. Del mismo modo, se comprobó que en las AMRs de los ratones tratados con esta citoquina existía un aumento del grosor de la pared vascular, en el ratio pared/lumen así como en el área de la sección transversal respecto a los ratones no tratados (figura 15).

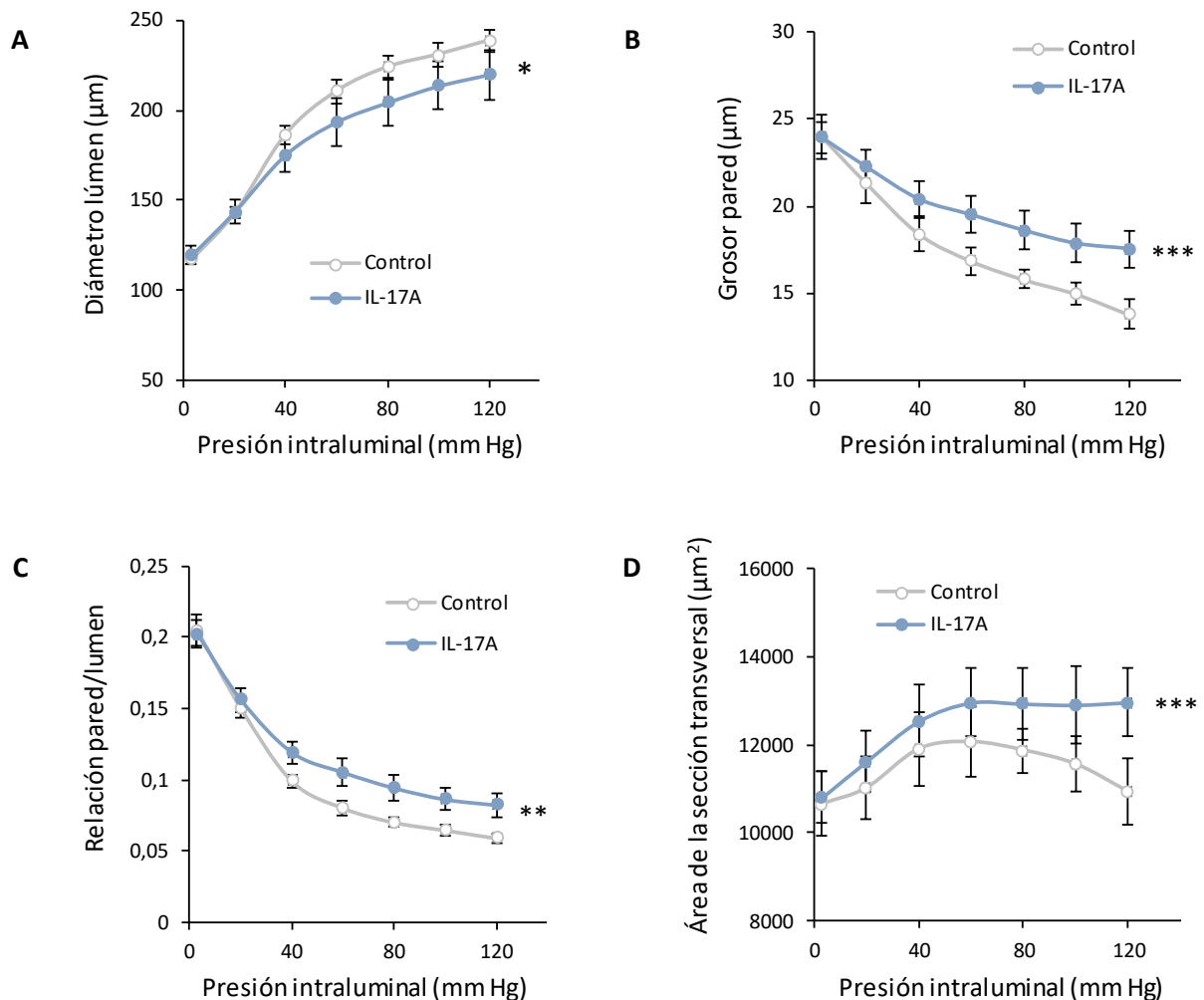


Figura 15. El tratamiento con IL-17A reguló las propiedades estructurales de las arterias mesentéricas de resistencia. Las gráficas muestran el diámetro del lumen (A), el grosor de la pared (B), la relación pared/lumen (C) y el área de la sección transversal (D). Las figuras muestran los datos como media \pm EEM de 9-10 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs ratón control.

Los estudios realizados por microscopía confocal reflejaron un incremento elevado en el grosor de la capa media de las AMRs de los ratones tratados con IL-17A, así como un ligero aumento en el grosor de la capa media tras ser comparadas con las AMRs del grupo control (figura 16 A y B). Por un lado, se comprobó que el número de células localizadas en la capa adventicia de las AMRs, así como el número de CMLVs fue similar en los diferentes grupos de estudio analizados (figura 16 C y D).

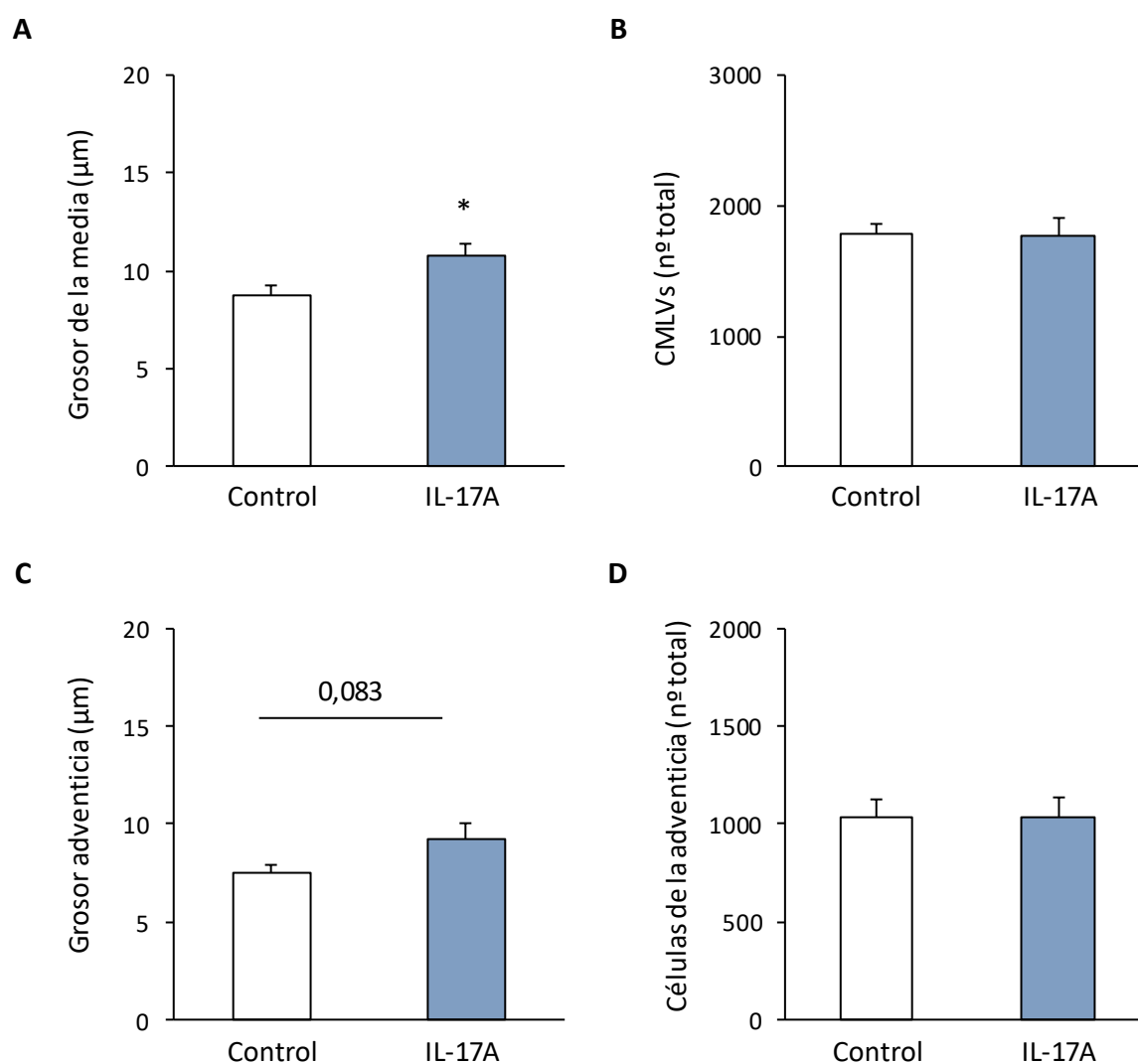


Figura 16. El tratamiento con IL-17A aumentó el grosor de las arterias mesentéricas de resistencia. En las AMRs fijadas con paraformaldehído del modelo de administración sistémica de IL-17A se realizó una evaluación de la estructura de las capas por microscopía confocal. Los gráficos muestran el grosor de la capa media (A) y el número de CMLVs (B), el grosor de la capa adventicia (C) y el número de células de la adventicia (D). La figura muestra datos como media \pm EEM de 7-8 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$ vs ratón control.

1.2.2. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A PRODUCE CAMBIOS ASOCIADOS A HIPERTROFIA EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

El análisis del tamaño nuclear de las CMLVs reflejó un aumento significativo en los ratones tratados con IL-17A en comparación con los obtenidos para las CMLVs de los ratones control (figura 17).

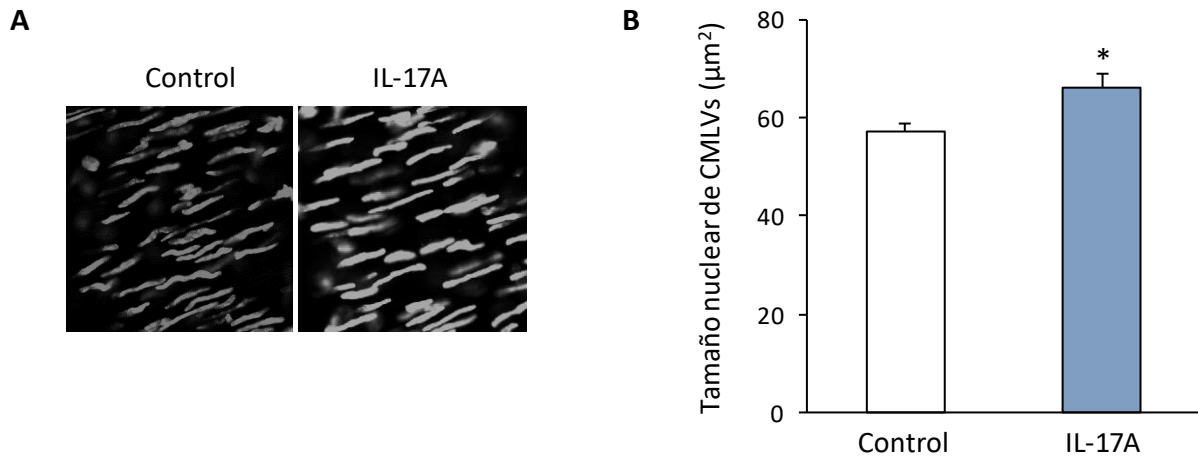


Figura 17. La infusión de IL-17A causó cambios asociados a hipertrofia vascular en la capa media de las arterias mesentéricas de resistencia. La figura A muestra una imagen representativa de los núcleos de las CMLVs presentes en las AMRs. La figura B representa la cuantificación del tamaño nuclear de las CMLVs. Tamaño de imagen: 119,5 × 119,5µm. Los datos representan la media ± EEM de 7-8 animales estudiados por grupo. *p<0,05 vs ratón control.

El estudio de los niveles de la proteína calponina, la cuál está asociada con cambios fenotípicos en las CMLVs (Blascke de Mello *et al.*, 2019), reflejó una menor expresión de esta proteína en las CMLVs de las AMRs en los ratones tratados con IL-17A en comparación con los niveles observados en las CMLVs de las AMRs de los ratones control (figura 18).

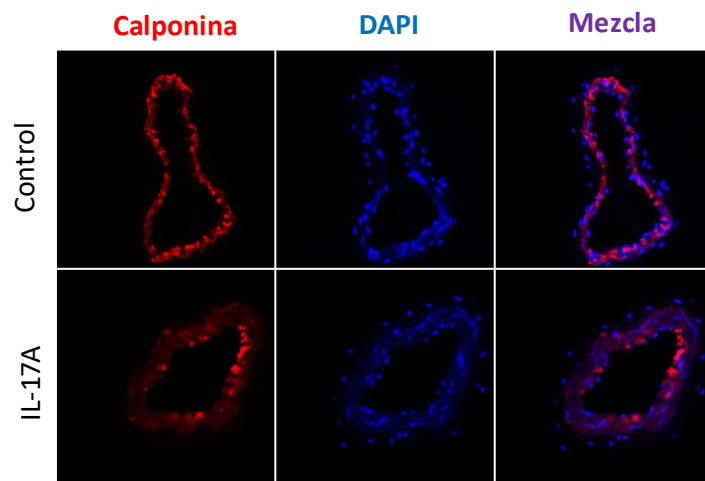


Figura 18. La administración sistémica de IL-17A reguló la expresión de calponina en las arterias mesentéricas de resistencia. La figura representa una inmunofluorescencia de calponina en secciones de AMRs incluidas en medio de criopreservación (marcado en rojo, debido a la utilización de un anticuerpo secundario Alexa-633; el marcaje azul representa los núcleos por la utilización de DAPI). Imágenes representativas de 6 animales por grupo. Tamaño de imagen: 246,03 x 246,03 µm.

1.2.3. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A PRODUCE CAMBIOS EN LA RIGIDEZ DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

El análisis de las propiedades mecánicas de las AMRs demostró que la infusión de IL-17A durante 14 días redujo la distensibilidad (figura 19 A) y aumentó la rigidez, esta última calculada por la curvatura de la relación estrés-tensión y por el incremento en el parámetro β (figura 19 B y C).

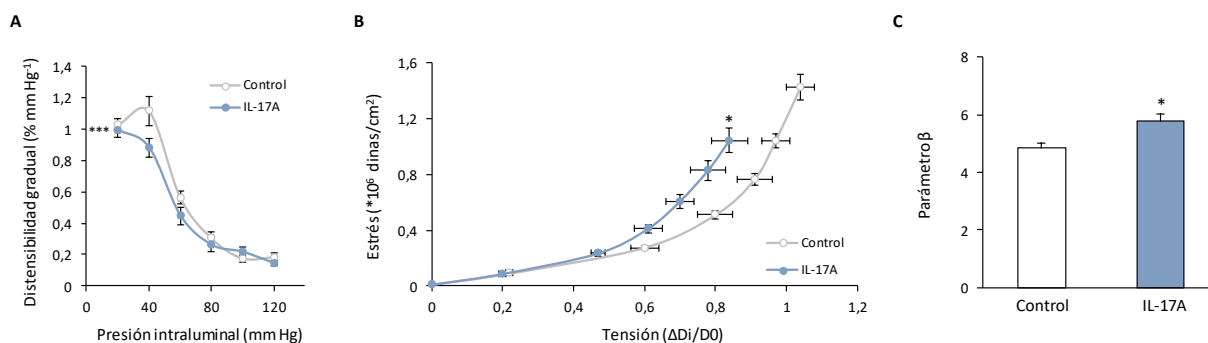


Figura 19. El tratamiento con IL-17A no cambió las propiedades mecánicas de las arterias mesentéricas de resistencia. Las gráficas representan los parámetros de distensibilidad (A), estrés-tensión (B) y parámetro β (C) evaluados en las AMRs del modelo de administración sistémica de IL-17A. La figura muestra datos como media \pm EEM de 9-10 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs ratón control.

1.2.4. EL TRATAMIENTO SISTÉMICO CON IL-17A NO MODIFICA LA ORGANIZACIÓN DE LA LÁMINA ELÁSTICA INTERNA NI LOS NIVELES DE MARCADORES DE FIBROSIS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS.

Los datos obtenidos del estudio de la organización de la lámina elástica interna de las AMRs no reflejaron diferencias significativas en el número ni en el área de las fenestras vasculares en las AMRs de los ratones tratados con IL-17A en comparación con los ratones control (figura 20 A-C). Por otro lado, el estudio de los niveles de expresión de colágeno tampoco mostró cambios en los niveles de expresión del colágeno tipo I ni del colágeno total (figura 20 D) tras el tratamiento sistémico con IL-17A.

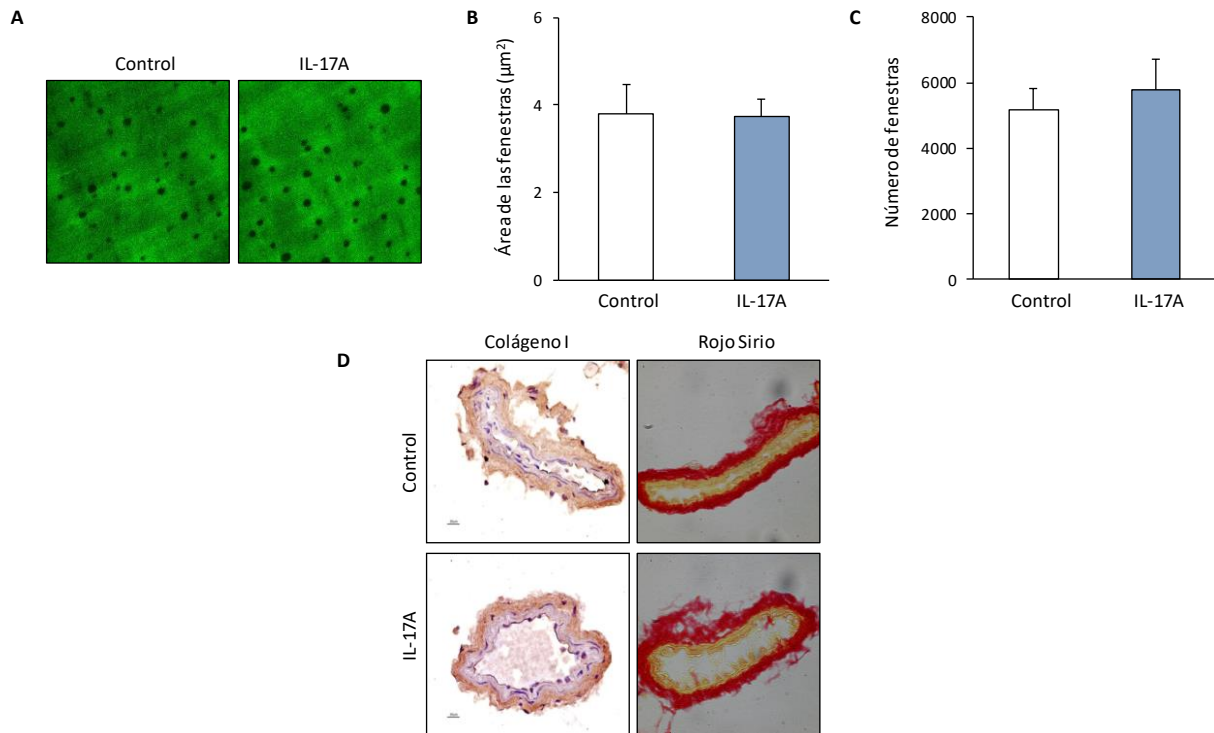


Figura 20. La administración sistémica de IL-17A no modificó la rigidez de las arterias mesentéricas de resistencia. La figura A es una imagen representativa de la estructura de la lámina elástica interna de las AMRs. Tamaño de imagen: 59,5×59,5 µm. Las figuras B y C representan la cuantificación del área y el número de fenestras, respectivamente. La figura D muestra imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de Colágeno I y de la tinción de Rojo Sirio (D) en las AMRs de los ratones tratados con IL-17A y sus respectivos controles. Magnificación x400. La figura muestra datos como media ± EEM de 9-10 animales estudiados por grupo.

1.2.5. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE UN INFILTRADO DE LINFOCITOS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA EN RATÓN.

El estudio de la presencia de linfocitos en secciones de AMRs, analizado mediante el análisis de los niveles del marcador CD3, determinó que la administración de IL-17A no induce un infiltrado inflamatorio en la pared vascular de las AMRs tras 14 días de tratamiento (figura 21).

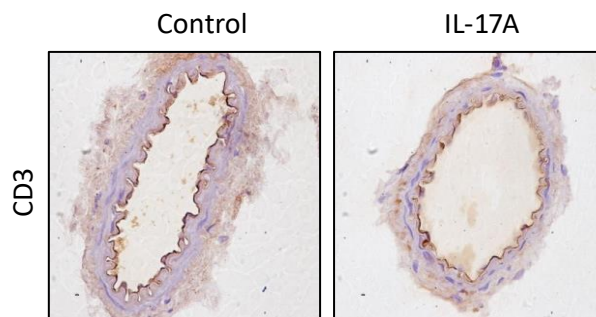


Figura 21. La infusión con IL-17A no indujo un infiltrado de linfocitos T en las arterias mesentéricas de resistencia. La figura muestra imágenes representativas de la inmunohistoquímica del marcador de superficie celular CD3 en las AMRs de los ratones tratados con IL-17A y sus respectivos controles. Magnificación x400.

1.2.6. LA INFUSIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MCP-1 EN AORTA.

El análisis de los niveles de expresión génica de la quimioquina MCP-1 (gen *Ccl-2*) reflejó un aumento en los niveles de expresión en las aortas del grupo de ratones tratados con IL-17A durante 14 días en comparación con el grupo control (figura 22).

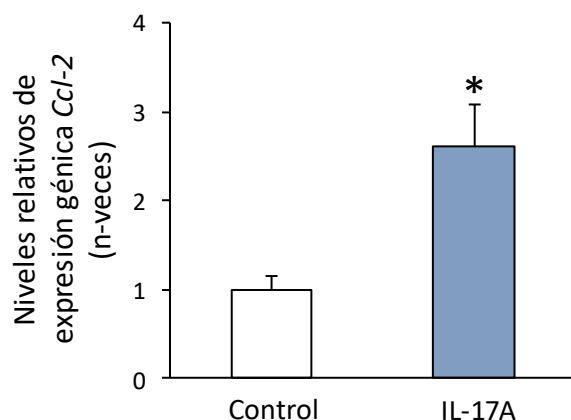


Figura 22. La infusión sistémica de IL-17A en ratón reguló la expresión génica de MCP-1 en aorta. La figura muestra los niveles en aorta de la expresión génica de MCP-1 (gen *Ccl-2*) analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0,05$ vs Control.

1.2.7. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) EN AORTA.

El análisis de la expresión del marcador de proliferación celular PCNA mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia dio como resultado un incremento en los niveles de PCNA en las CMLVs de las aortas de los ratones tratados con IL-17A en comparación con los niveles observados en las aortas de los ratones control (figura 23).

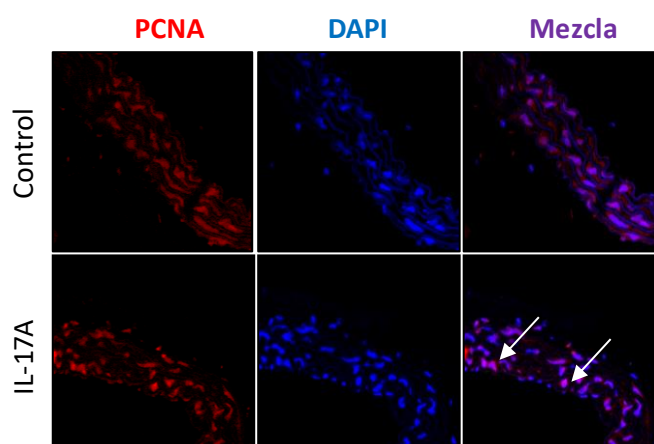


Figura 23. La administración sistémica de IL-17A en ratones aumentó los niveles de PCNA en aorta. En secciones de aortas incluidas en parafina de ratones tratados con IL-17A sacrificados a 14 días se determinó la presencia del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por inmunofluorescencia. La figura muestra las imágenes representativas de la tinción nuclear de PCNA (marcado en rojo, debido a la utilización de un anticuerpo secundario Alexa-633; el marcaje azul representa los núcleos por la utilización de DAPI) realizadas en un microscopio confocal.

1.2.8. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE CAMBIOS EN MARCADORES DE FIBROSIS EN AORTA.

La evaluación de los niveles de colágeno tipo I (figura 24) así como del contenido de colágeno total (figura 24), en secciones aórticas de ratones tratados con IL-17A y de sus respectivos controles sin tratar, determinó que no existían variaciones significativas entre los grupos estudiados (figura 24).

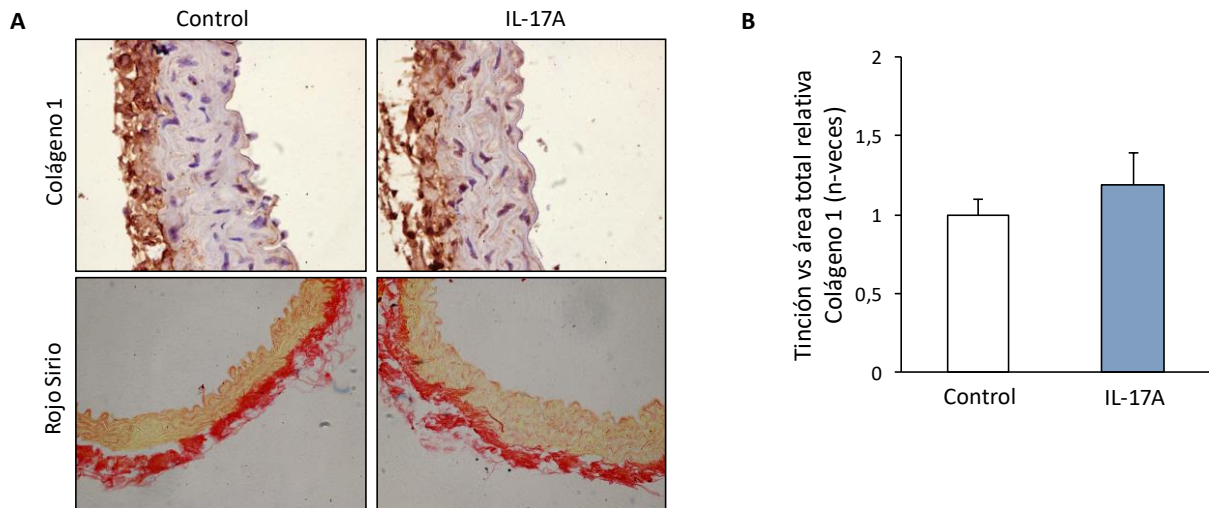


Figura 24. La administración sistémica de IL-17A no provocó cambios en la acumulación de colágeno tipo I en aorta. La figura A muestra una imagen representativa de la inmunohistoquímica de Colágeno I y de la tinción de Rojo Sirio en las aortas de los ratones tratados con IL-17A y sus respectivos controles. En la figura B se muestra la cuantificación del área de la capa media de la tinción con colágeno de tipo I. La figura muestra datos como media \pm EEM de 9-10 animales estudiados por grupo. Magnificación x400.

1.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A A NIVEL RENAL EN RATONES.

1.3.1. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO PRODUCE CAMBIOS EN LOS PARÁMETROS ASOCIADOS A LA FUNCIÓN RENAL.

El estudio de los niveles de creatinina sérica, de albúmina urinaria, así como de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN de sus siglas en inglés) no reflejó cambios significativos en los valores obtenidos en los ratones tratados con IL-17A durante 14 días en comparación con los valores obtenidos en el grupo control (figura 25).

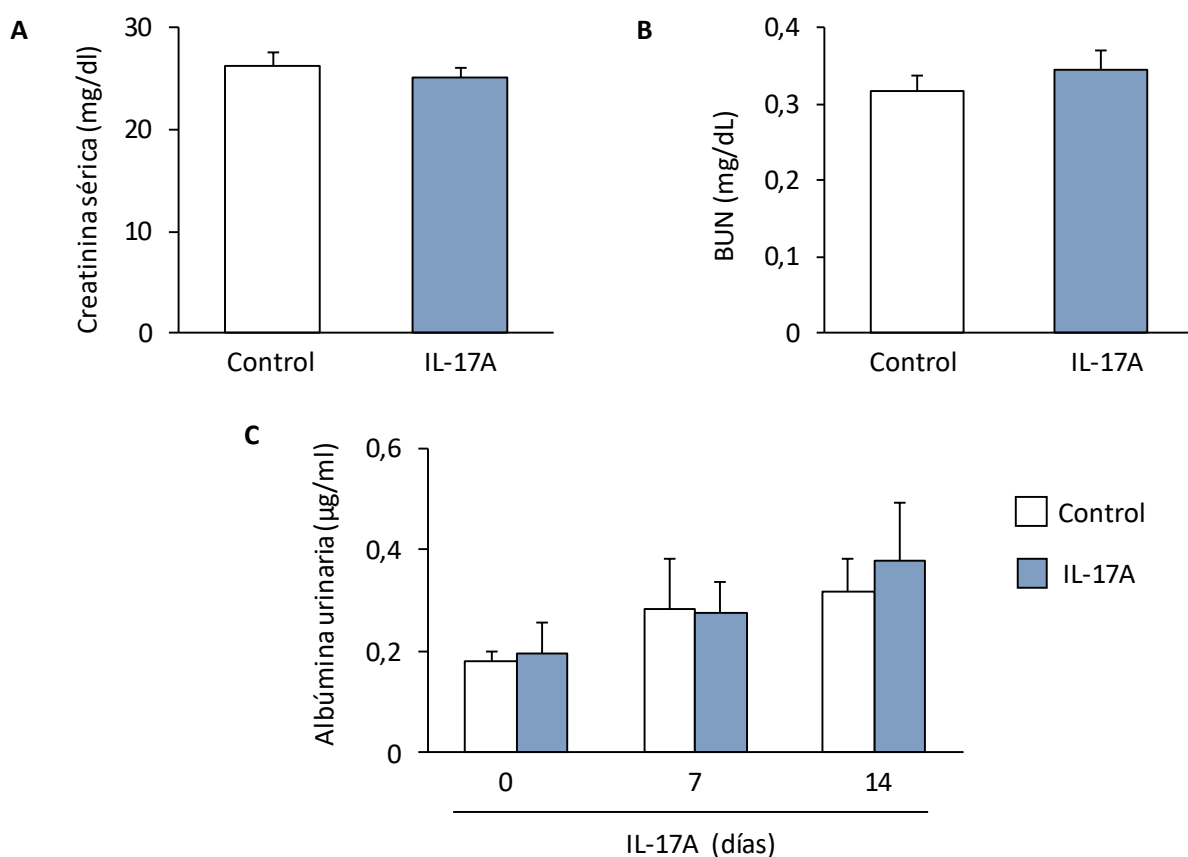


Figura 25. Evaluación de la función renal en el modelo de administración sistémica de IL-17A. Se realizó un modelo de administración sistémica de IL-17A a la dosis de 0,035 ng/kg/min mediante la implantación subcutánea de bombas osmóticas en ratones C/57BL6, utilizando un grupo como control no tratado. Se recogió la orina en tres periodos de tiempo: antes del tratamiento (t=0), a los 7 días del comienzo del modelo y antes de la eutanasia (14 días). Al eutanasiarse los ratones, se tomaron muestras de sangre para obtener suero. Los niveles de creatinina sérica (A), y BUN (B) se cuantificaron a los 14 días de exposición a la citoquina. Los niveles de albuminuria urinaria (C) se midieron a los 7 y 14 días desde la implantación de las minibombas. Los datos fueron expresados como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. p=n.s. vs. control

1.3.2. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A REGULA MARCADORES ASOCIADOS A DAÑO RENAL SIN INDUCIR DAÑOS HISTOPATOLÓGICOS.

El análisis de los niveles de expresión génica de los marcadores de daño renal NGAL y KIM-1 (genes *Lcn2* y *Havcr1*, respectivamente) reflejó un aumento en los niveles de expresión de ambos factores en los riñones del grupo de ratones tratados con IL-17A durante 14 días en comparación con el grupo control, siendo este aumento únicamente significativo para el biomarcador NGAL (figura 26 A). Del mismo modo, la evaluación de los niveles de expresión proteica del factor NGAL dio como resultado un incremento significativo en los riñones del grupo de ratones tratados con IL-17A tomando como referencia los valores de los riñones del grupo control (figura 26 B).

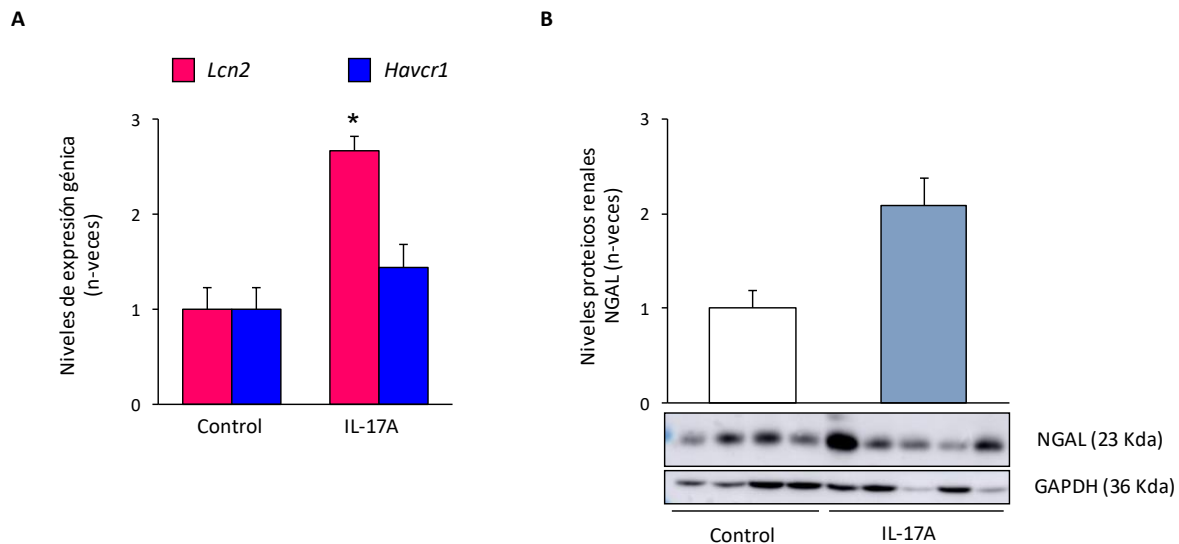


Figura 26. La administración de IL-17A a ratones reguló factores asociados a daño renal. La figura A muestra los niveles en riñón de la expresión génica de los marcadores NGAL (gen *Lcn2*) y KIM-1 (gen *Havcr1*), analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. La figura muestra un experimento representativo y los datos están expresados como media \pm EEM de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs. control. B) Se aislaron proteínas totales de tejido renal y los niveles de NGAL fueron evaluados por western blot. La figura muestra los datos expresados como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo.

A nivel histopatológico, la tinción con ácido peryódico de schiff (PAS) realizada en el grupo de ratones tratados durante 14 días con IL-17A y en el grupo de ratones control, no mostró daños a nivel del parénquima renal ni cambios en la estructura tubular. Del mismo modo, el PAS reflejó un mantenimiento en el borde en cepillo en todos los ratones sin encontrarse cilindros proteicos ni evidencias de fibrosis intersticial (figura 27). Adicionalmente, un análisis más profundo de las posibles lesiones renales mostró un marcado infiltrado inflamatorio en el grupo de ratones tratados con IL-17A, el cual estaba formado por leucocitos aislados en glomérulos dispersos (Flechas en la magnificación de la figura 27)

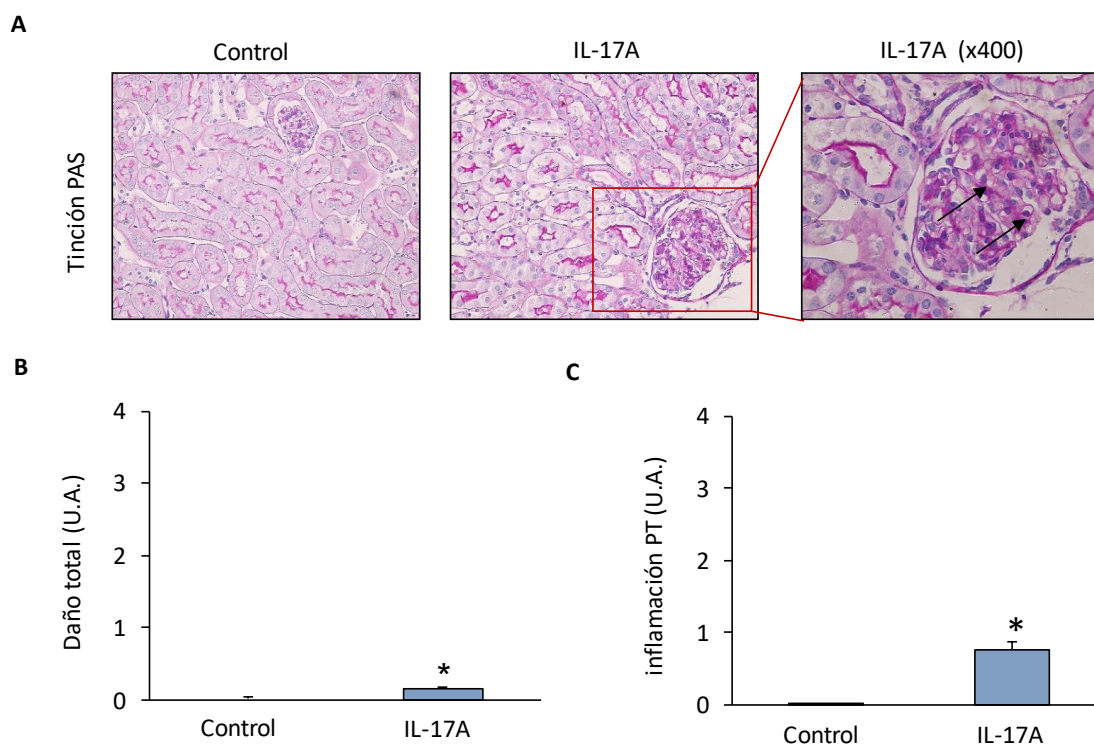


Figura 27. Evaluación histopatológica renal en ratones tratados con IL-17A. Se utilizó la tinción PAS para caracterizar la histopatología de las secciones renales de un modelo de administración sistémica de IL-17A en ratón. La figura A muestra imágenes representativas de microscopía óptica. En los ratones tratados con IL-17A no se encontraron cambios estructurales comparados con los ratones control. Magnificación x200. La figura B representa el daño renal total y la figura C la inflamación peritubular (PT). La figura muestra los datos expresados como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$ vs. control.

1.3.3. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL.

La caracterización de la respuesta inmune observada en los riñones de los ratones tratados con IL-17A mediante técnicas inmunohistoquímicas, reflejó un aumento en los niveles de expresión de células CD4⁺ y de neutrófilos, así como en los niveles de macrófagos y mastocitos (Figura 28)

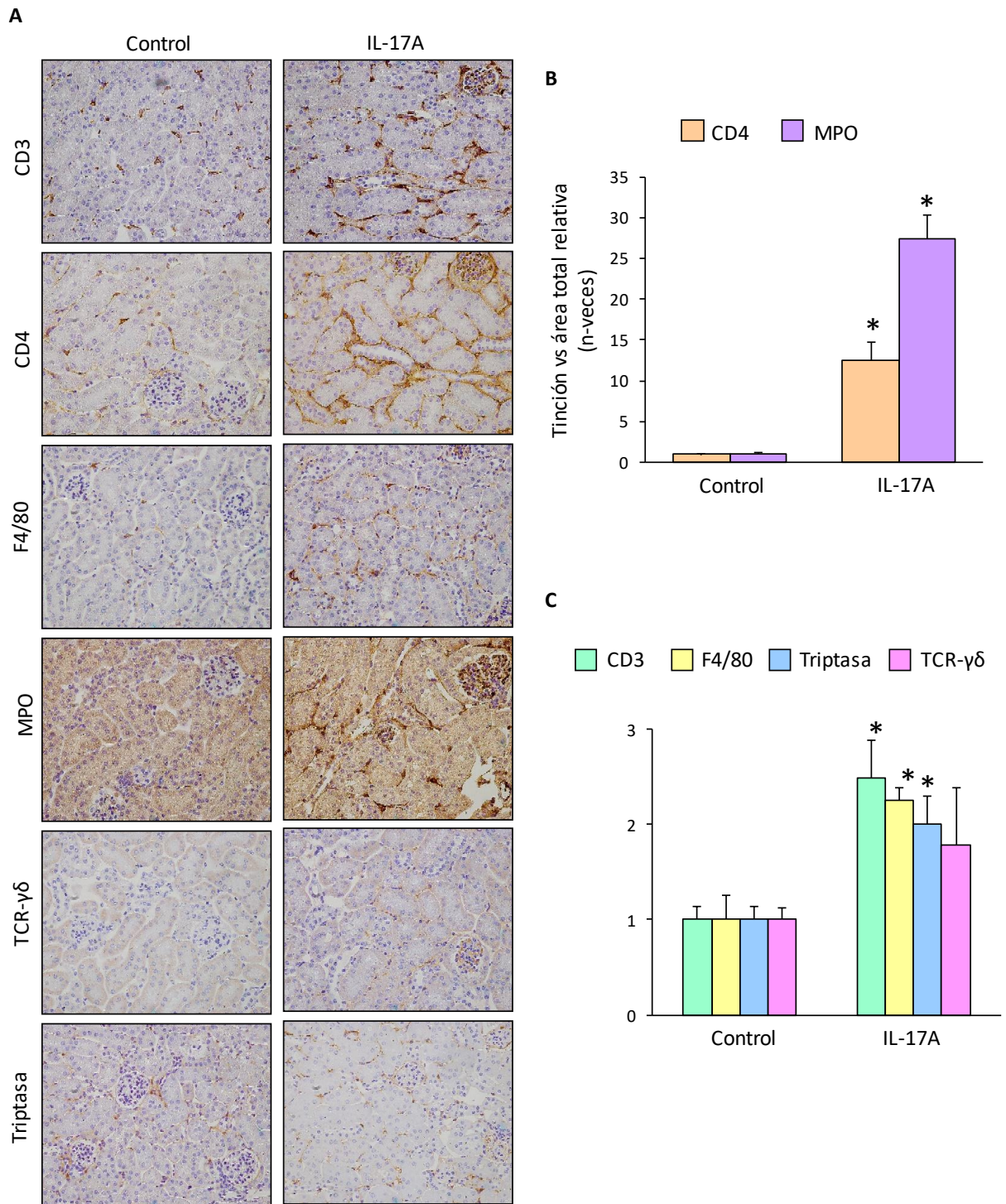


Figura 28. La administración sistémica de IL-17A en ratones aumentó los niveles de células infiltrantes en riñón. En los riñones de ratones tratados con IL-17A eutanasiados a 14 días se determinó la presencia de células inmunes por inmunohistoquímica. La figura A muestra una inmunohistoquímica representativa de secciones de riñón donde se observa tinción positiva para los marcadores de linfocitos CD3, CD4, mieloperoxidasa (MPO, neutrófilos), linfocitos $\gamma\delta$, F4/80 (macrófagos) y triptasa (mastocitos) de ratones tratados con IL-17A y sus respectivos controles. Las figuras B y C muestran la cuantificación de las secciones de los riñones de los ratones. Las gráficas muestran datos como media \pm EEM de 4-6 animales estudiados por grupo. * $p \leq 0,05$ vs Control.

El estudio de los posibles mecanismos intracelulares implicados en la respuesta inflamatoria observada, mostró un aumento en los niveles de expresión génica de diversos factores proinflamatorios implicados en el reclutamiento celular inmune. De este modo, los riñones de los ratones tratados con IL-17A presentaron un incremento significativo en la expresión de los genes *Ccl-2* (gen que codifica a la proteína MCP-1) y *Ccl-5* (gen que codifica a la proteína RANTES). Algunos genes asociados a inflamación como *IL-23r* aumentaron ligeramente (figura 29 A). Por el contrario, otros genes relacionados con la respuesta proinflamatoria como *IL-6*, *IL-1β*, *Tnf-α*, *Vcam*, *Icam* y *Tlr-4* se mantuvieron a los mismos niveles en ambos grupos de estudio (figura 29 B).

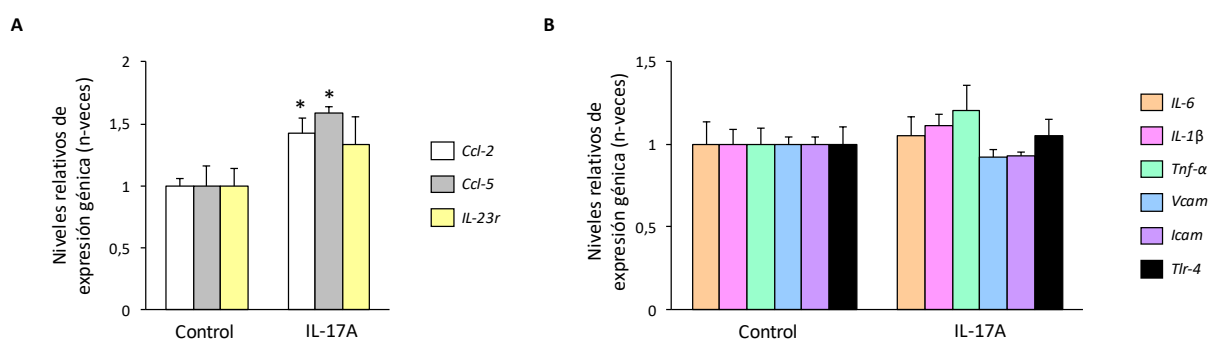


Figura 29. La infusión sistémica de IL-17A en ratón reguló genes proinflamatorios en el riñón. La figura A muestra los niveles en riñón de la expresión génica de *Ccl-2*, *Ccl-5* y *IL-23r*, y la figura B la expresión renal de los genes *IL-6*, *IL-1β*, *Tnf-α*, *Vcam*, *Icam* y *Tlr-4*, analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p ≤ 0,05 vs Control.

1.3.4. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A AUMENTA LA EXPRESIÓN DE CALICREÍNA TISULAR A NIVEL RENAL.

La administración de IL-17A aumentó la expresión génica y proteica de calicreína-1 (KLK-1), evaluadas por PCR cuantitativa e inmunohistoquímica, respectivamente, con respecto a los ratones control (figura 30).

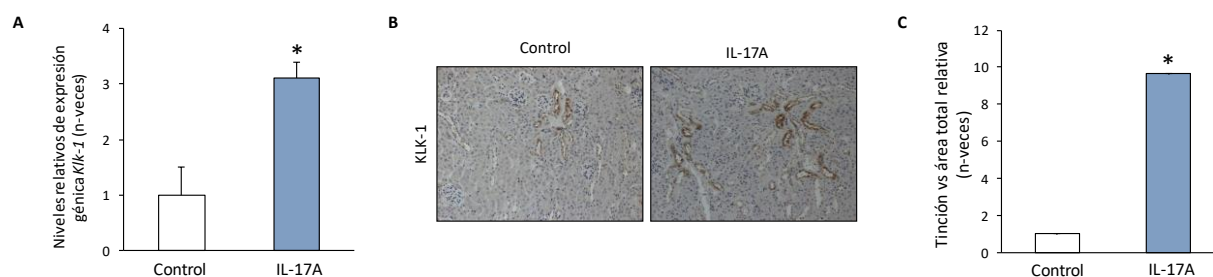


Figura 30. La infusión de IL-17A aumentó la expresión de calicreína-1 en el riñón. Los niveles génicos de calicreína-1 (*Klk-1*) se analizaron por PCR cuantitativa (A), normalizada frente a los niveles de GAPDH. La inmunohistoquímica renal de KLK-1 (B) mostró tinción tubular positiva y su cuantificación se muestra en C. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. La figura muestra un experimento representativo y los datos se expresan como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p ≤ 0,05 vs Control.

1.3.5. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A REGULA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR SMAD Y AKT A NIVEL RENAL.

El análisis de las posibles rutas de señalización implicadas en los resultados observados, mostró un incremento significativo de los niveles proteicos de Smad 2/3 y Akt 1/2/3 activados en los ratones tratados con IL-17A con respecto a los ratones control (figura 31).

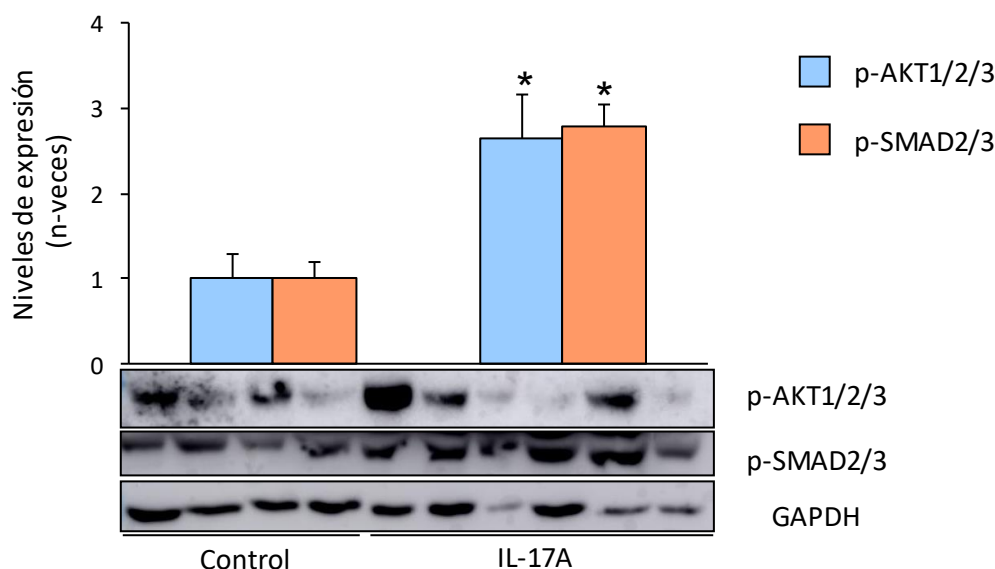


Figura 31. La infusión de IL-17A activó las vías de señalización de Smad y AKT. La activación de las vías intracelulares se evaluó por la fosforilación de Akt o Smad 2/3 por la técnica de western blot. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. La figura muestra varios ratones representativos de cada grupo y la cuantificación de los datos obtenidos. Los datos están expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0,05$ vs Control.

