

Teràpia gènica amb hHGF en models de dany renal

Marcel·la Franquesa Bartolomé

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

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES CLÍNiques
FACULTAT DE MEDICINA

Teràpia gènica amb hHGF en models de dany renal.

Doctorand: Marcel·la Franquesa Bartolomé

Directors: Dr. Joan Torras Ambrós
Prof. Josep M Grinyó Boira
Dra. Immaculada Herrero Fresneda



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Desembre 2009

Foto i Disseny de la portada: Karla Junyent

En **Joan TORRAS AMBROS** Doctor en Medicina i Cirurgia i Metge Adjunt del Servei de Nefrologia de l'Hospital de Bellvitge, en **Josep M^a GRINYÓ I BOIRA**, Doctor en Medicina i Cirurgia, Cap del Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge i Professor del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona, i la **IMMACULADA HERRERO FRESNEDA**, Doctora en Biologia i investigadora IDIBELL

FAN CONSTAR:

Que la **MARCEL·LA FRANQUESA BARTOLOMÉ**, Llicenciada en Biologia, ha realitzat sota la nostra direcció el treball de recerca per a elaborar la seva Tesi Doctoral titulada **Teràpia gènica amb hHGF en models de dany renal**, i mitjançant aquest escrit autoritzen la seva presentació per a optar al Grau de Doctora en el programa de Medicina.

Es fa constar per la present i a tots els efectes a Barcelona a 9 de Desembre de 2009.

Joan Torras
Ambros

Josep M^a Ginyó
i Boira

Immaculada Herrero
Fresneda

AGRAÏMENTS

Paral·lelament a la feina realitzada al laboratori que ha donat fruit a aquests treballs que tinc l'oportunitat d'analitzar en conjunt, m'agradaria recapitular les vivències a través de la gent a qui vull agrair aquesta tesi.

D'entrada als meus pares (el Jaume i la M^a Dolors) que m'han animat sempre a afrontar els reptes i m'han ensenyat que un pot fer tot allò que es proposi. També per ensenyar-me que un punt de fuga és on es troben dues paral·leles. Als meus germans (el Jaume i l'Oriol) per ser els millors germans i amb els que he practicat tant les tècniques de defensa i discussió..., i als avis (el Jaume i la Josefina) per ser un exemple de felicitat. Tots ells, la meua família, són perennes i han estat i seran el punt de referència per prendre la mesura de la meua vida.

En aquesta etapa de la tesi la vida es transforma i apareixen nous punts de referència i noves formes de pensar que t'absorbeixen.

Quan vaig començar a treballar al laboratori de Nefrologia Experimental aquest era una petita família tan sols formada per dues biòlogues (la Marta i l'Imma), una farmacèutica (la Núria Lloberas) i una tècnic de laboratori (la Núria Bolaños) i ens sobrava espai per tot arreu! A la Marta i a la Immaculada els vull agrair el coneixement transmès sense el qual no existirien aquests treballs i a la Núria Ll. per ser més que una companya una bona amiga i per tota la feina colze a colze i cafè a cafè! I a la Núria B. la incondicional ajuda i interès en tot i per les hores a l'estabulari! I no puc oblidar-me de la Gabriela, amb qui vam estar fent tantes isquèmies i electroporacions renals.

El Joan Torras, el Josep M^a Cruzado i el Josep M^a Grinyó estaven a laboratori encomanant-nos la passió per la nefrologia sempre que la feina a

l'Hospital els ho permetia. Gràcies Joan per ser-hi i per les discussions diàries (tant científiques com no científiques). Al Josep M^a Cruzado li vull agrair haver-me donat sempre el punt de vista que un no veu des de dintre i al Josep M^a Grinyó els incomptables consells sempre encertats i els ànims en els moments més baixos.

Ara el laboratori és un bullici! L'arribada de l'Oriol, la Maria, la Inés, la Gema, l'Esther, l'Èlia la Linda, la Mari i més recentment l'Eva, el Marc i el Franc han capgirat totalment la vida al laboratori. No em puc imaginar estar envoltada de millor companyes i companys amb una predisposició tan gran a ajudar-nos els uns als altres. Gràcies per totes les vivències dintre i fora del laboratori. I gràcies també al Rafa per posar (imposar) la banda sonora d'aquest últims anys.

En aquests anys he fet també un parèntesi per aprendre altres formes de fer ciència. Una menció a la gent de Boston per donar-me l'última empenta que necessitava. Gràcies al Professor Joe Bonventre per la seva acollida al laboratori on vaig compartir ciència i amistat amb el Lakshman Gunaratnam i el Jeremy Duffield, i gràcies a tots els Bigelowers, els presents i els passats.

I un agraïment a l'equip de Patologia Experimental de l'IDIBAPS liderat per la Gina Hotter i l'Anna Sola, per haver-me ajudat en la investigació in vitro.

També vull agrair-vos les tabarres que heu aguantat tots aquells que no teniu res a veure amb la investigació biomèdica i que en algun moment per amistat m'heu preguntat què tal la tesi? De què va? Buf!! Bé, sobretot doncs perdó als que heu aguantat el "rotllo": les meves nenes d'Igualada (la Carola, la Sílvia, la Núria per tants anys d'amistat i la Marta i la Karla que a sobre m'aguanten també m'aguanten a Barcelona), la colla Xavi's (sobretot

el Carles que com que pregunta..., i també al Llufa, el Pin, el Xino, l'Armari, ... bé a tots!), també als dublinesos amb qui vaig compartir l'etapa pre-tesi i que per tant han vist la metamorfosi soferta durant aquests anys (un petonàs pel Borja i per l'Edu).

De Barcelona agrair als que també us dediqueu això per compartir les penes! La Míriam, l'Eva i la Laia han estat claus per no tirar la tovallola. També l'Ibo i l'Aurora per donar-me l'exemple de compaginar ciència i vida. I als que no us hi dediqueu però que a l'estar rodejats de científics us sabeu ja què és una PCR: la M^a Angeles i la Cris.

Moltes gràcies a tots els que heu format part d'aquesta etapa per haver-la compartida amb mi. Espero compartir amb vosaltres encara moltes etapes més.

I. ÍNDEX

ÍNDIX

SECCIÓ	Pàgina
I. ÍNDIX	2
II. INTRODUCCIÓ	7
1. <u>FRA</u>	9
1.1 Definició i causes	9
1.2 FRA isquèmic	10
1.2.1 <u>Fases de la I/R renal</u>	11
1.3 Fisiopatologia	13
1.3.1 <u>Dany vascular. Alteracions hemodinàmiques</u>	13
1.3.1.1 Dany endotelial	14
1.3.1.2 Infiltrat leucocitari	15
1.3.2 <u>Dany tubular. NTA Gènesis</u>	16
1.3.2.1 Apoptosi	18
1.3.2.2 Inflamació	19
2. <u>Nefropatia crònica de l'altoempelt (NCA)- FI/AT</u>	23
2.1 Definició i causes	23
2.2 Lesió tissular per I/R en el trasplantament renal	23
2.3 Activació cel·lular i fase de dany	25
2.3.1 <u>Activació cel·lular i inflamació intersticial</u>	25
2.3.1.1 <u>Aparició de miofibroblasts intersticials i activació dels fibroblasts residents</u>	27
2.4 Fase de senyalització fibrogènica	27
2.5 Fase fibrogènica	33
2.5.1 <u>Producció de matriu extracel·lular</u>	34

2.5.2 <u>Desregulació del balanç degradació-producció de matriu extracel·lular</u>	35
2.6 Fase destructiva	37
2.7 Hipòxia	38
2.7.1 <u>Hipòxia i fibrosi renal</u>	39
2.7.2 <u>Cèl·lula túbulintersticial i hipòxia</u>	40
2.7.3 <u>Hipòxia i inflamació</u>	42
2.7.4 <u>NFκB i hipòxia</u>	43
3. <u>HGF</u>	45
3.1 Estructura	45
3.2 Descobriment	47
3.2.1 <u>Descobriment a ronyó</u>	47
3.3 HGF i dany renal	48
3.3.1 <u>HGF i FRA</u>	48
3.3.2 <u>HGF i FRC</u>	48
3.4 HGF com a agent terapèutic	51
3.5 Teràpia gènica amb HGF	54
3.6 Mecanismes d'acció estudiats/proposats	56
4. <u>TERÀPIA GÈNICA NO VIRAL</u>	59
4.1 Electroporació	60
4.2 SP1017	64
III. HIPÒTESI I OBJECTIUS	63
IV. RESULTATS	69
<u>LLISTA D'ARTICLES PUBLICATS</u>	73

ÍNDEX

<u>ARTICLE 1:</u>	Direct electrotransfer of hHGF into kidney ameliorates ischemic acute renal failure.	77
<u>ARTICLE 2:</u>	HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms.	93
<u>ARTICLE 3:</u>	Tubular epithelial cells transfected with hHGF counteracts monocyte chemotactic protein-1 up-regulation after hypoxia/reoxygenation insult.	111
V. DISCUSSIÓ		117
VI. CONCLUSIONS		133
VII. BIBLIOGRAFIA		137

II. INTRODUCCIÓ

1. FRACÀS RENAL AGUT

1.1 Definició i causes

El Fracàs Renal Agut (FRA) és una pèrdua sobtada de la funció renal que resulta en la retenció de compostos nitrogenats (urea i creatinina) i no nitrogenats que normalment són excretats pel ronyó. Té una progressió ràpida de dies o setmanes.

Per al funcionament renal són necessàries tres premisses:

- Perfusió sanguínia adequada
- Integritat del parènquima renal
- Permeabilitat de les vies excretores

L'alteració sobtada de qualsevol d'aquests paràmetres pot ocasionar un deteriorament de la funció renal anomenat *fracàs, insuficiència o dany renal agut*.

El FRA pot ser, per tant, resultat d'una disminució de la perfusió renal sense dany cel·lular; un insult isquèmic, tòxic o obstructiu en el túbul renal; un procés túbulintersticial amb inflamació i edema; o una reducció primària de la capacitat de filtració del glomèrul.

Encara que es considera un procés multifactorial, amb diverses condicions solapades (que inclouen isquèmia, sèpsia, medicació i nefrotoxicitat i, en etapes posteriors, efectes retrògrads d'obstrucció renal o uretral per pedres), es considera el grau d'isquèmia com la causa principal del FRA¹. A més a més, les toxines que causen necrosi tubular tenen un patró fisiopatològic molt semblant al del FRA isquèmic.

1.2 Isquèmia/reperfusió

La isquèmia es defineix com l'aturada del flux sanguini, que es tradueix en una disminució de la pressió parcial d'oxigen, privant als teixits afectats d'oxigen i nutrients i provocant una alteració del metabolisme cel·lular.

Quan es restableix de nou el rec sanguini es produeix el fenomen de reperfusió. Caldria esperar que al tornar a circular la sang i restaurar l'entrada d'oxigen i nutrients a l'òrgan, aquest es recuperaria, quedant només la lesió isquèmica. Malauradament, i de forma paradoxal, la reperfusió dona lloc a una lesió més greu que la pròpia de la isquèmia degut a la formació secundària de radicals lliures d'oxigen i nitrogenats.

En conjunt, els factors fisiopatològics que tenen lloc com a conseqüència del restabliment del flux sanguini després d'un període d'isquèmia es denominen síndrome d'isquèmia/reperfusió (I/R)².

1.2.1 Fases de la I/R renal

En el curs clínic la I/R es pot dividir en tres fases: inici, manteniment i recuperació. Depenent aquesta última de la gravetat de la lesió (Fig.1).

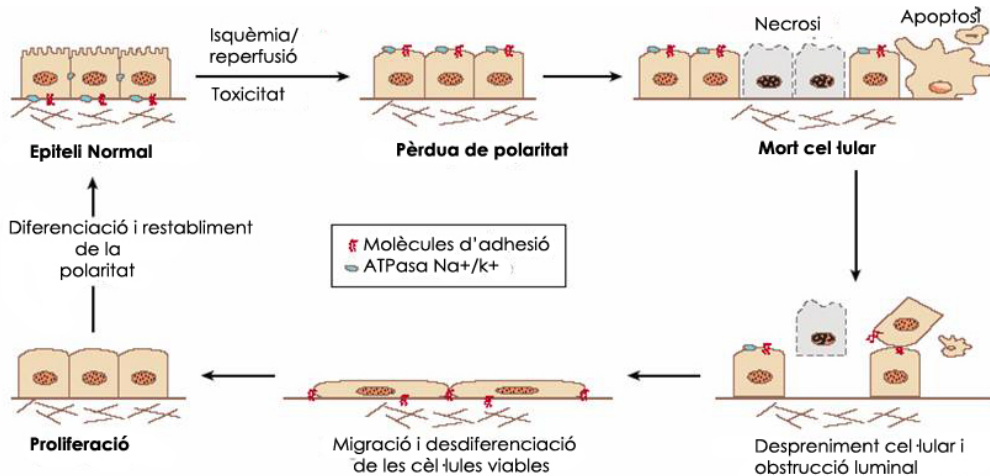


Figura 1. Cicle de dany-recuperació en l'epiteli tubular després d'un insult agut. (Cedit per J.V. Bonventre)