1.3.6. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A NO INDUCE UNA RESPUESTA FIBRÓTICA A NIVEL RENAL.

La determinación de la posible respuesta fibrótica inducida por el tratamiento sistémico con IL-17A demostró que no existían cambios en los niveles de expresión génica de diversos factores profibróticos y componentes de la matriz extracelular como son el *Col1a2* (Procolágeno 1), *Fn1* (Fibronectina) y *Pai-1* a nivel renal entre los diferentes grupos de estudio (figura 32 A). Adicionalmente, el análisis mediante la técnica de tinción del Rojo Sirio, determinó que el tratamiento con IL-17A tampoco generaba diferencias en la expresión proteica de colágeno total a nivel renal tras 14 días de tratamiento (figura 32 B y C).

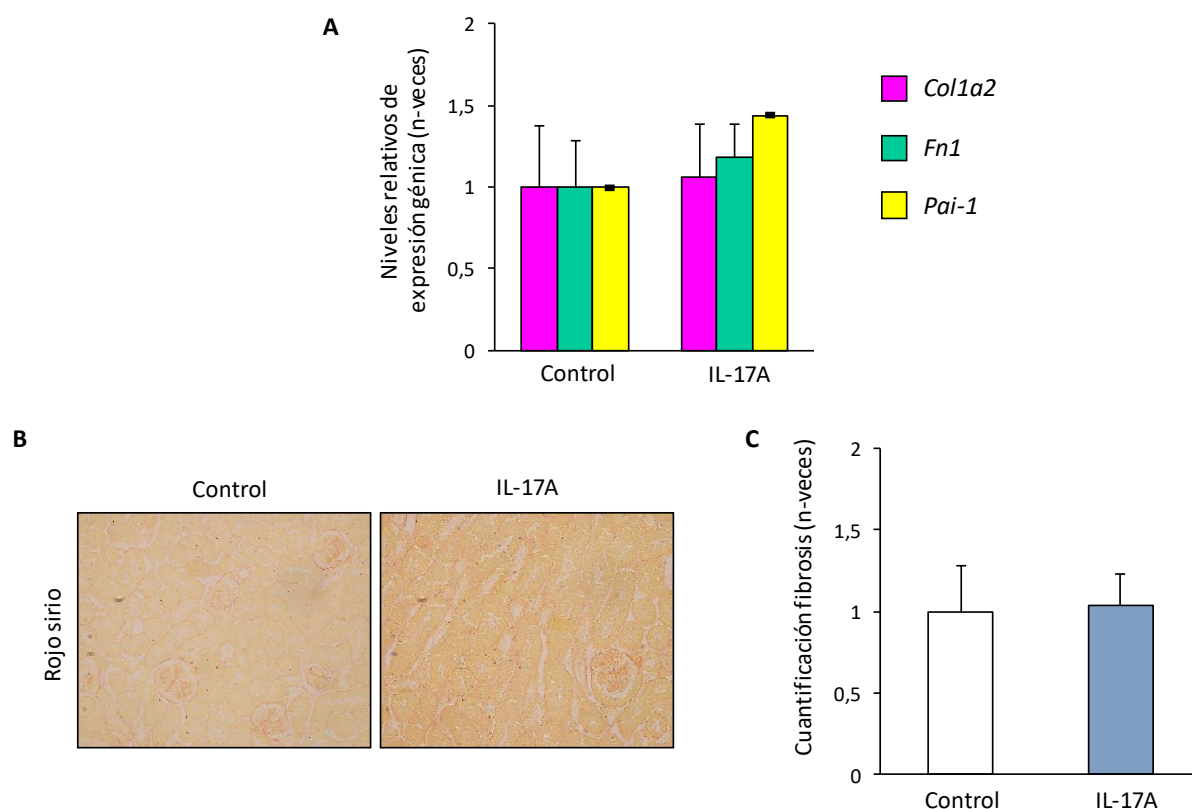


Figura 32. La administración de IL-17A en ratón no indujo fibrosis renal. La figura A muestra la expresión de los genes asociados a fibrosis *Col1a2*, *Fn1* y *Pai-1*, evaluados por PCR cuantitativa. La acumulación de colágeno se evaluó en secciones de riñones teñidos con Rojo Sirio. La figura B muestra una imagen representativa de esta tinción en cada uno de los grupos evaluados y la figura C muestra la cuantificación de la tinción. Los datos están expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0,05$ vs Control.

2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTICUERPO NEUTRALIZANTE DE LA CITOQUINA IL-17A EN UN MODELO DE INFUSIÓN SISTÉMICA DE ANGIOTENSINA II EN RATONES.

2.1. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYÓ LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN DE ANGIOTENSINA II EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS.

Los estudios de estructura y mecánica realizados por miografía de presión, reflejaron en respuesta a la administración sistémica de Ang II, un incremento significativo en el grosor de la pared vascular (figura 33 A) así como en la relación pared/lúmen (figura 33 B) en las AMRs, lo que dio como resultado un aumento en el área de la sección transversal de la arteria (figura 33 C). Por el contrario, los ratones que fueron tratados con un anticuerpo neutralizante de IL-17A de manera conjunta a la administración de Ang II sistémica, mostraron unos resultados similares a los observados en el grupo control en cuanto al grosor de la pared vascular, la relación pared/lumen y el área de la sección transversal (figura 33 A, B y C).

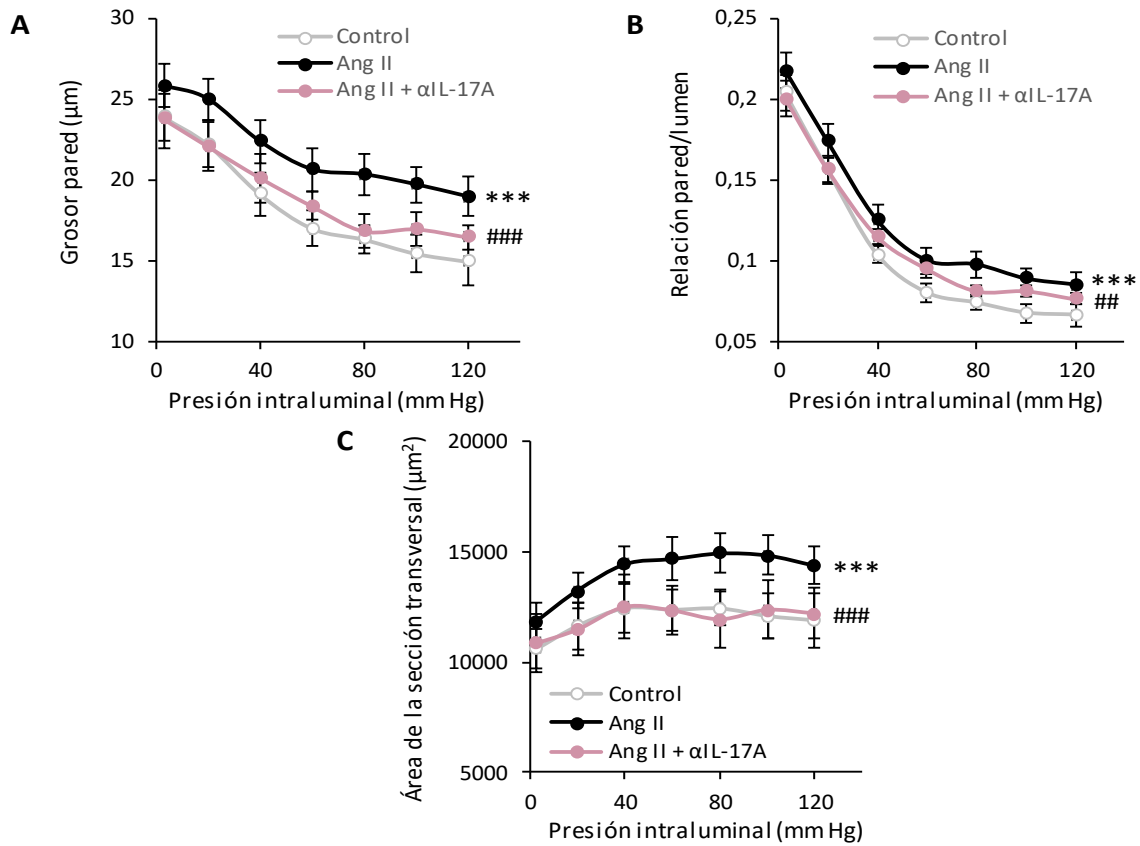


Figura 33. La inhibición de IL-17A restauró los cambios estructurales de las arterias mesentéricas inducidos por la administración de Angiotensina II. Un grupo de ratones C57BL/6 fue tratado con Ang II mediante la implantación de una minibomba osmótica de liberación sistémica (1000 ng/kg/día durante 14 días). Otro grupo fue tratado conjuntamente con la misma dosis de Ang II y con 3 dosis de un anticuerpo neutralizante de la citoquina IL-17A (100 µg/ratón), administrado por vía intraperitoneal un día antes de comenzar el tratamiento con Ang II y a día 4 y 9 del estudio. Las gráficas muestran el grosor de la pared (A), la relación pared/lumen (B) y el área de la sección transversal (C). Como controles se utilizaron ratones sin tratar. Los datos se expresaron como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. ***p<0,001 vs ratón control; ##p<0,01, ###p<0,001 vs Ang II.

El análisis de la estructura de la pared de las AMRs realizado mediante microscopía confocal mostró un engrosamiento de la capa media y de la capa adventicia, en el grupo de ratones tratados con Ang II (figura 34 A y C). Por otro lado, los ratones tratados conjuntamente con el anticuerpo neutralizante de IL-17A presentaron un engrosamiento menor de la capa media, no así de la capa adventicia la cual presentaba un engrosamiento similar al observado en los ratones tratados únicamente con Ang II (figura 34 A y C). La cuantificación del número de células presentes en la capa adventicia y en la capa media (CMLVs) de las AMRs no reveló cambios significativos entre ninguno de los tres grupos estudiados (figura 34 B y D).

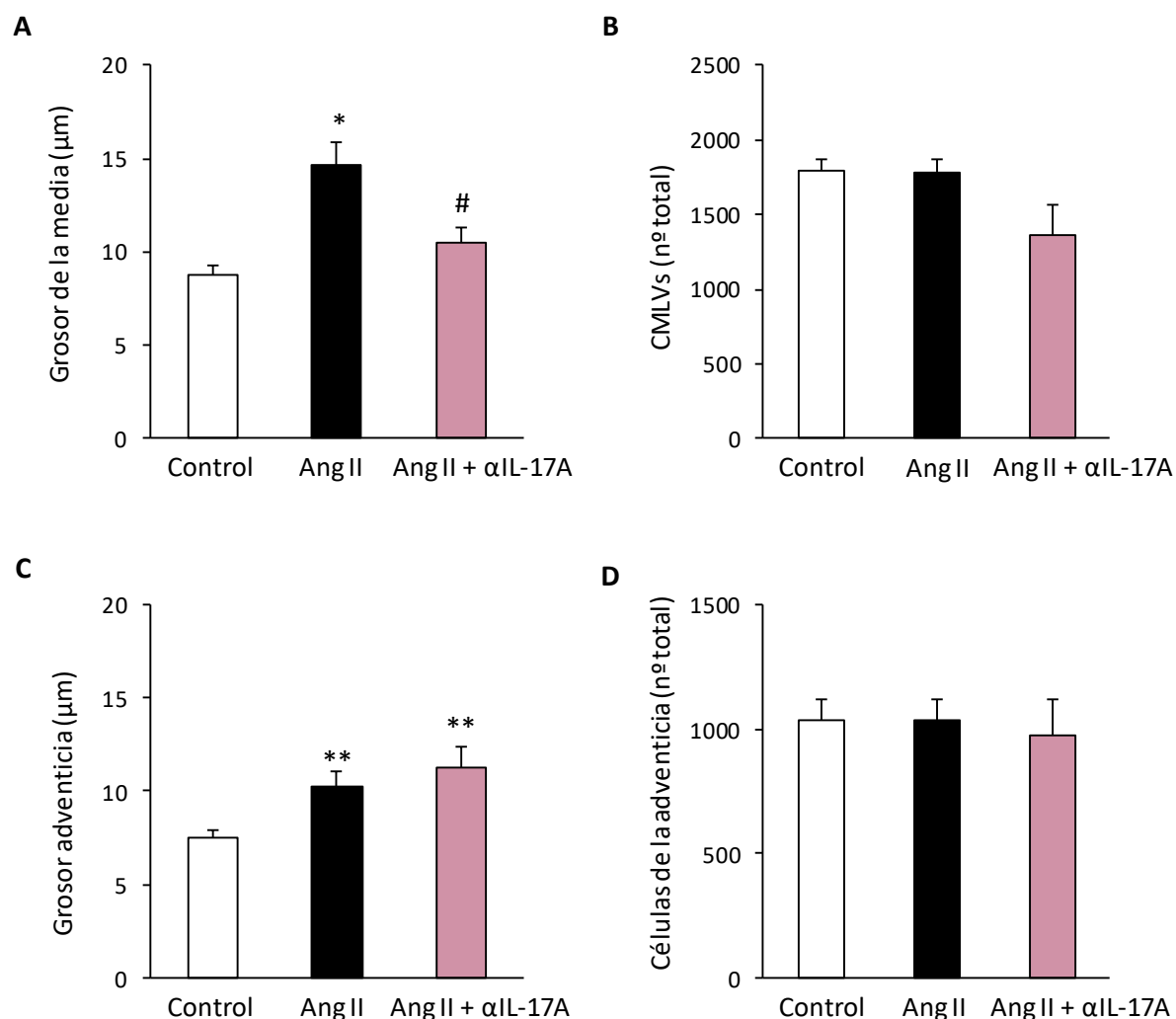


Figura 34. El bloqueo de IL-17A disminuyó las alteraciones de la estructura de las arterias mesentéricas de resistencia inducidas por Angiotensina II. En las AMRs del modelo de administración sistémica de Ang II se realizó una evaluación de la estructura de las capas por microscopía confocal. Los gráficos muestran el grosor de la capa media (A) y el número de CMLVs (B), el grosor de la capa adventicial (C), el número de células de la adventicia (D). La figura muestra datos como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs ratón control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs Ang II.

Sin embargo, el análisis del tamaño nuclear de las CMLVs de las AMRs determinó que existía un aumento significativo en el tamaño de los núcleos en los ratones infundidos sistémicamente con Ang II con respecto a los ratones del grupo control (figura 35), el cual se vio disminuido significativamente en los ratones del grupo tratado conjuntamente con el anticuerpo neutralizante de IL-17A y con Ang II (figura 35).

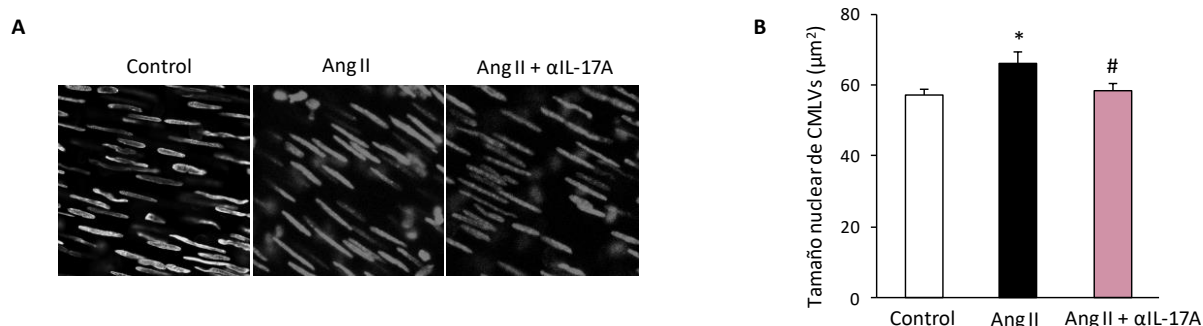


Figura 35. El bloqueo de IL-17A inhibió los cambios asociados a hipertrofia vascular en las arterias mesentéricas de resistencia. La figura A muestra una imagen representativa de los núcleos de las CMLVs presentes en las AMRs. La figura B representa la cuantificación del tamaño nuclear de las CMLVs. Tamaño de imagen: 119,5×119,5µm. Los datos representan la media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 vs ratón control; #p<0,05 vs Ang II.

2.2. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A NO PREVIENE LA ALTERACIÓN DE LOS PARÁMETROS MECÁNICOS INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

El estudio de los parámetros mecánicos de las AMRs mostró un incremento significativo en la rigidez de las AMRs de los ratones tratados con Ang II con respecto al control, el cual no se vio modificado en los ratones tratados conjuntamente con el anticuerpo neutralizante de IL-17A y con Ang II (figura 36).

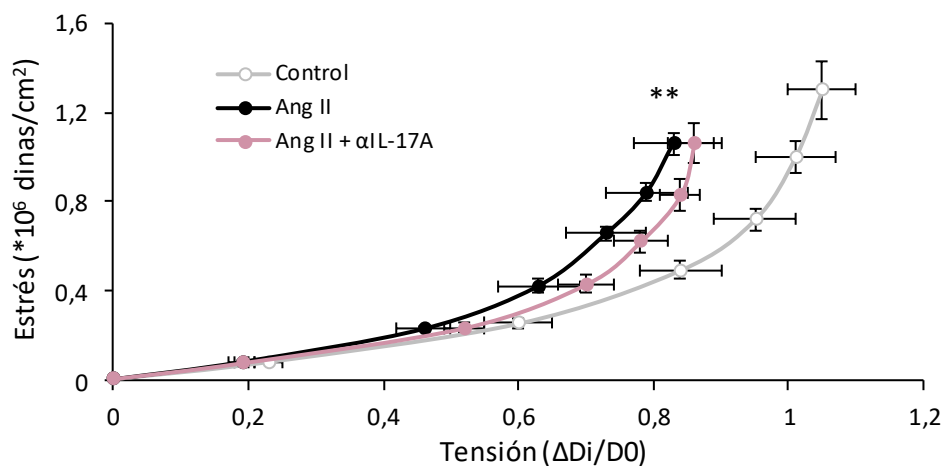


Figura 36. El tratamiento con un anticuerpo neutralizante de IL-17A no reguló las propiedades mecánicas modificadas por la administración sistémica de Angiotensina II en las arterias mesentéricas de resistencia. La gráfica representa la relación estrés-tensión, evaluada en las AMRs del modelo de neutralización de la respuesta Th17. La figura muestra datos como media ± EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. **p<0,01 vs ratón control.

2.3. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE EL AUMENTO EN LA EXPRESIÓN RENAL DEL GEN DE N-GAL INDUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE ANGIOTENSINA II.

La evaluación del daño renal inducido por la administración de Ang II reveló un incremento significativo en los niveles de ARN mensajero del factor NGAL (gen *Lcn2*). Los niveles de este factor se encontraron significativamente reducidos en respuesta al tratamiento con el anticuerpo neutralizante de IL-17A (figura 37).

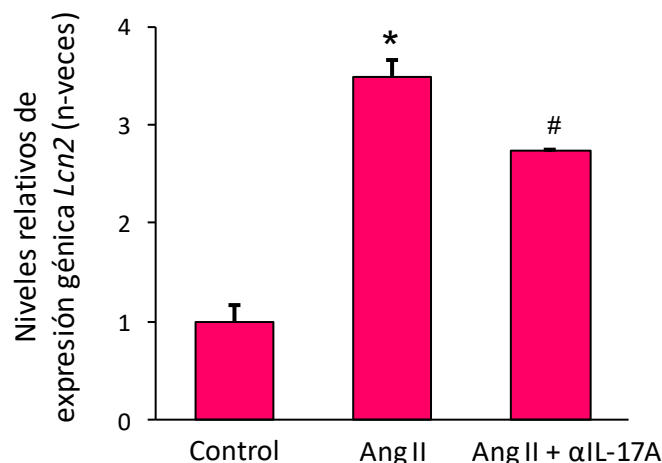


Figura 37. El bloqueo de IL-17A disminuyó ligeramente la expresión del marcador NGAL inducido por Angiotensina II en riñón. La figura muestra los niveles de expresión en riñón del gen *Lcn2* analizado por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. Los datos se expresan como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs ratón control; # $p < 0,05$ vs Ang II.

2.4. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II.

El estudio histopatológico renal realizado mediante la tinción con PAS realizado en todos los grupos del modelo de la neutralización de IL-17A no mostró daños a nivel del parénquima renal ni cambios en la estructura tubular. Del mismo modo, el PAS reflejó un mantenimiento en el borde en cepillo en todos los ratones sin encontrarse cilindros proteicos (figura 38 A-C). En cambio, en el grupo de ratones tratados con Ang II se observó la presencia de un infiltrado celular renal significativo caracterizado por la presencia de linfocitos T CD3⁺ y neutrófilos (figura 38 D y E). Este aumento, fue prevenido en los ratones tratados conjuntamente con el anticuerpo neutralizante de IL-17A y Ang II (figura 38 D y E).

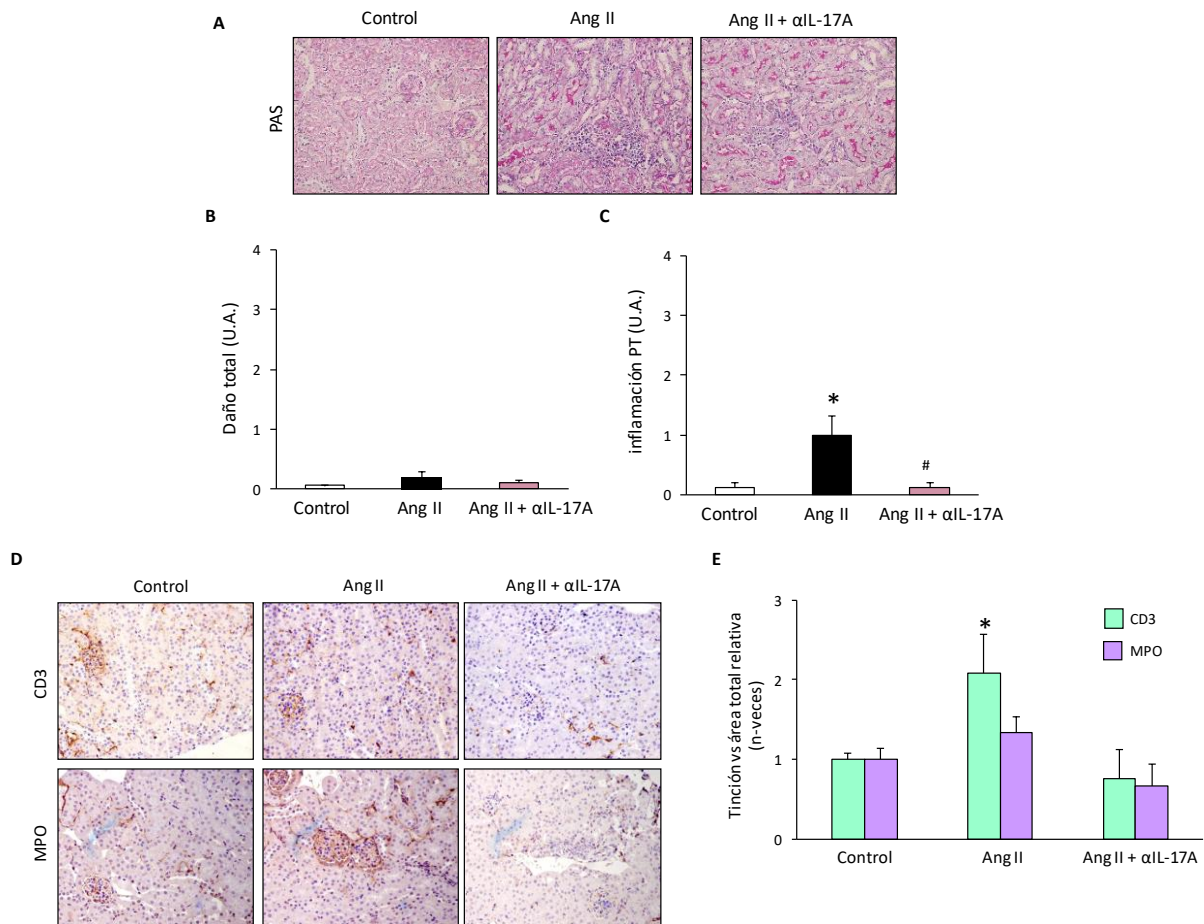


Figura 38. Efecto de la neutralización de IL-17A sobre la morfología renal y el infiltrado celular inflamatorio en el modelo de infusión de Ang II en ratón. La figura A muestra imágenes representativas de secciones renales teñidas con PAS. Magnificación x200. La figura B representa la cuantificación del daño renal y la figura C representa la cuantificación de la inflamación peritubular (PT). La figura D muestra las imágenes representativas de las inmunotinciones del marcador de linfocitos T CD3 y del marcador de neutrófilos mieloperoxidasa (MPO), y la figura E muestra la cuantificación de la tinción. Los datos están expresados como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 vs ratón control; #p<0,05 vs Ang II.

El análisis adicional de la respuesta inflamatoria renal en este modelo realizado mediante la evaluación de los niveles de expresión de ARNm de diversos factores proinflamatorios determinó que el tratamiento conjunto con el anticuerpo neutralizante de IL-17A y Ang II disminuyó el aumento en la expresión de *Ccl-2*, *Tnf-α*, *Vcam* y *Tlr-4*, mientras que el resto de genes estudiados se mantenían en niveles de expresión similares a los obtenidos en los ratones tratados únicamente con Ang II (figura 39).

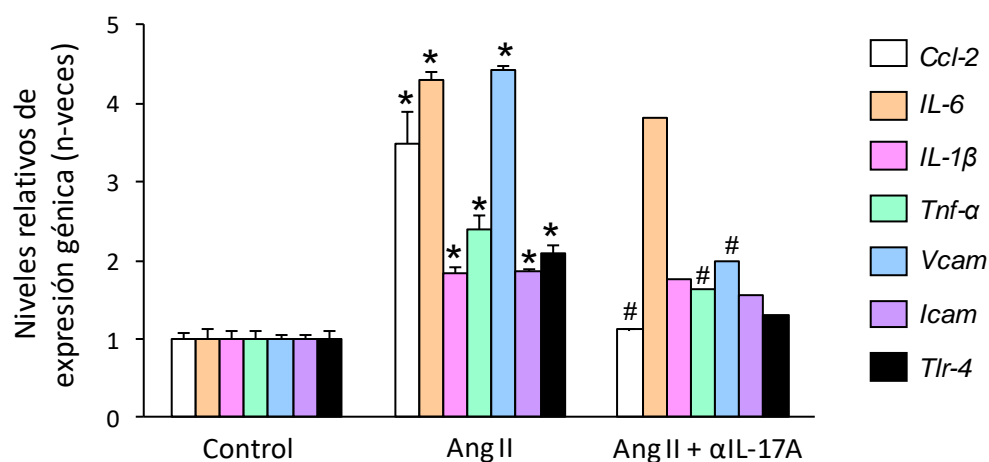


Figura 39. El bloqueo de IL-17A disminuyó la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por Angiotensina II en riñón. La figura muestra los niveles de expresión en riñón de los genes *Ccl-2*, *IL-6*, *IL-1β*, *Tnf-α*, *Vcam*, *Icam* y *Tlr-4*, analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. Los datos se expresan como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs ratón control; # $p < 0,05$ vs Ang II.

2.5. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A NO REGULA DE FORMA SIGNIFICATIVA LA FIBROSIS RENAL PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON ANGIOTENSINA II.

El estudio de los niveles de expresión del ARNm de diversos factores profibróticos y de componentes de la matriz extracelular realizado mediante PCR cuantitativa, determinó que el tratamiento con Ang II generaba un aumento significativo a nivel renal de Procolágeno 1 (gen *Col1a2*), Fibronectina (*Fn1*) y *Pai-1*. Este incremento se vio disminuido en el caso de *Pai-1* en el grupo tratado conjuntamente con el anticuerpo neutralizante de IL-17A y con Ang II, mientras que los niveles de *Col1a2* y *Fn* mostraron niveles similares a los observados en el grupo tratado solo con Ang II (figura 40 A). El estudio de los niveles de colágeno total realizado mediante la tinción histoquímica de Rojo Sirio, reflejó que el tratamiento con Ang II inducía un incremento en la acumulación de colágeno, la cual no se vio modificada por el tratamiento conjunto con el anticuerpo neutralizante de IL-17A (figura 40 B y C).

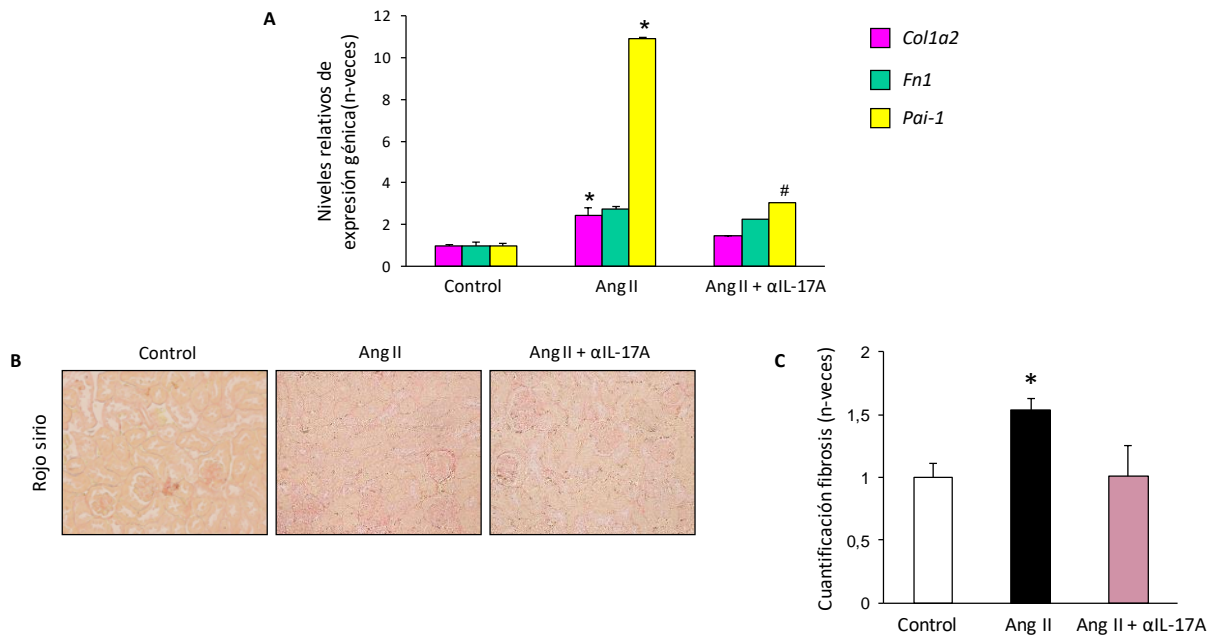


Figura 40. Efecto de la neutralización de IL-17A sobre la fibrosis en el modelo de administración sistémica de Ang II en ratón. La figura A muestra los niveles de expresión en riñón de los genes *Col1a2*, Fibronectina (*Fn1*) y *Pai-1*, analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. La figura B muestra imágenes representativas de secciones renales teñidas con Rojo Sirio. Magnificación x200. La figura C representa la cuantificación del colágeno. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. Los datos están expresados como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 vs ratón control; #p<0,05 vs Ang II.

3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON IL-17A EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATÓN *IN VITRO*.

3.1. EL TRATAMIENTO CON IL-17A AUMENTA LA VIABILIDAD, LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN CMLVs *IN VITRO*.

Los estudios de viabilidad celular realizados en CMLVs en cultivo determinaron un incremento significativo en la viabilidad de las células tratadas con varias dosis de 50 y 100 ng/ml de IL-17A durante 48 horas en comparación con la viabilidad observada en las células en estado basal (Figura 41).

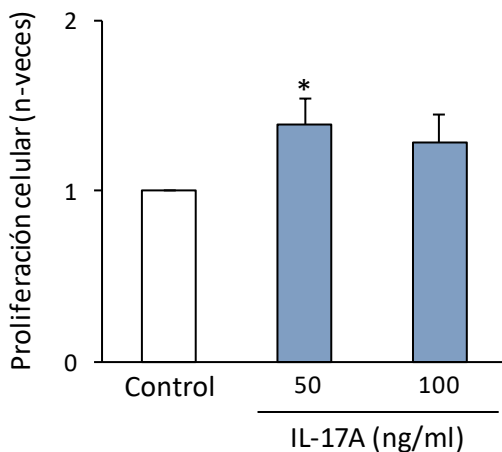


Figura 41. IL-17A aumentó la proliferación de las células de músculo liso vascular de ratón. Las CMLVs fueron estimuladas con la citoquina IL-17A a las dosis de 50 y 100 ng/ml durante 48 horas. Como control positivo se utilizó TGF-β (no mostrado). La gráfica muestra un experimento representativo de 5 realizados y los datos están expresados como media ± EEM. *p<0,05 vs control.

El análisis de los niveles del marcador de proliferación PCNA tras la incubación de las CMLVs con concentraciones crecientes de la citoquina IL-17A durante 24 horas, dio como resultado una tendencia al aumento en los niveles de expresión de PCNA a las concentraciones de 5, 10 y 50 ng/ml, siendo este incremento significativo para la dosis de 100 ng/ml (figura 42 A). Los estudios de inmunofluorescencia realizados en CMLVs tratadas con IL-17A (100 ng/ml) confirmaron el aumento en los niveles de PCNA, localizado principalmente en la región nuclear de las células, en comparación con las células en estado basal (figura 42 B).

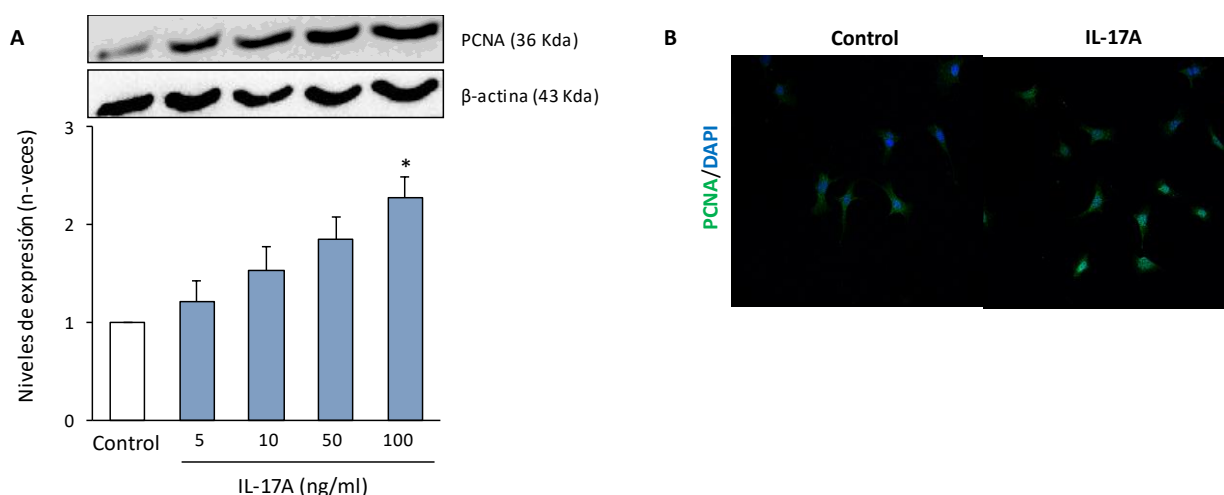


Figura 42. IL-17A aumentó la expresión de PCNA a 48 horas en células de músculo liso vascular de ratón. Se estimularon CMLVs con IL-17A a las dosis de 5, 10, 50 y 100 ng/ml durante 24 horas. En la figura A se muestran los niveles de PCNA de los extractos proteicos analizados por western blot y se utilizó los niveles de β -actina como control de carga. Como control positivo se utilizó TGF- β (no mostrado). La figura B muestra una inmunofluorescencia de la estimulación de CMLVs con IL-17A a la dosis de 100 ng/ml. La figura A muestra un western blot representativo de 5 realizados, y la gráfica de barras de datos como media \pm EEM. Las imágenes de la figura B se realizaron en un microscopio confocal. * $p < 0,05$ vs control.

Los experimentos de cierre de herida demostraron que el tratamiento con IL-17A a una dosis de 50 ng/ml durante 24 horas incrementaba significativamente el área de cierre de herida en CMLVs en cultivo en comparación con el área de cierre observado en las células control. Estos resultados fueron similares a los observados con el tratamiento con TGF- β (10 ng/ml), el cuál fue utilizado como control positivo de la técnica (figura 43).

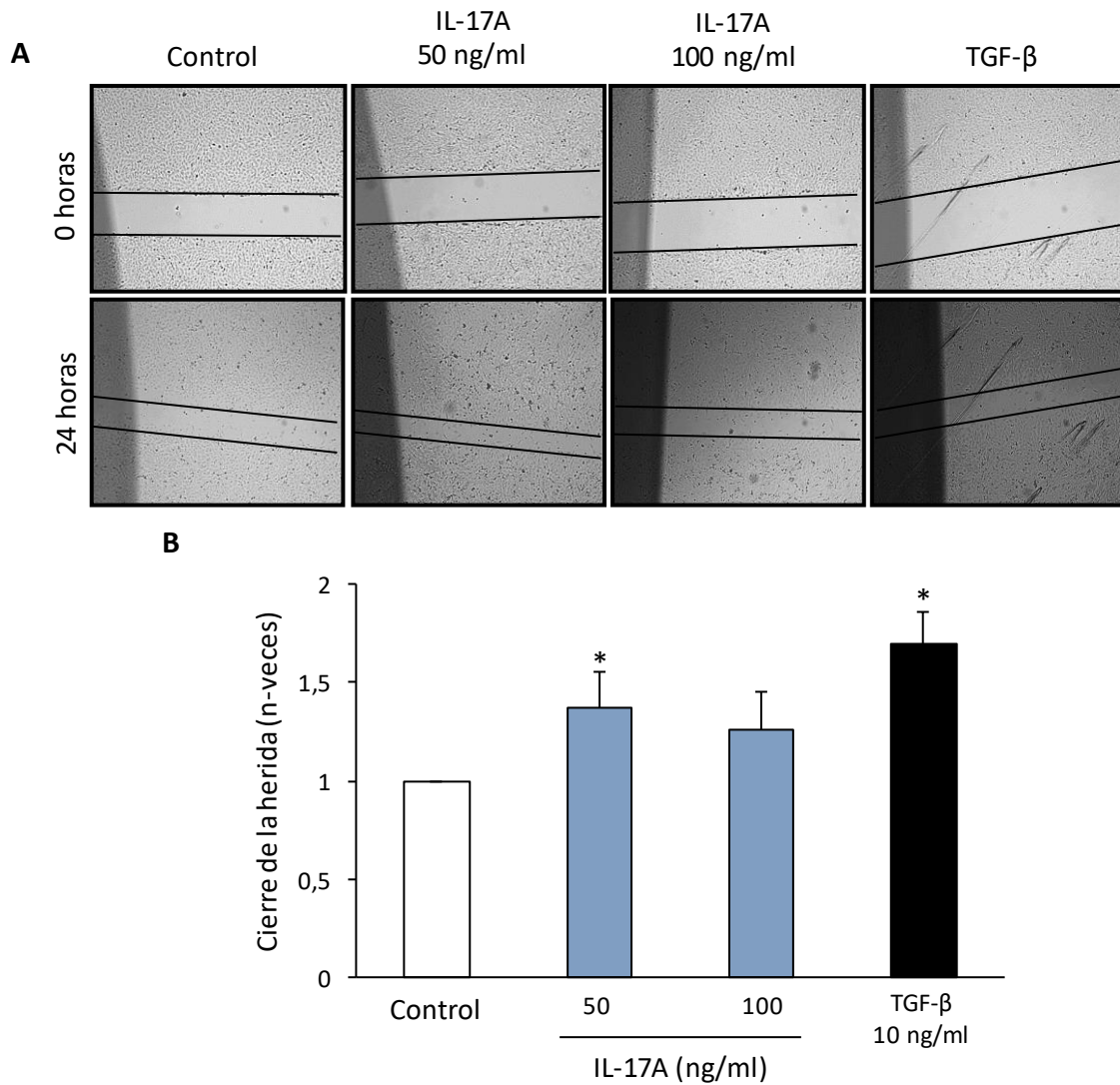


Figura 43. IL-17A promovió la migración de las células de músculo liso vascular a las 24 horas. Sobre una monocapa de CMLVs de ratón se realizaron experimentos de cierre de herida. Una vez realizada la herida, las células se estimularon con la citoquina IL-17A a las dosis de 50 y 100 ng/ml. Como control positivo se utilizó TGF- β (dosis 10 ng/ml). Se tomaron fotos en el momento de estimular las células (0 horas) y a las 24 horas post-estimulación (24 horas). Las imágenes de la figura A muestran una zona representativa de cada herida a las 0 y 24 horas de estimulación. Se realizaron 5 experimentos. La gráfica de la figura B muestra el porcentaje de cierre de cada herida a las 24 horas. Los datos están expresados como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

3.2. EL TRATAMIENTO CON IL-17A AUMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A INFLAMACIÓN PERO NO DE GENES ASOCIADOS A FIBROSIS EN CMLVs *IN VITRO*.

En los estudios de niveles de expresión génica realizados en CMLVs *in vitro*, se observó que las células incubadas con IL-17A a la dosis de 100 ng/ml, presentaban un aumento en la expresión génica del gen *Ccl-2* (gen que codifica a la proteína MCP-1) tras 24 horas de tratamiento (figura 44). Por el contrario, la evaluación de los niveles de expresión génica de varios factores profibróticos o componentes de MEC como fibronectina (*Fn1*), procolágeno tipo I (*Col1a2*), y *Pai-1*, mostró que no existían cambios significativos en sus niveles de expresión génica en CMLVs como respuesta a la estimulación con IL-17A (100 ng/ml; 24 horas), a diferencia de los aumentos observados en las CMLVs tratadas con TGF- β (10 ng/ml) en las que sí que se observó un aumento significativo en los tres genes estudiados (figura 44).

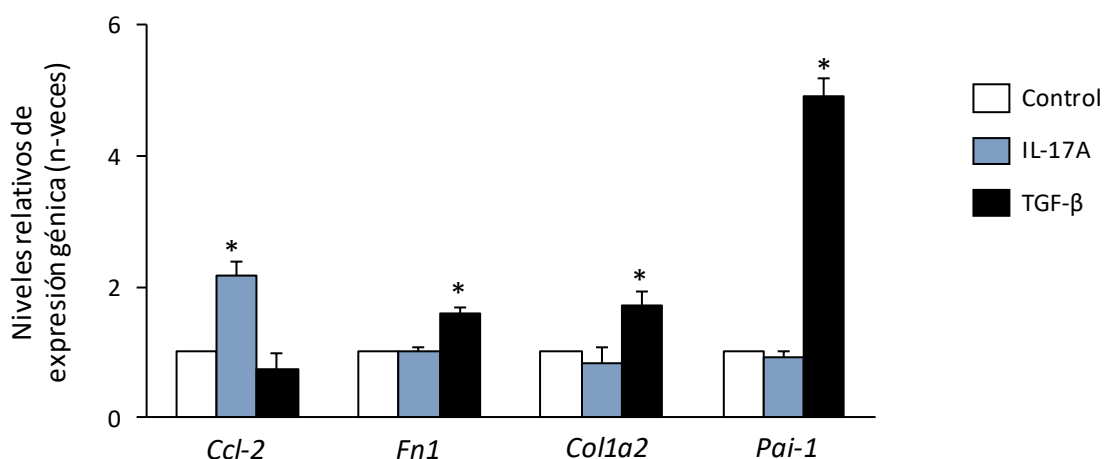


Figura 44. IL-17A aumentó la expresión génica de factores proinflamatorios y profibróticos en CMLVs tras 24 horas de estimulación. Se añadió una dosis de 100 ng/ml de IL-17A recombinante a las CMLVs y a las 24 horas de tratamiento se extrajo el ARN mensajero de estas células para evaluar los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa. Se utilizó TGF- β a la dosis de 10 ng/ml como control positivo. Las gráficas muestran los datos normalizados de la cuantificación expresados como media \pm EEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control.

3.3. LA ESTIMULACIÓN DE CMLVs *IN VITRO* CON IL-17A NO REGULA LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

La evaluación de los efectos de IL-17A en la producción de matriz extracelular no reflejó cambios significativos en los niveles de síntesis de fibronectina en los sobrenadantes de CMLVs tratadas con IL-17A a dosis de 50 y 100 ng/ml durante 24 horas, mientras que el tratamiento con TGF- β (10 ng/ml) durante el mismo periodo de tiempo sí que produjo un aumento significativo (figura 45).

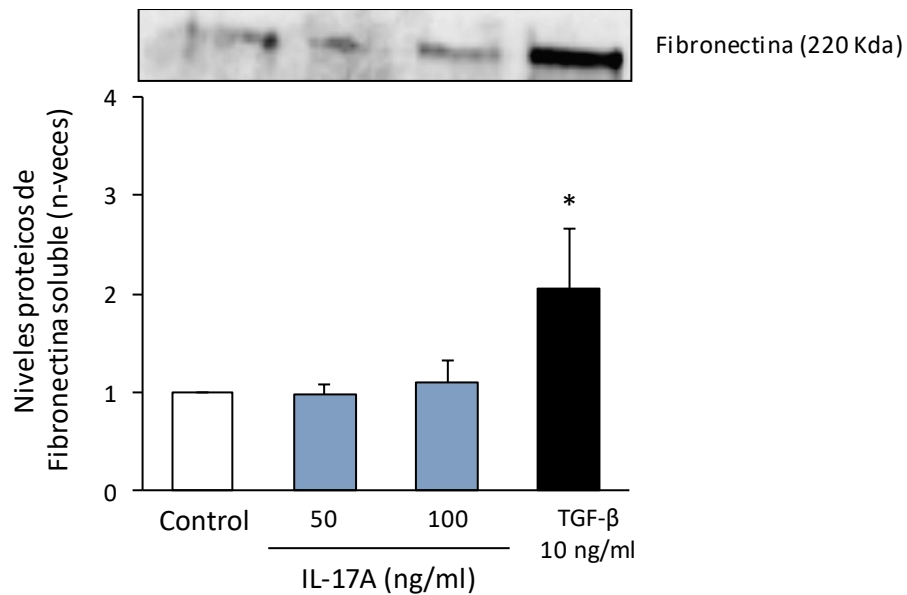


Figura 45. IL-17A a 24 horas no reguló proteínas de matriz extracelular en CMLVs. Se estimularon CMLVs con IL-17A a las dosis de 50 y 100 ng/ml durante 24 horas. A partir de los sobrenadantes celulares, se evaluó por western blot los niveles de fibronectina. Como control positivo se utilizó TGF- β a la dosis de 10 μ g/ml. Como control de carga se utilizó la proteína BSA visualizada en la membrana debido a la tinción de la misma con el colorante Rojo Ponceau (no mostrado). La figura muestra un experimento de western blot representativo de 4 realizados y en la gráfica de barras los datos como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

4. LA CITOQUINA IL-17A ESTÁ PRESENTE EN BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES CON NEFROPATÍA HIPERTENSIVA.

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en secciones de biopsias renales de pacientes con nefropatía hipertensiva (NH) pusieron de manifiesto la presencia de células productoras de IL-17A, las cuales se encontraban principalmente localizadas en las zonas con presencia de un infiltrado inflamatorio, así como en los túbulos (figura 46 A). Por otro lado, los estudios realizados utilizando técnicas de inmunofluorescencia mostraron un doble marcaje positivo para la citoquina IL-17A, para el marcador de superficie celular de linfocitos Th (CD4) y para el marcador específico de linfocitos $\gamma\delta$ (TCR- $\gamma\delta$) (figura 46 B).

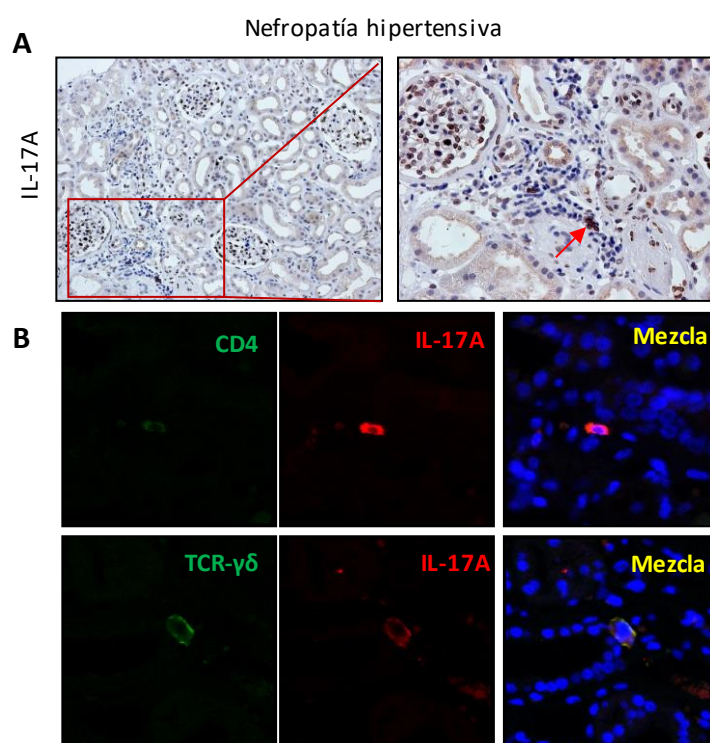


Figura 46. Expresión de IL-17A en biopsias renales de pacientes con Nefropatía hipertensiva. La figura A muestra biopsias renales de pacientes diagnosticados con Nefropatía hipertensiva (NH) donde se determinó la presencia de IL-17A por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra esta citoquina. La figura B muestra la localización de células que expresan IL-17A por inmunofluorescencias indirectas dobles. La citoquina fue marcada con un anticuerpo secundario Alexa-633 (rojo) y los distintos tipos celulares fueron marcados con un anticuerpo secundario Alexa-488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La figura muestra el análisis por microscopía confocal de un paciente representativo de 20 estudiados con similares resultados.

5. PAPEL DE IL-17A EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL Y HUMANA.

5.1. LA CITOQUINA IL-17A SE ENCUENTRA PRESENTE A NIVEL RENAL EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob.

El estudio de los niveles de expresión génica realizados mediante RT-PCR mostró un aumento significativo en los niveles de ARN mensajero del gen de *IL-17a* en los riñones de los ratones diabéticos (BTBR ob/ob) respecto a los ratones del grupo control a partir de la semana 10 de edad. Este incremento se mantuvo hasta la última semana de estudio (semana 20) alcanzando el máximo nivel de expresión en la semana 14 (figura 47).

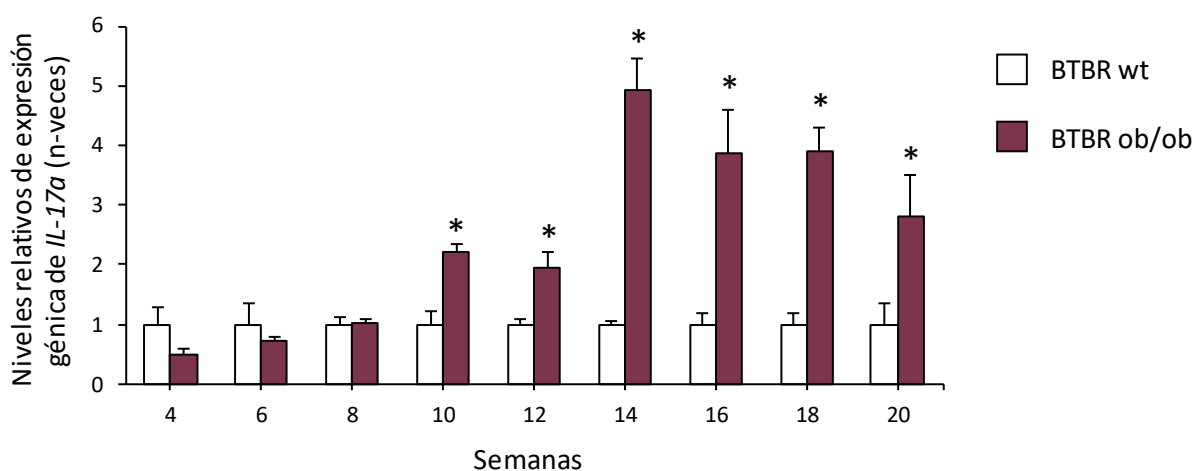


Figura 47. La expresión génica de IL-17A aumentó en ratones diabéticos BTBR deficientes en leptina (BTBR ob/ob) frente a ratones BTBR de fenotipo salvaje (BTBR wt) en riñón. Se eutanasiaron ratones BTBR ob/ob y BTBR wt con edades comprendidas entre las 4 y las 20 semanas de edad. Después de la eutanasia, se extrajeron los riñones para procesarlos con el fin de obtener el ARN mensajero. La figura muestra los niveles de expresión génica de IL-17A analizados por PCR a tiempo real y expresados como la media \pm EEM de la cuantificación normalizada de 6 animales estudiados por grupo. * $p < 0,05$ vs. BTBR wt.

En los riñones de los ratones BTBR ob/ob de 16 y 20 semanas, se observó un aumento a nivel proteico de IL-17A. Además, los factores de transcripción claves en el proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 ROR γ t y STAT3 fosforilada (p-STAT3), se encontraron elevados en los riñones diabéticos frente a los controles (figura 48).

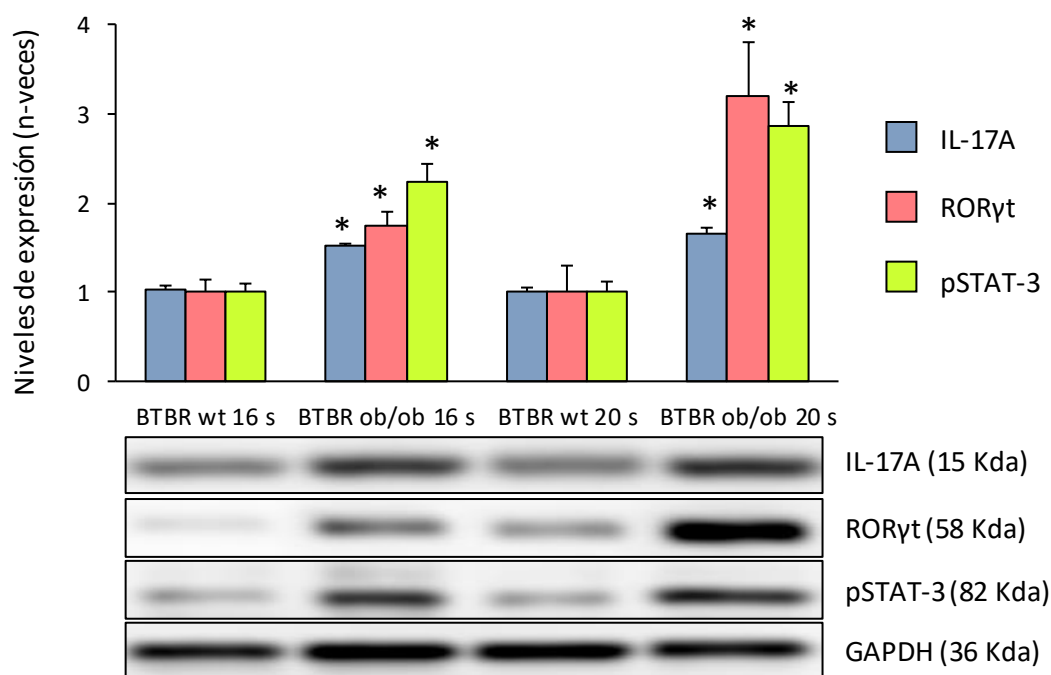


Figura 48. La respuesta Th17 está activada en el riñón de los ratones diabéticos BTBR ob/ob. La figura muestra los niveles proteicos de IL-17A y los factores de transcripción asociados a la respuesta Th17: el factor de transcripción de tipo huérfano del receptor del ácido retinoico γ t (ROR γ t) y la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción 3 fosforilada (p-STAT3) en los ratones BTBR ob/ob de 16 y 20 semanas con sus respectivos controles (BTBR wt), evaluados por western blot, junto con la cuantificación de estas proteínas. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Los datos están expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0,05$ vs BTBR wt.

La caracterización extensiva del proceso inflamatorio observado en los ratones BTBR ob/ob, mostró un incremento significativo del infiltrado celular renal desde la semana 14 hasta la semana 20, comparando este grupo con su correspondiente control no diabético (BTBR wt). El infiltrado celular se caracterizó por la presencia de macrófagos (células F4/80⁺), linfocitos T (CD4⁺ y linfocitos $\gamma\delta$), neutrófilos (mieloperoxidasa, MPO) y células IL-17A⁺ (figura 49).

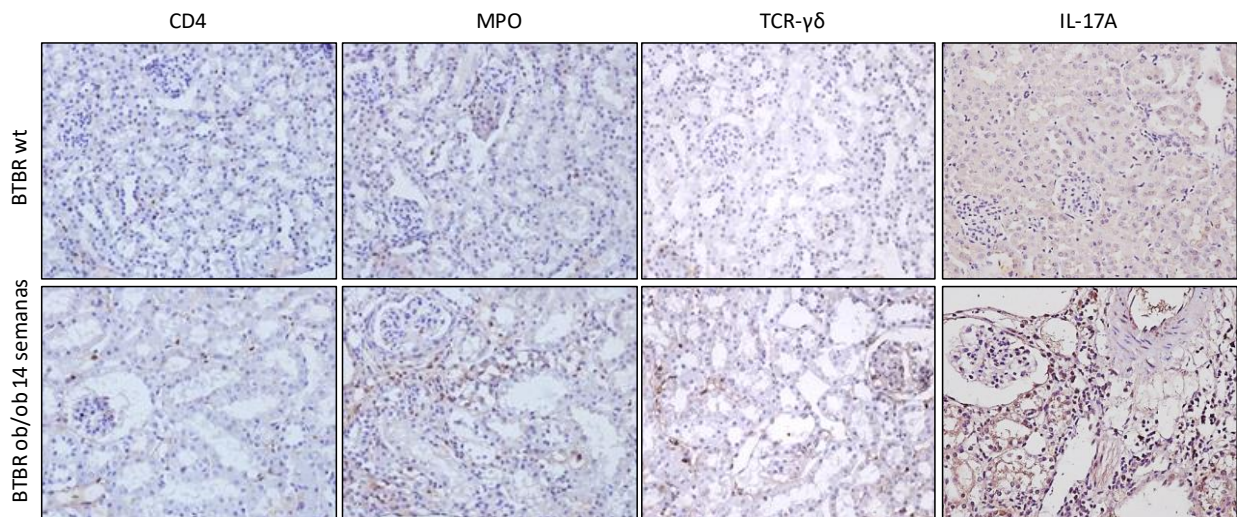


Figura 49. Caracterización de infiltrado inflamatorio en el modelo experimental de nefropatía diabética. En los riñones de ratones BTBR ob/ob de 14 semanas se determinó por inmunohistoquímica la presencia de células inmunes. La figura muestra una inmunohistoquímica representativa de secciones de riñón de ratones BTBR de fenotipo salvaje (BTBR wt) y BTBR ob/ob de 14 semanas de linfocitos CD4+ y $\delta\gamma$, neutrófilos y células IL-17A+.

El estudio realizado mediante técnicas de inmunofluorescencia reflejó la presencia de células positivas para el doble marcaje con IL-17A y CD4 (linfocitos Th) y con IL-17A y TCR- $\gamma\delta$ (Linfocitos $\gamma\delta$) en secciones renales de ratones BTBR ob/ob de 20 semanas de edad (figura 50).

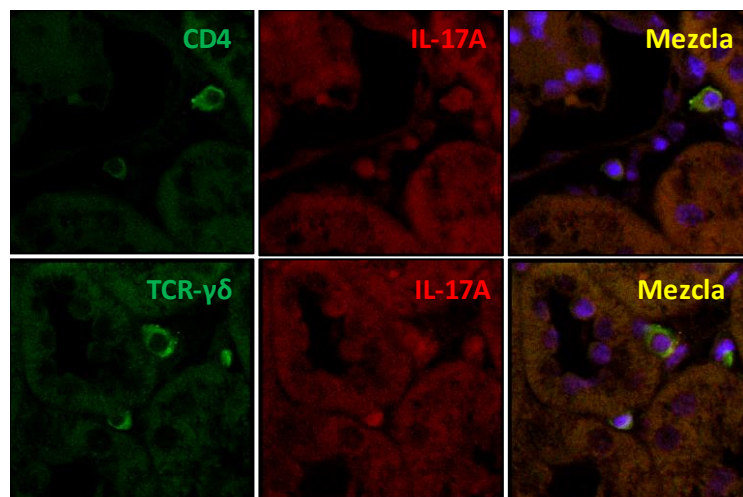


Figura 50. Localización de células que expresan IL-17A en ratones BTBR ob/ob de 20 semanas. Para caracterizar células que expresan IL-17A, se realizaron inmunofluorescencias indirectas dobles en biopsias renales. La citoquina efectora de la respuesta Th17 se marcó con un anticuerpo secundario Alexa Fluor-633 (rojo) y los distintos tipos celulares fueron marcados con un anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 (verde). Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; azul). La figura muestra el análisis por microscopía confocal de un animal representativo de seis estudiados con similares resultados.

5.2. LA CITOQUINA IL-17A SE ENCUENTRA PRESENTE EN BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA.

El análisis de las biopsias renales de pacientes diagnosticados con ND mediante técnicas inmunohistoquímicas, reveló la presencia de células productoras de IL-17A las cuales estaban localizadas principalmente en áreas con un infiltrado inflamatorio (figura 51 A). Los estudios posteriores realizados mediante técnicas de inmunofluorescencia mostraron células positivas para el doble marcaje con IL-17A y CD4 (linfocitos Th) y con IL-17 y TCR- $\gamma\delta$ (linfocitos $\gamma\delta$) (figura 51 B).

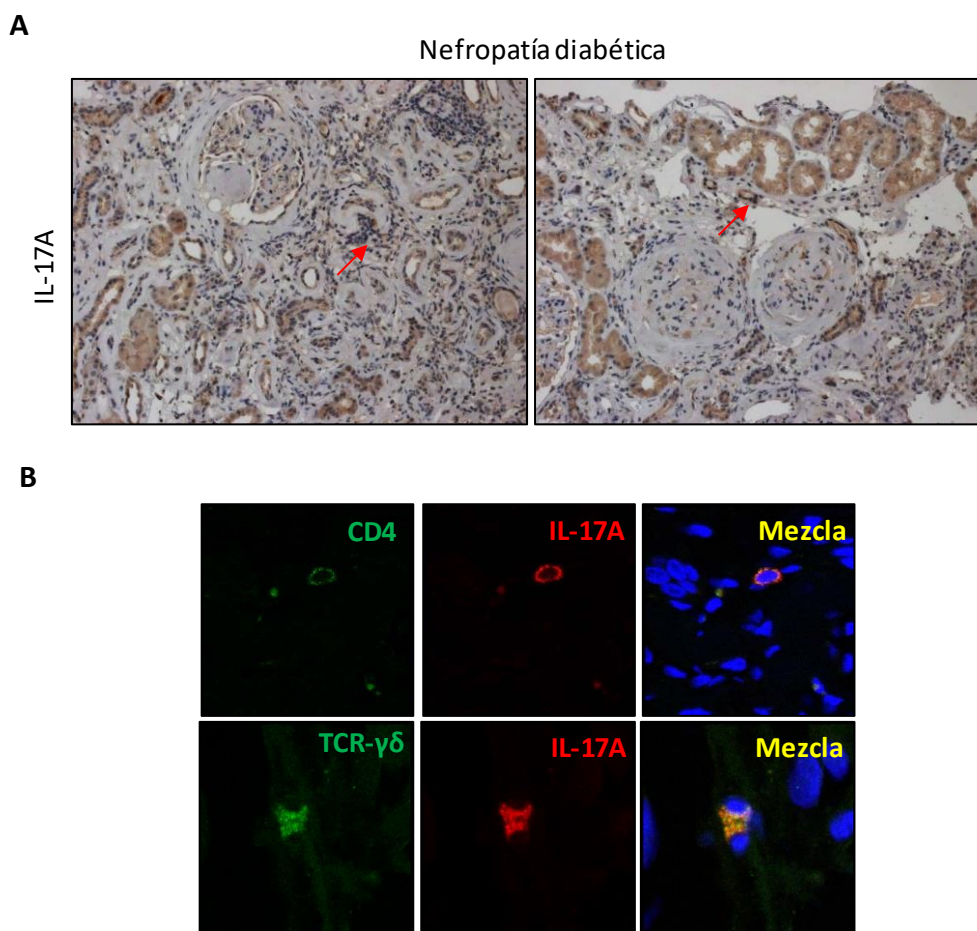


Figura 51. Expresión y localización de células IL-17A⁺ en biopsias renales de pacientes con ND. La presencia de células que expresan IL-17A se detectó por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra IL-17A. La figura A muestra una imagen representativa de biopsias humanas de ND. Las células positivas de IL-17A se encontraron en el infiltrado inflamatorio. Para caracterizar las células que expresan IL-17A, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia doble. IL-17A se marcó con un secundario Alexa Fluor-633 (rojo) y los diferentes tipos celulares fueron marcados utilizando un anticuerpo específico para el marcador de superficie celular CD4y para detectar linfocitos $\gamma\delta$ con un anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 (verde). Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; azul). La figura B muestra el análisis por microscopía confocal de un paciente representativo de 20 estudiados con similares resultados.

6. EFECTO DEL BLOQUEO DE IL-17A EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATÍA DIABÉTICA.

6.1. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A MEJORA LAS LESIONES RENALES GENERADAS EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob.

La determinación del daño renal mostró un incremento significativo en el cociente albúmina/creatinina a partir de la semana 16 de estudio en los ratones BTBR ob/ob IgG diabéticos con respecto a su correspondiente control no diabético (BTBR wt) (figura 52 A). Destaca que el grupo de ratones diabéticos tratados de manera terapéutica con un anticuerpo neutralizante de IL-17A (BTBR ob/ob + α IL-17A) estos niveles se encontraban disminuídos significativamente frente a los ratones diabéticos tratados con IgG control (figura 52 B).

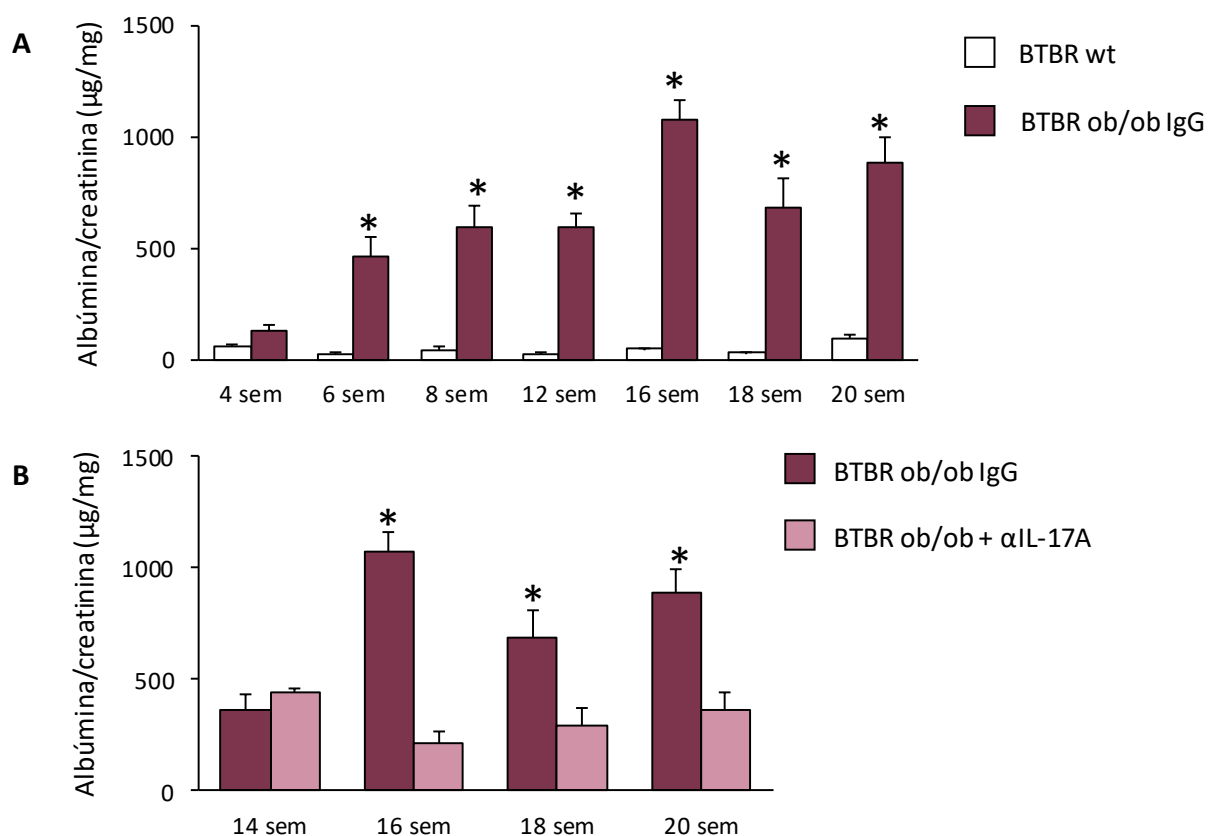


Figura 52. La administración sistémica de un anticuerpo neutralizante de IL-17A disminuyó los niveles de albuminuria en el ratón BTBR ob/ob. Se realizó un modelo de administración sistémica de un anticuerpo neutralizante de la citoquina IL-17A mediante la implantación de minibombas osmóticas a la dosis de 50 mg/kg/día. La implantación de las minibombas se produjo a las 15 semanas de edad (tratamiento terapéutico), eutanasiando a los ratones a las 20 semanas de edad. En paralelo, a un grupo de ratones BTBR ob/ob se les administró un anticuerpo IgG control. La figura A representa el cociente albúmina/creatinina medida en la orina en los ratones BTBR wt y BTBR ob/ob a las 4, 6, 8, 12, 16, 18 y 20 semanas de edad y la figura B representa el cociente albúmina/creatinina de los ratones BTBR ob/ob a las 14, 16, 18 y 20 semanas de edad, en comparación con los ratones BTBR ob/ob tratados con el anticuerpo neutralizante de IL-17A. Los datos están expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. A) * $p \leq 0,05$ vs BTBR wt. B) * $p \leq 0,05$ vs BTBR ob/ob α IL-17A.

La evaluación histopatológica de los riñones realizada mediante la tinción PAS mostró la presencia de un daño renal en los ratones BTBR ob/ob tratados con la IgG control en comparación con los ratones BTBR wt, el cual estaba caracterizado por un aumento en la matriz mesangial, en la hialinosis y en la infiltración celular intersticial. El grupo de ratones BTBR ob/ob tratado de manera preventiva con el anticuerpo neutralizante de IL-17A, presentó una disminución significativa en el daño renal comparados con los ratones diabéticos (figura 53).

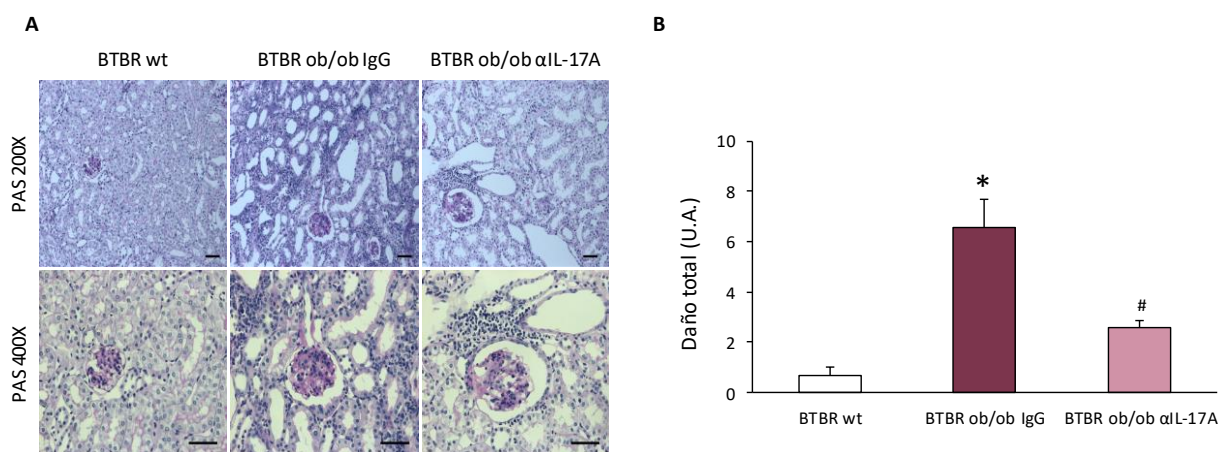


Figura 53. Efecto de la neutralización de IL-17A sobre la morfología renal y el infiltrado celular inflamatorio en el ratón BTBR ob/ob. La figura A muestra las imágenes representativas de secciones renales teñidas con PAS. Magnificación x200 y x400. La figura B representa la cuantificación del daño renal. Los datos están expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs BTBR wt; # $p < 0,05$ vs BTBR ob/ob.

6.2. LA NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA EN EL MODELO ACELERADO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL EN RATONES BTBR ob/ob.

El estudio del infiltrado inflamatorio de este modelo en la semana 20 de estudio puso de manifiesto un incremento significativo en el infiltrado celular renal de los ratones BTBR ob/ob tratados con la IgG control, el cual estaba caracterizado principalmente por la presencia de macrófagos (células F4/80⁺) y linfocitos (CD3⁺, CD4⁺). Este aumento en el infiltrado inflamatorio se vio disminuido significativamente en los ratones BTBR ob/ob tratados de manera preventiva con el anticuerpo neutralizante de IL-17A (figura 54).

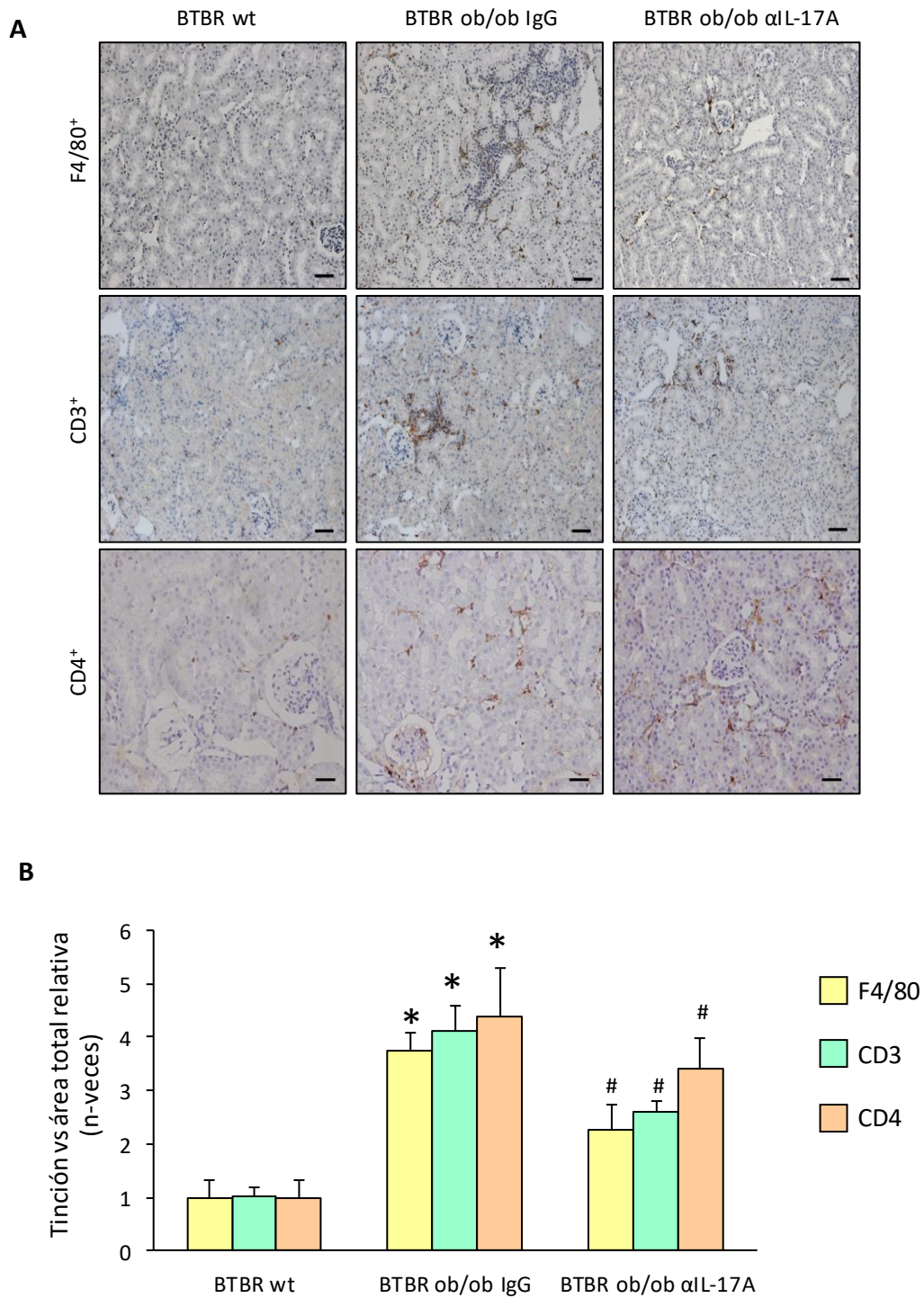


Figura 54. La neutralización de IL-17A inhibió las respuestas inflamatorias en el modelo murino de nefropatía diabética. La figura A muestra las imágenes representativas de inmunohistoquímicas para los grupos control, IgG y Anti-IL-17A de ratones BTBR ob/ob a 20 semanas de linfocitos CD4⁺ y $\delta\gamma$, neutrófilos y células IL-17A⁺. La figura B muestra la cuantificación de las imágenes. Los datos se muestran como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. * $p \leq 0,05$ vs BTBR wt; # $p \leq 0,05$ vs BTBR ob/ob + IgG.

El análisis de las posibles vías de señalización implicadas en las respuestas observadas transcurridas 20 semanas de estudio, determinó que existía un aumento en los niveles proteicos de la proteína IκB fosforilada (p-IκB) y de la proteína p65 fosforilada (p-p65), proteínas que participan en la vía de señalización de NF-κB, en el grupo de ratones BTBR ob/ob tratados con la IgG control en comparación con el grupo BTBR wt. Del mismo modo, se comprobó que en el grupo de ratones BTBR ob/ob tratados de manera preventiva con el anticuerpo neutralizante de IL-17A los niveles de ambas proteínas se encontraban significativamente más bajos que en los ratones BTBR ob/ob tratados con la IgG control (figura 55).

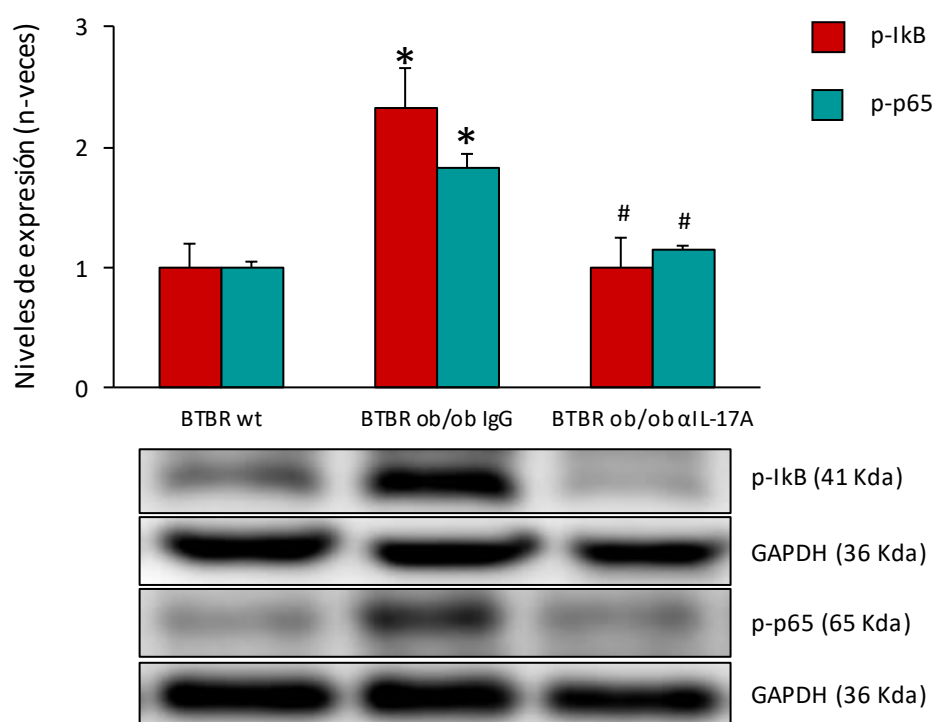


Figura 55. La administración sistémica del anticuerpo neutralizante de IL-17A disminuye la expresión de genes proinflamatorios en el ratón BTBR ob/ob. La figura A muestra los niveles proteicos de IκB fosforilada (p-IκB) y p65 fosforilada (p-p65) modelo de infusión sistémica del anticuerpo neutralizante de IL-17A en el ratón BTBR ob/ob evaluados por western blot. La figura B muestra la cuantificación de estas proteínas. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. La gráfica muestra los datos como media \pm EEM de 6-8 animales estudiados por grupo. * $p \leq 0,05$ vs Control; # $p \leq 0,05$ vs ob/ob IgG.

La evaluación de los niveles de expresión génica renal de diversos factores proinflamatorios mostró un incremento significativo en los niveles de ARNm de *Ccl-2*, *Ccl-5*, *IL-6* y *Tlr-4* en el grupo BTBR ob/ob tratado con la IgG control en la semana 20 de estudio. Este incremento se vio prevenido en el grupo BTBR ob/ob tratado con el anticuerpo neutralizante de IL-17A de tal forma que los valores observados para los genes en estudio fueron significativamente inferiores a los obtenidos en ratones diabéticos sin tratar (Figura 56).

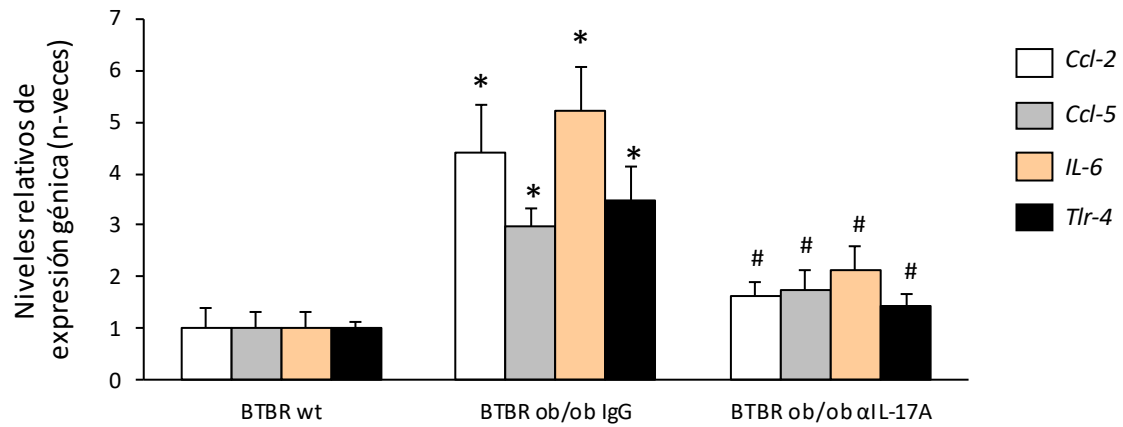


Figura 56. La administración sistémica del anticuerpo neutralizante de IL-17A disminuye la expresión de genes proinflamatorios en el ratón BTBR ob/ob. La figura muestra los niveles en riñón de la expresión génica de *Ccl-2*, *Ccl-5*, *IL-6* y *Tlr-4*, analizados por PCR en tiempo real. En cada animal, la expresión de cada gen se normalizó frente a los niveles correspondientes de GAPDH. Los datos se expresan como incremento respecto a los valores de animales control. Los datos se expresan como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0,05$ vs BTBR wt; # $p < 0,05$ vs BTBR ob/ob.

Discusión

DISCUSIÓN

1. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 ASOCIADA A HIPERTENSIÓN EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y RENAL.

1.1. LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE IL-17A EN RATÓN AUMENTA LA PRESIÓN ARTERIAL E INDUCE CAMBIOS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA. POSIBLE MECANISMO IMPLICADO EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA.

En esta tesis se ha observado que la administración sistémica de IL-17A en ratón provoca un incremento de la presión arterial sistólica significativo al cabo de 14 días. Estudios previos realizados en un ratón transgénico que sobreexpresa IL-17A en queratinocitos (Karbach *et al.*, 2014) y en un modelo murino de administración intraperitoneal de dosis elevadas de la citoquina recombinante (Nguyen *et al.*, 2013), han descrito que IL-17A aumenta la tensión arterial. Todos estos datos demuestran la participación de la IL-17A en la patogenia de la hipertensión. La dosis de IL-17A administrada en el modelo realizado en esta tesis es similar a los niveles séricos detectados en pacientes con un aumento de presión arterial en el rango 120/80 (Yao *et al.*, 2015), rango considerado actualmente por encima de los valores óptimos (Whelton *et al.*, 2018), sugiriendo que niveles circulantes elevados de IL-17A podrían contribuir a la generación de hipertensión.

Los mecanismos que regulan la hipertensión (HTA) son complejos, actuando en diferentes órganos e implicados diversos sistemas. Estudios preclínicos previos han investigado el papel de IL-17A en hipertensión y en daño vascular asociado, centrándose en el estudio de cambios estructurales y funcionales en la arteria aorta (Madhur *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Karbach *et al.*, 2014). Recientemente se ha remarcado la importancia de las arterias pequeñas en la patogenia de la hipertensión. En pacientes hipertensos se han observado un aumento en la relación media/lúmen y de la rigidez de la pared de las AMRs, estos cambios estructurales y funcionales causan un incremento en la resistencia vascular periférica, reduciendo el flujo sanguíneo y, por tanto, provocando un aumento de la presión sanguínea (Laurent y Boutouyrie, 2015; Rizzoni *et al.*, 2001; Mathiassen *et al.*, 2007). Los estudios realizados en esta tesis utilizando un modelo de administración continua de IL-17A en ratón han demostrado que el aumento en la presión sanguínea se asocia a un remodelado hipertrófico hacia el interior de las AMRs, estos cambios estructurales se caracterizan por una disminución del diámetro del lumen y un aumento del grosor de la pared y de la rigidez arterial. Además, se observan alteraciones funcionales, presentando una mayor rigidez en la AMRs de los animales expuestos a IL-17A. Estos resultados sugieren que los cambios estructurales y funcionales en la AMRs podrían ser un mecanismo por el cual IL-17A podría contribuir al aumento de la tensión arterial observado en el modelo experimental de administración sistémica de IL-17A.

1.2. LA IL-17A INDUCE HIPERTROFIA Y CAMBIOS EN EL FENOTIPO DE LAS CMLVs QUE SON RESPONSABLES DEL REMODELADO VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

La administración continua de IL-17A induce un remodelado hipertrófico hacia el interior de AMRs. Los procesos implicados en el remodelado vascular, incluyen cambios en el número o en el tamaño de las células que componen las capas vasculares (Intengan y Schiffrin, 2001). En respuesta a IL-17A en esta tesis se ha observado que el engrosamiento de la pared se produce mayoritariamente en la capa media, no observándose cambios significativos en la adventicia. Este engrosamiento es debido a un aumento del tamaño de las CMLVs, pero sin presentar variaciones relevantes el número total estas células. Además, en el modelo de hipertensión inducida por Ang II, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de IL-17A disminuyó el grosor de la capa media y la hipertrofia en CMLVs, sugiriendo así que las CMLVs son dianas de las acciones *in vivo* de IL-17A.

Las respuestas de IL-17A varían dependiendo del tipo celular y de las condiciones patológicas, ejerciendo principalmente acciones proinflamatorias (Aggarwal y Gurney, 2002; von Vietinghoff y Ley, 2010; Gong *et al.*, 2015; Beringer, Noack y Miossec, 2016; Nordlohne y von Vietinghoff, 2019). Los estudios *in vitro* realizados en esta tesis utilizando una línea celular de CMLVs murinas en cultivo han demostrado que IL-17A incrementó la expresión génica de la quimioquina MCP-1, confirmado las acciones proinflamatorias de esta citoquina. Se han descrito diversos mecanismos que podrían participar en el remodelado arterial asociado a hipertensión, entre los que se encuentran la inflamación, la proliferación y/o la apoptosis, y la fibrosis (Intengan y Schiffrin, 2001). En cardiomiocitos, IL-17A induce apoptosis (Liao *et al.*, 2012), mientras que en CMLVs (Liu *et al.*, 2014) y fibroblastos (Okamoto *et al.*, 2012) actúa como un factor proliferativo, al igual que se ha demostrado aquí en las CMLVs murinas en cultivo, puesto que aumenta la expresión del marcador de proliferación celular PCNA y, a través del reactivo MTS, se ha observado que IL-17A produce un incremento del número de células. Además, los experimentos de cierre de herida confirman que IL-17A regula la proliferación y migración las CMLVs, sugiriendo un mecanismo potencial implicado en el aumento del grosor de la íntima. Como limitación del estudio cabe destacar que el hecho de no observar un aumento significativo del número de CMLVs en las AMRs podría ser debido al tiempo de estudio del modelo experimental, solo 2 semanas, serian necesarios estudios a tiempos mas largos de administración de IL-17A para resolver esta cuestión.

En procesos de remodelado vascular las CMLVs sufren cambios fenotípicos, desde el tipo contráctil clásico a uno denominado de tipo sintético. Estas transformaciones celulares se asocian a cambios en proteínas, tanto celulares como del secretoma, que caracterizan dichos fenotipos (Hao, Gabbiani y M. L. Bochaton-Piallat, 2003; Safar *et al.*, 2018). Estudios previos en células en cultivo han

descrito que IL-17A induce cambios en fenotipos celulares, como la transición epitelio-mesénquima en células tubulopiteliales en cultivo (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). En los ratones tratados con IL-17A se observaron cambios en niveles de expresión de calponina de las CMLVs de las AMRs. Estos datos indican que la IL-17A tiene un papel importante en la modulación del fenotipo, sugiriendo un mecanismo clave en el daño vascular consistente con los cambios observados en las arterias de los ratones infundidos con IL-17A (figura 57).

Los resultados experimentales obtenidos en esta tesis sugieren que IL-17A es un mediador clave en el remodelado vascular de las AMRs, actuando principalmente sobre las CMLVs y proporciona evidencias nuevas del papel de la citoquina inflamatoria IL-17A en daño vascular asociado a hipertensión.

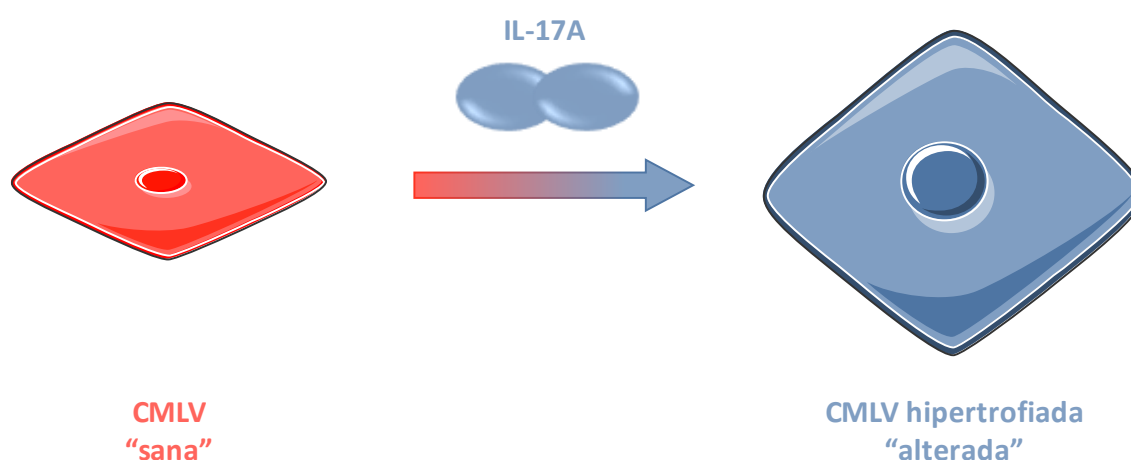


Figura 57. IL-17A promueve el cambio de fenotipo en las CMLVs.

1.3. LA IL-17A INDUCE RIGIDEZ PERO NO FIBROSIS EN LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA.

La rigidez arterial y la acumulación de MEC son factores que pueden contribuir al remodelado vascular y pueden ser la causa o la consecuencia de la hipertensión, siendo este tema aun muy controvertido (Safar *et al.*, 2018). En este trabajo, se ha observado que IL-17A aumenta la rigidez vascular intrínseca (independiente de la geometría del vaso), y esto se ha observado en ausencia de alteraciones en la estructura tridimensional de la elastina y de cambios en los niveles de colágeno, principales componentes de la MEC en las AMRs. La ausencia de un efecto fibrótico de IL-17A se ha confirmado en estudios *in vitro*. Se ha observado que IL-17A no modifica la expresión de genes de factores profibróticos ni de componentes de la MEC, ni induce cambios en la síntesis de fibronectina en CMLVs en cultivo.

Otros autores han evaluado el efecto de la modulación de IL-17A en la fibrosis vascular, aunque con resultados variables. De acuerdo con los datos de esta tesis, en un modelo de estenosis por ligación parcial de arteria carótida, cuya principal característica es el remodelado vascular y el aumento de proteínas de MEC, la delección génica de IL-17A no modifica el porcentaje de estenosis pero reduce el remodelado exterior (Madhur *et al.*, 2011). Además, en un estudio utilizando el modelo de aterosclerosis experimental en ratones deficientes en Apolipoproteína E, la delección adicional de IL-17A, no modificó el área de las placas ateroscleróticas ni los niveles de proteínas de MEC, tales como elastina y colágeno (Madhur *et al.*, 2011). En esta tesis se ha observado que el bloqueo de IL-17A no mejoró la rigidez vascular inducida por la administración sistémica de Ang II en AMRs, al contrario de los resultados descritos previamente en la aorta, donde la delección génica de IL-17A previene de los cambios en la rigidez inducidos por Ang II (Wu *et al.*, 2014). Estas diferencias podrían deberse por la disparidad entre las estrategias de bloqueo utilizadas (delección génica en comparación con anticuerpos neutralizantes) o en el lecho vascular analizado (aorta versus arterias pequeñas). Por otro lado, los niveles circulantes de Ang II pueden inducir rigidez vascular por mecanismos independientes de IL-17A. Entre ellos se ha demostrado la participación de los prostanoideos del eje COX-2/mPGES-1 en la rigidez vascular mediada por Ang II (Avendano *et al.*, 2016, 2018; Martinez-Revelles *et al.*, 2017).

Aunque clásicamente se ha considerado que la rigidez arterial es consecuencia del aumento de MEC, principalmente acumulación de colágeno, recientemente se ha demostrado que también puede ocurrir en ausencia de fibrosis y estar regulada por proteínas que controlan la contractilidad de las CMLVs y las interacciones célula-MEC (Safar *et al.*, 2018). Como se ha comentado anteriormente, la expresión de calponina, una proteína de unión a actina que regula las funciones contráctiles y la estabilización de las fibras de estrés en CMLVs (Belo *et al.*, 2016), disminuye por la acción de IL-17A. Por tanto, los cambios en calponina podrían estar implicados en la rigidez vascular que se ha observado en las AMRs de los ratones infundidos con IL-17A. Apoyando estos resultados en otros modelos de remodelado vascular hipertrófico se han descrito variaciones en la expresión de calponina (Zhang *et al.*, 2018; Blascke de Mello *et al.*, 2019) (figura 58).

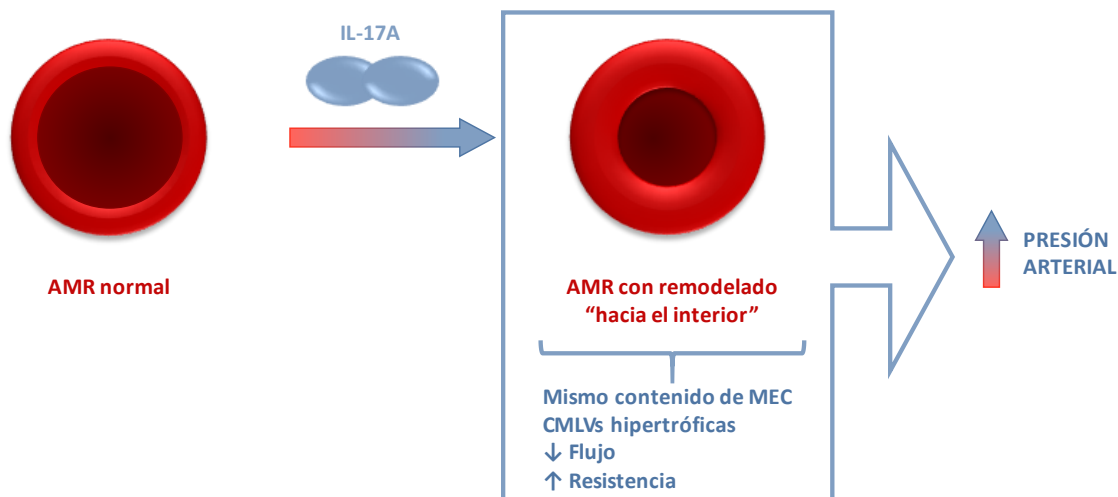


Figura 58. La administración sistémica de IL-17A induce un remodelado hacia el interior de las arterias mesentéricas de resistencia. La figura muestra un mecanismo por el cual la IL-17A estaría contribuyendo al aumento de la tensión arterial.

1.4. LA IL-17A INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL: MECANISMO CLAVE EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO.

Hasta ahora, no existen estudios que demuestren que las células residentes pueden producir IL-17A; sin embargo, muchas células expresan receptores para esta citoquina. Varios estudios *in vitro* han demostrado que en células tubuloepiteliales, CMLVs, células endoteliales y fibroblastos, IL-17A induce la liberación de una serie de mediadores proinflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas tales como IL-6, MCP-1, RANTES, CXCL1 y CXCL8, que promueven el reclutamiento de células T y macrófagos, conduciendo al daño en el órgano diana (Van Kooten *et al.*, 1998; Gaffen, 2009; Pietrowski *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Como se muestra en este trabajo, IL-17A aumenta la expresión génica de MCP-1 en CMLVs. Además, se ha descrito que esta citoquina puede inducir directamente quimiotaxis de monocitos *in vivo* e *in vitro* (Sergejeva y Linden, 2009; Shahrara *et al.*, 2009), contribuyendo, gracias a este mecanismo, a amplificar el reclutamiento de células inmunes a los tejidos dañados.