- Fase d'inici: és el període de temps donat entre l'exposició a la falta d'oxigen i l'inici del dany parenquimatós. Aquesta fase es caracteritza per la pèrdua de polaritat i inflamació cel·lular, pèrdua d'adherència a la matriu extracel·lular i mort cel·lular³. La taxa de filtració glomerular disminueix degut a una caiguda del flux sanguini renal, a la caiguda de la pressió de l'ultrafiltració glomerular i a la pèrdua de la integritat de l'epiteli tubular. La porció terminal del túbul proximal i la porció medullar ascendent de la nansa de Henle són els fragments més vulnerables de la nefrona a la isquèmia degut a l'elevada taxa de transport actiu de soluts, ATP-depenent, d'aquestes cèl·lules que porta també a un elevat consum d'oxigen.

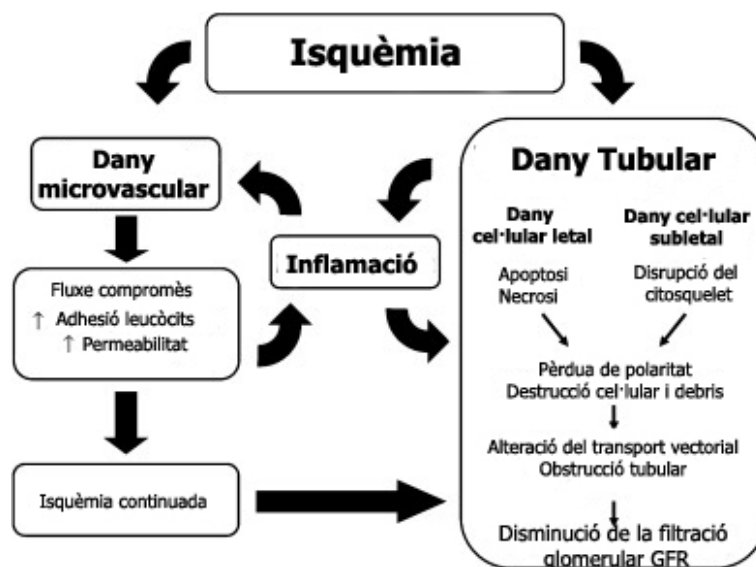
- Fase de manteniment: durant aquesta fase el dany parenquimatós ja està consolidat. Es produeix quan apareixen les complicacions urèmiques. No es coneix amb exactitud perquè la taxa de filtrat glomerular es manté baixa tot i corregir-se la baixa concentració d'oxigen. Hi ha varis mecanismes possiblement implicats, entre els quals s'inclouen la vasoconstricció renal permanent i la isquèmia medullar desencadenada per una alteració en l'alliberació de mediadors vasoactius per part de les cèl·lules endotelials danyades (per exemple el descens de l'òxid nítric (ON) i l'augment de l'endotelina-1 (ET-1)), la congestió dels vasos sanguinis medullars i la lesió per reperfusió provocada pels mediadors alliberats pels leucòcits o per altres cèl·lules del parènquima renal.

- Fase de recuperació: és el període en el qual es produeixen tots els fenòmens de reparació i regeneració del teixit renal i és absolutament dependent del grau del dany inicial. Això depèn tant de la capacitat de recuperació de les cèl·lules danyades subletalment, com de l'eliminació de restes necròtiques i cilindres intratubulars, i de la capacitat de regeneració de les cèl·lules tubulars per restaurar la continuïtat i la funció normal de l'epiteli tubular. A nivell cel·lular es manifesta per un increment de cèl·lules desdiferenciades i cèl·lules mitòtiques en les àrees danyades ^{4, 5}. La seva presència assenyala un procés regeneratiu post I/R renal. La continuació de la fase de recuperació s'associa amb la regeneració de l'epiteli i el restabliment de la polaritat.

1.3 Fisiopatologia de FRA isquèmic

La I/R provoca en el ronyó fonamentalment dos tipus d'alteracions:

- Dany vascular
- Dany tubular



1.3.1 Dany vascular. Alteracions hemodinàmiques⁶

Inicialment els estudis morfològics incriminaven les cèl·lules endotelials com a principals responsables de la disminució del flux sanguini renal contribuint a la congestió microvascular.^{5, 7} Estudis més tardans demostraren un increment de la congestió microvascular i un augment dels eritròcits atrapats a la medulla renal externa durant el FRA^{8, 9, 10}. Estudis addicionals^{11, 12, 13} demostraren que l'augment en la permeabilitat de la microvasculatura era un dels incidents primaris que promovia l'hemoconcentració i la congestió vascular per eritòcits.

A més a més, els estudis de Hellberg et al^{8, 12, 13} suggereixen que l'augment en la permeabilitat microvascular contribueix al descens general de la taxa de filtració glomerular no només per l'acumulació de glòbuls rojos i congestió vascular, sinó també a través de l'edema intersticial, l'increment de la pressió tubular i l'increment de l'obstrucció tubular.

La causa d'aquestes alteracions hemodinàmiques és múltiple, donant-se més importància a les següents¹⁴:

-La isquèmia redueix l'alliberació d'òxid nítric (ON) per part de les cèl·lules endotelials, resultant impossible el manteniment d'una vasodilatació arterial normal.

-Congestió de la circulació medullar per el manteniment d'aquesta, la qual cosa novament redueix l'alliberació d'oxigen a la zona medullar externa.

La suma d'aquests factors augmentaria la vasoconstricció. Aquesta provoca modificacions persistents en la distribució del flux sanguini renal i l'aportació d'oxigen, repercuteix en una isquèmia més severa en la medulla renal externa que a la resta del parènquima. Aquesta congestió de la medulla externa és una altre punt clau del dany vascular en el FRA isquèmic i s'associa a la sobrerregulació de molècules d'adhesió (ICAM, P-selectina).

1.3.1.1 Dany endotelial

En els models animals de FRA s'han observat alteracions en la morfologia de la cèl·lula endotelial i estudis recents demostren que en el FRA es dona una disrupció del citosquelet d'actina en les cèl·lules

endotelials de la microvasculatura renal¹⁵. La disrupció de l'esquelet d'actina endotelial té una implicació important per al manteniment de les estructures cel·lulars incloent els complexos d'adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula matriu.