Los resultados experimentales recogidos en esta tesis, usando un modelo de administración sistémica de IL-17A en ratón, muestran que IL-17A induce la presencia de células infiltrantes inflamatorias en los riñones e incrementa la expresión génica de *Ccl-2* (MCP-1) y *Ccl-5* (RANTES), mediadores asociados al reclutamiento de células inflamatorias en el riñón. Dada la infiltración celular detectada en los riñones de los ratones infundidos con IL-17A, se podría esperar la sobreexpresión de un elevado número de mediadores inflamatorios. Sin embargo, los niveles de ARN mensajero de citoquinas proinflamatorias relevantes, como IL-6 e IL-1 β no cambiaron con la administración sistémica de IL-17A comparado con el grupo control. De forma similar, en el modelo de daño renal inducido por Ang II, estos genes no disminuyeron por el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de IL-17A. Además, los efectos de la neutralización de IL-17A a nivel vascular en este modelo también incluyen la

inhibición de genes proinflamatorios. Los estudios en modelos de aterosclerosis experimental arrojan datos controvertidos sobre los efectos del bloqueo de IL-17A en las diferentes etapas del proceso aterosclerótico (Erbel et al., 2009; Smith et al., 2010; Akhavanpoor et al., 2017). Sin embargo, los estudios realizados en placas de ateroma humana demuestran la presencia de células IL-17A⁺ asociada con un incremento de la inflamación y la vulnerabilidad de la placa (Akhavanpoor et al., 2017). Todos estos datos apoyan el papel de IL-17A en la regulación del proceso inflamatorio en condiciones patológicas, incluyendo el daño en el riñón.

En este trabajo hemos observado que en CMLVs, la estimulación con IL-17A, regula la expresión de MCP-1 sin modificar la expresión de genes profibróticos. Además, en estudios previos en células endoteliales, CMLVs y macrófagos se ha observado que esta citoquina en combinación con otras citoquinas proinflamatorias potencia su efecto proinflamatorio (Erbel *et al.*, 2009). Con respecto a las células renales en cultivo, se conoce desde hace mucho tiempo que la IL-17A aumenta la producción de MCP-1 en células tubuloepiteliales (Van Kooten *et al.*, 1998). MCP-1 es un mediador clave del reclutamiento celular inflamatorio a los riñones, principalmente de monocitos/macrófagos (Jiang *et al.*, 1992), y se ha propuesto como un biomarcador urinario de progresión en ERC (Vianna *et al.*, 2013; Tam y Ong, 2019). De hecho, múltiples estudios preclínicos han demostrado que el bloqueo de MCP-1 es nefroprotector y actualmente se está utilizando en ensayos clínicos para ERC (Haringman *et al.*, 2006; Tesch, 2008; Haller *et al.*, 2016). Nuestros resultados *in vivo* sugieren que MCP-1 es una diana clave de la inflamación renal mediada por IL-17A, puesto que su expresión génica aumenta significativamente tras la administración sistémica de IL-17A, y disminuye al bloquear esta citoquina en ratones infundidos con Ang II. Estos datos sugieren que MCP-1 podría ser un mediador clave de las acciones renales de IL-17A, y apoyan el concepto de IL-17A como una citoquina proinflamatoria implicada en inflamación renal.

1.5. IL-17A Y FIBROSIS RENAL.

Existen evidencias que sugieren que la IL-17A contribuye a la fibrosis en varios órganos, tales como la piel o el hígado, pero los datos en el riñón son controvertidos (Ramani y Biswas, 2019). Los estudios preclínicos bloqueando la citoquina IL-17 o su receptor, o el uso de fármacos que modulan la respuesta Th17, como el micofenolato mofetil, son contradictorios demostrando que se disminuye o agrava la fibrosis renal (Peng *et al.*, 2015). Mehrotra *et al.*, 2017; Ramani *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). En estudios *in vitro* se ha descrito que la IL-17A aumenta la síntesis de MEC en varios cultivos celulares, entre los que se encuentran los fibroblastos de piel (Okamoto *et al.*, 2012). Sin embargo también podría contribuir a la degradación de la MEC al ser capaz de regular metaloproteinasas (MMPs) (Ramani y Biswas, 2019). En células renales no hay apenas estudios, solo se ha descrito que en células túbuloepiteliales la IL-17A induce transición epitelio mesenquimal (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*,

2017), aunque la contribución de este fenómeno a la fibrosis renal *in vivo* es controvertida (Lovisa *et al.*, 2015). En esta tesis se ha observado que el modelo de administración sistémica de IL-17A en ratón no cursa con cambios en los niveles de expresión de genes de factores profibróticos ni de componentes de la MEC, ni se produce acumulación de colágeno en los riñones de los ratones infundidos con IL-17A comparados con los controles. Además, la neutralización de IL-17A no disminuyó la fibrosis renal en el modelo de daño renal inducido por administración de Ang II. Un estudio reciente ha demostrado que en el modelo de daño renal por obstrucción unilateral del uréter el bloqueo de IL-17A, por delección génica del receptor de IL-17, disminuyó el infiltrado de neutrófilos, sin modificar los niveles del infiltrado de macrófagos, pero aumentó la fibrosis renal. Este aumento en la fibrosis renal se asoció a una disminución de la MMP-2, enzima clave en la degradación de colágeno (Ramani *et al.*, 2018), lo que podría explicar el efecto observado en la acumulación de MEC. Los mecanismos implicados en la regulación de las MMPs por IL-17A parecen estar mediados por la activación del sistema calicreína-cinina. Los estudios realizados por el grupo de Ramani, mostraron que la fibrosis renal observada en los ratones deficientes en el receptor de IL17A se inhibió por el tratamiento con bradiquinina, sugiriendo que la activación del sistema calicreína-cinina participa en el control de la expresión de metaloproteinasa-2 (Ramani *et al.*, 2018). Estudios previos sugieren una relación entre IL-17A y el sistema calicreína-cinina en el riñón (Ramani *et al.*, 2016). En esta tesis se ha demostrado que la infusión sistémica de IL-17A aumenta la expresión génica y proteica de calicreína-1 renal y el infiltrado de neutrófilos, sin inducir fibrosis renal. Basado en todas estas observaciones la IL-17A a través de la activación del sistema calicreína-cinina, podría regular las MMPs, como MMP-2, que participan en la degradación de la MEC, y este mecanismo podría ser responsable de la ausencia de fibrosis renal, a pesar de inducir inflamación sostenida (figura 59). Futuros estudios evaluando la actividad local de diferentes MMPs son necesarios para confirmar esta hipótesis.

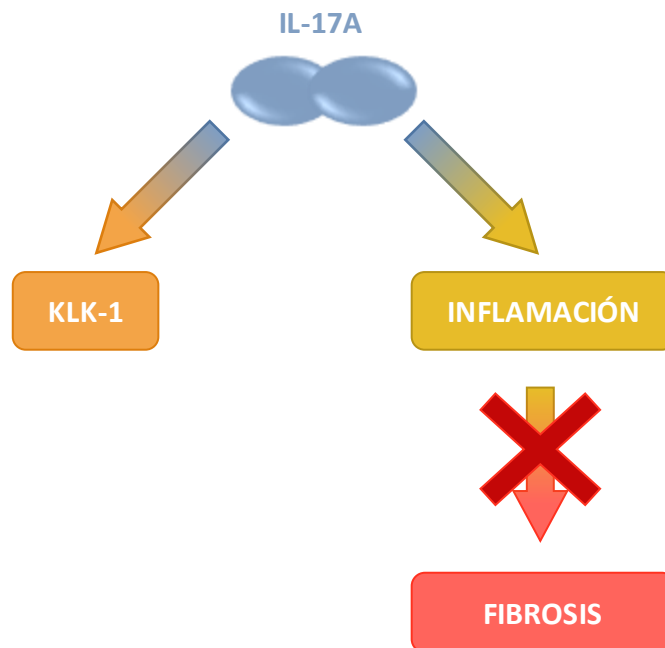


Figura 59. La administración sistémica de IL17A induce la expresión de caliceína-1 (KLK-1) y activa un proceso inflamatorio sin producir una respuesta fibrótica.

1.6. OTROS POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA ACTIVADOS POR IL-17A.

Varios estudios preclínicos, incluyendo datos presentados en esta tesis, describen la participación de la IL-17A en la elevación de la presión sanguínea (Nguyen *et al.*, 2013; Karch *et al.*, 2014) y sugieren que esta citoquina podría regular varios mecanismos implicados en la regulación de la presión sanguínea. En un modelo de hipertensión que combina DOCA-sal y Ang II, una deficiencia en el eje IL-17/IL-23 no modifica la hipertensión (Krebs *et al.*, 2014). Además, la deficiencia en IL-17A no regula el incremento inicial en la presión sanguínea inducido por la infusión de Ang II a las 2 semanas, pero mejora significativamente la hipertensión sostenida observada a las 4 semanas (Madhur *et al.*, 2010). La presión sanguínea es un proceso complejo en el que pueden participar otros sistemas y órganos como dianas de las acciones de IL-17A, entre los que se encuentran el riñón (Krebs *et al.*, 2014; Norlander *et al.*, 2016). Los datos recogidos en este trabajo sugieren que el remodelado vascular de las AMRs podría ser un mecanismo adicional implicado en la regulación de la presión sanguínea por IL-17A.

Existen diferentes mecanismos implicados en el control de la presión arterial. La mayoría de los trabajos enfocados en estudiar estos mecanismos se han centrado en las respuestas vasculares. Un estudio realizado en un ratón deficiente en IL-17A ha demostrado que la administración de Ang II no provocó un aumento de la presión arterial, no produjo cambios en la vasodilatación dependiente de endotelio y en la contracción por fenilefrina, y la producción de superóxido disminuyó, con respecto a los ratones de fenotipo salvaje (Madhur *et al.*, 2010). Un trabajo posterior demostró que el tratamiento

con IL-17A en ratones incrementó la presión arterial, aumentando la expresión de RhoA y regulando las respuestas dependientes óxido nítrico, en comparación con ratones sin el tratamiento (Nguyen *et al.*, 2013).

El sistema calicreína-cinina regula la presión arterial induciendo vasodilatación (Hillmeister y Persson, 2012). Sin embargo, hemos observado que la infusión de IL-17A indujo un aumento de calicreína-1, localizado en células tubuloepiteliales, por lo que este sistema no parece estar implicado en los efectos de IL-17A en la tensión arterial, puesto que lo esperable sería el efecto contrario. Otros posibles mecanismos implicados en la regulación de la presión sanguínea actúan a nivel renal. En un modelo de administración sistémica de Ang II en un ratón deficiente en IL-17A, se observó que la inyección intraperitoneal de salino no produce cambios en la diuresis y natriuresis con respecto a los ratones sin infusión de Ang II (Kamat *et al.*, 2015). En línea con este trabajo, estos autores demostraron que la deficiencia de IL-17A suprime la activación de los transportadores de túbulo distal, en concreto el cotransportador sodio-potasio y el canal epitelial de sodio y mejora el daño renal inducido por Ang II con respecto a los ratones de fenotipo salvaje (Norlander *et al.*, 2016). Todos estos datos demuestran que IL-17A regula la presión arterial por mecanismos complejos que actúan en diferentes tejidos y sistemas.

1.7. PRESENCIA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-17A EN EL RIÑÓN DE PACIENTES CON NEFROPATÍA HIPERTENSIVA Y EN MODELOS EXPERIMENTALES DE HIPERTENSIÓN

Estudios experimentales previos han demostrado que los linfocitos T y las citoquinas producidas por estas células participan en la patogenia de la hipertensión (McMaster *et al.*, 2015). En concreto, se han encontrado células que expresan IL-17A en los tejidos dañados por hipertensión, incluyendo el sistema cardiovascular y los riñones (Madhur *et al.*, 2010; McMaster *et al.*, 2015; Saleh, Norlander y Madhur, 2016). En ratones infundidos con Ang II se ha descrito la presencia de linfocitos T infiltrantes en la adventicia y en la grasa periadventicial de la aorta, colocalizando con una inmunotinción positiva para IL-17A (Madhur *et al.*, 2010). Estudios posteriores identificaron los linfocitos Th17 y de la estirpe T- $\gamma\delta$ como células productoras de IL-17A en los riñones y aortas de ratones infundidos con Ang II (Saleh, Norlander y Madhur, 2016). En esta tesis, se han identificado por primera vez células productoras de IL-17A, incluidos linfocitos Th17 (CD4+/IL-17A+) y linfocitos $\gamma\delta$, en el riñón hipertensos humano, estudiando biopsias de pacientes con nefroesclerosis hipertensiva.

Estudios preclínicos previos han descrito que los linfocitos T- $\gamma\delta$ son los principales productores de IL-17A en el corazón de ratones infundidos con Ang II (Li *et al.*, 2014). Estos linfocitos son células T no convencionales que reconocen muchos microorganismos, transforman células huésped y actúan como

la primera línea de defensa en tejidos periféricos (Shiromizu y Jancic, 2018; Higaki *et al.*, 2019). La IL-17A producida por estas células participa en la inmunidad antifúngica en respuesta a la infección por *Candida Albicans* (Fenoglio *et al.*, 2009) y en las etapas iniciales de las patologías autoinmunes (Hirata *et al.*, 2011). Las células T- $\gamma\delta$ productoras de IL-17A se generan en la periferia y pueden ser reclutadas y acumuladas en tejidos dañados como la piel contribuyendo a la inflamación sostenida en psoriasis (Shiromizu y Jancic, 2018). La observación de la presencia de linfocitos $\gamma\delta$ expresan IL-17A en el riñón de pacientes hipertensos, sugieren la posibilidad de un nuevo abordaje terapéutico basado en la inhibición de estas células frente al daño tisular asociado a hipertensión. En conjunto estos resultados sugieren la participación de la IL-17A la patogenia del daño renal asociado a hipertensión en humanos.

2. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 EN LA DIABETES

Varios estudios experimentales han sugerido que IL-17A podría estar implicada en el daño del órgano diana asociado a diabetes. Los primeros estudios experimentales se realizaron en ratones transgénicos para el receptor de células T BDC2-5 (denominados NOD), un modelo espontáneo de diabetes de tipo 1 sin obesidad, donde se observó que estos ratones presentan los niveles séricos de IL-17A elevados, un aumento en el número de células Th17 productoras de IL-17A y de células Th1 productoras de IFN- γ en el páncreas, comparado con sus correspondientes controles. Este estudio sugiere un posible mecanismo por el cual las células Th17 pueden contribuir a la diabetes de tipo 1 (Li, Mueller y Bradley, 2014). Estudios *ex vivo* realizados con linfocitos T CD4⁺ de estos ratones mostraron que estas células son capaces de diferenciarse al subtipo Th17 en presencia de las citoquinas IL-23 e IL-6, claves en este proceso de diferenciación celular. Además, cuando estas células Th17 se transferían a ratones NOD jóvenes causaban diabetes de tipo 1 (Bellemore *et al.*, 2015). En otro estudio posterior, se aislaron células Th17 que expresan IL-22 del páncreas de ratones diabéticos NOD y se demostró que esta citoquina podría tener un papel protector en la diabetes (Bellemore *et al.*, 2016).

La disregulación de las células Th17 y de células productoras de IL-17A se han implicado en otras complicaciones relacionadas con la diabetes. Existen numerosas evidencias que sugieren un papel importante del eje Th17/IL-17A en retinopatía diabética. Los niveles de IL-17A en fluido vitreo están elevados en pacientes con retinopatía diabética proliferativa (Takeuchi *et al.*, 2015). Sin embargo, no se encontraron niveles circulantes de IL-17A elevados o células inmunes activadas circulantes (Takeuchi *et al.*, 2015; Xu, Cai y Zhang, 2015; Chen *et al.*, 2016; Qiu, Liu y Wang, 2017), sugiriendo una activación local de la respuesta inmune Th17 implicada en el daño en el tejido diana en vez de una respuesta sistémica. El bloqueo de IL-17A por inyecciones intravitreales con anticuerpos monoclonales contra IL-17A o su receptor en retinopatía diabética mejora la progresión de la enfermedad por deterioro de la función de las células de Müller de la retina (Qiu, Liu y Wang, 2017). En un modelo de rata de

retinopatía diabética inducida por STZ, la inyección local de un anticuerpo contra IL-23 mejora la estructura de la barrera sangre-retina (Xu, Cai y Zhang, 2015).

2.1. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA Th17 EN LA NEFROPATIA DIABETICA EXPERIMENTAL Y HUMANA.

Diversos trabajos experimentales realizados en modelos de diabetes experimental han demostrado la activación de la respuesta inmune Th17, como el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y en diabetes autoinmune en ratones NOD (Emamaullee *et al.*, 2009; Kuriya *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015). En esta tesis, se ha descrito una activación local de la respuesta inmune Th17 en los ratones BTBR ob/ob incluyendo la producción de IL-17A, y la activación de los factores claves en la diferenciación de linfocitos CD4 a Th17, Stat-3 y ROR γ t en riñones diabéticos, y su asociación con la presencia de células infiltrantes inflamatorias.

Los estudios realizados hasta la fecha en pacientes con ND se han centrado en la evaluación de los niveles circulantes o en orina de IL-17A, no existiendo estudios en tejido renal. Además, los datos disponibles varían en función de la etapa de enfermedad renal que tengan los pacientes y sus complicaciones asociadas (Ryba-Stanislawowska *et al.*, 2013; Baharlou *et al.*, 2016; Marwaha *et al.*, 2017). En biopsias renales de pacientes con ND se describió la activación local de vías inflamatorias, en particular de la activación de NF- κ B unida al incremento de factores proinflamatorios como la quimioquina MCP-1 (Mezzano *et al.*, 2003), actualmente considerado como un biomarcador potencial de ND (Barutta *et al.*, 2015). Desde entonces, el papel de la inflamación en ND se ha demostrado en numerosos estudios experimentales y clínicos de intervención. En esta tesis, el análisis de las biopsias de pacientes con ND mostró la presencia de células que expresan IL-17A, identificadas como linfocitos Th17 CD4⁺ y linfocitos $\gamma\delta$, sugiriendo que esta citoquina podría jugar un papel importante en la patogénesis del daño renal asociado a diabetes.

2.2. EL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DE LA IL-17A MEJORA EL DAÑO RENAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES.

El bloqueo del eje Th17/IL-17A se ha sugerido como un tratamiento terapéutico prometedor para enfermedades inflamatorias renales. El efecto beneficioso del bloqueo de IL-17A se ha descrito en varios modelos experimentales de daño renal inmune y no-inmune (Xue *et al.*, 2011; Rodrigues-Diez *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015; Ramani *et al.*, 2016). En esta tesis, como se comenta anteriormente, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de IL-17A en el modelo de daño renal por administración de Ang II disminuye la respuesta inflamatoria renal. Sin embargo, actualmente existe cierta controversia acerca del papel de IL-17A en la diabetes experimental. El tratamiento de los ratones NOD con un agonista inverso selectivo de ROR α y γ t, que son los receptores nucleares que controlan la diferenciación de las células Th17, reduce significativamente la incidencia de diabetes, la insulinitis y la expresión de citoquinas proinflamatorias (Solt *et al.*, 2015), mostrando que el bloqueo de la diferenciación Th17 mejora la diabetes experimental. Además, el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de IL-17A en ratones NOD previno la diabetes (Emamaullee *et al.*, 2009). Más recientemente, el papel de IL-17A en el desarrollo de insulinitis se ha confirmado usando un ratón NOD deficiente para la IL-17A y el receptor de IFN- γ (Kuriya *et al.*, 2013). Otro trabajo ha demostrado que en ratones deficientes para IL-17A al inducir diabetes por administración de STZ, la hiperglicemia y la insulinitis fueron más leves que lo observado en los ratones de fenotipo salvaje (Tong *et al.*, 2015). Por el contrario, en un estudio realizado en ratones deficientes para IL-17A con diabetes inducida por STZ, las lesiones renales fueron más severas que en los ratones de fenotipo salvaje (Mohamed *et al.*, 2016). Además, este mismo grupo ha observado que la administración de bajas dosis de IL-17A recombinante en ratones Ins2Akita, un modelo para estudiar la diabetes de tipo 1 dependiente de insulina, reduce la albuminuria y las lesiones renales (Mohamed *et al.*, 2016). Este trabajo contradice los resultados previos en otros modelos de daño tisular causado por diabetes, pero presentan similitudes a la controversia actual sobre la IL-17A en el tema de aterosclerosis (Liuzzo, Trotta y Pedicino, 2013).

Los estudios preclínicos en diabetes experimental han demostrado que algunos tratamientos actúan regulando la respuesta Th17. El micofenolato mofetil atenúa el daño renal inducido por diabetes por STZ, suprimiendo la proliferación celular de linfocitos T y disminuyendo el número de células CD4⁺/IL-17A⁺ en el riñón (Kim *et al.*, 2015). Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) mejoran la función de las células beta y atenúa la autoinmunidad en modelos murinos de diabetes de tipo 1 (Perez-Gomez *et al.*, 2016). En células mononucleares periféricas sanguíneas humanas, el antagonista de DPP-4 sitagliptina reduce la proliferación celular y modula la diferenciación linfocítica hacia un fenotipo T regulador con alta secreción de TGF- β y una menor expresión génica de IL-17A (Pinheiro

et al., 2017). Todo estos datos sugieren que el bloqueo de la respuesta Th17 podría mejorar el daño renal en la ND.

La falta de un modelo experimental para replicar las características clave de la ND humana ha obstaculizado los esfuerzos para investigar tratamientos terapéuticos nuevos para esta enfermedad. Entre los diferentes modelos preclínicos de ND disponibles, el ratón BTBR ob/ob deficiente en leptina se ha descrito como un modelo animal robusto y progresivo que imita las características clave de los pacientes con ND avanzada (Hudkins *et al.*, 2010; Alpers y Hudkins, 2011). En esta tesis se ha demostrado que en un modelo experimental de nefropatía diabética en ratones BTBR ob/ob (con deficiencia en el gen de la leptina), que es el modelo que presenta mayor similitud con las lesiones renales en pacientes con ND, utilizando un tratamiento terapéutico con un anticuerpo neutralizante de IL-17A, administrado al comienzo del daño renal de forma similar a lo realizado en la práctica clínica, mejoró la función renal y retardó la progresión de la enfermedad (figura 60).

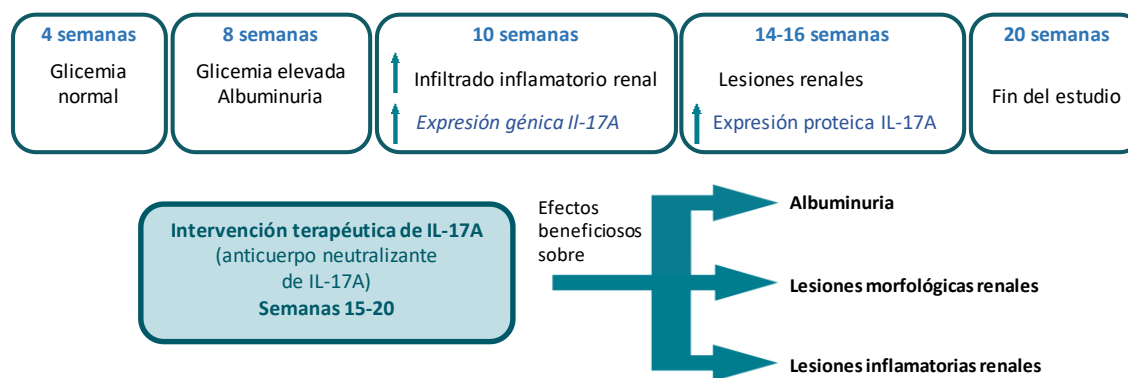


Figura 60. Esquema temporal de los resultados obtenidos en el modelo BTBR ob/ob con el tratamiento con el anticuerpo neutralizante de IL-17A.

Muchos estudios han investigado los mecanismos moleculares suscitados por IL-17A. La mayoría de ellos han sido enfocados en las respuestas inflamatorias de IL-17A, mostrando su implicación en la producción de las especies reactivas de oxígeno, la regulación de óxido nítrico, la activación de las cascadas de NF- κ B y las MAP quinasas y la expresión de moléculas de adhesión (Pietrowski *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Karbach *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). En esta tesis, el estudio de estos mecanismos activados por IL-17A en riñón se han extendido a la regulación de las vías Smad y Akt. Además, los efectos beneficiosos de la neutralización de IL-17A en el modelo experimental de ND en ratones BTBR ob/ob mas destacados fueron la disminución de la inflamación renal, proceso este último regulado por la inhibición de la vía NF- κ B y de factores proinflamatorios, como MCP-1. Estudios preclínicos han observado que el bloqueo de citoquinas y quimioquinas, incluyendo MCP-1 y TLR-4, mejoró el daño experimental en el riñón debido a la diabetes

(Kanamori *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2012). Todos estos resultados apoyando la idea de que las terapias anti-inflamatorias podrían ser una opción viable para el tratamiento de la ND.

La hipótesis demostrada en este trabajo es que, en condiciones de hipertensión y diabetes, el aumento de la producción renal de IL-17A, expresada por células infiltrantes de la respuesta inmune, puede activar a las células residentes renales induciendo la producción de mediadores proinflamatorios adicionales, como MCP-1, que podrían contribuir al reclutamiento de células inflamatorias en el riñón, amplificando así la respuesta inflamatoria (figura 61), y a través de este mecanismo participar en la progresión del daño renal.

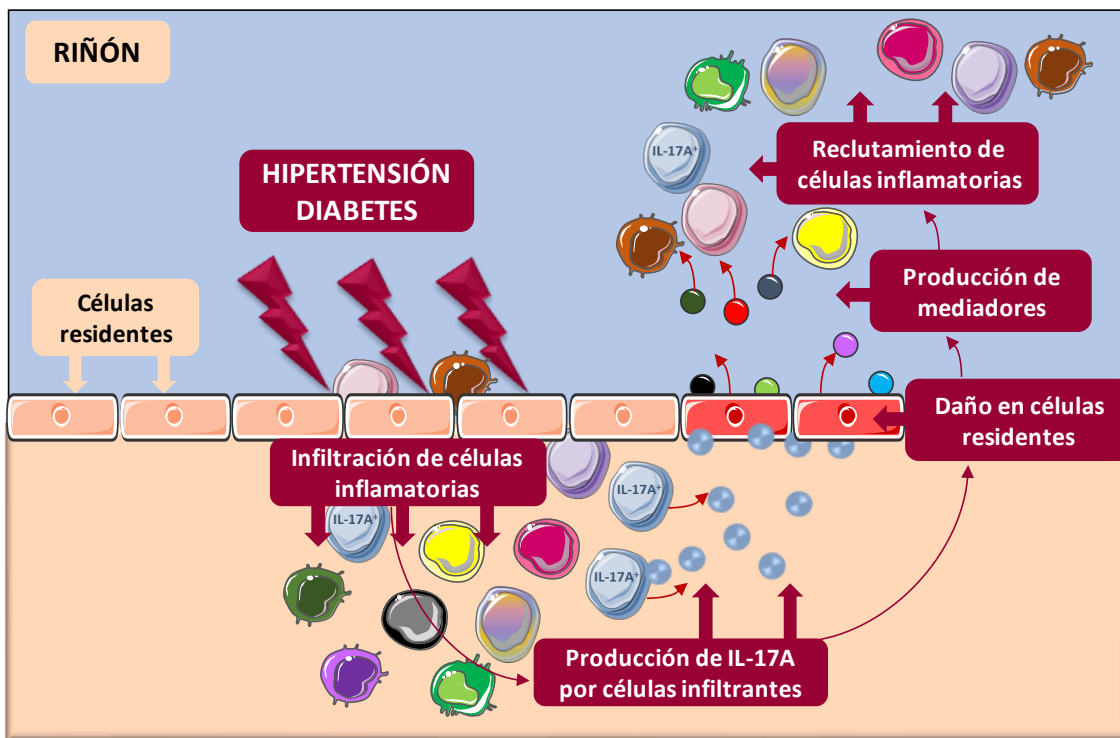


Figura 61. Respuesta generada por la citoquina IL-17A en condiciones de daño por hipertensión y diabetes.

3. PERSPECTIVAS

A pesar de la multitud de estudios experimentales y clínicos realizados en el campo de la ND, los tratamientos disponibles actualmente no pueden prevenir el desarrollo y la progresión de la enfermedad. Las estrategias terapéuticas utilizadas en pacientes con ND, tales como el control estricto de los niveles de glucosa y la presión sanguínea, así como el bloqueo del SRAA, ralentizan sin proteger completamente la progresión del daño renal. Los tratamientos más novedosos para la ND se basan en estrategias anti-inflamatorias. Además, la importancia de las citoquinas proinflamatorias en el desarrollo de la enfermedad renal terminal en diabetes ha sido demostrada recientemente (Niewczas *et al.*, 2019). El efecto beneficioso del tratamiento con anticuerpos neutralizantes IL-17A en el modelo experimental de nefropatía diabética en ratones BTBR ob/ob y de administración de Ang II, sugiere que

el bloqueo de IL-17A podría ser considerado como una aproximación potencial para prevenir la inflamación renal inducida por hipertensión y la diabetes. La presencia de células que expresan IL-17A en el riñón de pacientes con nefroesclerosis hipertensiva y con nefropatía diabética apoyan la translación clínica de los hallazgos experimentales de esta tesis, Actualmente, los bloqueantes de IL-17A se están testando en enfermedades inflamatorias crónicas, como la enfermedad de Crohn (NCT00936585), espondiloartritis (NCT03358134) y psoriasis (NCT03403036). Estos resultados apoyan la realización de futuros ensayos clínicos en ND u otras ERC o patologías asociadas a hipertensión con el fin de mejorar las opciones terapéuticas actuales disponibles en estos pacientes.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La infusión sistémica de IL-17A en ratón aumentó la presión arterial, causó cambios estructurales en las arterias mesentéricas de resistencia asociados a la inducción de hipertrofia vascular, e indujo inflamación renal. Estas alteraciones disminuyeron al neutralizar esta citoquina en un modelo de hipertensión inducido por la administración sistémica de Angiotensina II.
2. En biopsias renales de pacientes diagnosticados con nefropatía hipertensiva y diabética se detectaron células productoras de IL-17A.
3. En ratones diabéticos BTBR ob/ob, se observó una activación de la respuesta inmune Th17 en el riñón. El tratamiento terapéutico con anticuerpos neutralizantes de IL-17A en estos ratones diabéticos, mejoró la proteinuria y disminuyó las lesiones renales.

Aunque hacen falta más estudios sobre la respuesta Th17 y su citoquina efectora IL-17A, nuestros resultados experimentales indican que la activación de esta respuesta inmune participa en la patogenia del daño vascular y renal asociado a hipertensión y diabetes, y sugieren que puede ser una buena diana terapéutica en estos pacientes.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, S. G. *et al.* (2010) «Phase 1 study of anti-CTGF monoclonal antibody in patients with diabetes and microalbuminuria», *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(8), pp. 1420-1428. doi: 10.2215/CJN.09321209.
- Aggarwal, S. y Gurney, A. L. (2002) «IL-17: prototype member of an emerging cytokine family.», *Journal of leukocyte biology*. United States, 71(1), pp. 1-8.
- Ahmad, A. *et al.* (2018) «Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems.», *International journal of molecular sciences*. Switzerland, 19(9). doi: 10.3390/ijms19092605.
- Alicic, R. Z., Rooney, M. T. y Tuttle, K. R. (2017) «Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities», *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(12), pp. 2032-2045. doi: 10.2215/CJN.11491116.
- Alicic, R. Z. y Tuttle, K. R. (2014) «Novel Therapies for Diabetic Kidney Disease», *Advances in Chronic Kidney Disease*. Elsevier, 21(2), pp. 121-133. doi: 10.1053/j.ackd.2014.01.007.
- Alpers, C. E. y Hudkins, K. L. (2011) «Mouse models of diabetic nephropathy.», *Current opinion in nephrology and hypertension*. England, 20(3), pp. 278-284. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283451901.
- Ames, M. K., Atkins, C. E. y Pitt, B. (2019) «The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression», *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), pp. 363-382. doi: 10.1111/jvim.15454.
- Aréstegui, A. H. (2008) «SÍNDROME CARDIORENAL», *Revista Peruana de Cardiología*, 191.
- Avendano, M. S. *et al.* (2016) «Role of COX-2-derived PGE2 on vascular stiffness and function in hypertension.», *British journal of pharmacology*. England, 173(9), pp. 1541-1555. doi: 10.1111/bph.13457.
- Avendano, M. S. *et al.* (2018) «mPGES-1 (Microsomal Prostaglandin E Synthase-1) Mediates Vascular Dysfunction in Hypertension Through Oxidative Stress.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 72(2), pp. 492-502. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10833.
- Baharlou, R. *et al.* (2016) «Elevated Levels of T-helper 17-associated Cytokines in Diabetes Type I Patients: Indicators for Following the Course of Disease.», *Immunological investigations*. England, 45(7), pp. 641-651. doi: 10.1080/08820139.2016.1197243.

Barbaro, N. R. y Harrison, D. G. (2019) «Markers or Makers: Inflammatory Cytokines in Treatment-Resistant Hypertension», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, pp. 767-769. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12604.

Barutta, F. *et al.* (2015) «Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment», *Endocrine*, 48(3), pp. 730-742. doi: 10.1007/s12020-014-0437-1.

Bellefleur, S. M. *et al.* (2015) «Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice.», *Clinical and experimental immunology*. England, 182(3), pp. 261-269. doi: 10.1111/cei.12691.

Bellefleur, S. M. *et al.* (2016) «Pathogenic T helper type 17 cells contribute to type 1 diabetes independently of interleukin-22.», *Clinical and experimental immunology*. England, 183(3), pp. 380-388. doi: 10.1111/cei.12735.

Bello AK, Levin A, Lunney M, Osman MA, Ye F, Ashuntantang G, Bellorin-Font E *et al.* (2019) «Global Kidney Health Atlas: A report by the International Society of Nephrology on the Global Burden of End-stage Kidney Disease and Capacity for Kidney Replacement Therapy and Conservative Care across World Countries and Regions.», 23(3), p. 2019.

Belo, V. de A. *et al.* (2016) «Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension.», *Biochemical pharmacology*. England, 118, pp. 50-58. doi: 10.1016/j.bcp.2016.08.012.

Berger, M. *et al.* (2019) «Renal and vascular effects of kallikrein inhibition in a model of Lonomia obliqua venom-induced acute kidney injury.», *PLoS neglected tropical diseases*. United States, 13(2), p. e0007197. doi: 10.1371/journal.pntd.0007197.

Berlinger, A., Noack, M. y Miossec, P. (2016) «IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting», *Trends in Molecular Medicine*, 22(3), pp. 230-241. doi: 10.1016/j.molmed.2016.01.001.

Blascke de Mello, M. M. *et al.* (2019) «Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension», *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc, 116, pp. 36-44. doi: 10.1016/j.vph.2018.10.002.

Bright, R. (1836) «Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albumin», *Guy's Hospital Reports*. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60595-4.

Briones, A. M. *et al.* (2003) «Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling.», *The Journal of physiology*. England, 552(Pt 1), pp. 185-195. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046904.

Brown, I. A. M. *et al.* (2018) «Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(9), pp. 1969-1985. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229.

Carretero, O. A. (2005) «Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system.», *The Journal of clinical investigation*. United States, 115(3), pp. 588-591. doi: 10.1172/JCI24567.

Chan, C. T. *et al.* (2015) «Obligatory Role for B Cells in the Development of Angiotensin II-Dependent Hypertension.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 66(5), pp. 1023-1033. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05779.

Chang, S. H. y Dong, C. (2009) «IL-17F: Regulation, signaling and function in inflammation», *Cytokine*. Elsevier Ltd, 46(1), pp. 7-11. doi: 10.1016/j.cyto.2008.12.024.

Chehimi, M., Vidal, H. y Eljaafari, A. (2017) «Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases», *Journal of Clinical Medicine*, 6(7), p. 68. doi: 10.3390/jcm6070068.

Chen, H. *et al.* (2016) «Th17 cell frequency and IL-17A concentrations in peripheral blood mononuclear cells and vitreous fluid from patients with diabetic retinopathy.», *The Journal of international medical research*. England, 44(6), pp. 1403-1413. doi: 10.1177/0300060516672369.

Chen, J. *et al.* (2019) «Inflammation and Apparent Treatment-Resistant Hypertension in Patients With Chronic Kidney Disease.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 73(4), pp. 785-793. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12358.

Chen, Y. M. *et al.* (2004) «Pentoxifylline suppresses renal tumour necrosis factor- α and ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in rats», *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(5), pp. 1106-1115. doi: 10.1093/ndt/gfh127.

Chitnis, T. (2007) «The Role of CD4 T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis», *International Review of Neurobiology*, 79(07), pp. 43-72. doi: 10.1016/S0074-7742(07)79003-7.

Chow, F. Y. *et al.* (2006) «Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice.», *Kidney international*. United States, 69(1), pp. 73-80. doi: 10.1038/sj.ki.5000014.

Clausen, P. *et al.* (2000) «Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy.», *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. England, 17(9), pp. 644-649. doi: 10.1046/j.1464-5491.2000.00347.x.

Coffman, T. M. (2011) «Under pressure: The search for the essential mechanisms of hypertension», *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 17(11), pp. 1402-1409. doi: 10.1038/nm.2541.

Cooke, J. P. (2019) «Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair.», *Circulation research*. United States, 124(8), pp. 1166-1168. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314669.

Cortvrindt, C. *et al.* (2017) «The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases», *Pathology*, 49(3), pp. 247-258. doi: 10.1016/j.pathol.2017.01.003.

Crispín, J. C. *et al.* (2008) «Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys», *The Journal of Immunology*, 181(12), pp. 8761-8766. doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8761.

Dalekos, G. N. *et al.* (1997) «Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients?», *The Journal of laboratory and clinical medicine*. United States, 129(3), pp. 300-308.

Dong, X. *et al.* (2008) «Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction», *Kidney international*. 2008/08/13, 74(10), pp. 1294-1309. doi: 10.1038/ki.2008.394.

Dupage, M. y Bluestone, J. A. (2016) «Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease», *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(3), pp. 149-163. doi: 10.1038/nri.2015.18.

Eid, R. E. *et al.* (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*. United States, 119(10), pp. 1424-1432. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827618.

Emamullee, J. A. *et al.* (2009) «Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice», *Diabetes*, 58(6), pp. 1302-1311. doi: 10.2337/db08-1113.

Erbel, C. *et al.* (2009) «Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice», *The Journal of Immunology*, 183(12), pp. 8167-8175. doi: 10.4049/jimmunol.0901126.

Fenoglio, D. *et al.* (2009) «Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*.», *Blood*. United States, 113(26), pp. 6611-6618. doi: 10.1182/blood-2009-01-198028.

Fioretto, P. y Mauer, M. (2007) «Histopathology of Diabetic Nephropathy», 27(2), pp. 195-207. doi: 10.1016/j.semnephrol.2007.01.012.

Flack, J. M. *et al.* (2003) «Prevention of Hypertension and Its Complications: Theoretical Basis and Guidelines for Treatment», *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(suppl 2), p. S92 LP-S98. doi: 10.1097/01.ASN.0000070142.14843.8E.

Fossiez, F. *et al.* (1996) «T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.», *The Journal of Experimental Medicine*, 183(6), pp. 2593 LP - 2603. doi: 10.1084/jem.183.6.2593.

Gaffen, S. L. (2009) «Structure and signalling in the IL-17 receptor family.», *Nature reviews. Immunology*. England, 9(8), pp. 556-567. doi: 10.1038/nri2586.

Gibbons, G. H. y Dzau, V. J. (1994) «The emerging concept of vascular remodeling.», *The New England journal of medicine*. United States, 330(20), pp. 1431-1438. doi: 10.1056/NEJM199405193302008.

Gomez-Garre, D. *et al.* (1996) «Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 27(4), pp. 885-892. doi: 10.1161/01.hyp.27.4.885.

Gong, F. *et al.* (2015) «The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis.», *Cellular immunology*. Netherlands, 297(1), pp. 33-39. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.05.007.

Gorostidi, M. *et al.* (2018) «Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular», *Nefrología*, 38(6), pp. 606-615. doi: 10.1016/j.nefro.2018.04.004.

Guzik, T. J. *et al.* (2007) «Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction», *Journal of Experimental Medicine*, 204(10), pp. 2449-2460. doi: 10.1084/jem.20070657.

Guzik, T. J. y Touyz, R. M. (2017) «Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 70(4), pp. 660-667. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.

Haller, H. *et al.* (2016) «Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney.», *Current opinion in nephrology and hypertension*. England, 25(1), pp. 42-49. doi: 10.1097/MNH.0000000000000186.

Hao, H., Gabbiani, G. y Bochaton-Piallat, M.-L. (2003) «Arterial Smooth Muscle Cell Heterogeneity», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(9), pp. 1510-1520. doi: 10.1161/01.atv.0000090130.85752.ed.

Hao, H., Gabbiani, G. y Bochaton-Piallat, M. L. (2003) «Arterial smooth muscle cell heterogeneity: Implications for atherosclerosis and restenosis development», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(9), pp. 1510-1520. doi: 10.1161/01.ATV.0000090130.85752.ED.

Haringman, J. J. *et al.* (2006) «A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis.», *Arthritis and rheumatism*. United States, 54(8), pp. 2387-2392. doi: 10.1002/art.21975.

Hart, P. D. y Bakris, G. L. (2010) «Hypertensive nephropathy: Prevention and treatment recommendations», *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(16), pp. 2675-2686. doi: 10.1517/14656566.2010.485612.

Hernandez-Presa, M. *et al.* (1997) «Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis.», *Circulation*. United States, 95(6), pp. 1532-1541. doi: 10.1161/01.cir.95.6.1532.

Hetta, H. F. *et al.* (2017) «Serum Level of IL17a among Cirrhotic Hepatitis C Virus Infected Patients with Incidence of Diabetes Mellitus.», *The Egyptian journal of immunology*. Egypt, 24(1), pp. 79-88.

Higaki, A. *et al.* (2019) «Innate and Innate-Like Immune System in Hypertension and Vascular Injury.», *Current hypertension reports*. United States, 21(1), p. 4. doi: 10.1007/s11906-019-0907-1.

Hill, G. S. (2008) «Hypertensive nephrosclerosis».

Hillmeister, P. y Persson, P. B. (2012) «The Kallikrein-Kinin system», *Acta Physiologica*, 206(4), pp. 215-219. doi: 10.1111/apha.12007.

- Hirata, T. *et al.* (2011) «Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis.», *Fertility and sterility*. United States, 96(1), pp. 113-117. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.060.
- Hoch, N. E. *et al.* (2009) «Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II», *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 296(2), pp. 208-216. doi: 10.1152/ajpregu.90521.2008.
- Hudkins, K. L. *et al.* (2010) «BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(9), pp. 1533-1542. doi: 10.1681/ASN.2009121290.
- Hunemorder, S. *et al.* (2015) «TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis.», *The Journal of pathology*. England, 237(1), pp. 62-71. doi: 10.1002/path.4559.
- Ichiyama, K. *et al.* (2008) «Foxp3 inhibits ROR γ -mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ .», *The Journal of biological chemistry*. United States, 283(25), pp. 17003-17008. doi: 10.1074/jbc.M801286200.
- Imig, J. D. y Ryan, M. J. (2013) «Immune and inflammatory role in renal disease», *Comprehensive Physiology*, 3(2), pp. 957-976. doi: 10.1002/cphy.c120028.
- Intengan, H. D. y Schiffrin, E. L. (2001) «Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 38(3 Pt 2), pp. 581-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566935>.
- Ishii, H. *et al.* (1996) «Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor», *Science*, 272(5262), pp. 728-731. doi: 10.1126/science.272.5262.728.
- Itani, H. A. *et al.* (2016) «Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans», *Hypertension*, 68(1), pp. 123-132. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07237.
- Iyoda, M. *et al.* (2010) «IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: Synergy with TNF- α and IL-1 β », *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 298(3), pp. 779-787. doi: 10.1152/ajprenal.00198.2009.
- Jetten, A. M. (2009) «Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism.», *Nuclear receptor signaling*, 7. doi: 10.1621/nrs.07003.

Jha, V. *et al.* (2013) «Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives», *The Lancet*. Elsevier Ltd, 382(9888), pp. 260-272. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.

Jiang, Y. *et al.* (1992) «Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 148(8), pp. 2423-2428.

Jun, M. (2013) «Antioxidants for chronic kidney disease», *Nephrology*, 18(8), pp. 576-578. doi: 10.1111/nep.12103.

Kalantarinia, K., Awad, A. S. y Siragy, H. M. (2003) «Urinary and renal interstitial concentrations of TNF-alpha increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats.», *Kidney international*. United States, 64(4), pp. 1208-1213. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00237.x.

Kamat, N. V. *et al.* (2015) «Renal transporter activation during angiotensin-II hypertension is blunted in interferon- γ -/- and interleukin-17A-/- mice», *Hypertension*, 65(3), pp. 569-576. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04975.

Kanamori, H. *et al.* (2007) «Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy.», *Biochemical and biophysical research communications*. United States, 360(4), pp. 772-777. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.148.

Karbach, S. *et al.* (2014) «Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(12), pp. 2658-2668. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304108.

Kato, M. y Natarajan, R. (2019) «Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory», *Nature Reviews Nephrology*. Springer US. doi: 10.1038/s41581-019-0135-6.

Keith, D. S. *et al.* (2004) «Longitudinal Follow-up and Outcomes among a Population with Chronic Kidney Disease in a Large Managed Care Organization», *Archives of Internal Medicine*, 164(6), pp. 659-663. doi: 10.1001/archinte.164.6.659.

Keri, K. C. *et al.* (2018) «Diabetic nephropathy : newer therapeutic perspectives Diabetic nephropathy : newer therapeutic perspectives», *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. Taylor & Francis, 8(4), pp. 200-207. doi: 10.1080/20009666.2018.1500423.

Kim, K. M. *et al.* (2019) «Impact of chronic kidney disease on mortality: A nationwide cohort study.», *Kidney research and clinical practice*. Korea (South), 38(3), pp. 382-390. doi: 10.23876/j.krccp.18.0128.

- Kim, S. M. *et al.* (2015) «Targeting T helper 17 by mycophenolate mofetil attenuates diabetic nephropathy progression», *Translational Research*. Elsevier Ltd, 166(4), pp. 375-383. doi: 10.1016/j.trsl.2015.04.013.
- Klahr, S. (2001) «The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression», *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(suppl_1), pp. 60-62. doi: 10.1093/ndt/16.suppl_1.60.
- Kolls, J. K. y Lindén, A. (2004) «Interleukin-17 family members and inflammation», *Immunity*, 21(4), pp. 467-476. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Van Kooten, C. *et al.* (1998) «Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection», *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(8), pp. 1526-1534.
- Krebs, C. F. *et al.* (2014) «Deficiency of the interleukin 17/23 axis accelerates renal injury in mice with deoxycorticosterone acetate+angiotensin II-induced hypertension», *Hypertension*, 63(3), pp. 565-571. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02620.
- Krebs, C. F. *et al.* (2017) «T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease», *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 647-659. doi: 10.1038/nrneph.2017.112.
- Kriz, W. (2004) «Adenosine and ATP: traffic regulators in the kidney.», *The Journal of clinical investigation*. United States, 114(5), pp. 611-613. doi: 10.1172/JCI22669.
- Kuriya, G. *et al.* (2013) «Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse», *Diabetologia*, 56(8), pp. 1773-1780. doi: 10.1007/s00125-013-2935-8.
- Laurent, S. y Boutouyrie, P. (2015) «The Structural Factor of Hypertension: Large and Small Artery Alterations», *Circulation Research*, 116(6), pp. 1007-1021. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303596.
- Lewis, E. J. *et al.* (2012) «Pyridorin in type 2 diabetic nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(1), pp. 131-136. doi: 10.1681/ASN.2011030272.
- Li, C.-R., Mueller, E. E. y Bradley, L. M. (2014) «Islet antigen-specific Th17 cells can induce TNF-alpha-dependent autoimmune diabetes.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 192(4), pp. 1425-1432. doi: 10.4049/jimmunol.1301742.

Li, Y. *et al.* (2014) « $\gamma\delta$ T cell-derived interleukin-17A via an interleukin-1 β - dependent mechanism mediates cardiac Injury and Fibrosis in hypertension», *Hypertension*, 64(2), pp. 305-314. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02604.

Liao, Y. H. *et al.* (2012) «Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration», *Journal of the American College of Cardiology*, 59(4), pp. 420-429. doi: 10.1016/j.jacc.2011.10.863.

Libetta, C. *et al.* (2011) «Effects of different peritoneal dialysis fluids on the TH1/TH2 balance.», *European cytokine network*. France, 22(1), pp. 24-31. doi: 10.1684/ecn.2011.0280.

Lin, M. *et al.* (2012) «Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy.», *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. United States, 23(1), pp. 86-102. doi: 10.1681/ASN.2010111210.

Liu, M. *et al.* (2014) «Interleukin-17A promotes functional activation of systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cells by extracellular-regulated protein kinases signalling pathway», *Arthritis Research and Therapy*, 16(1), pp. 1-10. doi: 10.1186/s13075-014-0512-2.

Liu, S. *et al.* (2013) «Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A», *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(May), pp. 1-9. doi: 10.1038/ncomms2880.

Liuzzo, G., Trotta, F. y Pedicino, D. (2013) «Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: The good, the bad, and the unknown», *European Heart Journal*, 34(8), pp. 556-559. doi: 10.1093/eurheartj/ehs399.

Loverre, A. *et al.* (2011) «IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection», *American Journal of Transplantation*, 11(6), pp. 1248-1259. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03529.x.

Lovisa, S. *et al.* (2015) «Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis.», *Nature medicine*. United States, 21(9), pp. 998-1009. doi: 10.1038/nm.3902.

Lovisa, S., Zeisberg, M. y Kalluri, R. (2016) «Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis.», *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. United States, 27(10), pp. 681-695. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.004.

Di Lullo, L. *et al.* (2015) «Chronic kidney disease and cardiovascular complications.», *Heart failure reviews*. United States, 20(3), pp. 259-272. doi: 10.1007/s10741-014-9460-9.