1.3.1.2 Infiltrat leucocitari

En el dany per I/R renal la resposta inflamatòria dona com a resultat l'activació endotelial, augment de l'adhesió cèl·lula endotelial-leucòcit, migració leucocitària i compromís en el flux microvascular. A part de molècules d'adhesió per atreure leucòcits, les cèl·lules endotelials també alliberen mediadors inflamatoris per promoure l'activació de l'infiltrat. Aquests mediadors inclouen citoquines, espècies reactives d'oxigen (ROS) i eicosanoids que a més a més sobreregulen l'expressió de molècules d'adhesió. Els leucòcits són reclutats per les quimiocines que es sobreregulen per l'acció de les ROS¹⁶ i per les citoquines pro-inflamatòries IL1 i TNF α ^{17,18}.

Els diferents tipus leucocitaris també tenen un rol específic en la inflamació. Així l'activitat mieloperoxidasa (MPO) és elevada ràpidament després de l'insult isquèmic i probablement és degut a la infiltració de macròfags i/o neutròfils¹⁹. La cinètica de l'infiltrat de neutròfils és encara controvertida però les evidències mostren una aparició primerenca en els ronyons de ratolins²⁰ i també en biòpsies de pacients en les primeres fases de Necrosi Tubular Aguda (NTA) es troben neutròfils en els vasa recta²¹. Els macròfags i les cèl·lules T s'infiltra més tardanament en el curs del dany i persisteixen durant la fase de recuperació²². Ratolins Knockout (KO) per les molècules d'adhesió CD4+CD8+ dels limfòcits T estan protegits del dany per I/R renal²³. També el bloqueig de la coestimulació CD28-B7 protegeix

del dany isquèmic en rates inhibint significativament l'infiltrat de cèl·lula T i macròfags²⁴.

El paper dels macròfags i dels limfòcits T està essent qüestionat ja que s'estan trobant nous fenotips amb acció protectora i antiinflamatòria a nivell renal^{25,26}.

1.3.2 Dany tubular. NTA

La necrosi tubular aguda és la forma clínica paradigmàtica del FRA. Té un origen secundari en les modificacions hemodinàmiques que originen la isquèmia perllongada (NTA isquèmica) o agressions tòxiques (NTA nefrotòxica). Ambdós tipus d'agressions produeixen un dany estructural de les cèl·lules tubulars i insuficiència renal per alteracions en la perfusió renal, en la funció glomerular i en els túbuls renals.

En la NTA isquèmica són més sensibles la pars recta del túbul proximal i la porció gruixuda ascendent de la nansa de Henle, probablement degut als seus majors requeriments d'ATP (pel transport actiu de soluts molt important en aquest nivell), i perquè la zona medullar externa, lloc d'assentament d'aquestes estructures, té una pitjor irrigació vascular que altres zones renals¹⁴. (Fig.III)

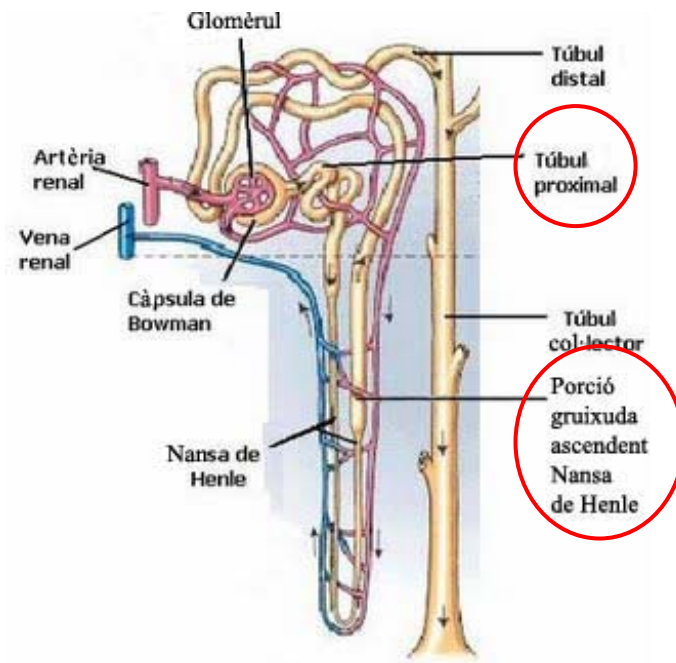


Figura III. Esquema d'una nefrona. Les porcions més sensibles a la disminució en la pressió parcial d'oxigen són el túbul proximal i la porció gruixuda ascendent de la nansa de Henle.

La disfunció que s'observa en la NTA és més probablement causada per una organització cel·lular alterada en les cèl·lules epitelials tubulars (CETs) danyades subletalment, els canvis en el flux sanguini i l'obstrucció vascular, i també l'obstrucció tubular per debris i cèl·lules despreses i la resposta inflamatòria al dany hipòxic

Les alteracions histològiques amb àrees de necrosi tubular, pèrdua cel·lular epitelial tubular, cilindres en els túbuls distals, etc. formen la base morfològica d'aquestes alteracions.