- Mack, M. (2018) «Inflammation and fibrosis.», *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. Netherlands, 68-69, pp. 106-121. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.010.
- Madhur, M. S. *et al.* (2010) «Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction», *Hypertension*, 55(2), pp. 500-507. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094.
- Madhur, M. S. *et al.* (2011) «Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), pp. 1565-1572. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.227629.
- Marketou, M. E. *et al.* (2012) «TLR2 and TLR4 gene expression in peripheral monocytes in nondiabetic hypertensive patients: the effect of intensive blood pressure-lowering.», *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*. United States, 14(5), pp. 330-335. doi: 10.1111/j.1751-7176.2012.00620.x.
- Marko, L. *et al.* (2012) «Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage.», *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 60(6), pp. 1430-1436. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199265.
- Martinez-lemus, L. A. (2011) «MiniReview The Dynamic Structure of Arterioles», pp. 5-11. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00813.x.
- Martinez-Revelles, S. *et al.* (2017) «Lysyl Oxidase Induces Vascular Oxidative Stress and Contributes to Arterial Stiffness and Abnormal Elastin Structure in Hypertension: Role of p38MAPK.», *Antioxidants & redox signaling*. United States, 27(7), pp. 379-397. doi: 10.1089/ars.2016.6642.
- Marwaha, A. K. *et al.* (2017) «Pre-diagnostic genotyping identifies T1D subjects with impaired Treg IL-2 signaling and an elevated proportion of FOXP3(+)IL-17(+) cells.», *Genes and immunity*. England, 18(1), pp. 15-21. doi: 10.1038/gene.2016.44.
- Mathiassen, O. N. *et al.* (2007) «Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension.», *Journal of hypertension*. England, 25(5), pp. 1021-1026. doi: 10.1097/HJH.0b013e32805bf8ed.
- Matsushita, K. *et al.* (2010) «Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis.», *Lancet (London, England)*. England, 375(9731), pp. 2073-2081. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60674-5.
- Mazurek, R. *et al.* (2017) *Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease*. 1.^a ed, *Advances in Pharmacology*. 1.^a ed. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.apha.2016.08.001.

McGeachy, M. J., Cua, D. J. y Gaffen, S. L. (2019) «The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease», *Immunity*. Elsevier Inc., 50(4), pp. 892-906. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.021.

McMaster, W. G. *et al.* (2015) «Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage», *Circulation Research*, 116(6), pp. 1022-1033. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303697.

Mehrotra, P. *et al.* (2017) «IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats.», *American journal of physiology. Renal physiology*. United States, 312(3), pp. F385-F397. doi: 10.1152/ajprenal.00462.2016.

Mencke, R. *et al.* (2019) «Klotho deficiency induces arteriolar hyalinosis in a trade-off with vascular calcification.», *The American journal of pathology*. United States. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.08.006.

Meneton, P. *et al.* (2001) «Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 98(5), pp. 2634-2639. doi: 10.1073/pnas.051619598.

Meyrier, A. (2015) «Nephrosclerosis: Update on a centenarian», *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(11), pp. 1833-1841. doi: 10.1093/ndt/gfu366.

Mezzano, S. *et al.* (2003) «Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy», en *Kidney International, Supplement*.

Mezzano, S. *et al.* (2004) «NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy.», *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. England, 19(10), pp. 2505-2512. doi: 10.1093/ndt/gfh207.

Mezzano, S. y Aros, C. (2005) «[Chronic kidney disease: classification, mechanisms of progression and strategies for renoprotection].», *Revista medica de Chile*. Chile, 133(3), pp. 338-348. doi: /S0034-98872005000300011.

Mirhafez, S. R. *et al.* (2014) «An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension.», *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*. United States, 8(9), pp. 614-623. doi: 10.1016/j.jash.2014.05.007.

Mohamed, R. *et al.* (2016) «Low-dose IL-17 therapy prevents and reverses diabetic nephropathy, metabolic syndrome, and associated organ fibrosis», *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(3), pp. 745-765. doi: 10.1681/ASN.2014111136.

Monin, L. y Gaffen, S. L. (2017) «Interleukin 17 Family Cytokines : Signaling and Therapeutic Implications», *Cold Spring Harb Perspect Biol*, pp. 1-18. doi: 10.1101/cshperspect.a028522.

Moreno, J. A. *et al.* (2018) «Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope», *Expert opinion on investigational drugs*. Taylor & Francis, 27(11), pp. 917-930. doi: 10.1080/13543784.2018.1538352.

Mosmann, T. R. *et al.* (1986) «Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(7), pp. 2348-57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419430>.

Mulvany, M. J. y Aalkjaer, C. (1990) «Structure and function of small arteries.», *Physiological reviews*. United States, 70(4), pp. 921-961. doi: 10.1152/physrev.1990.70.4.921.

National Kidney Foundation (2012) «KDIGO Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease», *Kidney International*, Supp:2(5), pp. 337-414. doi: 10.1038/kisup.2012.7.

Navarro-González, J. F. *et al.* (2009) «Tumor necrosis factor- α as a therapeutic target for diabetic nephropathy», *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(2), pp. 165-173. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.005.

Navarro-González, J. F. *et al.* (2011) «Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy», *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 7(6), pp. 327-340. doi: 10.1038/nrneph.2011.51.

Netea, M. G. *et al.* (2017) «A guiding map for inflammation.», *Nature immunology*. United States, 18(8), pp. 826-831. doi: 10.1038/ni.3790.

Nguyen, D. V., Shaw, L. C. y Grant, M. B. (2012) «Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes», *Frontiers in Endocrinology*, 3(DEC), pp. 1-7. doi: 10.3389/fendo.2012.00170.

Nguyen, H. *et al.* (2013) «Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension», *Cardiovascular Research*, 97(4), pp. 696-704. doi: 10.1093/cvr/cvs422.

Nieto, M. A. *et al.* (2016) «Emt: 2016», *Cell*, 166(1), pp. 21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

Niewczas, M. A. *et al.* (2019) «A signature of circulating inflammatory proteins and development of end-stage renal disease in diabetes», *Nature Medicine*. Springer US, 25(5), pp. 805-813. doi: 10.1038/s41591-019-0415-5.

Noack, M. y Miossec, P. (2014) «Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases», *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V., 13(6), pp. 668-677. doi: 10.1016/j.autrev.2013.12.004.

Noack, M. y Miossec, P. (2017) «Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis.», *Seminars in immunopathology*. Germany, 39(4), pp. 365-383. doi: 10.1007/s00281-017-0619-z.

Nogueira, E. *et al.* (2010) «Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis». doi: 10.1093/ndt/gfp783.

Nordlohne, J. y von Vietinghoff, S. (2019) «Interleukin 17A in atherosclerosis - Regulation and pathophysiologic effector function.», *Cytokine*. England, 122, p. 154089. doi: 10.1016/j.cyto.2017.06.016.

Norlander, A. E. *et al.* (2016) «Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension», *Hypertension*, 68(1), pp. 167-174. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493.

O'Shea, P. M., Griffin, T. P. y Fitzgibbon, M. (2017) «Hypertension: The role of biochemistry in the diagnosis and management.», *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Netherlands, 465, pp. 131-143. doi: 10.1016/j.cca.2016.12.014.

Okamoto, Y. *et al.* (2012) «Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice», *Arthritis and Rheumatism*, 64(11), pp. 3726-3735. doi: 10.1002/art.34643.

Okuda, T. y Grollman, A. (1967) «Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells.», *Texas reports on biology and medicine*. United States, 25(2), pp. 257-264.

Olsen, F. (1972) «Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man.», *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*. Denmark, 80(2), pp. 253-256.

Omenetti, S. y Pizarro, T. T. (2015) «The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome», *Frontiers in Immunology*, 6(DEC), pp. 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.

OMS (2013) «Información general sobre la hipertensión en el mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial», *Oms*, pp. 1-39. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf.

Pacheco-Lugo, L. *et al.* (2019) «Plasma cytokines as potential biomarkers of kidney damage in patients with systemic lupus erythematosus.», *Lupus*. England, 28(1), pp. 34-43. doi: 10.1177/0961203318812679.

Peeters, A. C. T. M. *et al.* (2001) «Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension», *European Journal of Clinical Investigation*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 31(1), pp. 31-36. doi: 10.1046/j.1365-2362.2001.00743.x.

Peng, X. *et al.* (2015) «IL-17A produced by both gammadelta T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction.», *The Journal of pathology*. England, 235(1), pp. 79-89. doi: 10.1002/path.4430.

Perez-Gomez, M. V. *et al.* (2015) «Horizon 2020 in Diabetic Kidney Disease: The Clinical Trial Pipeline for Add-On Therapies on Top of Renin Angiotensin System Blockade.», *Journal of clinical medicine*. Switzerland, 4(6), pp. 1325-1347. doi: 10.3390/jcm4061325.

Perez-Gomez, M. V. *et al.* (2016) «Targeting inflammation in diabetic kidney disease: early clinical trials.», *Expert opinion on investigational drugs*. England, 25(9), pp. 1045-1058. doi: 10.1080/13543784.2016.1196184.

Perico, N. y Remuzzi, G. (2012) «Chronic kidney disease: A research and public health priority», *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(SUPPL. 3). doi: 10.1093/ndt/gfs284.

Perlman, A. S. *et al.* (2015) «Serum Inflammatory and Immune Mediators Are Elevated in Early Stage Diabetic Nephropathy.», *Annals of clinical and laboratory science*. United States, 45(3), pp. 256-263.

Pietrowski, E. *et al.* (2011) «Pro-inflammatory effects of interleukin-17A on vascular smooth muscle cells involve NAD(P)H- oxidase derived reactive oxygen species.», *Journal of vascular research*. Switzerland, 48(1), pp. 52-58. doi: 10.1159/000317400.

Pindjakova, J. *et al.* (2012) «Interleukin-1 accounts for intrarenal Th17 cell activation during ureteral obstruction», *Kidney international*. 2011/10/05, 81(4), pp. 379-390. doi: 10.1038/ki.2011.348.

Pinheiro, M. M. *et al.* (2017) «Sitagliptin inhibit human lymphocytes proliferation and Th1/Th17 differentiation in vitro.», *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. Netherlands, 100, pp. 17-24. doi: 10.1016/j.ejps.2016.12.040.

Psaltis, P. J. y Simari, R. D. (2015) «Vascular wall progenitor cells in health and disease», *Circulation Research*, 116(8), pp. 1392-1412. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305368.

Qiu, A.-W., Liu, Q.-H. y Wang, J.-L. (2017) «Blocking IL-17A Alleviates Diabetic Retinopathy in Rodents.», *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. Germany, 41(3), pp. 960-972. doi: 10.1159/000460514.

Rabkin, S. W. (2009) «The role of interleukin 18 in the pathogenesis of hypertension-induced vascular disease.», *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*. England, 6(3), pp. 192-199. doi: 10.1038/ncpcardio1453.

Ramani, K. *et al.* (2016) «The Kallikrein-Kinin System: A Novel Mediator of IL-17-Driven Anti-Candida Immunity in the Kidney», *PLoS Pathogens*, 12(11), pp. 1-25. doi: 10.1371/journal.ppat.1005952.

Ramani, K. *et al.* (2018) «IL-17 receptor signaling negatively regulates the development of tubulointerstitial fibrosis in the kidney», *Mediators of Inflammation*. Hindawi, 2018. doi: 10.1155/2018/5103672.

Ramani, K. y Biswas, P. S. (2019) «Interleukin-17: Friend or foe in organ fibrosis», *Cytokine*. Elsevier, 120(July), pp. 282-288. doi: 10.1016/j.cyto.2018.11.003.

Rayego-Mateos, S. *et al.* (2018) «Connective tissue growth factor induces renal fibrosis via epidermal growth factor receptor activation.», *The Journal of pathology*. England, 244(2), pp. 227-241. doi: 10.1002/path.5007.

Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M. y van Eys, G. J. J. M. (2007) «Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity», *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. Bohn Stafleu van Loghum, 15(3), pp. 100-108. doi: 10.1007/bf03085963.

Reutens, A. T. (2013) «Epidemiology of Diabetic Kidney Disease», *Medical Clinics of North America*. Elsevier Inc, 97(1), pp. 1-18. doi: 10.1016/j.mcna.2012.10.001.

Rizzoni, D. *et al.* (2001) «Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.», *Circulation*. United States, 103(9), pp. 1238-1244. doi: 10.1161/01.cir.103.9.1238.

Rizzoni, D., Agabiti-Rosei, C. y Agabiti-Rosei, E. (2017) «Hemodynamic Consequences of Changes in Microvascular Structure», *American Journal of Hypertension*, 30(10), pp. 939-946. doi: 10.1093/ajh/hpx032.

Robert, M. y Miossec, P. (2017) «Effects of Interleukin 17 on the cardiovascular system», *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V., 16(9), pp. 984-991. doi: 10.1016/j.autrev.2017.07.009.

Rodrigo Tagle, V. (2010) «Terapia antihipertensiva en enfermedad renal crónica», *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(4), pp. 541-552. doi: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70569-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70569-1).

Rodrigues-Diez, R. *et al.* (2013) «The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response.», *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. United States, 93(7), pp. 812-824. doi: 10.1038/labinvest.2013.67.

Rodrigues-Diez, R. *et al.* (2014) «IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage.», *Kidney international*. United States, 86(2), pp. 303-315. doi: 10.1038/ki.2014.33.

Rodríguez-Iturbe, B. (2019) «The participation of immunity in the pathogenesis of arterial hypertension.», *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*. Spain. doi: 10.1016/j.nefro.2019.04.006.

Rodríguez-Vita, J. *et al.* (2005) «Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor- β -independent mechanism», *Circulation*, 111(19), pp. 2509-2517. doi: 10.1161/01.CIR.0000165133.84978.E2.

Roohi, A. *et al.* (2014) «Serum IL-17, IL-23, and TGF-beta levels in type 1 and type 2 diabetic patients and age-matched healthy controls.», *BioMed research international*. United States, 2014, p. 718946. doi: 10.1155/2014/718946.

Rouvier, E. *et al.* (1993) «CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(12), pp. 5445-56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390535>.

Ruiz-Ortega, M. *et al.* (1998) «Angiotensin II Participates in Mononuclear Cell Recruitment in Experimental Immune Complex Nephritis Through Nuclear Factor- κ B Activation and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Synthesis», *The Journal of Immunology*, 161(1), pp. 430 LP - 439. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/161/1/430.abstract>.

Ruiz-Ortega, M. *et al.* (2000) «Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms.», *Circulation research*. United States, 86(12), pp. 1266-1272. doi: 10.1161/01.res.86.12.1266.

Ruiz-Ortega, M, Lorenzo, O., Ruperez, M., Suzuki, Y., *et al.* (2001) «Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice.», *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. England, 16 Suppl 1, pp. 27-33. doi: 10.1093/ndt/16.suppl_1.27.

Ruiz-Ortega, M, Lorenzo, O., Ruperez, M., Blanco, J., *et al.* (2001) «Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors.», *The American journal of pathology*. United States, 158(5), pp. 1743-1756. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64130-2.

Ruiz-Ortega, Marta *et al.* (2001) «Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor- κ B and AP-1 in the kidney role of A T1 and AT2 receptors», *American Journal of Pathology*, 158(5), pp. 1743-1756. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64130-2.

Ruiz-Ortega, M. *et al.* (2006) «Renal and vascular hypertension-induced inflammation: Role of angiotensin II», *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15(2), pp. 159-166. doi: 10.1097/01.mnh.0000203190.34643.d4.

Ruiz-Ortega, M. *et al.* (2007) «TGF-beta signaling in vascular fibrosis.», *Cardiovascular research*. England, 74(2), pp. 196-206. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.008.

Ruiz-Ortega, M. y Egido, J. (1997) «Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts.», *Kidney international*. United States, 52(6), pp. 1497-1510. doi: 10.1038/ki.1997.480.

Ruperez, M., Ruiz-Ortega, M., *et al.* (2003) «Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney.», *The American journal of pathology*. United States, 163(5), pp. 1937-1947. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63552-3.

- Ruperez, M., Lorenzo, O., *et al.* (2003) «Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis.», *Circulation*. United States, 108(12), pp. 1499-1505. doi: 10.1161/01.CIR.0000089129.51288.BA.
- Ryba-Stanislawowska, M. *et al.* (2013) «Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes.», *Human immunology*. United States, 74(6), pp. 701-707. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.024.
- Safar, M. E. *et al.* (2018) «Interaction between hypertension and arterial stiffness an expert reappraisal», *Hypertension*, 72(4), pp. 796-805. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11212.
- Saleh, M. A., Norlander, A. E. y Madhur, M. S. (2016) «Inhibition of Interleukin-17A, But Not Interleukin-17F, Signaling Lowers Blood Pressure, and Reduces End-Organ Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension», *JACC: Basic to Translational Science*, 1(7), pp. 606-616. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.07.009.
- Sandison, M. E., Dempster, J. y McCarron, J. G. (2016) «The transition of smooth muscle cells from a contractile to a migratory, phagocytic phenotype: direct demonstration of phenotypic modulation.», *The Journal of physiology*. England, 594(21), pp. 6189-6209. doi: 10.1113/JP272729.
- Sanz, A. B. *et al.* (2010) «NF-kappaB in renal inflammation.», *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. United States, 21(8), pp. 1254-1262. doi: 10.1681/ASN.2010020218.
- Sanz, A. B. *et al.* (2019) «Advances in understanding the role of angiotensin-regulated proteins in kidney diseases.», *Expert review of proteomics*. England, 16(1), pp. 77-92. doi: 10.1080/14789450.2018.1545577.
- von Scholten, B. J. *et al.* (2016) «Impaired coronary microcirculation in type 2 diabetic patients is associated with elevated circulating regulatory T cells and reduced number of IL-21R(+) T cells.», *Cardiovascular diabetology*. England, 15, p. 67. doi: 10.1186/s12933-016-0378-5.
- Seccia, T. *et al.* (2019) «The Key Role of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Hypertensive Kidney Disease», *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), p. 3567. doi: 10.3390/ijms20143567.
- Sergejeva, S. y Linden, A. (2009) «Impact of IL-17 on cells of the monocyte lineage in health and disease.», *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. United Arab Emirates, 9(2), pp. 178-186.

Shahrara, S. *et al.* (2009) «IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 182(6), pp. 3884-3891. doi: 10.4049/jimmunol.0802246.

Sharma, D. *et al.* (2017) «Diabetic Nephropathy: New Insights into Established Therapeutic Paradigms and Novel Molecular Targets», *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier B.V., 128, pp. 91-108. doi: 10.1016/j.diabres.2017.04.010.

Sharma, K. *et al.* (2011) «Pirfenidone for diabetic nephropathy», *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(6), pp. 1144-1151. doi: 10.1681/ASN.2010101049.

Shen, F. y Gaffen, S. L. (2008) «Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy.», *Cytokine*. England, 41(2), pp. 92-104. doi: 10.1016/j.cyto.2007.11.013.

Shen, Q. *et al.* (2018) «1,25-Dihydroxyvitamin D3 Attenuates Angiotensin II-Induced Renal Injury by Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Autophagy.», *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. Germany, 51(4), pp. 1751-1762. doi: 10.1159/000495678.

Shiromizu, C. M. y Jancic, C. C. (2018) «gammadelta T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection.», *Frontiers in immunology*. Switzerland, 9, p. 2389. doi: 10.3389/fimmu.2018.02389.

Shoukry, A., Bdeer, S. E.-A. y El-Sokkary, R. H. (2015) «Urinary monocyte chemoattractant protein-1 and vitamin D-binding protein as biomarkers for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus.», *Molecular and cellular biochemistry*. Netherlands, 408(1-2), pp. 25-35. doi: 10.1007/s11010-015-2479-y.

Singh, P. *et al.* (2013) «TNF-alpha type 2 receptor mediates renal inflammatory response to chronic angiotensin II administration with high salt intake in mice.», *American journal of physiology. Renal physiology*. United States, 304(7), pp. F991-9. doi: 10.1152/ajprenal.00525.2012.

Solt, L. A. *et al.* (2015) «ROR inverse agonist suppresses insulinitis and prevents hyperglycemia in a mouse model of type 1 diabetes.», *Endocrinology*. United States, 156(3), pp. 869-881. doi: 10.1210/en.2014-1677.

- Stenvinkel, P. *et al.* (2016) «Inflammation Modifies the Paradoxical Association between Body Mass Index and Mortality in Hemodialysis Patients», *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(5), pp. 1479 LP - 1486. doi: 10.1681/ASN.2015030252.
- Sternlicht, H. y Bakris, G. L. (2016) «Management of Hypertension in Diabetic Nephropathy : How Low Should We Go ?», pp. 139-143. doi: 10.1159/000441264.
- Sun, B. *et al.* (2018) «Role of interleukin 17 in TGF-beta signaling-mediated renal interstitial fibrosis.», *Cytokine*. England, 106, pp. 80-88. doi: 10.1016/j.cyto.2017.10.015.
- Sun, H. (2019) *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*. Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-8871-2.
- Swaidani, S. *et al.* (2019) «TRAF Regulation of IL-17 Cytokine Signaling», *Frontiers in Immunology*, 10(June), pp. 1-7. doi: 10.3389/fimmu.2019.01293.
- Takeuchi, M. *et al.* (2015) «Elevated Levels of Cytokines Associated with Th2 and Th17 Cells in Vitreous Fluid of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients.», *PLoS one*. United States, 10(9), p. e0137358. doi: 10.1371/journal.pone.0137358.
- Tam, F. W. K. y Ong, A. C. M. (2019) «Renal monocyte chemoattractant protein-1: an emerging universal biomarker and therapeutic target for kidney diseases?», *Nephrology Dialysis Transplantation*. doi: 10.1093/ndt/gfz082.
- Tesch, G. H. (2008) «MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy.», *American journal of physiology. Renal physiology*. United States, 294(4), pp. F697-701. doi: 10.1152/ajprenal.00016.2008.
- Tesch, G. H. (2017) «Diabetic nephropathy – is this an immune disorder?», *Clinical Science*, 131(16), pp. 2183 LP - 2199. doi: 10.1042/CS20160636.
- Tong, Z. *et al.* (2015) «Interleukin-17A deficiency ameliorates streptozotocin-induced diabetes», *Immunology*, 146(2), pp. 339-346. doi: 10.1111/imm.12512.
- Tonna, S. *et al.* (2010) «Metabolic memory and diabetic nephropathy: Potential role for epigenetic mechanisms», *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 6(6), pp. 332-341. doi: 10.1038/nrneph.2010.55.

Toth-Manikowski, S. y Atta, M. G. (2015) «Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets», *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Publishing Corporation, 2015, pp. 1-16. doi: 10.1155/2015/697010.

Turkmen, K. (2016) «Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse», *International Urology and Nephrology*. Springer Netherlands, 49(5), pp. 1-8. doi: 10.1007/s11255-016-1488-4.

Tuttle, K. R. *et al.* (2005) «The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes», *Diabetes Care*, 28(11), pp. 2686-2690. doi: 10.2337/diacare.28.11.2686.

Velden, J. *et al.* (2012) «Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis», pp. 1663-1673. doi: 10.1152/ajprenal.00683.2011.

Vestra, M. D. *et al.* (2009) «The kidney in type 2 diabetes: focus on renal structure», *Endocrinología y Nutrición*. Elsevier, 56(SUPPL. 4), pp. 18-20. doi: 10.1016/S1575-0922(09)73511-9.

Vianna, H. R. *et al.* (2013) «Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases.», *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. Germany, 28(3), pp. 463-469. doi: 10.1007/s00467-012-2363-x.

von Vietinghoff, S. y Ley, K. (2010) «Interleukin 17 in vascular inflammation.», *Cytokine & growth factor reviews*. England, 21(6), pp. 463-469. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.10.003.

Wang, T. *et al.* (2017) «Interleukin-17 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition via the TGF-beta1 mediated Smad2/3 and ERK1/2 activation.», *PloS one*. United States, 12(9), p. e0183972. doi: 10.1371/journal.pone.0183972.

Wanner, C., Amann, K. y Shoji, T. (2016) «The heart and vascular system in dialysis.», *Lancet (London, England)*. England, 388(10041), pp. 276-284. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30508-6.

Whelton, P. K. *et al.* (2018) «2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary», *Journal of the American Society of Hypertension*. American College of Cardiology Foundation, 12(8), pp. 579.e1-579.e73. doi: 10.1016/j.jash.2018.06.010.

White, F. N. y Grollman, A. (1964) «AUTOIMMUNE FACTORS ASSOCIATED WITH INFARCTION OF THE KIDNEY.», *Nephron*.

- Wright, J. F. *et al.* (2008) «The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex», *The Journal of Immunology*, 181(4), pp. 2799-2805. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2799.
- Wu, J. *et al.* (2014) «Inflammation and mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen-activated protein kinase.», *Circulation research*. United States, 114(4), pp. 616-625. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302157.
- Wu, J. *et al.* (2016) «Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension.», *The Journal of clinical investigation*. United States, p. 1607. doi: 10.1172/JCI87425.
- Xiao, X. *et al.* (2009) «Cellular and humoral immune responses in the early stages of diabetic nephropathy in NOD mice.», *Journal of autoimmunity*. England, 32(2), pp. 85-93. doi: 10.1016/j.jaut.2008.12.003.
- Xie, Y. *et al.* (2018) «Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016», *Kidney International*. Elsevier Inc, 94(3), pp. 567-581. doi: 10.1016/j.kint.2018.04.011.
- Xing, X. *et al.* (2013) «IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway.», *PLoS one*. United States, 8(12), p. e85032. doi: 10.1371/journal.pone.0085032.
- Xu, H., Cai, M. y Zhang, X. (2015) «Effect of the blockade of the IL-23-Th17-IL-17A pathway on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats.», *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. Germany, 253(9), pp. 1485-1492. doi: 10.1007/s00417-014-2842-9.
- Xue, L. *et al.* (2011) «Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice.», *The Journal of surgical research*. United States, 171(1), pp. 266-274. doi: 10.1016/j.jss.2009.12.031.
- Yago, T. *et al.* (2017) «IL-23 and Th17 Disease in Inflammatory Arthritis.», *Journal of clinical medicine*. Switzerland, 6(9). doi: 10.3390/jcm6090081.
- Yang, J. *et al.* (2014) «Targeting Th17 cells in autoimmune diseases.», *Trends in pharmacological sciences*. England, 35(10), pp. 493-500. doi: 10.1016/j.tips.2014.07.006.
- Yao, W. *et al.* (2015) «Elevated Serum Level of Interleukin 17 in a Population With Prehypertension», *Journal of Clinical Hypertension*, 17(10), pp. 770-774. doi: 10.1111/jch.12612.

Yu, D. *et al.* (2005) «Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria.», *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. United States, 16(6), pp. 1733-1741. doi: 10.1681/ASN.2005020159.

Yuan, S. *et al.* (2015) «Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment.», *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. Germany, 36(6), pp. 2340-2356. doi: 10.1159/000430197.

Zhang, H. *et al.* (2013) «IL-17 induces expression of vascular cell adhesion molecule through signalling pathway of NF- κ B, but not Akt1 and TAK1 in vascular smooth muscle cells», *Scandinavian Journal of Immunology*, 77(4), pp. 230-237. doi: 10.1111/sji.12030.

Zhang, L. *et al.* (2018) «Akt/eNOS and MAPK signaling pathways mediated the phenotypic switching of thoracic aorta vascular smooth muscle cells in aging/hypertensive rats», *Physiological Research*, 67(4), pp. 543-553.

Zhang, Q. *et al.* (2017) «Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition.», *Oncogene*. England, 36(5), pp. 687-699. doi: 10.1038/onc.2016.240.

Anexo

ANEXO

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Macarena Orejudo, Raul R. Rodrigues-Diez, Raquel Rodrigues-Diez, Ana Garcia-Redondo, Laura Santos-Sánchez, Javier Rández-Garbayo, Pablo Cannata-Ortiz, Adrian M Ramos, Alberto Ortiz, Rafael Selgas, Sergio Mezzano, Carolina Lavo, Marta Ruiz-Ortega. **IL-17A participates in renal inflammation associated to experimental and human hypertension.** Front. Pharmacol. 10:1015. doi: 10.3389/fphar.2019.01015 Publicado el 13 de Septiembre de 2019.

Carolina Lavo, Yenniffer Sánchez Matus, **Macarena Orejudo**, J Daniel Carpio, Alejandra Droguett, Jesús Egido, Sergio Mezzano, Marta Ruiz-Ortega. **Interleukin-17A blockade reduces albuminuria and kidney injury in an accelerated model of diabetic nephropathy.** Kidney Int. 2019 Jun;95(6):1418-1432. doi: 10.1016/j.kint.2018.12.031. PMID: 30982673

Macarena Orejudo, Ana B. García-Redondo, Raúl R. Rodrigues-Diez, Raquel Rodrigues-Diez, Laura Santos-Sanchez, Rafael Selgas, Mercedes Salaiques, Ana M. Briones, Marta Ruiz-Ortega. **Interleukin-17A induces vascular remodeling of small arteries and blood pressure elevation.** En fase de revisión por la revista Clinical Science.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

Raúl Rodrigues-Diez, Ana Belén Garcia-Redondo, **Macarena Orejudo**, Raquel Rodrigues-Diez, Ana María Briones, Enrique Bosch-Panadero, Gyorgy Kery, Janos Pato, Alberto Ortiz, Mercedes Salaiques, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega. **The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF- κ B pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells.** Antioxid Redox Signal. 2015 Jan 1;22(1):29-47. doi: 10.1089/ars.2013.5500. PMID: 25065408

Raquel Rodrigues-Diez, Sandra Rayego-Mateos, **Macarena Orejudo**, Luiz S Aroeira, Rafael Selgas, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega. **TGF-Beta Blockade Increases Renal Inflammation Caused by the C-Terminal Module of the CCN2.** Mediators Inflamm. 2015;2015:506041. doi: 10.1155/2015/506041. PMID: 26074680

Laura Marquez-Exposito, Elena Cantero-Navarro, Carolina Lavo, Marta Fierro-Fernández, Jonay Poveda, Sandra Rayego-Mateos, Raúl Rodrigues-Diez, José Luis Morgado-Pascual, **Macarena Orejudo**, Sergio Mezzano, Marta Ruiz-Ortega. **Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases?** Nefrologia. 2018 Sep - Oct;38(5):466-475. doi: 10.1016/j.nefro.2017.11.027. PMID: 29439807

Laura Marquez-Exposito, Carolina Lavo, Raúl Rodrigues-Diez, Sandra Rayego-Mateos, **Macarena Orejudo**, Elena Cantero-Navarro, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Rafael Selgas, Sergio Mezzano, Marta Ruiz-Ortega. **Gremlin Regulates Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition via VEGFR2: Potential Role in Renal Fibrosis.** Front Pharmacol. 2018 Oct 17;9:1195. doi: 10.3389/fphar.2018.01195. PMID: 30386246



Interleukin 17A Participates in Renal Inflammation Associated to Experimental and Human Hypertension

Macarena Orejudo^{1,2}, Raul R. Rodrigues-Diez^{1,2}, Raquel Rodrigues-Diez³, Ana Garcia-Redondo³, Laura Santos-Sánchez^{1,2}, Javier Rández-Garbayo^{1,2}, Pablo Cannata-Ortiz^{1,4}, Adrian M. Ramos^{2,5}, Alberto Ortiz^{2,5}, Rafael Selgas^{2,6}, Sergio Mezzano⁷, Carolina Lavoz⁷ and Marta Ruiz-Ortega^{1,2*}

¹ Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ² Red de Investigación Renal (REDinREN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, ³ Pharmacology Department, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ⁴ Division of Nephrology and Hypertension, IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ⁵ Division of Nephrology and Hypertension, IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ⁶ Laboratory of Nephrology, Fundación de Investigación Biomédica Hospital Universitario la Paz (FIBHULP- IdiPAZ), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ⁷ Division of Nephrology, School of Medicine, Universidad Austral, Valdivia, Chile

OPEN ACCESS

Edited by:

Matthew Griffin,
National University of Ireland
Galway, Ireland

Reviewed by:

Brett M. Mitchell,
Texas A&M Health Science Center,
United States
Eoin Brennan,
University College Dublin,
Ireland

*Correspondence:

Marta Ruiz-Ortega
mruizo@fjd.es

Specialty section:

This article was submitted to
Renal Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 01 March 2019

Accepted: 09 August 2019

Published: 13 September 2019

Citation:

Orejudo M, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, Garcia-Redondo A, Santos-Sánchez L, Rández-Garbayo J, Cannata-Ortiz P, Ramos AM, Ortiz A, Selgas R, Mezzano S, Lavoz C and Ruiz-Ortega M (2019) Interleukin 17A Participates in Renal Inflammation Associated to Experimental and Human Hypertension. *Front. Pharmacol.* 10:1015. doi: 10.3389/fphar.2019.01015

Hypertension is now considered as an inflammatory disease, and the kidney is a key end-organ target. Experimental and clinical studies suggest that interleukin 17A (IL-17A) is a promising therapeutic target in immune and chronic inflammatory diseases, including hypertension and kidney disease. Elevated circulating IL-17A levels have been observed in hypertensive patients. Our aim was to investigate whether chronically elevated circulating IL-17A levels could contribute to kidney damage, using a murine model of systemic IL-17A administration. Blood pressure increased after 14 days of IL-17A infusion in mice when compared with that in control mice, and this was associated to kidney infiltration by inflammatory cells, including CD3⁺ and CD4⁺ lymphocytes and neutrophils. Moreover, proinflammatory factors and inflammatory-related intracellular mechanisms were upregulated in kidneys from IL-17A-infused mice. In line with these findings, in the model of angiotensin II infusion in mice, IL-17A blockade, using an anti-IL17A neutralizing antibody, reduced kidney inflammatory cell infiltrates and chemokine overexpression. In kidney biopsies from patients with hypertensive nephrosclerosis, IL-17A positive cells, mainly Th17 and $\gamma\delta$ T lymphocytes, were found. Overall, the results support a pathogenic role of IL-17A in hypertensive kidney disease-associated inflammation. Therapeutic approaches targeting this cytokine should be explored to prevent hypertension-induced kidney injury.

Keywords: IL-17A, hypertension, renal pathology, IL-17A neutralization, inflammation

INTRODUCTION

Hypertension is a prevalent disorder and the second leading cause of kidney failure after diabetes (Coffman, 2011). It may be complicated by target organ damage, including cardiovascular, brain, and kidney injuries. Despite the availability of antihypertensive drugs, blood pressure control is frequently suboptimal, and end-organ damage is still common. Thus, improved organ protection

strategies are needed. The etiology of essential hypertension remains unclear and is still a matter of intense debate. In the 1960s, experimental work showed that inflammation was involved in hypertension (White and Grollman, 1964). Later on, several independent clinical studies have described elevated levels of circulating proinflammatory cytokines in hypertensive patients, and extensive preclinical research has unraveled a role for innate, cellular, and humoral immunity in the pathogenesis of hypertension and its complications (McMaster et al., 2015). Interleukin 17A (IL-17A), the effector cytokine of Th17 cells, has emerged as a promising therapeutic target in immune and chronic inflammatory diseases, including hypertension and chronic kidney disease (Caillon and Schiffrin, 2016; Solak et al., 2016; Cortvrindt et al., 2017). Initial studies described the involvement of IL-17A in pathogen clearance during infection (Fossiez et al., 1998). Now, IL-17A is considered as a pleiotropic cytokine involved in tissue inflammation and destruction through the increased expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and matrix metalloproteases (Von Vietinghoff and Ley, 2010; Cortvrindt et al., 2017).

Regarding hypertension, elevated circulating IL-17A levels have been described in hypertensive patients and in patients with hypertension-associated diseases, including systemic lupus erythematosus, preeclampsia, and chronic allograft rejection (McMaster et al., 2015; Yao et al., 2015; Beringer et al., 2016; Loverre et al., 2011; Chehimi et al., 2017). Experimental data support a role for Th17 cells and its effector cytokine IL-17A in the pathogenesis of hypertension (McMaster et al., 2015). A pioneer study showed that mice lacking T and B cells did not develop hypertension in response to angiotensin II (AngII) infusion. Moreover, adoptive transfer of T, but not B, cells restored the hypertensive response (Kvakan et al., 2009). Experimental studies in genetically modified mice for IL17A or its receptor and studies using neutralizing antibodies against IL-17A further support a role for this cytokine in the pathogenesis of hypertension and associated renal and vascular end-organ dysfunction (Madhur et al., 2010; Nguyen et al., 2013; Saleh et al., 2016; Guzik and Touyz, 2017). Even though IL-17A has emerged as a key regulator of the immune response in several disease conditions, its regulation is still poorly understood. Interestingly, preclinical studies have reported both pro- and anti-atherogenic roles of IL-17A (Gong et al., 2015), showing that the function of IL-17A in disease conditions may be more complex than previously thought. Importantly, IL-17A blockers have proven effective to treat ankylosing spondylitis, chronic plaque psoriasis, and psoriatic arthritis and are being studied in other inflammatory diseases (Leonardi et al., 2012; Baeten et al., 2013; Baeten et al., 2015; Mease et al., 2015). Interestingly, administration of recombinant IL-17A results in increased systolic blood pressure in mice, and this was associated to endothelial dysfunction and vascular damage (Nguyen et al., 2013). However, the kidney effects of IL-17A in the context of hypertension remain to be investigated.

In this paper, we tested the hypothesis that chronically elevated circulating IL-17A levels could contribute to renal damage and the potential mechanisms involved. To this aim, we

have developed a novel model of continuous infusion of systemic IL-17A in mice, resembling chronically elevated IL-17A levels found in prehypertensive patients (Yao et al., 2015).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Models

All procedures on animals were performed according to recommendations by the European Community, and the protocol was approved by Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz Animal Research Ethical Committee and by Comunidad de Madrid.

To evaluate the renal effects of chronic exposure to elevated circulating IL-17A levels, an experimental model of continuous infusion of systemic IL-17A was developed in adult male C57BL/6 mice (9–12 weeks old, 20 g). Recombinant IL-17A administration was done using subcutaneous osmotic minipumps (Model 2002; Alza Corp., Palo Alto, CA, USA), at the dose of 1.5 ng/g of body weight, and mice were studied after 14 days. This dose was based on previous data observed in preclinical mice studies and serum IL-17A levels observed in prehypertensive patients (Madhur et al., 2010; Nguyen et al., 2013; Yao et al., 2015).

Systemic infusion of AngII to adult male C57BL/6 mice was done using osmotic minipumps (at the dose of 1,000 ng/kg/min for 14 days), as described (Esteban et al., 2003; Kvakan et al., 2009; Madhur et al., 2010; Alique et al., 2014). One group of mice was also treated with a neutralizing anti-IL-17A antibody (100 µg/mouse i.p. every 4 days), at a dose previously described (Rodríguez-Díez et al., 2014). This dose of AngII was previously shown to cause after 3 days an early kidney inflammatory cell infiltration (Esteban et al., 2003) associated to upregulation of renal *Ngal* gene expression and elevated urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels (Suarez-Alvarez et al., 2017). After 2 weeks of AngII infusion, persistent kidney inflammation was observed, but there was no decrease in renal function (as assessed by serum creatinine), whereas there was no fibrosis (Alique et al., 2014). By 4 weeks, kidney fibrosis and proteinuria were evident, but no significant changes in serum creatinine levels were found (Lu et al., 2019).

In mice experiments, control animals were untreated or infused with saline adult male C57BL/6 mice, showing no differences between those groups. Therefore, all experiments were compared with untreated mice (considered as controls in the text).

Hypertension-induced renal damage was also evaluated in renal biopsies of male Wistar rats continuously infused with 100 ng/kg/min AngII for 14 days (subcutaneous osmotic minipumps; Model 2002). This model is characterized by increased blood pressure and kidney inflammatory cell infiltration and fibrosis, as previously described (Ruiz-Ortega et al., 2001; Lavoz et al., 2012; Wang et al., 2015). In addition, 16-week-old spontaneously hypertensive (SHR) rats were also studied. SHR rats presented elevated blood pressure, albuminuria, and renal fibrosis, compared with control WKY of the same age, as described (Lavoz et al., 2012).

Sample Processing

Spot urine samples were collected once a week from all mice and analyzed for albumin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ALPCO Immunoassays, Salem, NH, USA). Blood samples were obtained by cardiac puncture at the time of sacrifice, and blood was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min to obtain serum that was stored at -80°C until analysis (standard biochemical determinations: blood urea nitrogen and creatinine), as previously described (Martin-Sanchez et al., 2018).

At the time of sacrifice, animals were anesthetized with 5 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer AG) and 35 mg/kg ketamine (Ketolar, Pfizer), and the kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. A piece of the kidney (2/3) was fixed, embedded in paraffin, and used for immunohistochemistry, and the rest was snap-frozen in liquid nitrogen for renal cortex RNA and protein studies.

Systolic Blood Pressure Measurements

The LE5001 noninvasive blood pressure acquisition system (Panlab, Harvard apparatus) and the appropriated cuff and transducer (76-0432 for mice; Panlab Harvard Apparatus) were used. The blood pressure measurements were done in a quiet and temperature-regulated area ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Animals were preheated (37°C , 10 min) before measurements and maintained at 35°C . The occlusion cuff was placed at the base of the tail, and the transducer was placed adjacent to the occlusion cuff. In each session, 10 to 15 measurements per animal were done, and the first 5 data were excluded. Mice were habituated for at least 3 days before experiments. Systolic blood pressure is expressed as the mean of 5 to 10 measurements each day.

Clinical Data and Human Renal Biopsies

Percutaneous renal biopsies performed at the Division of Nephrology, Austral University, Valdivia, Chile were studied if samples were available after completing the diagnostic workup and if patients signed written informed consent forms approved by local hospital ethics committee (Comité de Ética de Investigación, Servicio de Salud Valdivia, Ministerio de Salud, Chile). The study is adhered to the Declaration of Helsinki. All patients ($n = 20$, age 56.7 ± 17.1 years; male/female ratio: 7/12) had hypertension, and the indication of renal biopsy was the diagnostic workup of an abnormal urinalysis (mainly the presence of proteinuria) and/or decreased renal function. Thus, mean proteinuria values were 200 ± 130 mg/dl and serum creatinine $2.0 \text{ mg} \pm 1.3$ mg/dl. The key inclusion criterion was a histopathological diagnosis of nephroangiosclerosis that was attributed to hypertension in the absence of evidence of other separate kidney diseases, defined by the findings at light microscopy hematoxylin–eosin (H&E), Masson trichrome and periodic acid-Schiff (PAS) staining, with negative immunofluorescence for immune deposits and absence of electron immune deposits at electron microscopy. This diagnosis represented 2% of renal biopsies. A limitation of the present study is the absence of control kidneys (from healthy humans) that were not possible to obtain.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Paraffin-embedded $3\text{-}\mu\text{m}$ (immunostaining, H&E, PAS) or $5\text{-}\mu\text{m}$ (picrosirius red) thick kidney sections were stained using standard histology procedures: H&E (for structural evaluation), PAS (to evaluate renal lesions), and picrosirius red (to evaluate renal fibrosis). Samples were mounted in nonaqueous dibutylphthalate polystyrene xylene medium.

Histopathological analysis was performed by PAS-stained paraffin-embedded murine kidney samples in a blinded fashion by a pathologist examined in a Nikon Eclipse E400 microscope. Kidney damage was evaluated by a semiquantitative score: grade 0, normal; grade 1, segmental lesion $<25\%$; grade 2, $25\text{--}50\%$; grade 3, $50\text{--}75\%$; grade 4, $75\text{--}100\%$, as described (Shen et al., 2018). PAS evaluation was realized by visual approach, using parameters such as mesangial proliferation (glomeruli parameter); regeneration, tubular atrophy, and tubular dilatation (tubular parameters); fibrosis, peritubular, and perivascular inflammatory infiltrate. Total renal damage is the sum of those parameters. At least 20 glomeruli were analyzed in each group. Sirius Red staining was used to evaluate tubulointerstitial fibrosis index. The areas of interstitial fibrosis were evaluated in 10 random $400\times$ magnification fields stained. For fibrosis quantification, the percentage stained area out of the total area was calculated in five randomly chosen fields ($\times 200$ magnification) using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics Inc. Rockville, MD, USA), and results were expressed as fold-change over control. Picrosirius red sections were also viewed with polarization contrast illumination in a Leica DMD108 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Immunohistochemistry was performed in a Dako Autostainer (Dako), as described previously (Lavoz et al., 2018). Firstly, endogenous peroxidase was blocked, and then, sections were incubated for 30 min at room temperature or overnight at 4°C with primary antibodies as described later, followed by 1 h of secondary antibody incubation (AP132B and AP124B, dilution: 1:200; Merk Millipore). Finally, the EnVision™ DuoFLEX Doublestain System using 3,3'-diaminobenzidine was used. Sections were counterstained with hematoxylin and evaluated by optical microscopy. Images were obtained with a Nikon Eclipse E400 microscope and analyzed with Image Pro-plus (Media Cybernetics Inc. Rockville, MD, USA). Negative controls included nonspecific immunoglobulin and no primary antibody (not shown). IL-17A and interstitial infiltrating cells were detected by staining with anti-IL-17A (ab9565, dilution: 1:100, Abcam, Cambridge, U.K.), anti-F4/80 for monocytes/macrophages (MCA497, dilution: 1:70, Bio-Rad), anti-CD3 for T lymphocytes (A0452, dilution: 1:150, Dako), anti-CD4 for T helper lymphocytes (IS649, ready to use, Dako), anti- $\gamma\delta$ -TCR for $\gamma\delta$ lymphocytes (331201, dilution: 1:250; Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-myeloperoxidase for neutrophils (A0398, dilution: 1:1,000, Dako), or anti-tryptase for mast cells (IR640; ready to use, Dako) antibodies.

For immunofluorescence staining, primary antibodies were followed by their corresponding anti-IgG Alexa488- or Alexa633-conjugated secondary antibody. Nuclei were counterstained

with 4,6-diamidino-2-phenylindole. Samples were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies Corporation) and examined by using a Leica DM-IRB confocal microscope.

Protein Studies

Proteins were obtained from mouse or rat kidneys using lysis buffer (50 mmol/l Tris-hydrochloric acid, 150 mol/l sodium chloride, 2 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid, 2 mmol/l egtazic acid, 0.2% Triton X-100, 0.3% IGEPAL, 10 μ l/ml proteinase inhibitor cocktail, 0.2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.2 mmol/l orthovanadate). Protein levels were quantified using a Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). For Western blotting, cell protein extracts (20–25 μ g/lane) or cell supernatants (25–30 μ l/lane) were separated on 6–12% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gels under reducing conditions. Samples were then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (BioRad, Spain), blocked with Tris-buffered saline/5% nonfat milk/0.05% Tween-20, and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies. The quality of proteins and efficacy of protein transfer were evaluated by Red Ponceau staining (data not shown). After washing, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences) and developed using Luminata™ Crescendo Western horseradish peroxidase substrate (Millipore). Digital chemiluminescence images were taken by LAS 4000 (GEHealthcare) and quantified by Quantity One® software. The following primary antibodies were employed [dilution]: p-AKT1/2/3 (sc-271966 [1:500], Santa Cruz Biotechnology), pSmad2/3 (sc-11760 [1:500] Santa Cruz Biotechnology), kallikrein (420308 antibody, 1:100 dilution, Calbiochem), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ([1:5,000]; Chemicon International), and α -tubulin (T5168 [1:10,000], Sigma-Aldrich).

Gene Expression Studies

RNA was isolated with the TriPure reagent (Roche) from renal tissue pulverized in a metallic chamber. Complementary DNA was synthesized by a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) using 2 μ g of total RNA primed with random hexamer primers following the manufacturer's instructions. Next, quantitative gene expression analysis was performed by real-time PCR on an AB7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems) using fluorogenic TaqMan MGB probes and primers designed by Assay-on-Demand™ gene expression products. Mouse assay IDs were: *Kidney injury molecule 1 (Kim1 or Havcr1)*, Mm00506686_m1; *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal or Lcn2)*, Mm01324470_m1; *Fibronectin (Fn1)*, Mm01256744_m1; *type I collagen (Col1a2)*, Mm00483888_m1; *Plasminogen activator inhibitor (pai-1 or Serpine)*, Mm00435858_m1; *Monocyte chemoattractant protein1 Mcp1 (Ccl2)*, Mm00441242_m1; *Rantes (Ccl5)*, Mm01302428_m1; *IL23a*, Mm00518984_m1; *IL23r*, Mm00519943_m1; *Klk-1*, Mm00834006_g1; *IL6*, Mm00446190_m1; *Icam1*, Mm00516023_m1; *Vcam1*, Mm01320970_m1; *Tnfa*, Mm00443258_m1; *IL1 β* , Mm00434228_m1; *Tlr4*,

Mm01302428_m1. Data were normalized to mouse *gapdh*: Mm99999915_g1. The messenger RNA (mRNA) copy numbers were calculated for each sample by the instrument software using the Ct value ("arithmetic fit point analysis for the lightcycler"). Results were expressed in copy numbers, calculated relative to unstimulated cells after normalization against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Statistical Analysis

Results throughout the text are expressed as mean \pm SEM of fold increase over control. Differences between groups were assessed by Student t (cells), Mann-Whitney (mice) and nonparametric analysis of variance (rats) tests. Statistical significance was assumed when a null hypothesis could be rejected at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego California USA).

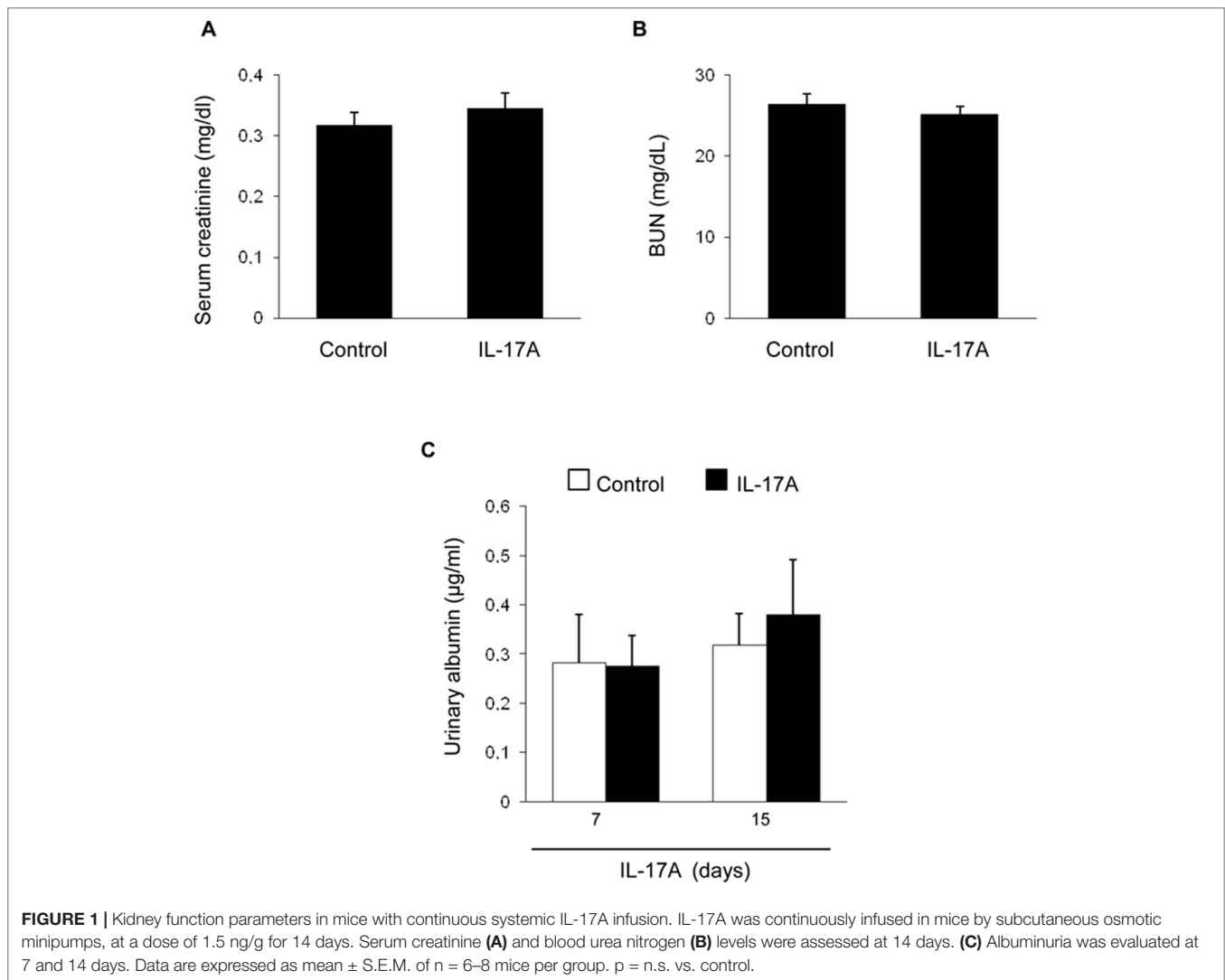
RESULTS

Systemic Infusion of Interleukin 17A in Mice Increased Blood Pressure and Induced Kidney Inflammation

Systemic IL-17A infusion in mice increased systolic blood pressure over control values (117 ± 4 mm Hg vs. 88 ± 3 mm Hg; $p < 0.05$ vs control, $n = 6-8$ mice per group at 14 days). However, IL-17A infusion did not modify renal function as assessed by serum urea and creatinine (Figures 1A, B) or spot albuminuria (Figure 1C). These data suggest no significant impact of IL-17A infusion on parameters of kidney function or injury that are commonly used in the clinic, at the time points studied. A more sensitive assessment of kidney injury explored kidney gene expression of two biomarkers, *Kim-1* and *Ngal*. There was a nonsignificant trend toward higher kidney *Kim-1* mRNA levels, while *Ngal* was upregulated by IL-17A infusion (Figure 2). These data, evidencing subclinical kidney injury, suggest that the clinically significant kidney injury might eventually occur on longer follow-up.

Histopathological evaluation of PAS-stained samples revealed no significant damage to parenchymal renal cells after 2 weeks of IL-17A infusion (Figure 3), no tubular injury (dilatation or atrophy) was found, the brush border was preserved in all mice, and there were no proteinaceous casts or evidence of interstitial fibrosis (Figures 3A, B). Interestingly, IL-17A-infused mice showed increased inflammatory cell infiltration (Figure 3C), including isolated leukocytes in scattered glomeruli (marked by arrows in Figure 3A).

Cell infiltrates were further characterized by immunohistochemistry. T-lymphocytes, neutrophils, monocyte/macrophages, and mastocytes were observed in the kidneys of IL-17A-infused mice, whereas while few inflammatory cells were detected in controls (Figures 4A–C). To investigate the mechanisms involved in IL-17A-induced renal inflammatory cell recruitment, we evaluated the expression of genes encoding pro-inflammatory chemokines and cytokines. In IL-17A-infused

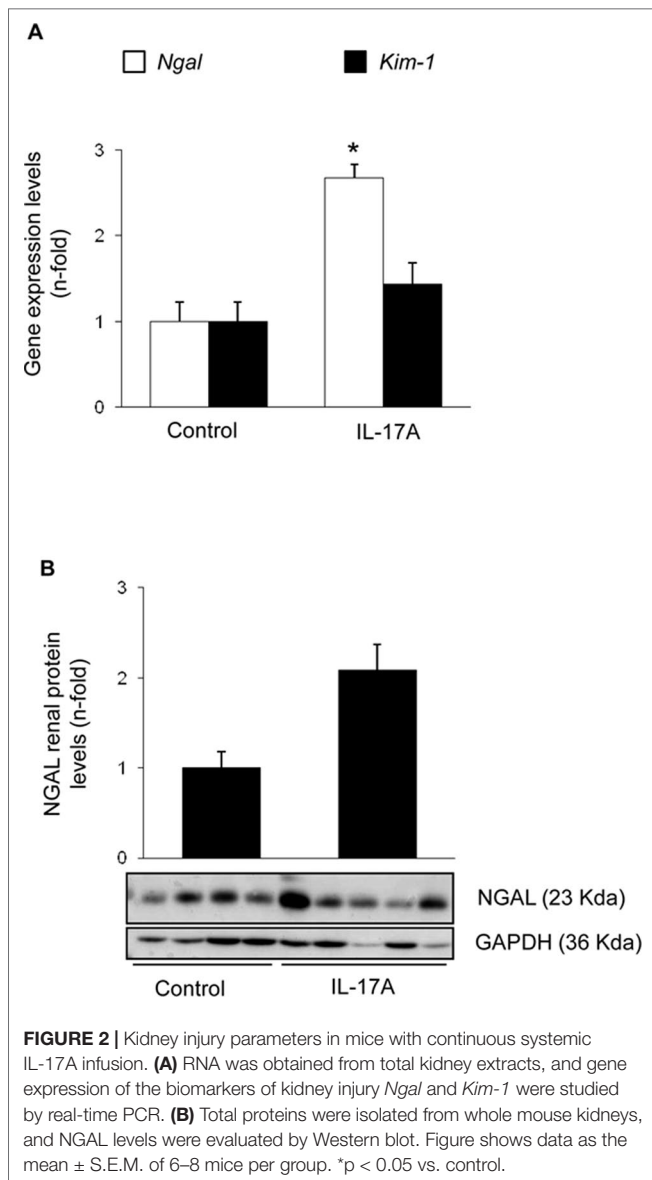


mice, renal expression levels of *Ccl-2* (encoding MCP-1) and *Ccl-5* (encoding RANTES) were significantly increased when compared with the control group (Figure 5A). Some proinflammatory-related genes were slightly upregulated, as *IL-23r* mRNA, whereas other genes were not changed, as the cytokines *il-6* and *il1-β* (Figure 5A). Interestingly, administration of IL-17A increased renal *kallikrein-1* gene and protein levels, observed by quantitative PCR, and immunohistochemistry (Figures 5B–D). Additionally, evidence of intracellular signaling activation (Smad and Akt pathways) was found in IL-17A-infused mice (Figure 6).

To further evaluate renal effects of systemic elevated IL-17A, gene expression encoding profibrotic factors or extracellular matrix components (ECM) was evaluated. There were no changes in the mRNA expression levels of the ECM components *type I procollagen* or *fibronectin*, neither in profibrotic factors, such as *PAI-1* (Figure 7A). This finding was consistent with the absence of kidney collagen accumulation, as assessed by Picrosirius red staining (Figures 7B, C).

Treatment With an Anti-IL-17A Neutralizing Antibody Markedly Reduced Renal Inflammation in AngII-Infused Mice

Next, we tested whether IL-17A blockade with a neutralizing antibody modulated renal inflammation *in vivo* in the well-characterized model of sustained renal inflammation triggered by systemic AngII infusion in mice (Alique et al., 2014). First, the histopathological injury was evaluated by PAS and Picrosirius red staining (Figure 8). In AngII-infused mice, no relevant renal damage was observed (Figure 8B) but significantly increased inflammatory cell infiltration (Figure 8C) and collagen deposition (Figure 8D) compared with controls was found. IL-17A neutralization decreased AngII-induced kidney inflammatory cell infiltration (Figure 8C) and diminished the presence of CD3⁺ T-lymphocytes and neutrophils (Figures 9A, B). Moreover, IL-17A blockade markedly decreased kidney gene expression induced by AngII, including lower expression of *Ngal* (Figure 10 A). Importantly, there was a significant downregulation of genes encoding pro-inflammatory factors (including the chemokine



ccl-2, the adhesion molecule *vcam*, and the cytokine *tnf- α* and there is a tendency to decrease in *thr-4*), supporting a key role of IL-17A in the regulation of inflammatory process in experimental renal damage (Figure 10C). In contrast, IL-17A neutralization did not ameliorate AngII-induced collagen deposition, observed by Picosirius red staining (Figure 8D). Accordingly, IL-17A blockade did not change gene expression levels of the ECM components fibronectin and collagen upregulated by AngII administration (Figure 10B).

Expression of IL-17A in Human Renal Biopsies From Patients With a Diagnosis of Hypertensive Nephroangiosclerosis

In renal biopsies of patients with a clinical and histopathological diagnosis of hypertensive nephroangiosclerosis, IL-17A positive cells were found localized mainly in areas of focal

inflammatory cell infiltration (Figure 11A). Th17 cells were identified by confocal microscopy as CD4⁺/IL-17A⁺ cells (Figure 11B). Among other cell types producing IL-17A, IL-17A⁺/ $\gamma\delta$ T lymphocytes were also observed in diseased kidney (Figure 11B). Thus, IL-17A may be produced by different types of infiltrating leukocytes in patients with hypertensive kidney disease.

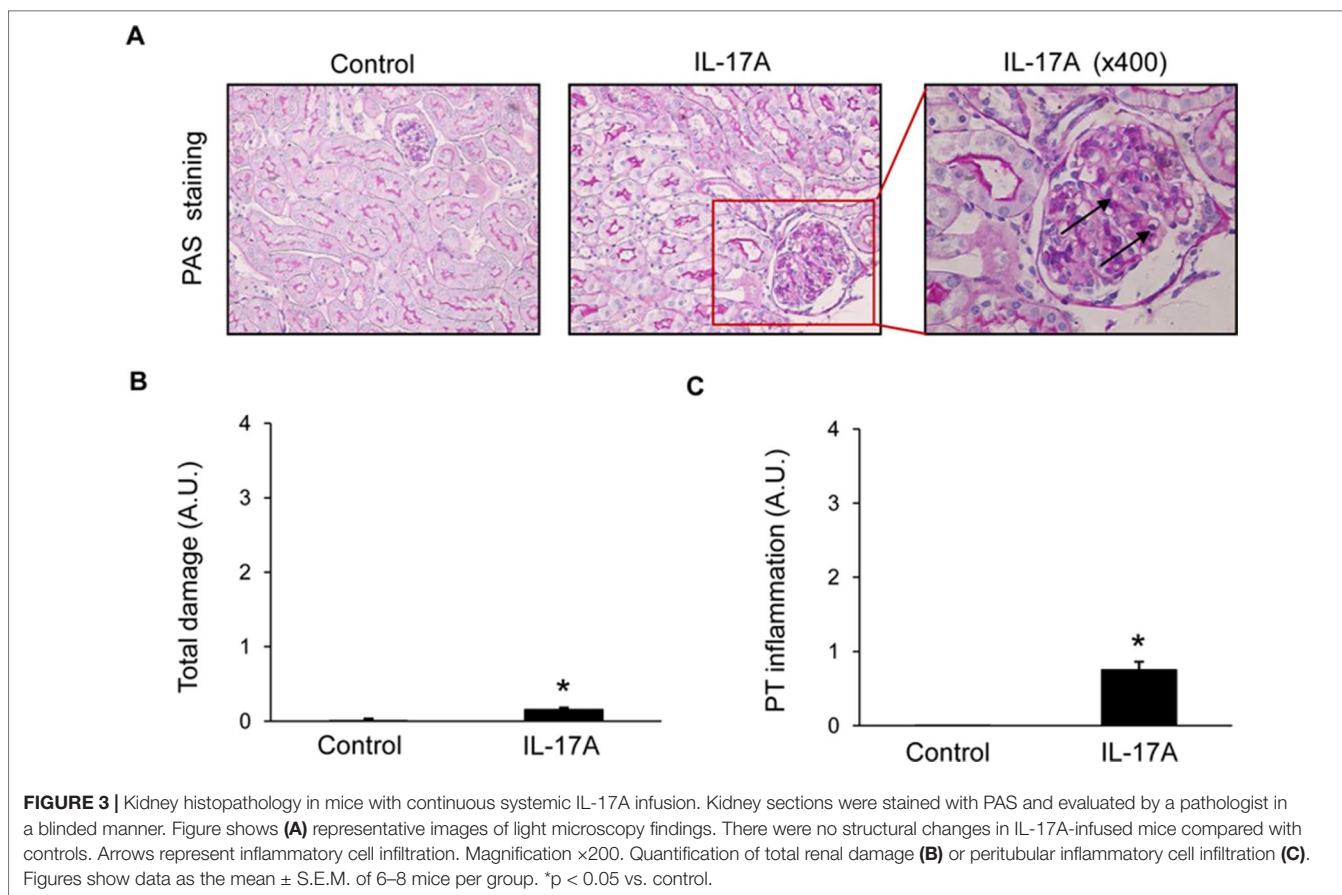
Expression of Interleukin 17A in the Kidney of Hypertensive Animals

The presence of IL-17A in hypertensive kidneys was also observed in two rat models: AngII infusion and SHR rats. In AngII-infused rat kidneys, positive IL-17A immunostaining was found, whereas no IL-17A signal was observed in control rat kidneys (Figure 12A). The presence of $\gamma\delta$ T lymphocytes was also detected in AngII-infused rats (Figure 12A). Double immunostaining identified CD4⁺ lymphocytes as a source of IL-17A in hypertensive rat kidneys (Figure 12B). Moreover, ELISA of kidney homogenates demonstrated increased kidney IL-17A protein levels in both AngII-infused and SHR rats (Figure 12C).

DISCUSSION

Our experimental studies in a model of IL-17A systemic administration of low circulating concentration levels of this cytokine demonstrate the involvement of IL-17A in the recruitment of inflammatory cells into the kidney. Our data confirm and extend previous studies showing that IL-17A targeting decreased kidney inflammation in preclinical models of renal damage, suggesting that the blockade of IL-17A could be an anti-inflammatory treatment to prevent hypertension-induced renal inflammation.

Until now, there exist no studies demonstrating kidney parenchymal cells production of IL-17A. However, many cell types express IL-17A receptors. Several *in vitro* studies have described that IL-17A activates tubular epithelial cells, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, and fibroblasts, to release a large array of proinflammatory mediators, including chemokines, such as MCP-1, RANTES, CXCL1, and CXCL8, which, in turn, may recruit T cells and macrophages leading to target organ injury (Van Kooten et al., 1998; Gaffen, 2009; Pietrowski et al., 2011; Zhang et al., 2013). IL-17A can also directly promote monocyte chemotaxis *in vivo* and *in vitro* (Sergejeva and Lindén, 2009; Shahrara et al., 2009), contributing to amplify the recruitment of immune cells to injured tissues. Accordingly, our *in vivo* results showed that systemic IL-17A administration significantly upregulated renal gene expression of MCP-1 and RANTES associated to the recruitment inflammatory cells to the kidney. Given the increased immune cell infiltration detected in the IL-17A-infused mice kidneys, overexpression of a large array of inflammatory mediators could be expected. However, mRNA levels of relevant proinflammatory cytokines, as *il-6* and *il-1 β* were no changed by IL-17A systemic administration. Correspondingly, in the model of AngII-induced renal damage,

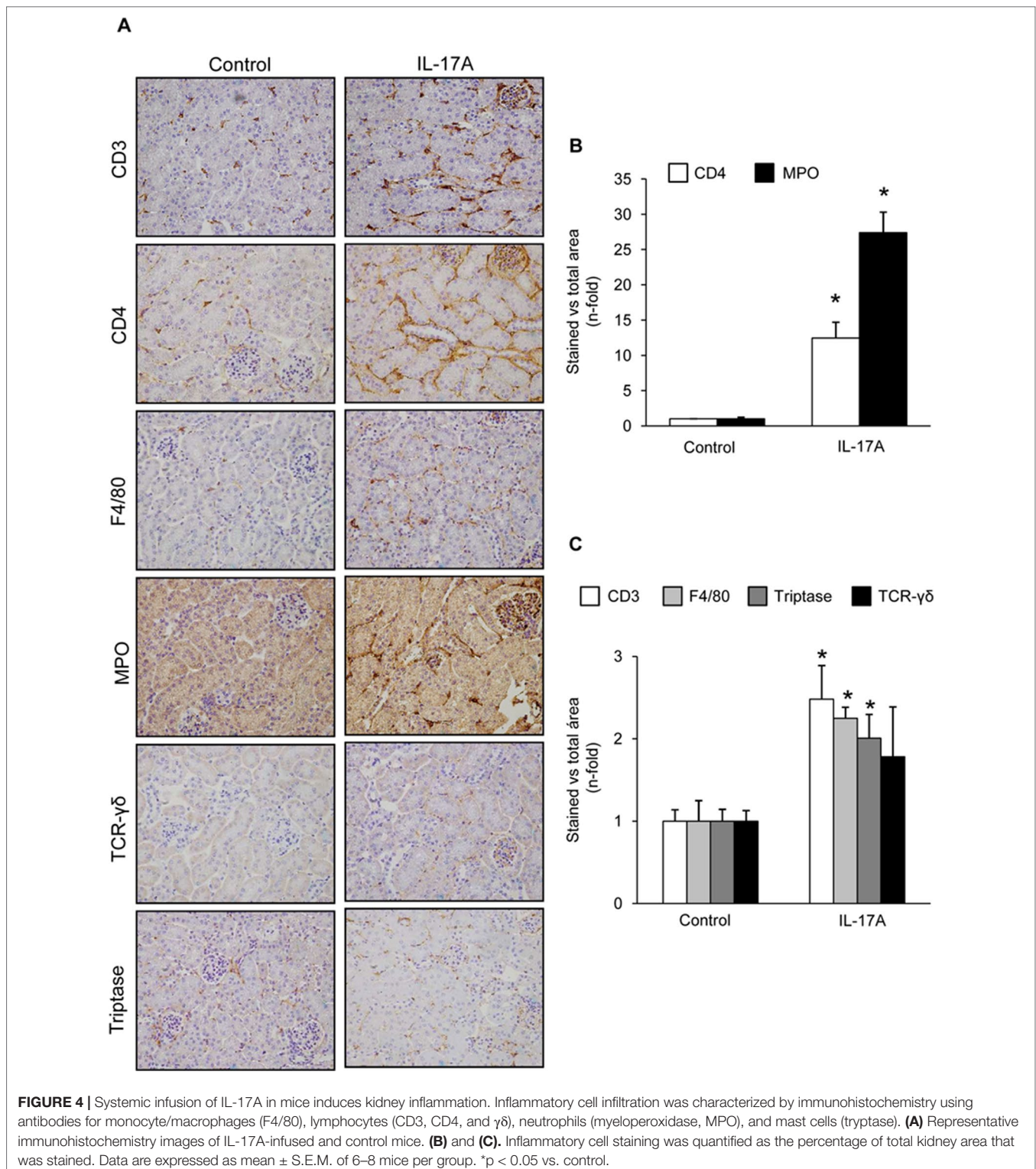


those genes were not diminished by IL-17A neutralization treatment. In cultured cells, stimulation with IL-17A did not upregulate many proinflammatory genes by itself. However, IL-17A in combination with other inflammatory cytokines showed a synergist inflammatory effect (Erbel et al., 2009). Regarding cultured renal cells, IL-17A increases the production of MCP-1 in tubular epithelial cells (Van Kooten et al., 1998). MCP-1 is a key driver of inflammatory cell recruitment to the kidneys, mainly of monocyte/macrophages, and has been proposed as a biomarker of kidney damage. Indeed, MCP-1 blockade is nephroprotective in preclinical studies decreasing renal inflammation and is undergoing clinical trials for CKD (Tesch, 2008; Haller et al., 2016). Our *in vivo* data suggest that MCP-1 is a key target of IL-17A-mediated renal inflammation, as demonstrated by the significant upregulation at gene levels in IL-17A infused mice and by the inhibitory effect of IL-17A blockade in AngII-infused mice. These data suggest that MCP-1 could be a key downstream mediator of IL-17A renal actions and support the concept of IL-17A as a proinflammatory cytokine involved in renal inflammation.

Many studies mainly developed in vascular cells have investigated the molecular pathways activated by IL-17A. Most of them have focused on the inflammatory responses to IL-17A and have shown increased reactive oxygen species (ROS) production, modulation of nitric oxide levels, and activation

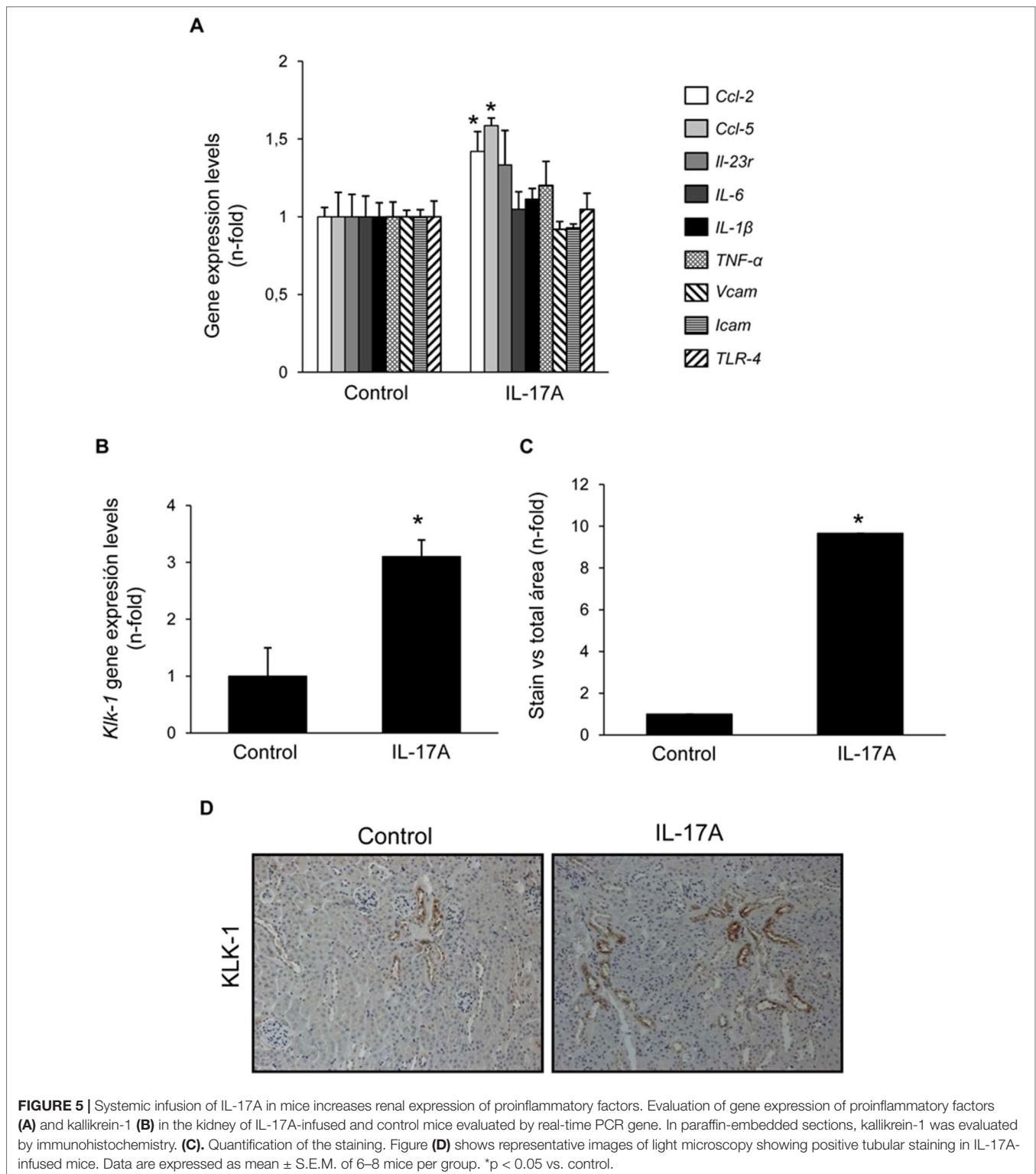
of protein kinases, including RhoA/Rho-kinase and the MAPK cascade (Pietrowski et al., 2011; Xing et al., 2013; Zhang et al., 2013; Karchach et al., 2014; Wu et al., 2016). In this regard, IL-17A signaling has been extensively studied in preclinical atherosclerosis. However, both protective (Erbel et al., 2009; Smith et al., 2010) and deleterious effects (Akhavanpoor et al., 2017) have been described, illustrating the complexity of the system and potential contributions of the stage of the disease and the local microenvironment. Now, we have extended these mechanisms to the regulation of Smad and Akt pathways. All these data support the role of IL-17A in the regulation of inflammatory process in pathological conditions, including renal diseases and hypertension.

Experimental studies have demonstrated the involvement of T cells and T-cell-derived cytokines in the pathogenesis of hypertension (McMaster et al., 2015). Indeed, IL-17A-expressing cells were observed in target tissues of hypertension-induced damage, including the cardiovascular system and the kidneys (Madhur et al., 2010; McMaster et al., 2015; Saleh et al., 2016), as observed here in experimental hypertension in rats. In mice infused with AngII, T cell infiltrates were described in the adventitia and periadvential fat of the aorta associated with positive IL-17A immunostaining (Madhur et al., 2010). Kidney and aorta cells producing IL-17A were identified as Th17 and $\gamma\delta$ T lymphocytes (Saleh et al., 2016). Interestingly, in murine



AngII-induced hypertrophic hearts, $\gamma\delta$ T lymphocytes are the main sources of IL-17A (Li et al., 2014). IL-17A production by $\gamma\delta$ T cells has been involved in antifungal immunity and in the onset of autoimmune disease (Fenoglio et al., 2009; Hirata et al., 2011). Human IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells are generated in the

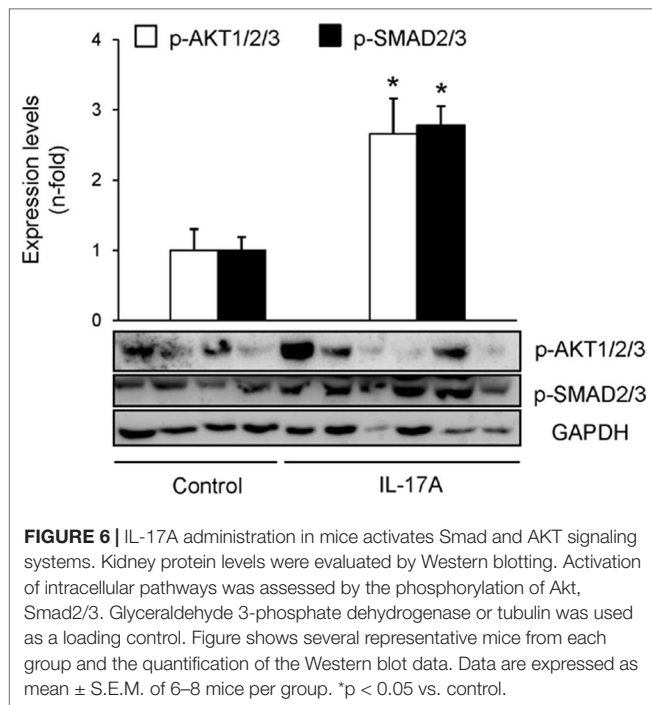
periphery and can be recruited to and accumulate in inflamed tissues, contributing to sustain inflammation (Shiromizu and Jancic, 2018). Importantly, our analysis of human kidney biopsies of hypertensive patients with nephroangiosclerosis showed positive IL-17A immunostaining, mainly in areas of



interstitial inflammatory cell infiltration, identified as Th17 lymphocytes (CD4⁺/IL-17A⁺) and $\gamma\delta$ T lymphocytes. The novel finding that $\gamma\delta$ T cells express IL-17A in the kidney of hypertensive patients with nephroangiosclerosis remark the importance of additional studies evaluating whether specific

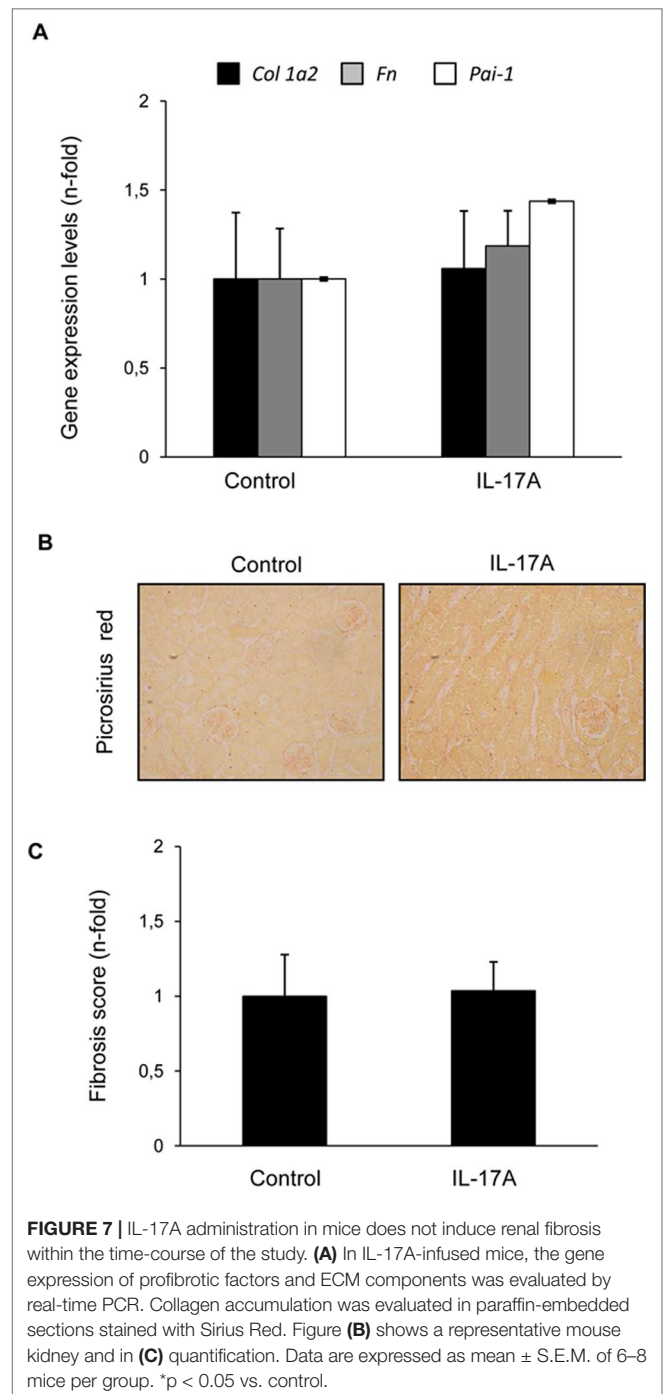
pharmacological inhibition of $\gamma\delta$ T cells could be used to treat hypertensive end-organ damage.

In this regard, blockade of the Th17/IL-17A axis has been suggested as a novel treatment for inflammatory kidney diseases. Beneficial effects of IL-17A blockade were described in



preclinical immune- and nonimmune-mediated renal damage (Xue et al., 2011; Rodrigues-Díez et al., 2013; Peng et al., 2015; Ramani et al., 2016), as observed here by the anti-inflammatory effects observed in the model of AngII infusion. IL-17A blockers are tested for chronic inflammatory diseases, such as Crohn disease (NCT00936585), spondyloarthritis (NCT03358134), and psoriasis (NCT03403036). The presence of IL-17A-expressing cells in the kidneys of patients with hypertensive nephrosclerosis supports the clinical translation of our experimental findings and suggests that IL-17A blockade could be considered as a potential approach to prevent hypertension-induced kidney inflammation. In a recent study, we have found that therapeutic treatment with an anti-IL-17A neutralizing antibodies, starting after nephropathy, had already developed, improved kidney dysfunction and decreased kidney NF- κ B activation, proinflammatory factors and inflammatory cell infiltration in experimental diabetic nephropathy in BTBR ob/ob (leptin deficiency mutation) mice (Lavoz et al., 2019), a model that uniformly develops human diabetic nephropathy features (Hudkins et al., 2010). The importance of inflammatory cytokines in the development of end-stage renal disease in diabetes has been recently demonstrated (Niewczas et al., 2019). Anti-inflammatory strategies are currently being explored in human clinical trials for diabetic kidney disease. Since hypertension frequently accompanies and accelerates CKD progression in other nephropathies, including the most common cause of end-stage renal disease, diabetic nephropathy, the clinical translation of our findings may not be limited to hypertensive kidney disease. However, only eventual clinical trials may answer the question of human translation.

Some evidences suggest that IL-17A contributes to fibrosis in several organs, such as skin and liver, but kidney data are



contradictory (Ramani and Biswas, 2019). Targeting IL-17A or its receptor by gene deletion or pharmacological approaches in different experimental models of renal damage showed decreased or exacerbated fibrosis (Mehrotra et al., 2017; Sun et al., 2018; Ramani et al., 2018). In our present study, neither ECM gene upregulation nor collagen accumulation was found in the kidneys of IL-17A-infused mice. In addition, IL-17A neutralization treatment did not ameliorate AngII-induced renal fibrosis. IL-17A increases ECM synthesis in several culture cells, including skin fibroblasts, but this cytokine

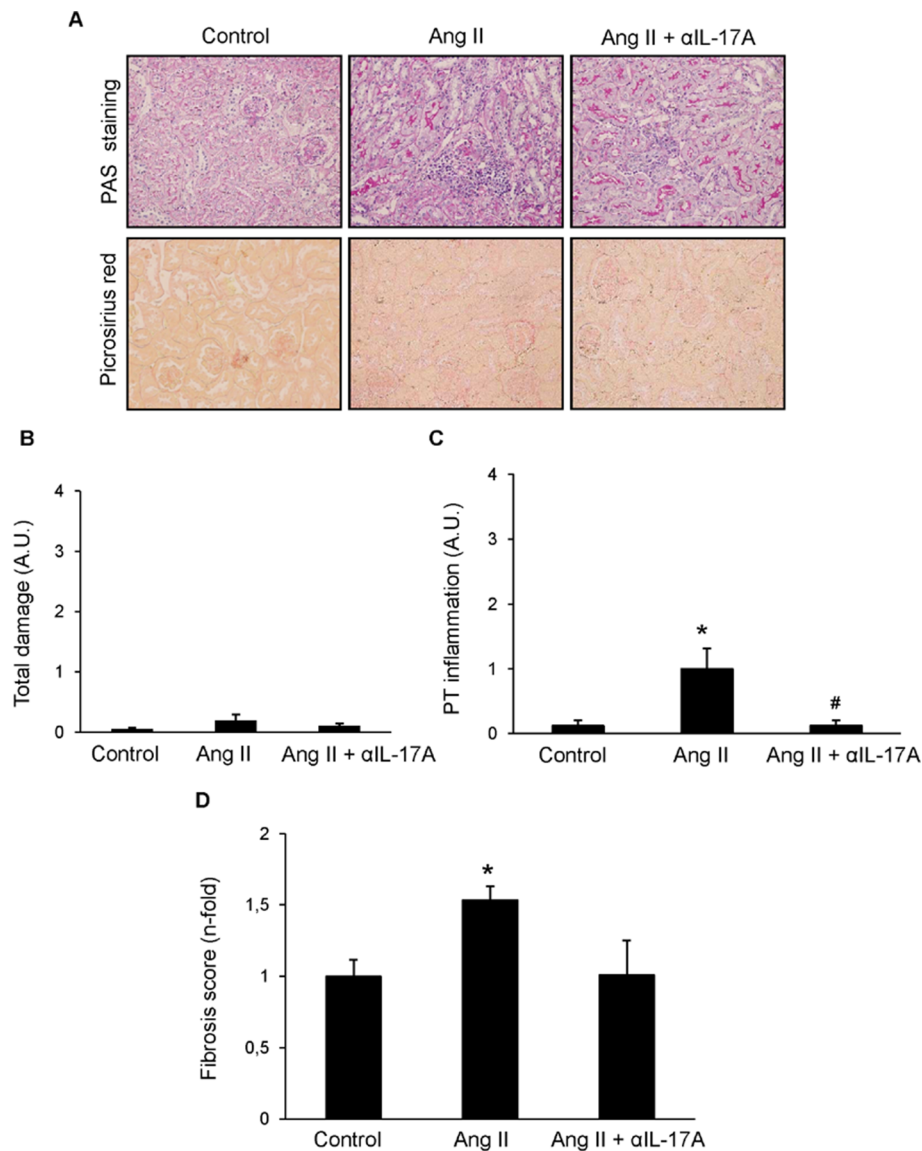
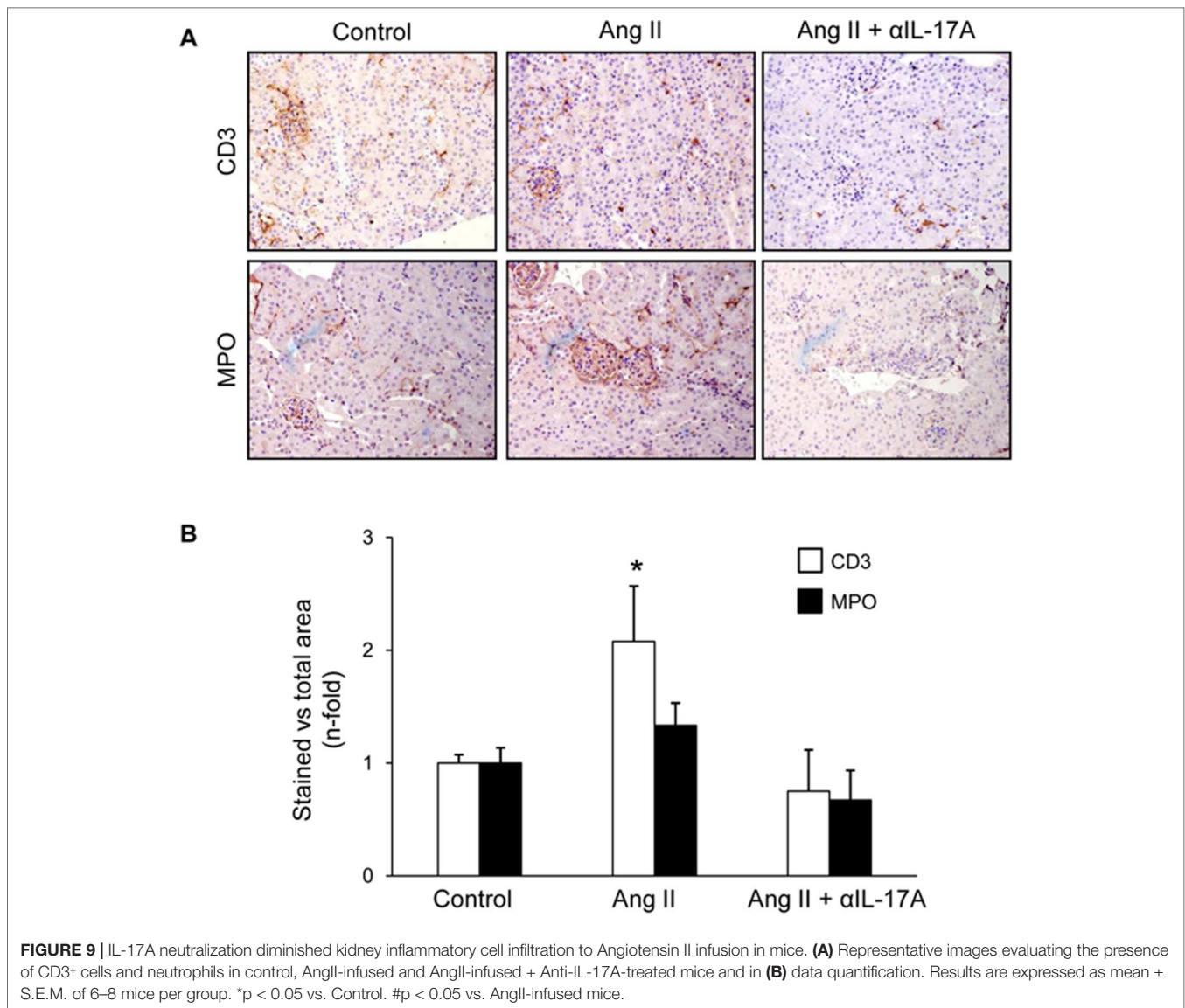


FIGURE 8 | Effect of IL-17A neutralization on renal morphology and fibrosis in the model of angiotensin II infusion in mice. Mice were infused with 1,000 ng/kg/min angiotensin II (Ang II) for 14 days, treated or not with a neutralizing antibody against IL-17A (100 µg/mouse i.p. every 4 days), and compared with control mice. **(A)** Kidney sections were stained with PAS and picrosirius red. Figures show representative images of light microscopy. Magnification $\times 200$. The quantification of renal lesion **(B)**, inflammatory infiltration **(C)**, and collagen **(D)** is also shown. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 6–8 mice per group. * $p < 0.05$ vs. Control. # $p < 0.05$ vs. AngII-infused mice.

could also contribute to ECM degradation by regulating metalloproteinases (Ramani and Biswas, 2019). In this regard, unilateral ureteral obstruction in IL-17 receptor knockout mice showed exacerbated renal fibrosis, increased renal kallikrein-1, and lower neutrophil, but not macrophages, infiltration that were restored by bradykinin treatment (Ramani et al., 2018). These authors suggest that IL-17 renal protection against fibrosis is due to metalloproteinase-2 diminution *via* kallikrein–kinin system regulated process. Other findings support the direct relation of IL-17A and kallikrein-1 in the kidney (Ramani et al., 2016). Accordingly, we have found that

systemic IL-17A administration increased renal kallikrein-1 gene and protein levels, associated to neutrophils infiltration in the kidney, but no fibrosis.

Another important finding of our study is that IL-17A increased blood pressure. The mechanisms involved in the regulation of blood pressure are complex. Previous studies have demonstrated that IL-17A can directly induce hypertension associated to endothelial dysfunction, as observed in transgenic mice overexpressing IL-17A in keratinocytes (Karbach et al., 2014), or by intraperitoneal administration of high doses of recombinant IL-17A



(Nguyen et al., 2013). The dose chosen in our study is expected to provide IL-17A exposure in the range described in pre-hypertensive patients (Yao et al., 2015) and suggests that low circulating IL-17A levels could be involved in the generation of hypertension. In this regard, IL-17A knockout mice were protected from Ang-II-induced increase in blood pressure. Moreover, AngII-induced changes in endothelium-dependent vasodilatation, phenylephrine-induced contraction, and ROS production were also prevented in IL-17A deficient mice (Madhur et al., 2010). RhoA/Rho-kinase and NO regulation contribute to IL-17A-mediated hypertension (Nguyen et al., 2013). Recent studies indicate that TLR-4 participates in hypertension (Biancardi et al., 2017) and in the regulation of experimental renal inflammation (Lin et al., 2012; Gonzalez-Guerrero et al., 2017). In TLR4 knockout mice, AngII-dependent blood pressure increase was blunted, in association with a diminution in ROS production, renal macrophage

infiltration, and MCP-1 expression (Pushpakumar et al., 2017). We have observed that blockade of IL-17A significantly diminished renal *tlr-4* mRNA upregulation in AngII-infused mice, suggesting interplay between IL-17A and TLR-4 beneficial effects. Cytokines, including TGF- β 1, TNF α , IFN γ , IL-1 β , and IL-17A, may regulate blood pressure through effects on endothelial dysfunction, salt and water balance, and sympathetic regulation (Wen and Crowley, 2018). Accordingly, IL-17A-KO mice infused with AngII had preserved diuresis and natriuresis responses to an acute saline challenge (Kamat et al., 2015). However, IL-17A modulates the expression and activity of sodium transporters along the nephron. IL-17A deficiency abolished the activation of distal tubule transporters, specifically the sodium-chloride cotransporter and the epithelial sodium channel, and decreased AngII-induced renal damage (Norlander et al., 2016). Our study shows that IL-17A increases blood pressure, and therefore,

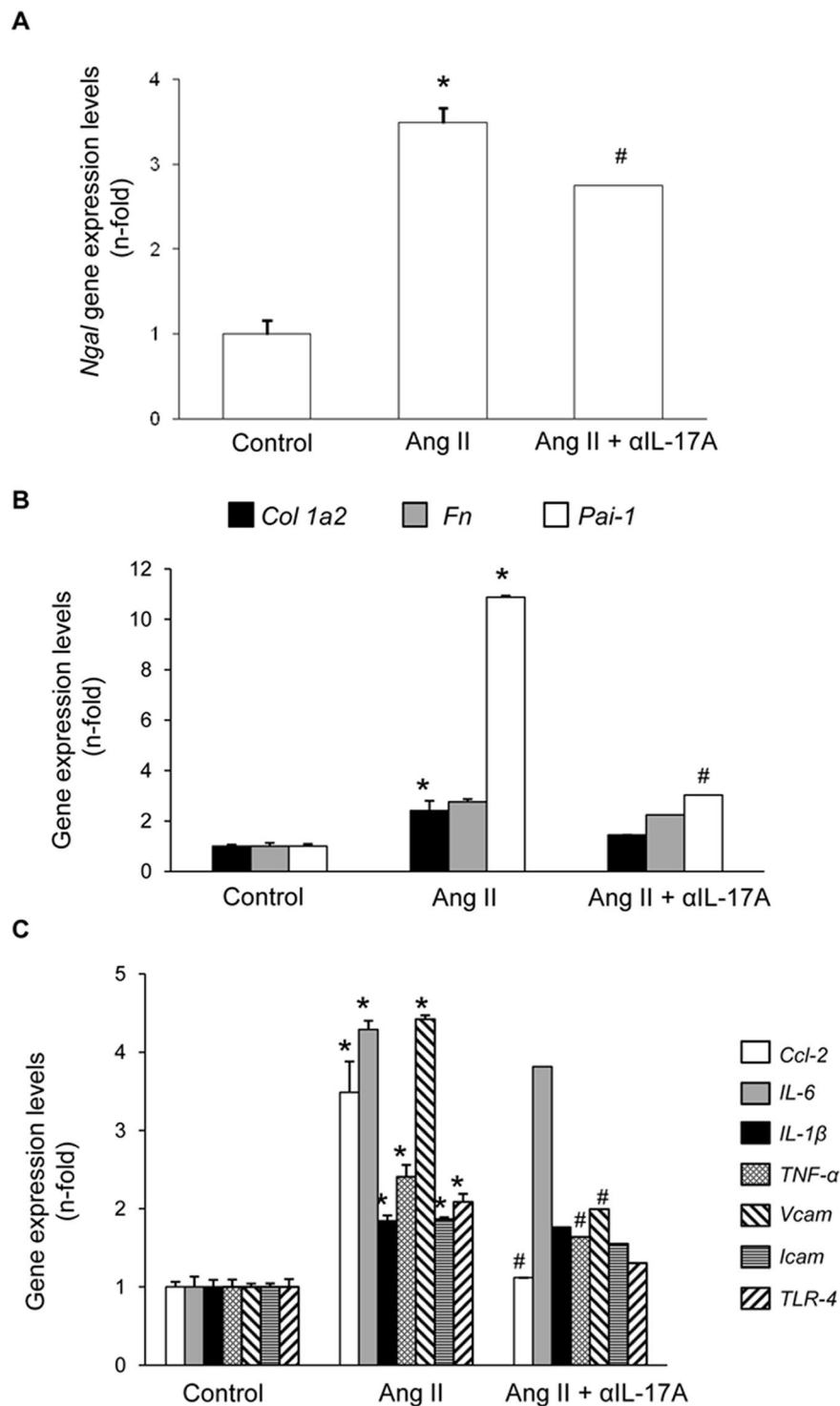
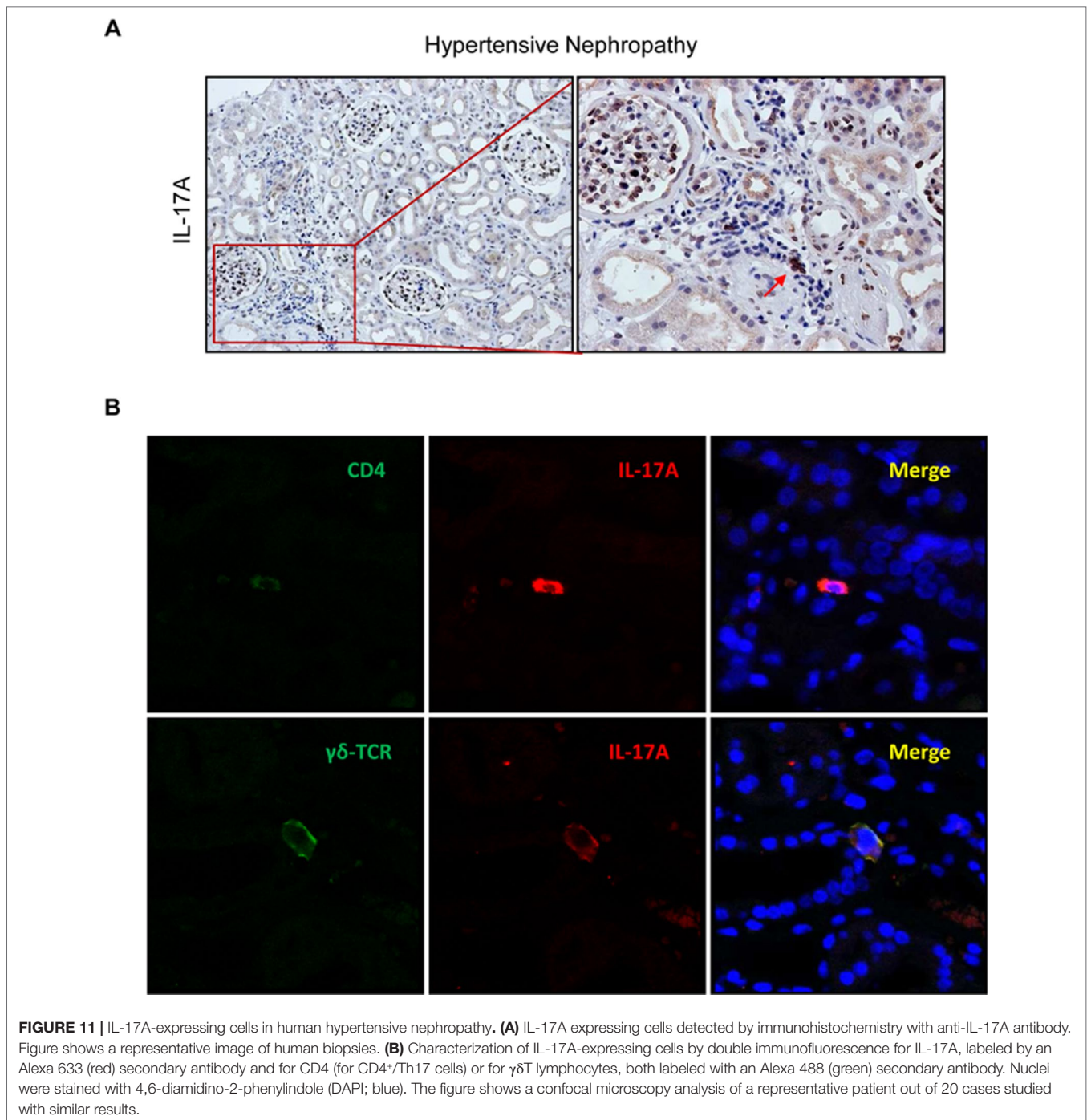


FIGURE 10 | Effect of IL-17A neutralization on renal gene expression in Angiotensin II-infused mice. Figures show renal gene expression levels of N-gal (A), Collagen-1, Fibronectin, PAI-1 (B), Ccl-2, Ccl-5, Il-23r, IL-6, IL-1β, TNF-α, Vcam, Icam and TLR-4 (C). Renal mRNA expression was evaluated by real-time PCR. Figures show the mean ± S.E.M. of 6–8 mice per group. *p < 0.05 vs. Control. #p < 0.05 vs. AngII-infused mice.

additional studies are needed to further address the relation between IL-17A, hypertension, and renal inflammation.