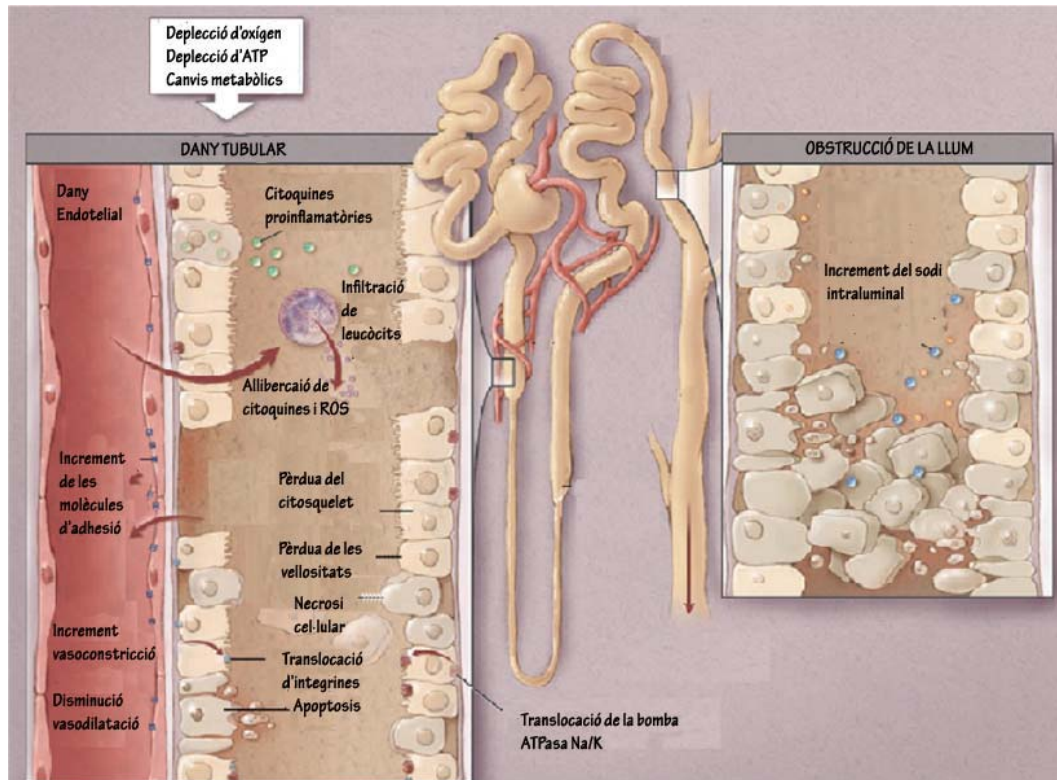


Figura IV. La depleció d'oxigen inicia una cascada d'esdeveniments que impliquen necrosi i apoptosi tubular, dany endotelial, adhesió i infiltració de cèl·lules infiltrants i formació de cilindres en els túbuls distals.

1.3.2.1 Apoptosi

La patogènesis de la mort cel·lular en la NTA és complexa i varia depenent de l'etiologia, severitat i fase del dany. Hi ha però cada cop més evidències del paper central que juga l'apoptosi^{27, 28}.

El FRA induït per I/R renal està associat amb activació de les caspases i amb sobreexpressió de varis gens o proteïnes proapoptòtiques com

FADD (Fas-associated death domain), p53, Bad, fas, Smac/Diablo i Par-4 (Prostate apoptosis response-4)²⁹.

En el context del trasplantament renal l'apoptosi de l'epiteli tubular del ronyó del donant i una disminució de Bcl-xL i Bcl-2 estan associats a una elevada incidència de FRA^{30,31}. La interferència en una o més vies apoptòtiques durant la progressió del FRA tindria un paper protector.

1.3.2.2 La cèl·lula tubular com a cèl·lula proinflamatòria³²

El FRA isquèmic està associat també a inflamació túbul-intersticial, que s'associa amb la sobreexpressió d'una varietat de mediadors com citoquines i quimiocines, activació del complement i infiltració de leucòcits al parènquima renal desencadenant una cascada inflamatòria³³. (Fig.V)

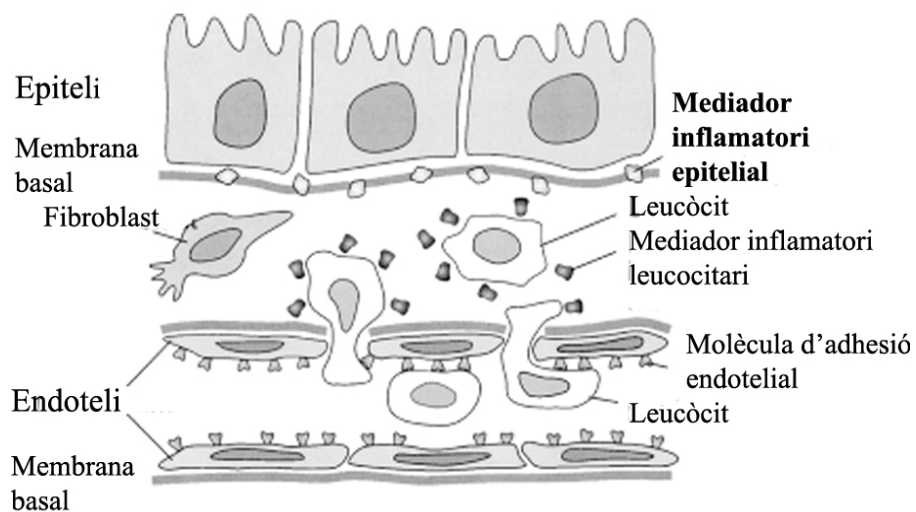


Figura V. L'epiteli tubular es transforma en secretor de molècules inflamatòries en resposta a varis estímuls. *Modificat de Bonventre et al*³³.

La cèl·lula epitelial tubular proximal (CETP) podria tenir un paper clau en el progrés del dany agut inflamatori al dany crònic, posant èmfasis en la producció de complement, citocines i quimiocines per part d'aquestes. En aquest procés la cèl·lula epitelial tubular no és només una víctima del dany hipòxic sinó que activament dirigeix el procés inflamatori i contribueix a un augment del dany.

La cèl·lula tubular allibera citocines pro-inflamatòries com el TNF α (Tumor Necrosis Factor α), la IL-6, la IL-1 β (Interleucines 6 i 1 β)¹⁸, el TGF β (Transforming Growth Factor- β), i les quimiocines com MCP-1, IL-8, RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), ENA-78 (Epithelial-derived Neutrophil Activating Protein 78)³⁴. S'ha observat que MCP-1 i IL-8 s'expressen en les cèl·lules tubulars corticals després de depleció d'ATP³⁵, i també que la reducció de l'expressió en cèl·lula tubular de TNF α , IL-8 i MCP-1, IL-1 β i IL-6 mitjançant l'administració de BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7, un membre de la família de TGF β) tenia un efecte protector en el dany isquèmic³⁶.

Les fractalquines (membres de la família de les quimiocines) també són produïdes per les CETPs³⁷. Tenen una funció combinada de quimiocina i molècula d'adhesió i indueixen la migració i adhesió de leucòcits, facilitant el dany induït per macròfags.

L'epiteli proximal tubular també modula l'activació dels limfòcits T³⁵. CD40 s'expressa en les cèl·lules proximals del túbul proximal i actua com a receptor de CD154 (l'ligand expressat típicament en les cèl·lules T). Quan CD154 s'uneix a CD40 activa TRAF6 (TNF receptor-activating Factor 6). CD40 i TRAF es transloquen separatament des de la membrana i TRAF6 activa la fosforilació de les vies de JNK (Jun-Kinase) i p38 MAPK (mitogen activated protein kinase), que al seu torn estimulen la producció d'IL-8 i

MCP-1³⁵. CD40 també indueix la producció de RANTES en l'epiteli tubular proximal humà. Aquest efecte és amplificat per IL-4 i IL-13 expressat per la subpoblació de cèl·lules Th2³⁸.