Our present study has other limitations. The systemic IL-17A infusion in C57BL/6 mice increased blood pressure and

promoted the recruitment of inflammatory cells into the kidney, but, at the dose and time-points studied, this did not result in biochemical or histological evidence of kidney disease beyond inflammation. Whether higher doses or longer exposure to



IL-17A results in kidney disease should be addressed in future studies. In this regard, there was some evidence of subclinical parenchymal kidney injury. Thus, IL-17A-infused mice presented increased kidney *Ngal* expression. NGAL is expressed in the normal renal tubular epithelium and is overexpressed in AKI and CKD patients (Satirapoj, 2018). NGAL has been described as an early marker of kidney disease, since it is increased in urine during AKI before serum creatinine level elevation (Mori and Nakao, 2007; Devarajan, 2008; Parikh and

Devarajan, 2008), and it is also increased in populations at high risk of CKD before other evidence of CKD develops (Ramírez-Rubio et al., 2016).

In summary, the present data support a role of IL-17A in kidney inflammation that highlights a potential contribution to regulation of hypertension. Our results suggest that IL-17A blockade could eventually be explored as an anti-inflammatory approach to prevent hypertension-associated end-organ injury.

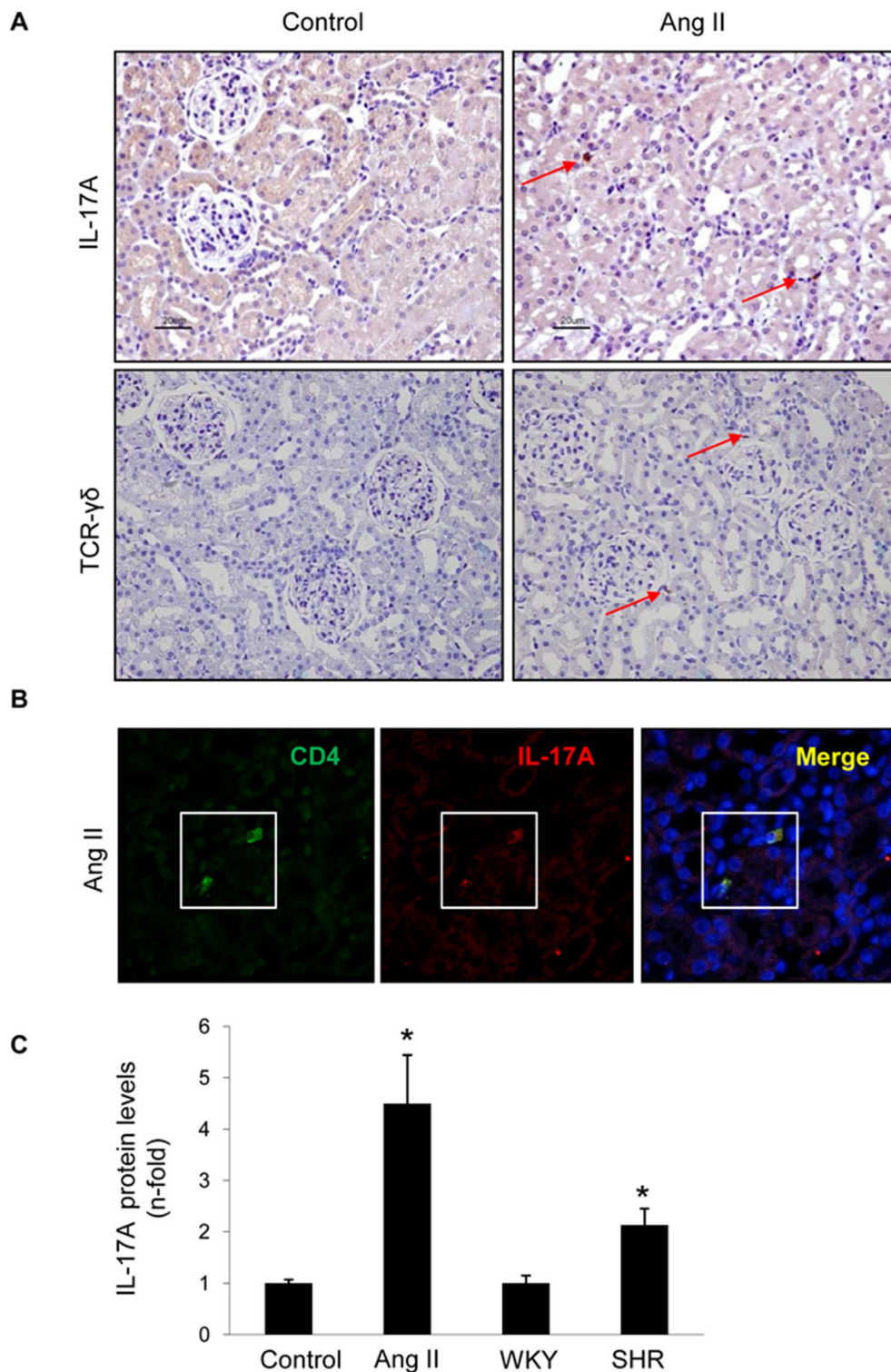


FIGURE 12 | IL-17A-expressing cells in the kidney of rats with experimental hypertension. **(A)** The presence of IL-17A and $\gamma\delta$ T lymphocytes was detected by immunohistochemistry. Figure shows a representative image. **(B)** Double immunofluorescence for IL-17A, labeled with an Alexa 633 (red) secondary antibody, and CD4 (for CD4⁺/Th17 cells) labeled with an Alexa 488 (green) secondary antibody. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). **(C)** IL-17A protein levels were evaluated in total protein renal extracts by ELISA. The figure shows a confocal microscopy analysis of a representative rat of four studied with similar results. * $p < 0.05$ vs control.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and the supplementary files.

ETHICS STATEMENT

All the procedures on animals were performed according to the European Community and Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz Animal Research Ethical Committee guidelines. Studies were performed in adult male C57BL/6 mice (9–12 weeks old, 20 g). All patients provided informed consent and this study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board. Only tissue remaining after a pathological diagnosis achieved was used for research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All the authors have reviewed the manuscript and approved the final version. MO and RRR-D contributed to the design of the experiments, acquisition, analysis and interpretation of all data, and drafted the manuscript. RR-D and AG-R contributed to design of the experiments, analysis and interpretation of data, and drafted the manuscript. LS-S and JR-G have participated in the

development of mouse models, histology, immunohistochemistry experiments, and analysis of data. PC-O has evaluated all histological samples in a blinded manner. AMR, AO, RS, SM, and CL contributed to the critical review of the manuscript and the financial support of the work. MR-O contributed to the design of the experiments, analysis and interpretation of the all data, draft of the manuscript, and financial support of the experiments.

FUNDING

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Fondos FEDER European Union (PI17/00119, Red de Investigación Renal REDINREN: RD16/0009/0007, and CIBER-CV CB16/11/00286), Sociedad Española de Nefrología, “NOVELREN-CM: Enfermedad renal crónica: nuevas Estrategias para la prevención, Diagnóstico y tratamiento” B2017/BMD-3751; PAI 82140017 and FONDECYT 1160465 (Chile). MO was a Fundación Conchita Rabago fellow and RR-D is supported by Postdoctoral MICINN Program IJCI-2017-31399; Spain.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank M^a Mar Gonzalez Garcia-Parreño for her technical help with confocal microscopy.

REFERENCES

- Akhavanpoor, M., Akhavanpoor, H., Gleissner, C. A., Wangler, S., Doesch, A. O., Katus, H. A., et al. (2017). The two faces of interleukin-17A in Atherosclerosis. *Curr. Drug Targets* 18 (7), 863–873. doi: 10.2174/1389450117666161229142155
- Alique, M., Civantos, E., Sanchez-Lopez, E., Lavoz, C., Rayego-Mateos, S., Rodrigues-Diez, R., et al. (2014). Integrin-linked kinase plays a key role in the regulation of angiotensin II-induced renal inflammation. *Clin. Sci. (Lond.)* 127 (1), 19–31. doi: 10.1042/CS20130412
- Baeten, D., Baraliakos, X., Braun, J., Sieper, J., Emery, P., van der Heijde, D., et al. (2013). Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 382 (9906), 1705–1713. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61134-4
- Baeten, D., Sieper, J., Braun, J., Baraliakos, X., Dougados, M., Emery, P., et al. (2015). Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* 373 (26), 2534–2548. doi: 10.1056/NEJMoa1505066
- Beringer, A., Noack, M., and Miossec, P. (2016). IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends Mol. Med.* 22 (3), 230–241. doi: 10.1016/j.molmed.2016.01.001
- Biancardi, V. C., Bomfim, G. F., Reis, W. L., Al-Gassimi, S., and Nunes, K. P. (2017). The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacol Res.* 120, 88–96. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.017
- Caillon, A., and Schiffrin, E. L. (2016). Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. *Curr. Hypertens. Rep.* 18 (3), 21. doi: 10.1007/s11906-016-0628-7
- Chehimi, M., Vidal, H., and Eljaafari, A. (2017). Pathogenic role of IL-17-producing immune cells in obesity, and related inflammatory diseases. *J. Clin. Med.* 6, 68. doi: 10.3390/jcm6070068
- Coffman, T. M. (2011). Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat. Med.* 17 (11), 1402–1409. doi: 10.1038/nm.2541
- Cortvrindt, C., Speckaert, R., Moerman, A., Delanghe, J. R., and Speckaert, M. M. (2017). The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology* 49, 247–258. doi: 10.1016/j.pathol.2017.01.003
- Devarajan, P. (2008). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) A new marker of kidney disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 241, 89–94. doi: 10.1080/00365510802150158
- Esteban, V., Ruperez, M., Vita, J. R., López, E. S., Mezzano, S., Plaza, J. J., et al. (2003). Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int. Suppl.* (86), S33–S38. doi: 10.1046/j.1523-1755.64.s86.7.x
- Erbel, C., Chen, L., Bea, F., Wangler, S., Celik, S., Lasitschka, F., et al. (2009). Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J. Immunol.* 183 (12), 8167–8175. doi: 10.4049/jimmunol.0901126
- Fenoglio, D., Poggi, A., Catellani, S., Battaglia, F., Ferrera, A., Setti, M., et al. (2009). Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans. *Blood* 113 (26), 6611–6618. doi: 10.1182/blood-2009-01-198028
- Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., and Lebecque, S. (1998). Interleukin-17. *Int. Rev. Immunol.* 16 (5-6), 541–551. doi: 10.3109/08830189809043008
- Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 556–567. doi: 10.1038/nri2586
- Gong, F., Liu, Z., Liu, J., Zhou, P., and Liu Y and Lu, X. (2015). The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis. *Cell. Immunol.* 297, 33–39. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.05.007
- González-Guerrero C., Cannata-Ortiz P., Guerri C., Egido J., Ortiz A., Ramos A.M., et al. (2017). TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 91, 1925–1939. doi: 10.1007/s00204-016-1830-8
- Guzik, T. J., and Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension.* 70 (4), 660–667. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802
- Haller, H., Bertram, A., Nadrowitz, F., and Menne, J. (2016). Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 25 (1), 42–49. doi: 10.1097/MNH.0000000000000186
- Hirata, T., Osuga, Y., Takamura, M., Saito, A., Hasegawa, A., Koga, K., et al. (2011). Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of

- cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil. Steril.* 96 (1), 113–117. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.060
- Kamat, N. V., Thabet, S. R., Xiao, L., Saleh, M. A., Kirabo, A., Madhur, M. S., et al. (2015). Renal transporter activation during angiotensin-II hypertension is blunted in interferon- γ -/- and interleukin-17A-/- mice. *Hypertension.* 65 (3), 569–576. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04975
- Karbach, S., Croxford, A. L., Oelze, M., Schöler, R., Minwegen, D., Wegner, J., et al. (2014). Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (12), 2658–2668. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304108
- Kvakan, H., Kleinewietfeld, M., Qadri, F., Park, J. K., Fischer, R., Schwarz, I., et al. (2009). Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation.* 119 (22), 2904–2912. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832782
- Lavoz, C., Poveda, J., Marquez-Exposito, L., Rayego-Mateos, S., Rodrigues-Diez, R. R., Ortiz, A., et al. (2018). Gremlin activates the Notch pathway linked to renal inflammation. *Clin. Sci. (Lond.)* 132 (11), 1097–1115. doi: 10.1042/CS20171553
- Lavoz, C., Rodrigues-Diez, R., Benito-Martin, A., Rayego-Mateos, S., Rodrigues-Diez, R. R., Alique, M., et al. (2012). Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. *PLoS One* 7 (7), e40490. doi: 10.1371/journal.pone.0040490
- Lavoz, C., Sánchez Matus, Y., Orejudo, M., Carpio, J. D., Droguett, A., Egido, J., et al. (2019). IL-17A blockade improves proteinuria and renal lesions in an accelerated model of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 95(6):1418–1432. doi: 10.1016/j.kint.2018.12.031
- Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., et al. (2012). Anti-Interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 366, 1190–1199. doi: 10.1056/NEJMoa1109997
- Li, Y., Wu, Y., Zhang, C., Li, P., Cui, W., Hao, J., et al. (2014). γ DT Cell-derived interleukin-17A via an interleukin-1 β -dependent mechanism mediates cardiac injury and fibrosis in hypertension. *Hypertension.* 64 (2), 305–314. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02604
- Lin, M., Yiu, W. H., Wu, H. J., Chan, L. Y., Leung, J. C., Au, W. S., et al. (2012). Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (1), 86–102. doi: 10.1681/ASN.2010111210
- Loverre, A., Tataranni, T., Castellano, G., Divella, C., Battaglia, M., Dittono, P., et al. (2011). IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* 11, 1248–1259. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03529.x
- Lu, Q., Ma, Z., Ding, Y., Bedarida, T., Chen, L., Xie, Z., et al. (2019). Circulating miR-103a-3p contributes to angiotensin II-induced renal inflammation and fibrosis via a SNRK/NF- κ B/p65 regulatory axis. *Nat. Commun.* 10 (1), 2145. doi: 10.1038/s41467-019-10116-0
- Madhur, M. S., Lob, H. E., McCann, L. A., Iwakura, Y., Blinder, Y., Guzik, T. J., et al. (2010). Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 55 (2), 500–507. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094
- Martin-Sanchez, D., Fontecha-Barriuso, M., Carrasco, S., Sanchez-Niño, M. D., Mässenhausen, A. V., Linkermann, A., et al. (2018). TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (16), 4182–4187. doi: 10.1073/pnas.1716578115
- McMaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S., and Harrison, D. G. (2015). Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ. Res.* 116 (6), 1022–1033. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303697
- Mease, P. J., McInnes, I. B., Kirkham, B., Kavanaugh, A., Rahman, P., van der Heijde, D., et al. (2015). Secukinumab Inhibition of Interleukin-17A in Patients with Psoriatic Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 373 (14), 1329–1339. doi: 10.1056/NEJMoa1412679
- Mehrotra, P., Collett, J.A., McKinney, S.D., Stevens, J., Ivancic, C.M., and Basile, D.P. (2017). IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 312(3):F385–F397. doi: 10.1152/ajprenal.00462.2016
- Mori, K., and Nakao, K. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int.* 71, 967–970. doi: 10.1038/sj.ki.5002165
- Nguyen, H., Chiasson, V. L., Chatterjee, P., Kopriva, S. E., Young, K. J., and Mitchell, B. M. (2013). Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovasc. Res.* 97 (4), 696–704. doi: 10.1093/cvr/cvs422
- Niewczas, M. A., Pavkov, M. E., Skupien, J., Smiles, A., Md Dom, Z. I., Wilson, J. M., et al. (2019). A signature of circulating inflammatory proteins and development of end-stage renal disease in diabetes. *Nat. Med.* 25 (5), 805–813. doi: 10.1038/s41591-019-0415-5
- Norlander, A. E., Saleh, M. A., Kamat, N. V., Ko, B., Gnecco, J., Zhu, L., et al. (2016). Interleukin-17A regulates renal sodium transporters and renal injury in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 68 (1), 167–174. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493
- Parikh, C. R., and Devarajan, P. (2008). New biomarkers of acute kidney injury. *Crit. Care Med.* 36, S159–S165. doi: 10.1097/CCM.0b013e318168c652
- Peng, X., Xiao, Z., Zhang, J., Li, Y., and Dong Y and Du, J. (2015). IL-17A produced by both γ DT and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J. Pathol.* 235, 79–89. doi: 10.1002/path.4430
- Pietrowski, E., Bender, B., Huppert, J., White, R., Luhmann, H. J., and Kuhlmann, C. R. (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 (1), 52–58. doi: 10.1159/000317400
- Pushpakumar, S., Ren, L., Kundu, S., Gamon, A., Tyagi, S. C., and Sen, U. (2017). Toll-like receptor 4 deficiency reduces oxidative stress and macrophage mediated inflammation in hypertensive kidney. *Sci. Rep.* 7 (1), 6349. doi: 10.1038/s41598-017-06484-6
- Ramani, K., and Biswas, P. S. (2019). Interleukin-17: Friend or foe in organ fibrosis. *Cytokine* 120, 282–288. doi: 10.1016/j.cyto.2018.11.003
- Ramani, K., Tan, R. J., Zhou, D., Coleman, B. M., Jawale, C. V., Liu, Y., et al. (2018). IL-17 Receptor Signaling Negatively Regulates the Development of Tubulointerstitial Fibrosis in the Kidney. *Mediators Inflamm.* 2018, 5103672. doi: 10.1155/2018/5103672
- Ramani, K., Garg, A. V., Jawale, C. V., Conti, H. R., Whibley, N., Jackson, E. K., et al. (2016). The kallikrein-kinin system: a novel mediator of IL-17-driven anti-candida immunity in the kidney. *PLoS Pathog.* 12 (11), e1005952. doi: 10.1371/journal.ppat.1005952
- Ramirez-Rubio, O., Amador, J. J., Kaufman, J. S., Weiner, D. E., Parikh, C. R., Khan, U., et al. (2016). Urine biomarkers of kidney injury among adolescents in Nicaragua, a region affected by an epidemic of chronic kidney disease of unknown aetiology. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31 (3), 424–432. doi: 10.1093/ndt/gfv292
- Rodrigues-Diez, R., Aroeira, L. S., Orejudo, M., Bajo, M. A., Heffernan, J. J., Rodrigues-Diez, R. R., et al. (2014). IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int.* 86 (2), 303–315. doi: 10.1038/ki.2014.33
- Rodrigues-Diez, R., Rodrigues-Diez, R. R., Rayego-Mateos, S., Suarez-Alvarez, B., Lavoz, C., Stark Aroeira, L., et al. (2013). The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab. Invest.* 93 (7), 812–824. doi: 10.1038/labinvest.2013.67
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Rupérez, M., Blanco, J., and Egido, J. (2001). Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor- κ B and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am. J. Pathol.* 158 (5), 1743–1756. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64130-2
- Saleh, M. A., Norlander, A. E., and Madhur, M. S. (2016). Inhibition of Interleukin 17-A but not Interleukin-17F signaling lowers blood pressure and reduces end-organ inflammation in angiotensin II-induced hypertension. *JACC Basic Transl. Sci.* 1 (7), 606–616. doi: 10.1016/j.jacbs.2016.07.009
- Satirapoj, B. (2018). Tubulointerstitial biomarkers for diabetic nephropathy. *J. Diabetes Res.* 2018, 2852398. doi: 10.1155/2018/2852398
- Sergejeva, S., and Lindén, A. (2009). Impact of IL-17 on cells of the monocyte lineage in health and disease. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 9 (2), 178–186. doi: 10.2174/187153009788452444
- Shahrara, S., Pickens, S. R., Dorfleutner, A., and Pope, R. M. (2009). IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 182 (6), 3884–3891. doi: 10.4049/jimmunol.0802246
- Shen, Q., Bi, X., Ling, L., and Ding, W. (2018). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Attenuates Angiotensin II-induced renal injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 1751–1762. doi: 10.1159/000495678

- Shiromizu, C. M., and Jancic, C. C. (2018). $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front. Immunol.* 16 (9), 2389. doi: 10.3389/fimmu.2018.02389
- Smith, E., Prasad, K. M., Butcher, M., Dobrian, A., Kolls, J. K., Ley, K., et al. (2010). Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 121 (15), 1746–1755. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924886
- Solak, Y., Afsar, B., Vaziri, N. D., Aslan, G., Yalcin, C. E., Covic, A., et al. (2016). Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease. *Hypertens Res.* 39 (8), 567–573. doi: 10.1038/hr.2016.35
- Suarez-Alvarez, B., Morgado-Pascual, J. L., Rayego-Mateos, S., Rodriguez, R. M., Rodrigues-Diez, R., Cannata-Ortiz, P., et al. (2017). Inhibition of bromodomain and extraterminal domain family proteins ameliorates experimental renal damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2), 504–519. doi: 10.1681/ASN.2015080910
- Sun, B., Wang, H., Zhang, L., Yang, X., Zhang, M., Zhu, X., et al. (2018). Role of interleukin 17 in TGF- β signaling-mediated renal interstitial fibrosis. *Cytokine* 106:80–88. doi: 10.1016/j.cyto.2017.10.015
- Tesch, G. H. (2008). MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294 (4), F697–F701. doi: 10.1152/ajprenal.00016.2008
- Van Kooten, C., Boonstra, J. G., Paape, M. E., Fossiez, F., Banchereau, J., Lebecque, S., et al. (1998). Interleukin-17 activates human renal epithelial cells *in vitro* and is expressed during renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (8), 1526–1534.
- Von Vietinghoff, S., and Ley, K. (2010). Interleukin 17 in vascular inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (6), 463–469. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.10.003
- Wang, F., Lu, X., Liu, M., Feng, Y., Zhou, S. F., and Yang, T. (2015). Renal medullary (pro)renin receptor contributes to angiotensin II-induced hypertension in rats via activation of the local renin-angiotensin system. *BMC Med.* 10 (13), 278. doi: 10.1186/s12916-015-0514-1
- Wen, Y., and Crowley, S. D. (2018). Renal effects of cytokines in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 27 (2), 70–76. doi: 10.1097/MNH.0000000000000385
- White, F. N., and Grollman, A. (1964). Autoimmune factors associated with infarction of the kidney. *Nephron* 1, 93–102. doi: 10.1159/000179322
- Wu, J., Saleh, M. A., Kirabo, A., Itani, H. A., Montaniel, K. R., Xiao, L., et al. (2016). Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *J. Clin. Invest.* 126 (1), 50–67. doi: 10.1172/JCI80761
- Xing, X., Yang, J., Yang, X., Wei, Y., Zhu, L., Gao, D., et al. (2013). IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. *PLoS One* 8(12):e85032. doi: 10.1371/journal.pone.0085032.
- Xue, L., Xie, K., Han, X., Yang, Z., Qiu, J., Zhao, Z., et al. (2011). Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Surg. Res.* 171, 266–274. doi: 10.1016/j.jss.2009.12.031
- Yao, W., Sun, Y., Wang, X., and Niu, K. (2015). Elevated serum level of interleukin 17 in a population with prehypertension. *J. Clin. Hypertens (Greenwich).* 17 (10), 770–774. doi: 10.1111/jch.12612
- Zhang, H., Chen, J., Liu, X., Awar, L., McMickle, A., Bai, F., et al. (2013). IL-17 induces expression of vascular cell adhesion molecule through signalling pathway of NF- κ B, but not Akt1 and TAK1 in vascular smooth muscle cells. *Scand. J. Immunol.* 77 (4), 230–237. doi: 10.1111/sji.12030

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Orejudo, Rodrigues-Diez, Rodrigues-Diez, Garcia-Redondo, Santos-Sánchez, Rández-Garbayo, Cannata-Ortiz, Ramos, Ortiz, Selgas, Mezzano, Lavoz and Ruiz-Ortega. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Interleukin-17A blockade reduces albuminuria and kidney injury in an accelerated model of diabetic nephropathy

OPEN

Carolina Lavoz¹, Yenniffer Sánchez Matus¹, Macarena Orejudo², J. Daniel Carpio¹, Alejandra Droguett¹, Jesús Egido³, Sergio Mezzano¹ and Marta Ruiz-Ortega²

¹Division of Nephrology, School of Medicine, Universidad Austral, Valdivia, Chile; ²Cellular and Molecular Biology in Renal and Vascular Pathology Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain; and ³Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

Diabetic nephropathy (DN) is one of the most common complications of diabetes, and currently the first end-stage renal disease worldwide. New strategies to treat DN using agents that target inflammatory pathways have attracted special interest. Recent pieces of evidences suggest a promising effect of IL-17A, the Th17 effector cytokine. Among experimental DN models, mouse strain BTBR ob/ob (leptin deficiency mutation) develops histological features similar to human DN, which means an opportunity to study mechanisms and novel therapies aimed at DN regression. We found that BTBR ob/ob mice presented renal activation of the factors controlling Th17 differentiation. The presence of IL-17A-expressing cells, mainly CD4⁺ and $\gamma\delta$ lymphocytes, was associated with upregulation of proinflammatory factors, macrophage infiltration and the beginning of renal damage. To study IL-17A involvement in experimental DN pathogenesis, treatment with an IL-17A neutralizing antibody was carried out starting when the renal damage had already appeared. IL-17A blockade ameliorated renal dysfunction and disease progression in BTBR ob/ob mice. These beneficial effects correlated to podocyte number restoration and inhibition of NF- κ B/proinflammatory factors linked to a decrease in renal inflammatory-cell infiltration. These data demonstrate that IL-17A takes part in diabetes-mediated renal damage and could be a promising therapeutic target to improve DN.

Kidney International (2019) **95**, 1418–1432; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.12.031>

KEYWORDS: BTBR ob/ob; diabetic nephropathy; IL-17A; inflammation

Copyright © 2019, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Correspondence: Carolina Lavoz, Division of Nephrology, School of Medicine, Universidad Austral de Chile, Independencia 631, Valdivia 5090146, Chile. E-mail: carolina.lavoz@uach.cl

Received 9 February 2018; revised 1 December 2018; accepted 28 December 2018; published online 8 March 2019

Translational Statement

Some clinical trials blocking IL-17A have proven beneficial effects in chronic inflammatory diseases. Novel therapeutic options to prevent renal damage clinically are unmet for diabetic nephropathy (DN). Our preclinical data suggest that treatment with neutralizing IL-17A antibodies could be a therapeutic option for diabetic patients with albuminuria.

In recent decades, diabetes mellitus became one of the greatest public health care problems worldwide. DN is one of the most prevalent microvascular complications in patients with diabetes^{1,2} and currently is more prevalent than end-stage renal failure worldwide.³ DN affects approximately 20% to 30% of patients with type 1 or type 2 diabetes. Knowledge about underlying pathophysiological processes leading to DN has evolved a great deal in recent years, with both genetic and environmental factors interacting to result in complex pathophysiological events.⁴

Although DN is considered a nonimmune disease, emerging evidence suggests that both systemic and local inflammatory mechanisms play an important role in its pathogenesis and progression through the regulation of cell adhesion molecules, growth factors, chemokines, and proinflammatory cytokines.^{1,5–7}

The Th17 effector cytokine interleukin (IL)-17A has become an important therapeutic target for a wide variety of diseases.^{8,9} Recent studies suggest that IL-17A blockade is a promising tool for chronic human inflammatory diseases, with special relevance in ankylosing spondylitis, chronic plaque psoriasis, and psoriatic arthritis.^{10–13} Recent studies also have suggested that IL-17A is involved in acute and chronic kidney disease.¹⁴

IL-17A is a cytokine with pleiotropic functions. It coordinates tissue inflammation by inducing expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteases, which mediate both tissue infiltration and destruction.¹⁵ However, experimental data evaluating the direct effects of IL-17A modulation in the diabetic kidney are controversial.^{16,17}

The lack of an experimental model to replicate the key features of human DN has hampered efforts to investigate novel therapeutic treatments for this disease. Among the different preclinical models of DN available, the leptin-deficient BTBR ob/ob mouse recently has been described as a robust and progressive animal model that uniformly develops human DN features. The model largely agrees with the criteria proposed by the Animal Models of Diabetic Complications Consortium¹⁸ and therefore is a promising tool to test novel treatments for this disease. The aim of the current study was to explore whether the cytokine IL-17A could be involved in the pathogenesis of DN by using a neutralizing antibody against IL-17A in the experimental model of BTBR ob/ob mice.

RESULTS

Activation of the Th17 immune response in the kidney of BTBR ob/ob mice was associated with the onset of renal damage

Previous studies of the BTBR ob/ob animal model have described the presence of monocyte/macrophage infiltrate in the glomerulus at approximately 12 weeks.¹⁸ In light of these findings, we extensively characterized the inflammatory process in this model of DN until 20 weeks, comparing BTBR ob/ob animals, consisting of diabetic obese animals (referred to here as “diabetic mice”) and a nondiabetic, nonobese control, that is, BTBR wild-type (WT) mice (referred to here as “control mice”).

In the diabetic mice studied, periodic acid–Schiff staining showed that interstitial cellular infiltration can be initially perceived in the lesions at 8 weeks (Figure 1a) and increased progressively in older mice. At age 14 weeks, the kidneys of diabetic mice presented a significant increase in cellular infiltration compared with control subjects. To further characterize the cellular infiltration, immunohistochemistry studies using specific markers were performed at this time. Different immune cells, including monocytes/macrophages (F4/80⁺ cells), T-lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, and $\gamma\delta$ lymphocytes), and neutrophils (myeloperoxidase [MPO]) were observed in the diabetic kidneys, whereas few inflammatory cells were detected in control subject kidneys (Figure 1a).

Next, the renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a key chemokine involved in the recruitment of inflammatory cells in the kidney,¹⁹ was evaluated over the time. In diabetic mice, *mcp-1* mRNA expression was significantly increased from week 10 until the end of the study (Figure 1b). In contrast, nondiabetic control kidneys exhibited no changes in *mcp-1* gene levels.

To determine whether the inflammatory response was associated with kidney damage, we analyzed the gene expression of 2 two biomarkers of renal injury. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) has been described as an early marker of kidney disease, and kidney injury molecule 1 (KIM-1) has been related to the transition from acute to chronic renal damage.^{20,21} In diabetic mice, mRNA levels of *ngal* and *kim-1* increased significantly at the eighth and 10th

week, respectively, compared with the control group (Figure 1c and d). These data confirm the importance of renal inflammation in this experimental model of DN, as described in other diabetic mice models and in patients with DN.

To investigate whether the Th17 immune response was involved in the pathogenesis of DN in BTBR ob/ob mice, we first evaluated the progression of renal levels of IL-17A, the effector cytokine of Th17 response. In the kidneys of diabetic mice, increased *Il-17A* mRNA expression was found as early as 10 weeks of age (Figure 2a) compared with the earliest time points and control mice and remained elevated thereafter. Moreover, in diabetic kidneys, elevated IL-17A protein levels also were observed relative to control subjects, both by Western blot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay (Figure 2b, c, and e). Immunohistochemical staining was positive for IL-17A in interstitial areas of diabetic mice, whereas no IL-17A signal was observed in the kidneys of control mice (Figure 2c). The identification of IL-17A-expressing cells was performed by double immunostaining with antibodies against IL-17A and markers of inflammatory cells and confocal microscopy. We found out that CD4⁺ and $\gamma\delta$ lymphocytes produced IL-17A in murine diabetic kidneys (Figure 2d).

The process by which CD4⁺ T lymphocytes differentiate into Th17 cells is regulated by the activation of the specific transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and the induction of retinoic acid–related orphan receptor γ t (ROR γ t) expression.²² In our study, diabetic mice presented elevated levels of ROR- γ t and phosphorylated STAT3 (p-STAT3), the latter indicating activation of this transcription factor (Figure 2b and e). Changes in cytokine expression patterns can regulate Th differentiation, with IL-6 being the key driver of Th17 differentiation, whereas transforming growth factor (TGF)- β induces regulatory T cell polarization.^{23,24} At 16 and 20 weeks, diabetic mice had increased *il-6* and *tgf- β* mRNA levels compared with control mice (Figure 2f). Moreover, an increase in active TGF- β protein levels was noted in the kidneys of BTBR ob/ob mice compared with control subjects (data not shown) (Figure 2g).

Serum IL-17A levels are elevated in several inflammatory diseases, both in murine models and in patients with arthritis, multiple sclerosis, asthma, and atherosclerosis.^{25–29} In diabetic mice, however, we observed that circulating IL-17A levels were not modified in any of the groups studied and remained at levels similar to those of control mice (data not shown).

Treatment with an anti-IL-17A neutralization antibody markedly reduced albuminuria in DN mice

BTBR ob/ob mice develop albuminuria and renal lesions, and thus they share some of the characteristics of human patients with DN.¹⁸ To investigate the role of endogenous IL-17A in the pathogenesis of DN, we used a neutralizing antibody against IL-17A in BTBR ob/ob animals (referred to here as “anti-IL-17A–treated diabetic mice”). This antibody was

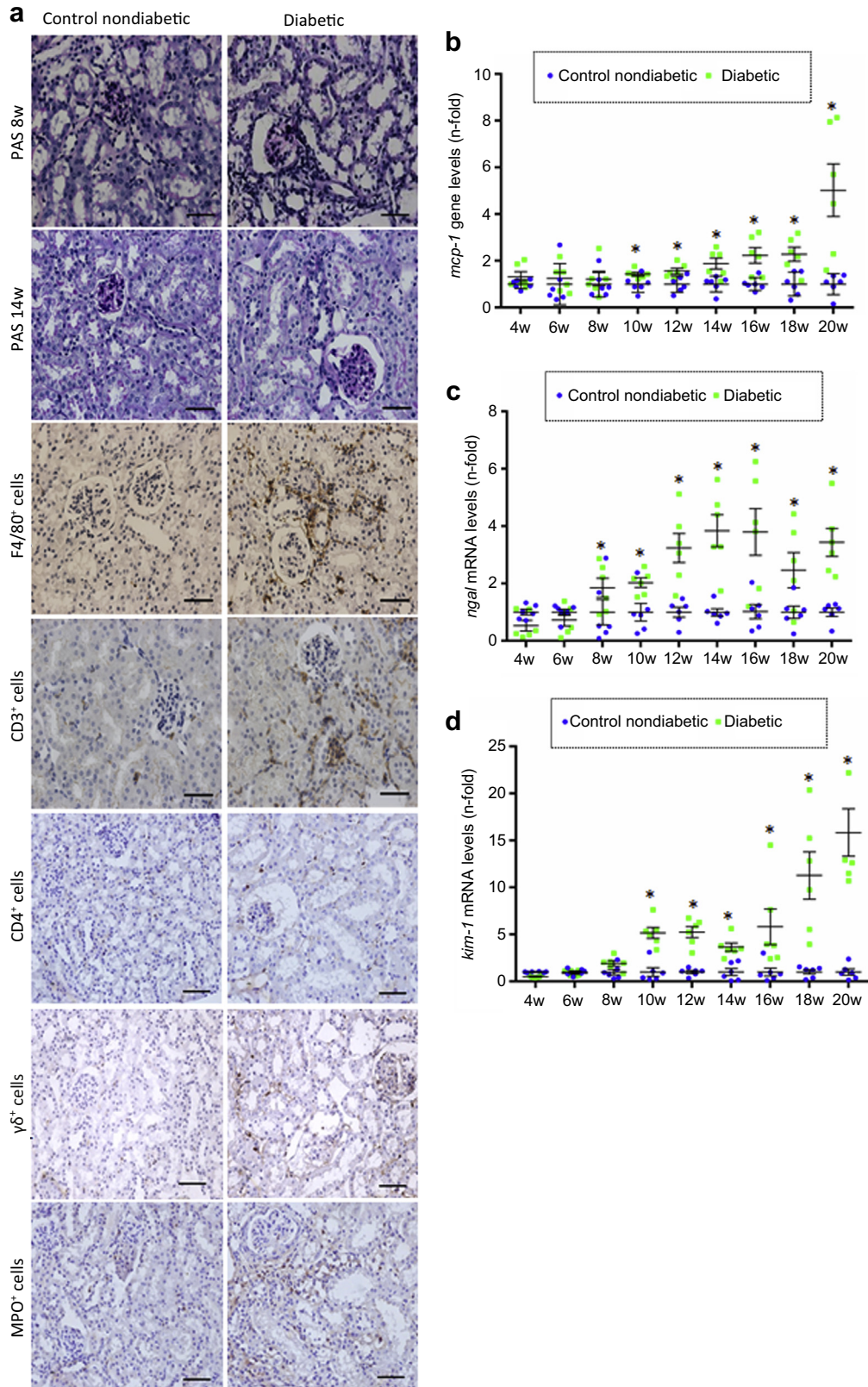


Figure 1 | Evolution of renal damage and inflammation in the model of experimental diabetes. BTBR ob/ob mice, diabetic and obese (called diabetic mice) and their corresponding controls (BTBR wild-type [WT] littermate mice) were studied from 4 to 20 weeks of age. Evaluation of renal lesions and characterization of inflammatory cell infiltration. To evaluate renal structure, mice were studied at different time points (8 and 14 weeks), and kidney sections were stained with periodic acid–Schiff (PAS). Inflammatory cell infiltration was characterized at 14 weeks by immunohistochemistry using specific antibodies for monocyte/macrophages (F4/80), (continued)

administered using osmotic minipumps, which release a continuous and controlled dose of 50 mg/kg/d of anti-IL-17A. This dose was similar to those described in other experimental models of tissue damage.^{23,30,31}

Because our goal was to block IL-17A as a therapeutic regime, BTBR ob/ob mice were treated with IL-17A neutralizing antibody in the 15th week of life when they developed renal damage classified as DN (as shown by morphologic lesions, Figure 1a) and when renal IL-17A mRNA and protein levels were already elevated (Figure 2a and b). Then the mice were randomly distributed in 2 groups, one receiving IL-17A neutralization treatment (referred to here as “anti-IL-17A-treated mice”) and the other treated with its corresponding isotype IgG (referred to here as “IgG-treated diabetic mice”), as described in the Methods section. Other control groups studied were untreated BTBR ob/ob mice and BTBR WT nonobese, nondiabetic mice.

First, to validate our model in relation to previous studies,¹⁸ the onset of albuminuria was measured by using the albumin/creatinine ratio in spot urine samples from week 4 until the end of the study. The IgG-treated diabetic mice showed an increase in albuminuria as early 6 weeks of age, remaining elevated up to 20 weeks and reaching a difference of more than 10-fold compared with control mice of the same age ($885 \pm 112 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $92 \pm 26 \mu\text{g}/\text{mg}$; $P < 0.05$ vs. control mice; Figure 3a). As expected, no significant changes were found between IgG-treated diabetic mice and untreated diabetic mice (data not shown). Interestingly, the albumin/creatinine ratio was correlated with changes in renal *ngal* mRNA expression in diabetic mice (Figure 1d).

The evolving effectiveness of IL-17A neutralization treatment on albuminuria values in diabetic mice was also examined (Figure 3b). Importantly, in response to IL-17A blockade, the albumin/creatinine ratio was significantly decreased compared with IgG-treated diabetic mice ($359 \pm 85 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $885 \pm 112 \mu\text{g}/\text{mg}$, at 20 weeks, $P < 0.05$ vs. IgG-treated diabetic mice).

The percentage of albumin/creatinine ratio reduction in diabetic mice treated with the IL-17A antibody compared with IgG-treated animals was 41%, clearly showing that IL-17A neutralization ameliorates renal dysfunction in experimental DN (Figure 3b). Creatinine blood levels were stable across groups and remained in the normal range rate over the course of the diabetic disease (Figure 3c), as previously described.³² Moreover, treatment with IL-17A-neutralizing antibody also markedly diminished renal gene expression of

kim-1 and *ngal* (Figure 3d). All these data suggest that IL-17A neutralization ameliorates renal damage in BTBR ob/ob mice.

As described in this model,¹⁸ blood glucose levels were significantly increased in IgG-treated diabetic mice compared with control mice, showing a significant elevation at 6 weeks of age and progressing to values averaging $598 \pm 2 \text{ mg}/\text{dl}$ ($P < 0.05$ vs. control mice) at the end of the study, that is, at 20 weeks (Figure 3e). In response to IL-17A neutralization, a slight decrease in blood glucose levels was found compared with the IgG-treated diabetic group ($540 \pm 15 \text{ mg}/\text{dl}$ vs. $599 \pm 2 \text{ mg}/\text{dl}$ at the end of the study; $P < 0.05$; Figure 3e) but still remained highly elevated compared with control mice. These slight changes in blood glucose levels could be explained by the impairment of systemic inflammation and subsequent improvement in insulin resistance.

Body weight also was affected by treatment. IgG-treated diabetic mice presented a significant increase in body weight compared with control mice at 20 weeks, as expected in this obese model. Interestingly, in response to anti-IL-17A antibody treatment, diabetic mice presented a significant reduction in body weight (Figure 3e). However, there were no differences detected in kidney weight among all the BTBR ob/ob mice groups, whereas this weight was significantly increased compared with control mice (Figure 3f).

Of note, the discrete decrease of both renal weight (6%) and blood glucose levels (11%) during anti-IL-17A treatment does not seem to justify the marked reduction in the proteinuria *per se*. Despite the slight reduction in glucose blood levels, the animals remained diabetic throughout the study.

IL-17A neutralization diminishes renal lesions in DN mice

As previously described, BTBR ob/ob diabetic mice present several renal changes similar to human DN,¹⁸ as noted here in the IgG-treated diabetic mice (Figure 4). Changes in renal structure in response to IL-17A neutralization were studied at 20 weeks. The tissue damage score was calculated as described,³³ including the degree of glomerular sclerosis, increased mesangial matrix, hyalinosis, tubular casts, acute tubular damage, and tubular atrophy, as well as the presence of interstitial inflammatory cells and interstitial fibrosis. Histopathologic analysis of IgG-treated diabetic mice showed a significantly higher kidney damage score compared with control mice, decreasing significantly in the anti-IL-17A-treated mice group (Figure 4a).

Briefly, periodic acid-Schiff staining revealed an increase in mesangial matrix, hyalinosis, and interstitial cellular

Figure 1 | (continued) lymphocytes (CD3, CD4, and $\gamma\delta$), and neutrophils (myeloperoxidase [MPO]). (a) Representative images of light microscopy and immunohistochemistry (bars = 20 μm) of at least 3 mice per group. Renal gene expression levels of the proinflammatory marker *monocyte chemoattractant protein-1* (*mcp-1*) (b) and of the biomarkers of renal damage *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (*ngal*) (c) and *kidney injury molecule-1* (*kim-1*) (d) were assessed at different time points. Mice were killed at indicated times (every 2 weeks) and total RNA was extracted from renal tissue. Gene expression levels were evaluated by real-time polymerase chain reaction, and mRNA levels in each sample were normalized by cyclophilin 1. At each time point, data were normalized by the mean value of their corresponding controls. Figures show individual gene expression values of each mouse and the mean \pm SEM of each group. $N = 6\text{--}8$ mice per group. * $P < 0.05$ versus control. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

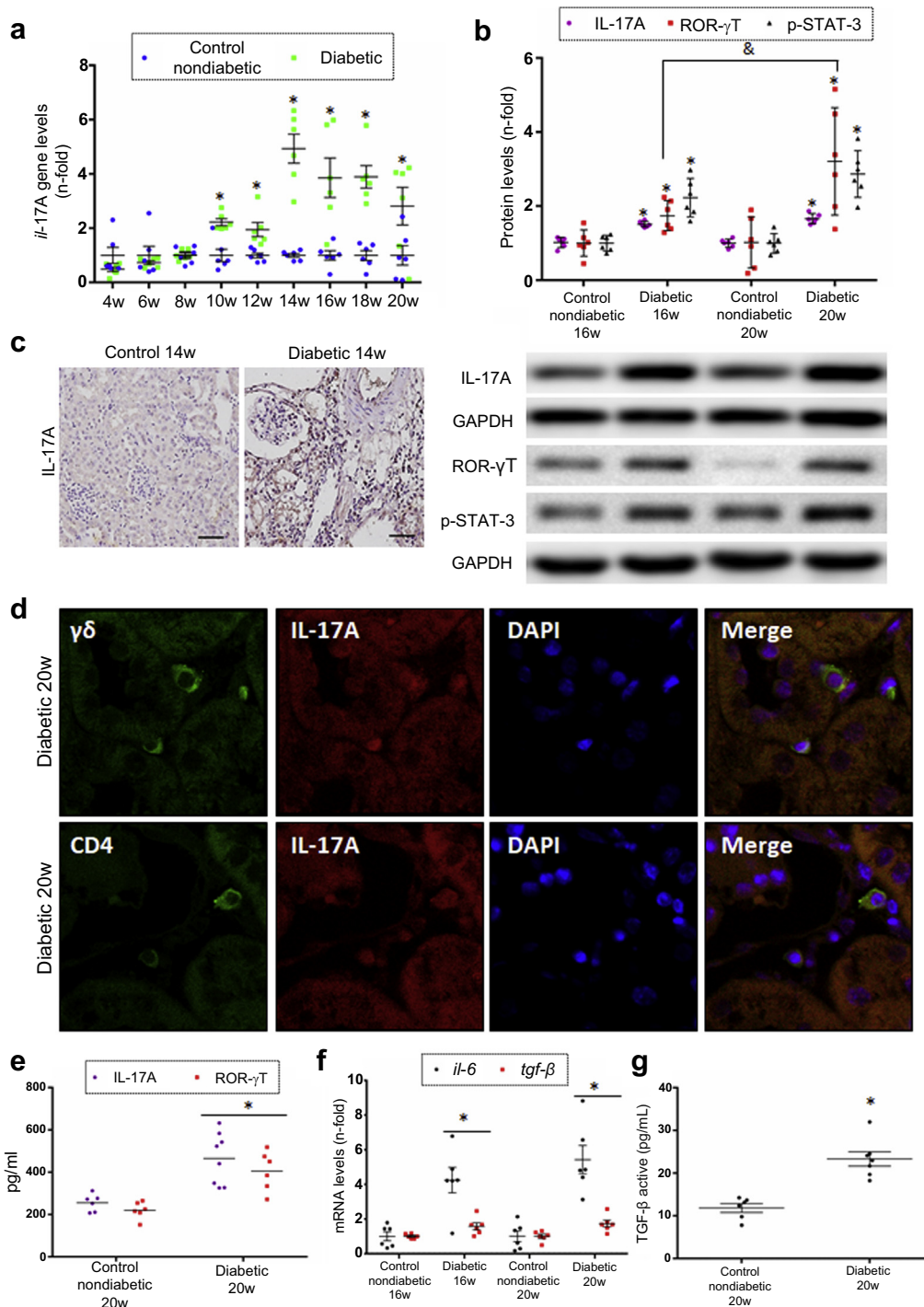


Figure 2 | Increased interleukin (IL)-17A production and activation of Th17-related factors in the kidneys of diabetic mice. (a) In renal samples of BTBR ob/ob mice (diabetic mice) and their corresponding controls, *il-17A* gene expression levels were studied from 4 to 20 weeks of age. (b) Protein levels of IL-17A and the Th17-related factors, retinoic acid-related orphan receptor (ROR)- γ T and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT-3), were evaluated at indicated times by Western blotting (a representative blot is shown in the upper panel), and densitometric analysis of normalized data is shown below. (c) IL-17A was detected in kidney sections by immunohistochemistry. A representative image of control and diabetic mice (14 weeks) is shown (bars = 20 μ m). (d) IL-17A-expressing cells were evaluated by double immunofluorescence in diabetic mice (20 weeks). IL-17A was detected with a secondary Alexa 633 (red), and the different cell types were determined using a specific anti-T-cell receptor $\gamma\delta$ antibody ($\gamma\delta$ lymphocytes) or anti-CD4 antibody (for CD4⁺ cells) labeled with a secondary Alexa 488 (green). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). IL-17A, p-STAT-3 (e), and transforming growth factor (TGF)- β active (g) protein levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in diabetic and control mice at 20 weeks of age. (f) *il-6* and *tgf- β* mRNA levels were analyzed at the indicated times. Gene expression levels were evaluated by real-time polymerase chain reaction, and mRNA levels in each sample were (continued)

infiltration in IgG-treated diabetic mice compared with control mice. In response to IL-17A neutralization, the previously described lesions also were noted, but to a lesser extent (Figure 4b). However, at the time point analyzed, interstitial fibrosis was not detected by Masson's trichrome staining in any of the evaluated groups (data not shown).

To further assess glomerular damage, an electron microscopy analysis was carried out. Diabetic kidneys (IgG-treated diabetic group) showed thickening of the glomerular basement membrane, irregular laminations, and localized protrusions in some segments, along with greater effacement of foot processes, thus resembling lesions found in diabetic patients; these changes were not observed in control mice (Figure 4c, d, f, g, i, and j). In response to anti-IL-17A treatment, diabetic mice presented less glomerular basement membrane thickening (Figure 4e and i). Furthermore, the mesangial matrix expansion detected in IgG-treated diabetic mice (Figure 4g and j) was significantly decreased in mice treated with the anti-IL-17A antibody (Figure 4h and j).

IL-17A neutralization restores podocyte number in DN mice

Podocyte damage is a key characteristic of DN. To assess the podocyte number in the glomeruli of diabetic mice, we examined Wilms tumor protein-1 (WT-1) staining, using this as a podocyte marker protein. Of note, in IgG-treated diabetic mice, the podocyte number was strongly decreased compared with control mice (Figure 5a–c), clearly indicating podocyte damage in this model as described in human patients.

In BTBR ob/ob mice, IL-17A neutralization treatment led to a recovery of the number of podocytes when compared with IgG-treated diabetic mice (Figure 5a and 5d). Additionally, IL-17A blockade restored the downregulation of gene expression of several podocyte markers in IgG-treated diabetic mice, including *nephrin* (*nphs-1*), *podocin* (*nphs-2*), *wt-1*, and *synaptopodin* (*synpo*) (Figure 5e).

IL-17A blockade inhibits the diabetic-induced renal inflammatory response

In diabetic mice, IL-17A neutralization treatment caused a significant diminution in the number of inflammatory infiltrating cells in the kidney, mainly monocytes/macrophages (F4/80⁺ cells) and T-lymphocytes (CD3⁺ and CD4⁺ cells) when compared with IgG-treated diabetic mice (Figure 6a and b).

Diabetic kidneys presented overexpression of several proinflammatory genes, including chemokines and cytokines, involved in the recruitment of inflammatory cells.³⁴ In BTBR ob/ob mice, treatment with the neutralizing anti-IL17A antibody markedly diminished proinflammatory gene upregulation compared with its corresponding control (Figure 6c).

Toll-like receptor-4 (TLR-4) promotes tubule-interstitial inflammation in DN and is essential for IL-17A generation.^{35,36} Blockade of IL-17A significantly diminished *tlr-4* mRNA upregulation in diabetic kidneys (Figure 6c).

Many signaling pathways are involved in renal inflammation; of these, the nuclear factor-κB signaling pathway (NF-κB) is the most widely studied.³⁷ Diabetic BTBR ob/ob kidneys presented activation of NF-κB, as described in other experimental models of diabetes and in human DN.³⁸ Blockade of IL-17A prevented renal NF-κB activation, as shown by downregulation of phosphorylated IκBα and p65 levels, reaching values similar to healthy control mice of the same age (Figure 6d).

These data clearly demonstrate the involvement of IL-17A in renal inflammation in DN, likely due to the modulation of the NF-κB pathway and downstream proinflammatory mediators.

DISCUSSION

Despite the many experimental and clinical studies performed in the field of DN, no currently available treatments can prevent the development and progression of the disease. Recognized therapeutic strategies used in patients with DN, such as strict control of glucose levels and blood pressure, as well as blockade of the renin-angiotensin system, retard the progression of renal damage but offer incomplete protection. BTBR ob/ob mice develop lesions that mimic key features of advanced human DN.^{18,39}

Here we have found that a therapeutic regimen consisting of a neutralizing antibody against IL-17A, administered after renal lesions have developed, reversed the structural abnormalities of DN, including mesangial matrix accumulation, glomerular basement membrane thickening, and inflammatory infiltrate. These beneficial effects were temporally associated with discrete better glycemic control. One important finding of our study is that IL-17A blockade elicited a marked decrease in albuminuria (higher than 50% compared with diabetic mice, without treatment) and an improvement in renal lesions. These results suggest that IL-17A blockade could be a potential therapeutic option for DN and a worthwhile approach to testing in a well-designed clinical trial.

IL-17A has been associated with many inflammatory diseases, including psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, asthma, lupus, renal allograft rejection, and obesity.^{9,40,41} Within the field of kidney diseases, many studies have demonstrated the involvement of Th17 and IL-17A in immune and nonimmune renal diseases.^{42–45} In BTBR ob/ob mice, we found a local activation of the Th17 immune response, including activation of

Figure 2 | (continued) normalized by cyclophilin 1. Protein levels were evaluated in total renal extracts and normalized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) values in each sample. At each time point, data were normalized by the mean value of their corresponding controls. Figures show individual gene or protein expression values of each mouse and the mean ± SEM of each group. *N* = 6–8 mice per group. **P* < 0.05 versus control. ⁸*P* < 0.05 versus the 16th week. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

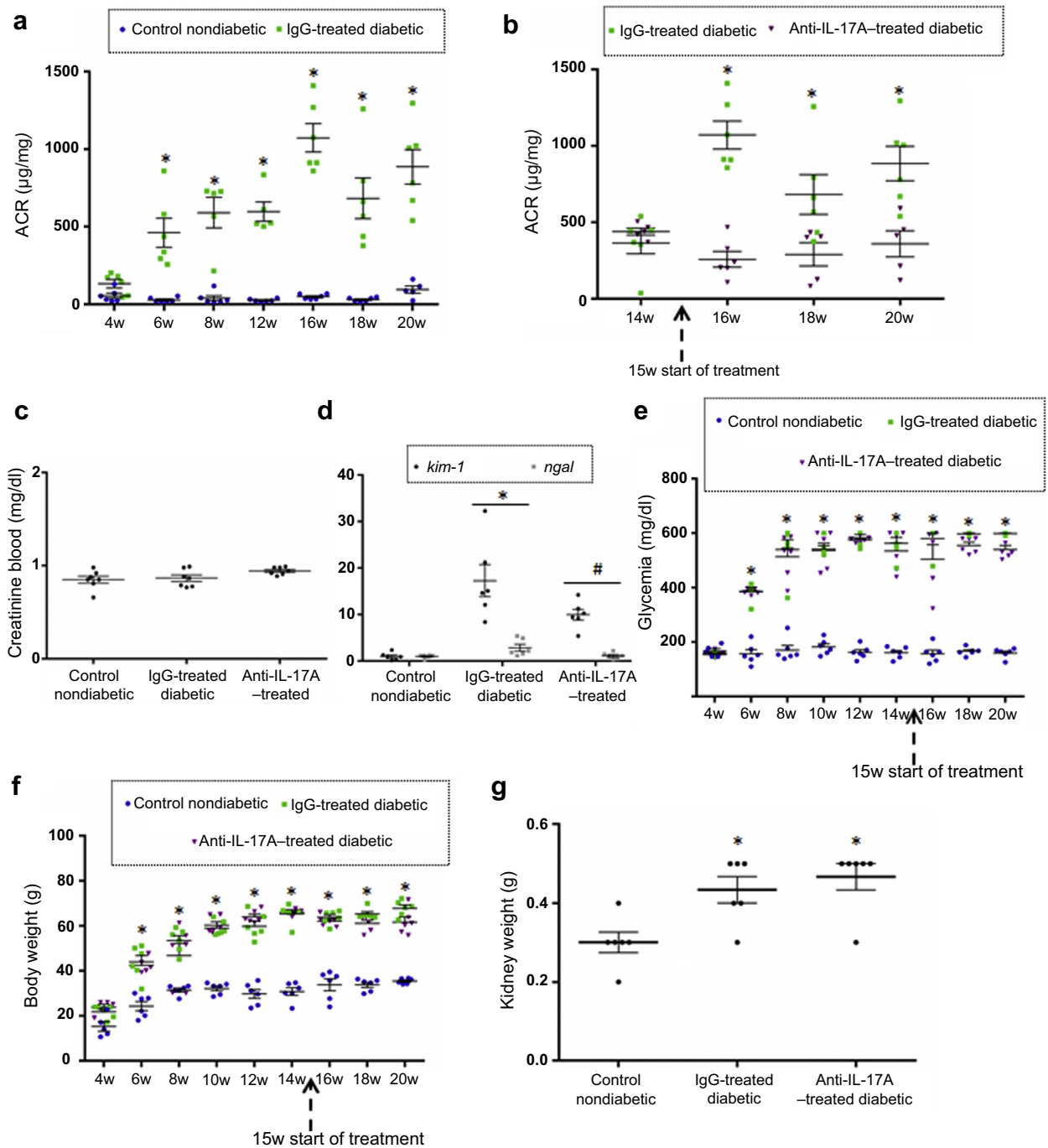


Figure 3 | Effect of interleukin (IL)-17A-neutralization treatment in biochemical parameters in experimental diabetes. BTBR ob/ob mice (diabetic mice) were studied from the 4th to 20th weeks of age, and biochemical time-course determinations were done every 2 weeks. At 15 weeks, mice were randomly distributed into 2 groups: mice were treated with an IL-17A-neutralizing antibody (called anti-IL-17A-treated diabetic) and its corresponding control (IgG-treated diabetic mice) and studied until week 20 (blood and kidney determinations were performed at the time the mice were killed). Arrow indicates treatment initiation time point (week 15). As a control group, nondiabetic mice (BTBR wild-type [WT] mice) also were studied. Evolution of albuminuria, determined as the albuminuria/creatinine ratio (ACR), is shown for each mouse. **(a)** The comparison between control nondiabetic versus diabetic (IgG-treated) mice is shown. **(b)** The effect of IL-17A neutralization treatment in ACR in diabetic mice (comparison of IgG-treated vs. anti-IL-17A-treated). **(c)** Evaluation of creatinine levels in blood. **(d)** Renal expression levels of *kidney injury molecule-1 (kim-1)* and *neutrophil gelatinase-associated lipocalin (ngal)* were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction, and normalized versus control mice, as previously described. Evaluation over time of **(e)** glycemia and **(f)** body weight. **(g)** Kidney weight at the final time point. Figures show individual data of each animal and the mean ± SEM of the different groups in each time point, $N = 6-8$ mice per group. * $P < 0.05$ versus control. # $P < 0.05$ versus IgG-treated diabetic.

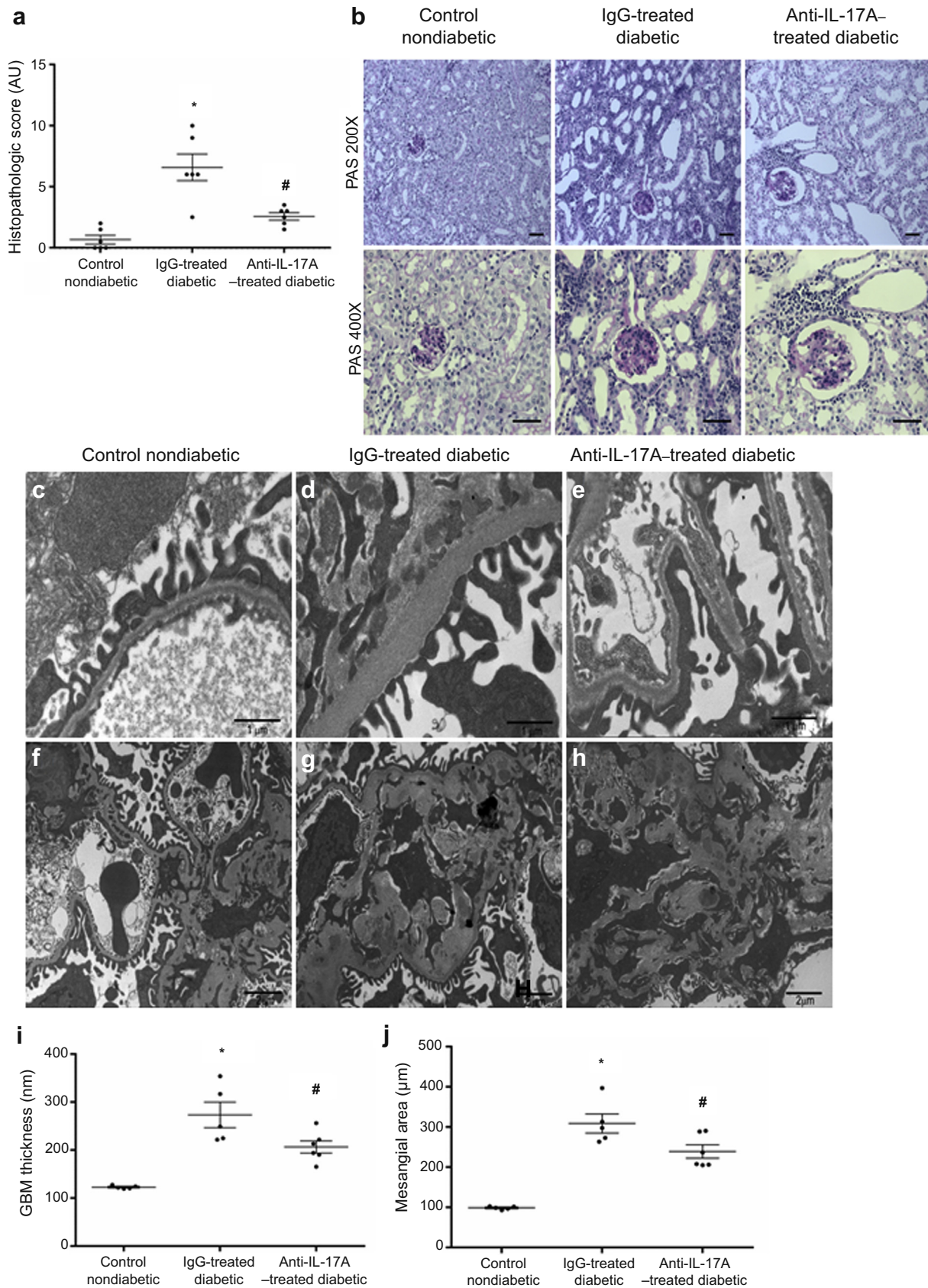


Figure 4 | Effect of interleukin (IL)-17A neutralization treatment on renal lesions in a BTBR ob/ob experimental model. (a) Quantification of histopathologic score at week 20. **(b)** Representative images of light microscopy of kidney sections of (continued)

Th17 differentiation factors and production of IL-17A in diabetic kidneys, associated with the presence of inflammatory cell infiltration and upregulation of proinflammatory mediators, such as MCP-1. Several immune cells can produce IL-17A, including lymphocytes, neutrophils, and mast cells.^{9,46–48} In the diabetic kidney we have detected the presence of Th17 (IL-17A⁺/CD4⁺) cells, the main source of IL-17A producing cells, and $\gamma\delta$ lymphocytes, which also express IL-17A. Previous studies in other models of experimental diabetes also have described activation of the Th17 immune response, as in streptozotocin-induced diabetes,^{49,50} confirming our findings.

Many experimental studies have focused on the role of immune cells in experimental type 1 diabetes. The earliest experimental studies in nonobese diabetic mice found increased IL-17A serum levels and an elevated number of pancreatic IL-17A-producing Th17 cells and interferon- γ -producing Th1 cells.¹³ In agreement with our results, reduction of IL-17A attenuated DN progression induced by streptozotocin and autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.^{49–52} Moreover, blockade of Th17 differentiation by using a selective ROR α / γ inverse agonist in nonobese diabetic mice ameliorated diabetes incidence and insulinitis and downregulated proinflammatory cytokine overexpression.⁵³

The beneficial effect of IL-17A blockade also has been described in other experimental models of immune- and nonimmune-mediated renal damage, suggesting that blocking the Th17/IL-17A axis could be useful in the treatment of inflammatory renal diseases.^{30,54–56} Importantly, Th17/IL-17A inhibition ameliorated diabetes-associated damage observed in other target tissues, including the retina.^{57,58} However, other experimental studies in diabetes have produced controversial results. Therapy with low doses of recombinant IL-17A prevented and reversed DN,¹⁷ whereas IL-17A knockout mice delayed the onset of immune-mediated type 1 diabetes.⁵² Similarly, therapies using cytokines in experimental models of renal injury also have found controversial results, as observed in response to angiotensin-II administration in anti-Thy glomerulonephritis.^{59,60} Even though IL-17A has emerged as a crucial regulator of immune response and diseases, its regulation is still poorly understood. Interestingly, in atherosclerosis, a vascular inflammatory disease, IL-17A plays a dual role, carrying out pro- and anti-atherogenic roles,⁶¹ thus supporting such opposite roles of IL-17A in some pathologic conditions.

The loss of podocytes is a key event in human DN³ that also can be found in BTBR ob/ob diabetic mice and other

experimental models. Our study also revealed a significant decrease in podocyte number associated with a downregulation of podocin (*nphs2*) gene expression, the latter consistent with the podocytopenia. An important finding of our study is that IL-17A blockade restored both the podocyte number and the *nphs2* gene expression levels and induced *de novo* expression of WT-1 (a specific marker of podocytes). This protective effect may be key to the preservation of renal function observed in response to IL-17A-neutralization treatment, suggesting that IL-17A blockade can be used to protect podocytes as part of a therapeutic strategy.

Our current hypothesis is that in diabetic conditions the elevated renal IL-17A production produced by infiltrating immune cells can activate resident renal cells and directly cause kidney damage, mainly inducing the production of additional proinflammatory mediators, which could contribute to the recruitment of inflammatory cells into the diabetic kidney, thereby amplifying the inflammatory response. It has been described that IL-17A can bind to its receptors expressed in tubular, mesangial, and endothelial cells, as well as fibroblasts, inducing the release of cytokines and chemokines such as IL-6, MCP-1, and regulated on activation, T cell expressed, and secreted, among others.⁶² Therefore, the beneficial effects of IL-17A-neutralization treatment observed in our study may be due to the blockade of IL-17A proinflammatory actions in the diabetes-induced kidney damage. Many preclinical studies have observed that the blockade of chemokines and cytokines, including MCP-1 and TLR4, ameliorates experimental diabetic renal damage.^{63,64} In addition, some of these compounds have been tested in clinical trials, supporting the idea that anti-inflammatory therapies could be a feasible option for the treatment of diabetic nephropathy.⁶⁵

Among the mechanisms activated by IL-17A in renal cells, the transcription factor NF- κ B has special relevance in human and experimental DN.^{9,40,66–69} Numerous drugs used in clinical practice that have protective effects in DN also reduced the NF- κ B activation. Moreover, direct inhibition of NF- κ B activation by BAY 11-7082 reduced renal injury, inflammation, and hyperglycemia in experimental diabetes.⁷⁰

We found that IL-17A-neutralization treatment blocked NF- κ B activation and the subsequent proinflammatory gene upregulation linked to the inhibition of inflammatory cell infiltration in the kidney, suggesting one potential mechanism involved in the beneficial effect of IL-17A blockade in DN. Another important signaling system involved in diabetic renal

Figure 4 | (continued) control mice, IgG-treated diabetic mice, and anti-IL-17A-treated diabetic mice stained with periodic acid–Schiff (PAS). Original magnification: $\times 200$ and $\times 400$. Bars = 20 μ m. IL-17A blockade reduces glomerular basement membrane (GBM) thickening and mesangial matrix accumulation. Electron micrographs of glomeruli of representative animals for (c,f) control mice, (d,g) IgG-treated diabetic mice, and (e,h) anti-IL-17A-treated diabetic mice show changes in GBM and mesangial matrix. (c–e) Bar = 1 μ m, original magnification $\times 16,500$. (f–h) Bar = 2 μ m, original magnification $\times 16,500$. The quantitative measure of (i) GBM thickness and (j) mesangial area. Figures show individual histologic score data of each animal and the mean \pm SEM of the different groups, $N = 6–8$ mice per group. * $P < 0.05$ versus control # $P < 0.05$ versus IgG-treated diabetic mice. AU, arbitrary units. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

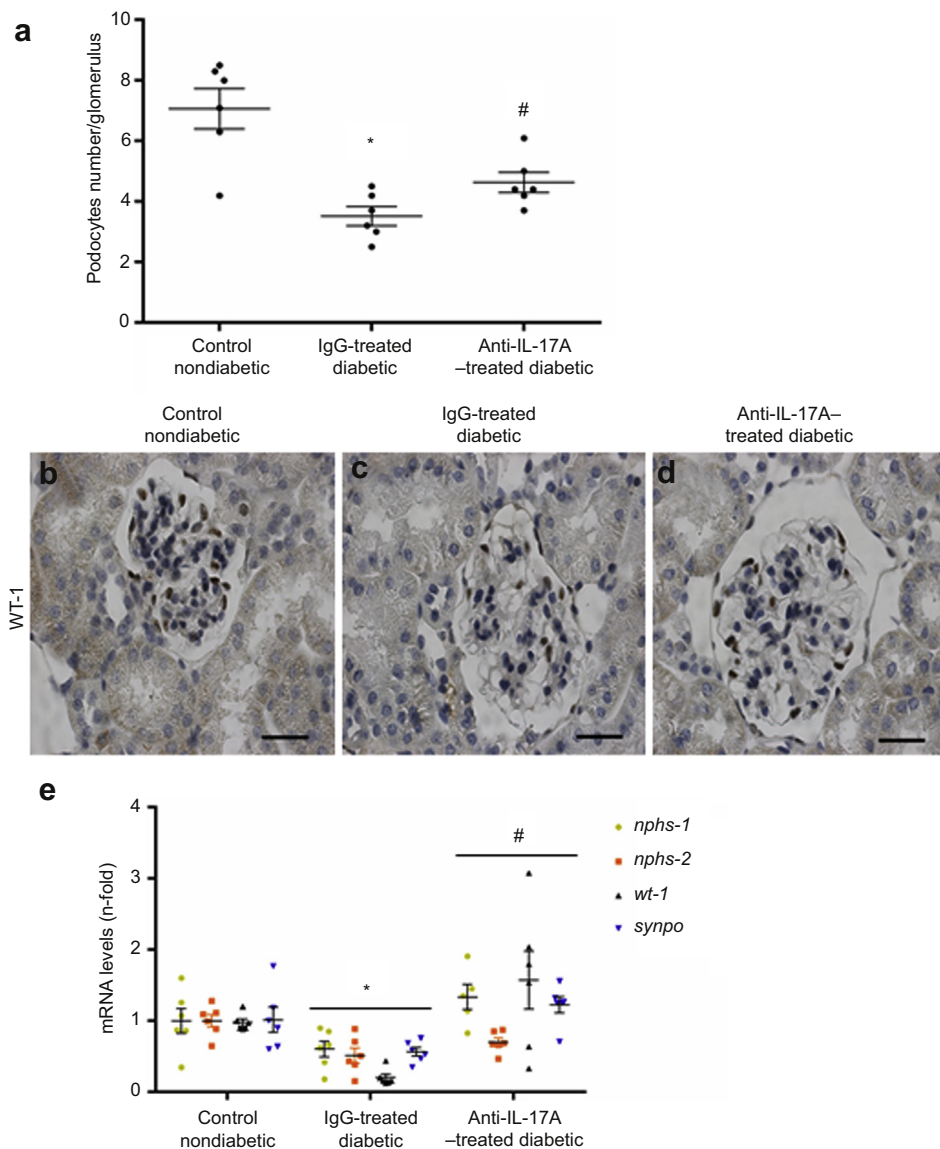


Figure 5 | Podocyte number and gene expression of podocyte markers in BTBR ob/ob experimental model. (a) The average number of podocytes observed of a total of 25 glomeruli per animal, and the mean \pm SEM of control mice, IgG-treated diabetic mice, and anti-interleukin (IL)-17A-treated diabetic groups. Representative images of immunohistochemistry against podocyte marker Wilms tumor protein 1 (WT-1; brown stained nuclei) for (b) control, (c) IgG-treated diabetic, and (d) anti-IL-17A-treated diabetic mice. Original magnification $\times 400$. Bars = 20 μ m. (e) Gene expression levels of *nphs1*, *nphs2*, *wt-1*, and *synpo* were evaluated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. mRNA levels in each sample were normalized by cyclophilin 1. At each time point, data were normalized by the mean value of their corresponding controls. Figures show individual gene expression values of each mouse and the mean \pm SEM of each group. $N = 6-8$ mice per group. * $P < 0.05$ versus control. # $P < 0.05$ versus IgG-treated diabetic. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

injury is the STAT pathway. The selective compound targeting STAT3 (nifuroxazide) inhibited hyperglycemia-induced cell responses and ameliorated renal damage in experimental DN.⁷¹ We also observed that blockade of IL-17A diminished STAT3 activation in the diabetic kidney. All these findings support the notion that the beneficial effects of IL-17A neutralization could be due to its antiinflammatory actions, blocking these important signaling pathways involved in the genesis of diabetic renal damage.

Although future studies are needed, our experimental data, which show that IL-17A blockade ameliorated damage

associated with DN, support the concept of IL-17A neutralizing antibody as a promising tool for chronic inflammatory diseases, including chronic kidney diseases.

METHODS

Design of the experimental model

The principles of laboratory animal care were followed, and the mice were killed after administration of anesthesia in accordance with the protocols approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the Universidad Austral de Chile (permit No. 222-2015) and according to National Institutes of Health guidelines. The establishment of BTBR ob/ob animals, diabetic and obese mice

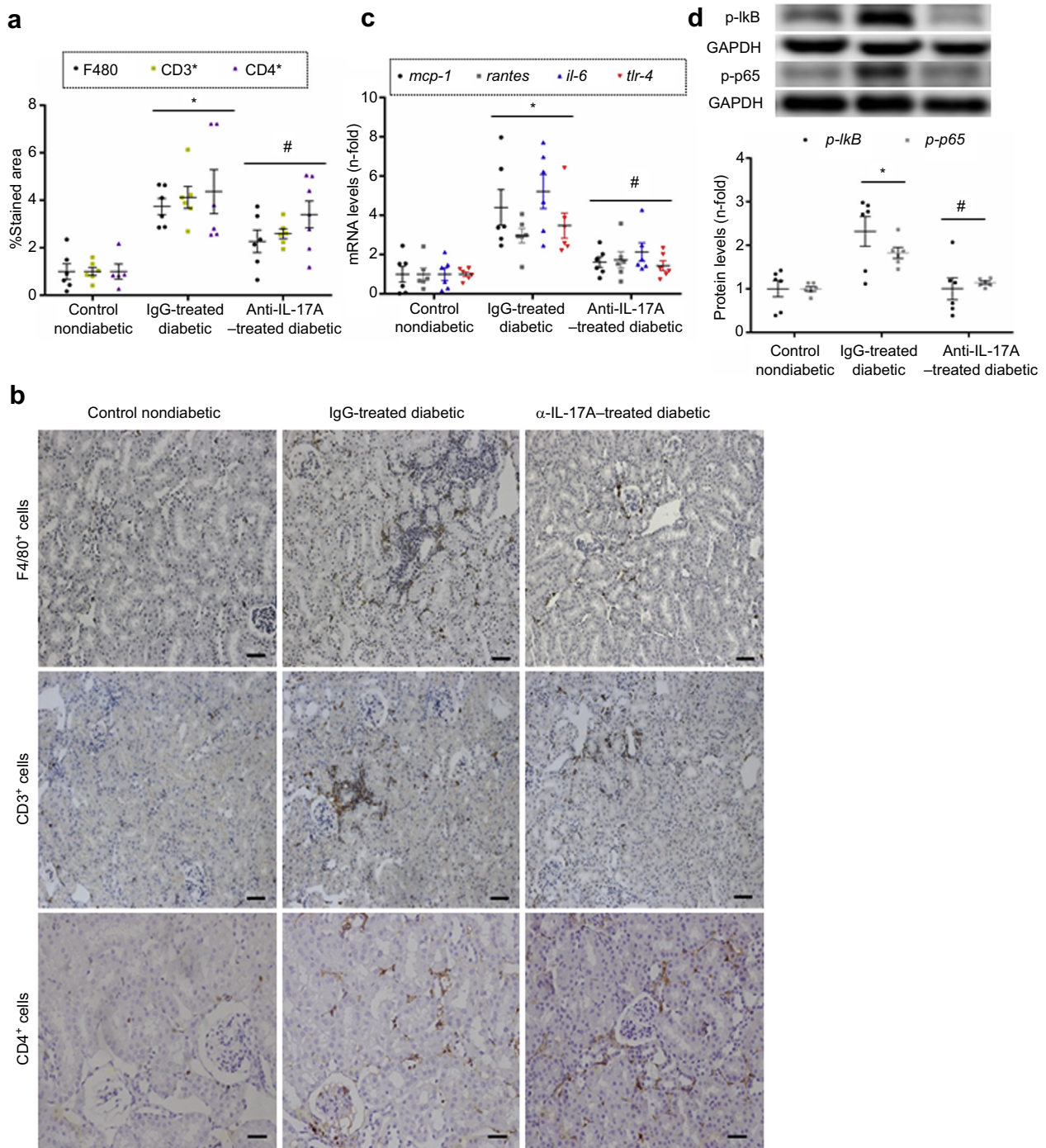


Figure 6 | Interleukin (IL)-17A neutralization inhibited renal-inflammatory responses in the mouse model of diabetic nephropathy. (a) Quantification of F4/80⁺, CD3⁺, and CD4⁺ cells as described in the Methods section, as n-fold change of positive staining versus total area, normalized by values of control mice and data of each animal and mean ± SEM. (b) Representative images of immunohistochemistry for control, IgG-treated, and anti-IL-17A-treated animals. Original magnification ×200. Bars = 20 μm. (c) Renal chemokines mRNA expression (*monocyte chemoattractant protein-1 [mcp-1]*; *regulated on activation, T-cell expressed, and secreted [rantes]*; *il-6*; and *Toll-like receptor [tlr-4]*) in each sample, normalized by cyclophilin 1. At each time point, data were normalized by the mean value of their corresponding controls. Figures show individual gene expression values of each animal and the mean ± SEM of each group. N = 6–8 mice per group. (d) Activation of renal nuclear factor (NF)-κB was evaluated, determining levels of p-IκB and p65 NF-κB subunit by Western blotting (representative immunoblots are shown in the upper panel and the summary of normalized quantification appears below). Figures show individual values of each mouse and are expressed as the mean ± SEM of 6–8 mice per group. *P < 0.05 versus control. #P < 0.05 versus IgG-treated diabetic mice. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

Table 1 | Western blot antibodies

Antibody	Dilution	Reference
IL-17A	1/500	ab79056
p-STAT3	1/500	#9131 Cell Signaling
ROR- γ T	1/500	14-6981 eBioscience
Phosphorylated p65 (Ser536)	1/500	#3033 Cell Signaling
Phosphorylated I κ B- α (Ser32)	1/500	sc-8404 Santa Cruz
GAPDH (loading control)	1/5000	MAB374 Chemicon Int

GADPH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; p-STAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; ROR- γ T, retinoic acid-related orphan receptor- γ T.

(referred to here as “diabetic mice”) and their corresponding controls (BTBR WT litter mate mice) has been previously described.⁷² These mice rapidly develop morphologic renal lesions characteristic of both early and advanced human DN.¹⁸

Characterization of DN throughout the study

Male BTBR ob/ob diabetic mice and corresponding control subjects were killed serially every 2 weeks, starting at week 4 and up until 20 weeks of age ($N = 6$ for each group).

Body weight was checked once a week. At the time the mice were killed, serum was collected and mice were anesthetized with 2% 2,2,2-tribromethanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) dissolved in 2-methyl-butanol (Sigma-Aldrich). The kidneys were removed, decapsulated, and cut along the sagittal plane. A portion of the left kidney was fixed in 4% formaldehyde or 2% glutaraldehyde and the right kidney was immediately frozen in liquid nitrogen and processed for RNA and protein extraction.

Once a week, blood glucose levels were checked with Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by caudal vein puncture. Serum creatinine levels were measured by Jaffe reaction (Creatinine LiquiColor, Human Biochemica und Diagnostica GmbH, Wiesbaden, Germany). Spot urine samples were collected once a week from all mice and analyzed for albumin by enzyme-linked immunosorbent assay (ALPCO, Salem, NH) and for creatinine by Jaffe reaction (Creatinine LiquiColor, Human Biochemica und Diagnostica GmbH, Germany) to obtain the urine albumin/creatinine ratio.

IL-17A neutralization model

Neutralizing antibody against murine IL-17A or its corresponding treatment control, the mouse IgG1-K isotype (eBioscience, Vienna,

Austria), were administered to BTBR ob/ob mice via subcutaneous osmotic minipumps (Alza Corp., Mountain View, CA) at a dose of 50 mg/kg/d, as in previous studies^{30,72} ($N = 6-8$ animals per group). This experimental approach was chosen to ensure correct antibody dose delivery, because previously described weekly i.p. injection^{30,72} could be difficult in this obese model because of the elevated abdominal fat of these mice after 6 weeks. IL-17A neutralization was started in the 15th week of life of the BTBR ob/ob mice, when mice already have developed the characteristic lesions of DN (therapeutic approach), and treatment was continued for 5 weeks. For neutralization experiments, BTBR ob/ob (diabetic mice) were studied as of 4 weeks of age, and at 15 weeks the mice were randomly distributed among 2 groups: one treated with an anti-IL-17A neutralizing antibody (“anti-IL-17A-treated”) and the other with IgG1-K isotype (“IgG-treated”) and studied at week 20 ($N = 6-8$ mice per group). In some experiments, these mice were compared with untreated BTBR ob/ob mice or control mice of the same age.

Protein studies

Total proteins from frozen renal tissues were isolated in T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL). Protein levels were quantified using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Renal protein levels were evaluated by Western blot analysis. Proteins (100 μ g/lane) were separated on 10% to 12% polyacrylamide-sodium dodecylsulfate gels under reducing conditions. Protein quality and efficacy of transfer were evaluated by Ponceau red staining (data not shown). Primary antibodies (Table 1) were detected with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, developed by Luminata Forte (MilliporeSigma, Billerica, MA), and scanned using the G:BOX Chemi XRQ (Syngene, Frederick, MD). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control.

IL-17A (eBioscience), pSTAT3 (Invitrogen, Rockford, IL), and TGF- β active (BioLegend, San Diego, CA) renal protein levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

Histologic analysis and immunohistochemistry

The specimens fixed in 4% formaldehyde were embedded in paraffin and cut into 4- μ m tissue sections for further histologic (periodic acid-Schiff/Masson) and immunohistochemistry studies. The tissue fixed in 2% glutaraldehyde (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was postfixed with 1% osmium tetroxide (Ted Pella Inc., Hedding, CA) included in resin EMbed 812 (Electron Microscopy Sciences,

Table 2 | Primers used for quantitative polymerase chain reaction

Gene	Forward	Reverse
<i>il-17A</i>	5'-TCTCCACCGCAATGAAGACC-3'	5'-GACCAGGATCTCTTGCTGGA-3'
<i>ngal</i>	5'-GCCCTGAGTGTCATGTGTCT-3'	5'-GAACTGATCGCTCCGGAAGT-3'
<i>kim-1</i>	5'-TGTCGAGTGGAGATTCCTGGATGGT-3'	5'-GGTCTCTGTAGCTGTGGGCC-3'
<i>mcp-1</i>	5'-AGCTCTCTTCTCCACCA-3'	5'-GGCGTTAACTGCATCTGGCT-3'
<i>rantes</i>	5'-AGAGGACTCTGAGACAGACA-3'	5'-CGAGCCATATGGTGAGGCAG-3'
<i>il-6</i>	5'-CCCCAATTTCCAATGCTCTCC-3'	5'-CGCACTAGGTTTGCCGAGTA-3'
<i>tlr-4</i>	5'-CTGGTTGCAGAAAATGCCAGG-3'	5'-TCATCAGGACTTTGCTGAGTT-3'
<i>nphs1</i>	5'-AGGGTCCGAGGATCGAA-3'	5'-GGGAAGCTGGGGACTGAAGT-3'
<i>nphs2</i>	5'-CCAAAGTGCAGGATGTC-3'	5'-TGA TGC TCC CTT GTG CTC TG-3'
<i>wt-1</i>	5'-CAGCGAAAGTTTTCCCGGTC-3'	5'-TGTTGTATGGCGGACCAAT-3'
<i>synpo</i>	5'-TCTCCTCGAGCCAAGCA-3'	5'-GAGAAGGGGACAAGACAGGC-3'
<i>cyc</i>	5'-GGCAATGCTGGACCAACACAA-3'	5'-GTAATAATGCCCGCAAGTCAAAAG-3'

cyc, cyclophilin; *il*, interleukin; *kim-1*, kidney injury molecule-1; *mcp-1*, monocyte chemoattractant protein-1; *ngal*, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; *nphs1*, nephrin; *nphs2*, podocin; *rantes*, regulated on activation, T cell expressed, and secreted; *synpo*, synaptopodin; *tlr*, Toll-like receptor; *wt-1*, Wilms tumor protein-1.

Hatfield, PA), cut, stained, and observed under a Philips Tecnai 12 BioTWIN electron microscope (Philips Research, Eindhoven, The Netherlands) at 80 kV.

Glomerular and tubulo-interstitial lesions were graded according to their histopathologic score (from 0 to 4) as previously described.³³ Immunohistochemistry for detection of WT-1 as a podocyte marker was performed with use of a heat-induced antigen retrieval system (Tris-base 10 mM, ethylenediamine tetraacetic acid 1 mM, 0.05% Tween 20, pH 9.0) for 10 minutes in a microwave oven. Sections were incubated overnight with Monoclonal Mouse Anti WT1 protein Clone 6F-H2, M3561 (dilution: 1:100; Dako, Carpinteria, CA) followed by incubation with the Mouse on Mouse (M.O.M.) Immunodetection Kit (PK 2200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and ImmPACT DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories).

IL-17A and interstitial infiltrating cells were detected by means of IL-17A, F4/80 (monocytes/macrophages) and CD3 (T lymphocytes), CD4 (T-helper lymphocytes), $\gamma\delta$ lymphocytes and myeloperoxidase (neutrophils) antibodies. F4/80 was detected with use of the MA1-91124 antibody (dilution: 1/100, Thermo Scientific) followed by ImmPRESS Reagent Kit (MP 7444, Vector Laboratories). IL-17A (ab79056 antibody, dilution: 1/100, Abcam, Cambridge, UK) and CD3 (A 0452 antibody, dilution: 1:200, Dako) were detected using Trilogy epitope retrieval (Cell Marque Corp., Rocklin, CA) and followed by horseradish peroxidase streptavidin (dilution 1:500, SA-5004, Vector Laboratories), revealed with DAB SK4105 (Vector Laboratories), and counterstained with hematoxylin. Gamma-delta lymphocytes (dilution: 1:250; BioLegend), myeloperoxidase (A0398 antibody, dilution: 1:1000, Dako), and CD4 (IS649 antibody, ready to use) staining were performed using the Dako Autostainer (Dako), as described previously.³¹ First, endogenous peroxidase was blocked and then sections were incubated for 30 minutes at room temperature or overnight at 4° C with primary antibodies. Slides were then treated with the EnVision DuoFLEX Doublestain System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. Sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin and evaluated by optical microscopy.

Image analysis and quantification of the immunohistochemistry signals were performed using the KS300 imaging system, version 3.0 (Zeiss, Oberkochen, Germany). For each sample, the mean staining area was obtained by analysis of 20 randomly chosen fields (original magnification $\times 200$) using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Rockville, MD). Data are expressed as positive-stained area compared with total area analyzed.

Podocyte involvement was calculated by enumerating podocyte nuclei stained for WT-1-positive glomerular cells by counting stained cells by immunohistochemistry in 25 glomeruli.

For double immunofluorescence staining, primary antibodies were followed by their corresponding anti-IgG Alexa488-conjugated or Alexa633-conjugated secondary antibody. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Samples were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) and examined using a Leica DM IRB confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Gene expression studies

Total RNA from renal tissue was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the method provided by the manufacturer and treated with DNase I to remove potential contamination with genomic DNA. cDNA was synthesized by the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corp., Madison, WI) using 2 μ g of total RNA primed with random hexamer primers. Quantitative gene expression analysis was performed on a Rotor-Gene Q (Qiagen,

Hilden, Germany) using primers designed by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) and the reagent KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) to determine the expression of genes of interest. Primers used for quantitative polymerase chain reaction are shown in Table 2. Polymerase chain reaction product specificity was verified by melting curve analysis, and all real-time polymerase chain reactions were performed in triplicate. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyze the relative changes in gene expression levels.

Statistical analysis

Results throughout the text are expressed as the n-fold increase over control subjects (mean \pm SEM). Differences between groups were assessed with the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was assumed when a null hypothesis could be rejected at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using SPSS statistical software, version 16.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants PAI 82140017 to CL; Fondecyt 1160465 to SM; Division of Nephrology, Universidad Austral de Chile, the Instituto de Salud Carlos III and FEDER European Union funds (PI14/00041, PI17/00119 to MR-O, and PI14/00386 and PI17/01495 to JE); Red de Investigación Renal (REDinREN; RD16/009) and Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3751 NOVELREN-CM) to MR-O, and Sociedad Española de Nefrología.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL contributed to the conception, design, and performance of the experiments; acquisition, analysis, and interpretation of all data; drafting of the manuscript; and in securing financial support for the study. YSM contributed to the performance of the experiments and the acquisition and analysis of data. MO contributed to the analysis and interpretation of data.

JDC contributed to the analysis and interpretation of data. AD contributed to the performance of the experiments. JE contributed to interpretation of the data, the critical review of the manuscript, and in securing financial support for the study. SM contributed to interpretation of the data, the critical review of the manuscript, and in securing financial support for the study. MR-O contributed to the design of the experiments, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript, and in securing financial support for the study. All authors reviewed the manuscript and approved the final version to be published.

REFERENCES

1. Nguyen DV, Shaw LC, Grant MB. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Front Endocrinol.* 2012;3:1–7.
2. Sharma D, Bhattacharya P, Kalia K, et al. Diabetic nephropathy: new insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:91–108.
3. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;2:2032–2045.
4. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, de Fuentes MM, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7:327–340.
5. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol.* 2013;3:957–976.
6. Turkmen K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. *Int Urol Nephrol.* 2016;49:1–8.

7. Tesch GH. Diabetic nephropathy—is this an immune disorder? *Clin Sci*. 2017;131:2183–2199.
8. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:763–776.
9. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22:230–241.
10. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;382:1705–1713.
11. Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, et al. Secukinumab, an interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis. *N Engl J Med*. 2015;373:2534–2548.
12. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2012;366:1190–1199.
13. Mease P, McInnes IB, Kirkham B, et al. Secukinumab inhibition of interleukin-17A in patients with psoriatic arthritis. *N Engl J Med*. 2015;373:1329–1339.
14. Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, et al. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology*. 2017;49:247–258.
15. Chen D-Y, Chen Y-M, Wen M-C, et al. The potential role of Th17 cells and Th17-related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis. *Lupus*. 2012;21:1385–1396.
16. Galvan DL, Danesh FR. Paradoxical role of IL-17 in progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:657–658.
17. Mohamed R, Jayakumar C, Chen F, et al. Low-dose IL-17 therapy prevents and reverses diabetic nephropathy, metabolic syndrome, and associated organ fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:745–765.
18. Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, et al. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1533–1542.
19. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:802–809.
20. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med*. 2008;36:S159–S165.
21. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2008;241:89–94.
22. Nalbant A, Eskier D. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2016;8:427–435.
23. Das J, Ren G, Zhang L, et al. Transforming growth factor β is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med*. 2009;206:2407–2416.
24. Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453:1051–1057.
25. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999;42:963–970.
26. Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9:589–593.
27. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1526–1534.
28. Matusiewicz D, Kivisäkk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 1999;5:101–104.
29. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;35:258–264.
30. Rodrigues-Díez R, Rodrigues-Díez RR, Rayego-Mateos S, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest*. 2013;93:812–824.
31. Rodrigues-Díez R, Aroeira LS, Orejudo M, et al. IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int*. 2014;86:303–315.
32. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int*. 2007;71:74–78.
33. Zoja C. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2898–2908.
34. Hojs R, Ekart R, Bevc S, et al. Biomarkers of renal disease and progression in patients with diabetes. *J Clin Med*. 2015;4:1010–1024.
35. Lin M, Han Yiu W, Jia Wu H, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:86–102.
36. Yu R, Bo H, Villani V, et al. The inhibitory effect of rapamycin on Toll like receptor 4 and interleukin 17 in the early stage of rat diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41:55–69.
37. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, et al. NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1254–1262.
38. Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:2505–2512.
39. Alpers CE, Hudkins KL. Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20:278–284.
40. Loverre A, Tataranni T, Castellano G, et al. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2011;11:1248–1259.
41. Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic role of IL-17-producing immune cells in obesity, and related inflammatory diseases. *J Clin Med*. 2017;6:68.
42. Turner J-E, Paust H-J, Steinmetz OM, et al. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int*. 2010;77:1070–1075.
43. Gan P-Y, Steinmetz OM, Tan DSY, et al. Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:925–931.
44. Chen S, Crother TR, Ardit M. Emerging role of IL-17 in atherosclerosis. *J Innate Immun*. 2010;2:325–333.
45. Summers SA, Steinmetz OM, Li M, et al. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:2518–2524.
46. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, et al. N(H) γ T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:353–357.
47. Keijsers RRM, Joosten I, van Erp PEJ, et al. Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol*. 2014;23:799–803.
48. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun*. 2015;60:1–11.
49. Tong Z, Liu W, Yan H, et al. Interleukin-17A deficiency ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Immunology*. 2015;146:339–346.
50. Kim S-M, Lee S-H, Lee A, et al. Targeting T helper 17 by mycophenolate mofetil attenuates diabetic nephropathy progression. *Transl Res*. 2015;166:375–383.
51. Emamullee J, Davis J, Merani S, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009;58:1302–1311.
52. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, et al. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 2013;56:1773–1780.
53. Solt LA, Banerjee S, Campbell S, et al. ROR inverse agonist suppresses insulinitis and prevents hyperglycemia in a mouse model of type 1 diabetes. *Endocrinology*. 2015;156:869–881.
54. Xue L, Xie K, Han X, et al. Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Surg Res*. 2011;171:266–274.
55. Peng X, Xiao Z, Zhang J, et al. IL-17A produced by both $\gamma\delta$ T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol*. 2015;235:79–89.
56. Ramani K, Biswas PS. Interleukin 17 signaling drives type I interferon induced proliferative crescentic glomerulonephritis in lupus-prone mice. *Clin Immunol*. 2016;162:31–36.
57. Qiu AW, Liu QH, Wang JL. Blocking IL-17A alleviates diabetic retinopathy in rodents. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41:960–972.
58. Xu H, Cai M, Zhang X. Effect of the blockade of the IL-23-Th17-IL-17A pathway on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253:1485–1492.
59. Takazawa Y, Maeshima Y, Kitayama H, et al. Infusion of angiotensin II reduces loss of glomerular capillary area in the early phase of anti-Thy-1.1 nephritis possibly via regulating angiogenesis-associated factors. *Kidney Int*. 2005;68:704–722.
60. Wenzel UO, Thaiss F, Helmchen U, et al. Angiotensin II infusion ameliorates the early phase of a mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2002;61:1020–1029.
61. Gong F, Liu Z, Liu J, et al. The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis. *Cell Immunol*. 2015;297:33–39.
62. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:556–567.

63. Kanamori H, Matsubara T, Mima A, et al. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360:772–777.
64. Lin M, Han Yiu W, Jia Wu H, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:86–102.
65. Moreno JA, Gomez-Guerrero C, Mas S, et al. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope. *Expert Opin Investig Drugs.* 2018;27: 917–930.
66. Liu D, Zhang R, Wu J, et al. Interleukin-17A promotes esophageal adenocarcinoma cell invasiveness through ROS-dependent, NF- κ B-mediated MMP-2/9 activation. *Oncol Rep.* 2017;37:1779–1785.
67. Shen Y, Xie X, Li Z, et al. Interleukin-17-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiac myocytes requires nuclear factor κ B through the phosphorylation of p65. *Microbiol. Immunol.* 2017;61: 280–286.
68. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine.* 2013;62:175–182.
69. Oguiza A, Recio C, Lazaro I, et al. Peptide-based inhibition of I κ B kinase/nuclear factor- κ B pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2015;58:1656–1667.
70. Kolati SR, Kasala ER, Bodduluru LN, et al. BAY 11-7082 ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammation via NF- κ B pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39:690–699.
71. Said E, Zaitone SA, Eldosoky M, et al. Nifuroxazide, a STAT3 inhibitor, mitigates inflammatory burden and protects against diabetes-induced nephropathy in rats. *Chem Biol Interact.* 2018;281:111–120.
72. Clee SM, Nadler ST, Attie AD. Genetic and genomic studies of the BTBR ob/ob mouse model of type 2. *Am J Ther.* 2005;12:491–498.