Així també, les teràpies que tenen com a diana específica algun dels tipus de cèl·lula inflamatòria o bé les proteïnes efectores com ara les proteïnes del complement^{39, 40}, quimiocines^{41, 42}, o molècules d'adhesió^{43,44} poden millorar el FRA isquèmic en models animals.

A part doncs dels efectes citotòxics derivats de la hipòxia, la cèl·lula tubular juga un paper actiu, doncs, en la inducció del procés inflamatori que contribueix al dany tissular que en resulta.. Després del dany per I/R s'ha vist un increment en l'expressió de TLR2 i TLR4 (Toll-like Receptor 2 i 4) en aquestes cèl·lules⁴⁵. La senyalització a través de TLR2 indueix a l'elaboració de quimiocines per part de les TECs. També la síntesis de C3 (proteïna del complement) contribueix al dany mediat pel complement⁴⁶, i també un augment en l'expressió del receptor C5a en les cèl·lules després del dany per I/R³⁹. En canvi, l'expressió en la superfície cel·lular d'inhibidors està disminuïda⁴⁷. Els mediadors alliberats per les cèl·lules inflamatòries són responsables directes de l'activació de les cèl·lules tubulars proximals, que al seu torn s'involucren en la cascada inflamatòria amb la producció pròpia de mediadors inflamatoris.

2. NEFROPATIA CRÒNICA DE L'AL·LOEMPELT

2.1 Definició i causes

És un dany cumulatiu que es caracteritza per un empitjorament gradual de la funció renal i pels canvis característics en la biòpsia renal: fibrosi crònica intersticial (FI) i atròfia tubular (AT)^{48,49}. La nomenclatura NCA ha estat en els darrers anys abandonada (per la no especificitat) i s'està adoptant l'acrònim FI/AT que es suggeria en la conferència de Banff del 2005⁵⁰

En el context del trasplantament hi ha dos factors que juguen un rol principal en la generació del dany crònic:

-El dany per isquèmia/reperfusió. Principal causa del dany túbulintersticial generat.

-El rebuig agut. Causant del dany vascular i glomerular.

2.2 Lesió tissular per I/R en el trasplantament renal

La lesió per isquèmia/reperfusió desencadena una reacció inflamatòria que afecta la funció de l'empelt renal tant a curt com a llarg terme. Estudis previs⁵¹ han demostrat la relació entre la resposta purament immunològica, desencadenada pels factors al·loreactius, i la resposta

inflamatòria inherent al procés del trasplantament fent-se evident l'activació recíproca entre ambdós processos que convergeixen en el que s'ha denominat resposta immuno-inflamatòria. Aquesta resposta té lloc en el període inicial d'allotrasplantament i predisposa l'empelt al reconeixement immunològic i al rebuig, accelerant i agreujant la NCA.

En la resposta immuno-inflamatòria els limfòcits T migren cap a l'àrea subendotelial per mediació de les molècules d'adhesió i indueixen la producció de gran varietat de citoquines estimuladores (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α) i de factors de creixement (PDGF, IGF-1, FGF, TGF- β , EGF, VEGF,...) que participen en el procés de rebuig i a més a més promouen la progressió del dany endotelial⁵². Aquests mediadors són sintetitzats tant per les cèl·lules infiltrants com per les residents del parènquima renal. En totes les vies activades per hipòxia, especialment les relacionades amb la inflamació, s'activa la cascada d'NF- κ B⁵³. Els factors de creixement, com PDGF i VEGF, indueixen la proliferació de les cèl·lules endotelials i els miofibroblasts via activació de PI3K. Les vies implicades, tot i ser en principi independents, acaben convergint i actuant sinèrgicament exacerbant la conseqüència de la lesió.

Aquests tipus de nefropatia porten a un procés de fibrosi destructiva (hi ha una correlació entre el grau de fibrosi intersticial i la pèrdua de funció renal) que té lloc en diferents moments després del trasplantament i en diferents compartiments histològics (les dividim arbitràriament en 4 seguint la classificació d'Eddy et al⁵⁴):

- Activació cel·lular i fase de dany
- Fase de senyalització fibrogènica
- Fase fibrogènica

-Fase destructiva

2.3. Activació cel·lular i fase de dany

Aquesta fase es basa en dues accions que són requisits per la fibrosi renal:

-Activació de la cèl·lula tubular i inflamació intersticial

-Aparició de miofibroblasts intersticials i activació dels fibroblasts residents.

2.3.1 Activació de la cèl·lula tubular i inflamació intersticial

Les primeres accions en la progressió del dany renal es produeixen en les cèl·lules túbulintersticials que són crítiques en l'acumulació de proteïnes de matriu extracel·lular a l'espai intersticial. La proteïnúria ofereix un ambient únic a les cèl·lules tubulars⁵⁵ que es veuen exposades a molècules que propaguen el dany renal, faciliten la inflamació i/o directament contribueixen a la fibrosi com:

- Molècules bioactives originades al plasma o en els glomèruls inflamats com la transferrina. Aquesta genera ió fèrric que es pot catalitzar per la reacció de Haber-Weiss Fenton i produir espècies reactives d'oxigen⁵⁶.

- L'acció dels mecanismes intrínsecs antioxidants (catalasa, glutatió peroxidasa i superòxid dismutasa).

- Producció de pèptids vasoactius (ET-1 i Ang II que propaguen el dany isquèmic degut al seu efecte vasoconstrictor)⁵⁷.
- Modulació de la resposta a quimioatracients, proteïnes del complement i citoquines, a la isquèmia, la lipidúria i la deposició de cristalls túbulintersticials.
- Producció de quimiocines com MCP-1 que atreuen els macròfags que contribueixen a la generació de fibrosi⁵⁸.
- Generació de proteïnes del complement que també són potents atraients de macròfags. Les cèl·lules tubulars activen C3a i C5a però també generen C3 i C4⁵⁹.
- Molècules d'adhesió de leucòcits com ICAMs, VCAMs (Intercellular and Vascular cell Adhesion Molecules), osteopontina^{60, 61}, que faciliten el reclutament de cèl·lules mononuclears i que s'expressen tant en la superfície de les cèl·lules tubulars com de les endotelials
- Expressió, com a conseqüència del dany, d'antígens que activen la resposta immunològica mediada per cèl·lula T com HSP70⁶².
- Molècules directament implicades en la fibrosi com IGF-1 i TGF β (Insuline Growth Factor-1) poden ser filtrades durant la proteïnúria, unir-se a la membrana apical de la cèl·lula tubular i estimular la síntesis de proteïnes de la matriu extracel·lular⁶³.

2.3.2 Aparició de miofibroblasts intersticials i activació dels fibroblasts residents

El segon factor prerequisite per la generació de fibrosi és l'aparició de miofibroblasts intersticials i l'activació dels miofibroblasts residents. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per l'expressió de la proteïna α SMA (Smooth Muscle Actin), i són considerats més profibròtics que els fibroblasts intersticials residents. L'estudi de l'origen d'aquest tipus cel·lular és una àrea activa d'investigació. Les hipòtesis encara obertes inclouen la diferenciació i/o proliferació de fibroblasts intersticials, migració de cèl·lules perivasculars i la transdiferenciació i migració de cèl·lules tubulars⁶⁴.

També estan sota estudi actiu els possibles factors iniciadors. Alguns dels candidats ja s'han identificat:

-TGF β té la capacitat de transformar fibroblasts a miofibroblasts i induir l'expressió d' α SMA i canvis fenotípics en les cèl·lules tubulars⁶⁵.

-PDGF-BB injectat en les rates promou l'aparició de miofibroblasts intersticials⁶⁶.

2.4 Fase de senyalització fibrogènica

Alhora o com a conseqüència dels processos cel·lulars es generen un conjunt de molècules que tenen el seu receptor en les cèl·lules túbulintersticial que resulten en una acumulació de matriu al llarg de tota la membrana basal i en l'espai intersticial. Les més importants són:

TGF β

Es considera el principal promotor de la fibrosi i sembla que juga un paper clau en la patogènesis de la fibrosi renal. S'han detectat tres isoformes en mamífers però la més estudiada en la fibrosi és TGF β 1. Tant els leucòcits infiltrants com els residents a ronyó estimulen la producció latent de TGF β . També pot venir filtrat del plasma durant la proteïnúria. Existeixen varis factors capaços d'estimular la producció de TGF β incloent Ang II, ET-1, isquèmia, glucosa, insulina, IGF-1, el factor natriurètic atrial, factors activador de plaquetes, tromboxà i medicació com la ciclosporina⁶⁷. TGF β pot també autoinduir la seva pròpia expressió. La major part del TGF β aïllat del plasma, l'orina o el teixit renal es troba com en forma de complex latent que s'ha de processar per alliberar l'homodímer actiu de 25kDa. L'activació és un pas important que limita la bioactivitat de TGF β , tot i que no es coneix el mecanisme a través del qual es produeix aquesta activació en el ronyó. L'activació es pot produir *in vitro* mitjançant plasmina, furina, glicosidasa, transglutaminasa, metalloproteinasa-9, pH àcidic, trombospondina i IGF/receptor mannanosa-6-fosfat.

La majoria de cèl·lules expressen receptors de TGF β , la qual cosa suggereix que la disponibilitat de receptors no serà un factor limitant per la bioactivitat de TGF β . Existeixen també varis inhibidors naturals de TGF β com LAP (pèptid associat a la latència) que és un pèptid que queda després d'alliberar-se la forma activa de TGF β . També formes solubles del receptor tipus II⁶⁷.

Els efectes biològics de TGF β són produïts per transmissió nuclear de senyals a través dels receptors cel·lulars. La forma activa de TGF β s'uneix al receptor de tipus II de TGF β que és una serina-treonina quinasa que

subsegüentment recluta i fosforila el receptor de tipus I. El complex lligand-receptor heterodimèric fosforila llavors les proteïnes citoplasmàtiques de la família de les SMAD. En general Smad2 i Smad3 estimulen els mecanismes nuclears dependents de TGF β mentre que Smad6 i Smad7 actuen coma inhibidors d'aquesta senyal. Se sap encara poc sobre la senyalització nuclear en el dany renal progressiu.

L'activació de TGF β dispara algunes accions que promouen fibrosi incloent la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes de la matriu, inhibidors d'enzims degradadors de la matriu i receptors integrines d'unió de la matriu; la transformació dels fibroblasts a miofibroblasts; transdiferenciació de cèl·lules epitelials tubulars a miofibroblasts; i quimiotaxis de fibroblasts i monòcits. L'expressió sobrerregulada de TGF β és una característica de quasi tots els models experimentals de fibrosi renal. Alguns estudis han confirmat que els efectes fibrogènics de TGF β després d'una curta exposició i el seu rol en situacions on l'acumulació de proteïnes de la matriu es produeix durant un llarg període no està totalment establert i estudiat per manca de dades funcionals *in vivo* però en models de ratolí transgènic que sobreexpressen TGF β l'evidència mostra que desenvolupen fibrosi glomerular i intersticial^{68,69}. Saber si la inhibició de TGF β es pot produir sostingudament durant llargs períodes de temps per prevenir la fibrosi renal crònica seria molt interessant per establir la rellevància d'aquest factor.

CTGF

És un important mediador secundari de l'activitat de TGF β . Indueix proliferació de fibroblasts, síntesis de proteïnes de la matriu, i expressió d'integrines. S'uneix al seu propi receptor. La producció intersticial

incrementada de CTGF s'ha observat en àrees de dany crònic de biòpsies humanes⁷⁰ i en ratolins amb nefropatia diabètica⁷¹. La inhibició de CTGF mitjançant oligonucleòtids antisentit disminueix la fibrosi induïda per Ang II disminuint la producció de fibronectina⁷².

Angiotensina II

El ronyó és capaç de produir tots els substrats i enzims necessaris per generar Ang II localment⁷³. L'Ang II estimula la producció de TGF β en diverses cèl·lules incloent les cèl·lules tubulars renals i els fibroblasts. Alguns estudis demostren que l'ús d'antagonistes del receptor de l'Ang II o de l'enzim convertidor d'Ang II (ECA) redueix el TGF β en models experimentals i atenua la fibrosi intersticial^{74,75}. A més a més, els ratolins genèticament deficients per Ang II desenvolupen menys fibrosi a partir d'obstrucció ureteral unilateral⁷⁶. En humans amb nefropatia diabètica o NCA, el bloqueig farmacològic d'Ang II s'ha vist que disminueix els nivells plasmàtics de TGF β , i es correlaciona amb la preservació de la funció renal⁷⁷. També és possible que alguns dels efectes profibròtics d'AngII siguin independents de TGF β . Estudis *in vitro* indiquen que l'Ang II pot tenir efectes directes sobre l'expressió de col·lagen⁷⁸. L'efecte vasoconstrictor de l'Ang II podria contribuir a la isquèmia túbulintersticial i per tant agreujar la fibrosi.

Endotelina-1

Existeixen tres isoformes en mamífers però l'ET-1 és l'endotelina renal més abundant. L'ET-1 pot ser produïda per diverses cèl·lules en el ronyó com les cèl·lules tubulars, les endotelials, els fibroblasts i els macròfags. D'entre

els possibles estímuls potencialment activadors, s'ha observat que l'exposició de les cèl·lules tubulars a proteïnes que es poden haver perdut en l'orina durant la proteïnúria, estimula la producció d'ET-1⁷⁹. Degut a les propietats vasoconstrictores, la producció renal d'ET-1 pot intensificar el dany isquèmic. A més a més de incrementar l'expressió de TGF β , ET-1 pot promoure fibrosi estimulant directament la síntesis de matriu i disminuint l'activitat de la col·lagenasa. Estudis experimentals en models de nefrotoxicitat per ciclosporina⁸⁰, nefritis lúpica⁸¹, isquèmia freda⁸², NCA⁸³ demostren que els antagonistes d'ET-1⁸⁴ o els bloquejants del seu receptor preserven la funció renal per disminuir la severitat del dany túbulintersticial. A més a més un model de ratolí transgènic que sobreexpressa ET-1 humana, és normotens però desenvolupa anormalitats associades amb cists tubulars i fibrosi intersticial⁸⁵.

Altres factors fibrogènics

Hi ha altres factors i citoquines que s'ha vist que tenen efectes profibròtics però els coneixements sobre la seu paper en la fibrosi renal són encara limitats.

>PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor): s'ha vist implicat en la fibrosi renal intersticial per la seva capacitat de transformar fibroblasts en miofibroblasts. Aquest efecte s'ha vist tant *in vitro* com *in vivo* en el tractament de rates amb PDGF-BB recombinant promovent l'aparició de miofibroblasts intersticials i macròfags⁶⁶. L'augment de l'expressió tubular i intersticial de la subunitat B del receptor de PDGF s'ha associat en models experimentals i humans a fibrosi⁸⁶. Manquen encara estudis per aprofundir en el rol d'aquest factor.

>**bFGF (basic Fibroblasts Growth Factor)**: és conegut sobretot pel seu paper en l'angiogènesis i pel seu efecte mitogènic en diverses cèl·lules incloent les cèl·lules residents del ronyó. L'administració crònica de bFGF en les rates causa esclerosis glomerular⁸⁷.

>**TNF α** : és una citoquina pleiotròpica que exerceix diversos efectes pro-inflamatoris i immunomoduladors. Actua unint-se a dos receptors independents p55 i p75. Mentre TNF α és un conegut mediador del dany glomerular agut, hi ha evidències recents que suggereixen que pot tenir efectes profibròtics. Ratolins deficientes per p55 i p75 desenvolupen fibrosi intersticial després de lligació ureteral⁸⁸. No està clar si té un efecte directe o bé indirecte a través de l'estimulació d'altres factors fibrogènics com TGF β . TNF α és mitogènic i quimiotàctic pels fibroblasts però pot tenir també efectes anti-fibròtics augmentant l'activitat de la col·lagenasa.

>**IL-1**: és una altra citoquina pro-inflamatòria que s'ha vist fortament implicada en la patogènesis del FRA. També té el potencial d'activar la proliferació dels fibroblasts i possiblement la producció de matriu. L'estudi amb un model de ratolí deficient per IL-1 o pel seu receptor tipus I ha demostrat que la deficiència per IL-1RI protegeix de la fibrosi intersticial reduint també TGF β 1 i l'acumulació de col·lagen. La deficiència d'IL-1 β ofereix una lleugera protecció però no reducció en l'acumulació de col·lagen⁸⁹.

Factors antifibròtics

-**IFN γ (Interferó γ)**: aquesta citoquina immunomoduladora també té conegudes accions antifibrogèniques degudes al seu efecte inhibitor de l'expressió de miofibroblasts i de col·lagen. La infusió d'IFN γ recombinant

directament en el ronyó de rata després d'una nefrectomia 5/6 disminueix significativament l'acumulació de col·lagen intersticial⁹⁰.

-HGF (Hepatocyte Growth Factor): aquest factor de creixement i el seu receptor c-met juguen un paper crític en el desenvolupament i la regeneració després del dany agut. Una incrementada producció tubular d'HGF s'ha observat en àrees de dany tubular en biòpsies humanes⁹¹. El tractament de ratolins nefròtics amb HGF recombinant inhibeix la fibrosi túbulintersticial, i s'associa a la reducció en la producció renal de PDGF i TGF β i formació de miofibroblasts intersticials. TGF β inhibeix la formació d'HGF, il·lustrant així interaccions recíproques entre aquests factors pro- i antifibròtic⁹².

-IGF-1: s'ha vist que accelera la recuperació després d'un dany isquèmic agut i recentment també s'ha observat com redueix significativament l'acumulació de col·lagen intersticial en rates neonates amb uropatia obstructiva(UUO)⁹³. En altres contextes IGF-1 pot tenir efectes profibrogènics⁹⁴.

El balanç entre factors pro- i anti-fibròtics és d'importància cabdal en la progressió del dany.

2.5 Fase fibrogènica

La síntesis i secreció d'una o varies molècules fibrogèniques per part de les cèl·lules túbulintersticials resulta en l'activació d'un nou grup de gens que porten a l'acumulació de matriu extracel·lular a l'espai intersticial. Actualment es creu que l'excessiva acumulació de proteïnes de la matriu

extracel·lular que causen una cicatrització progressiva és la conseqüència de dos processos paral·lels: un augment en la síntesis i una disminució en la degradació. El manteniment d'aquest balanç és doncs un punt clau.

2.5.1 Producció de matriu extracel·lular

La cicatrització intersticial consisteix de fet en vàries molècules el rol de les quals no està del tot clar. Inclou proteïnes normals de la matriu (Col·làgens I, III, V, VII, XV, fibronectina) i proteïnes de la matriu normalment restringides a la membrana basal dels túbuls (col·lagen IV i laminina). Alguns estudis que usen la hibridació *in situ* demostren que els miofibroblasts són els majors productors d'aquestes proteïnes però també les cèl·lules tubulars i altres cèl·lules intersticials⁹⁵. A més a més, per tal d'establir suport estructural, aquestes proteïnes poden interaccionar amb receptors cel·lulars, especialment de la família de les integrines. Com a conseqüència, la matriu extracel·lular pot influenciar el comportament de les cèl·lules veïnes. La fibronectina també té propietats quimiotàctiques que poden perpetuar la inflamació intersticial.

La cicatrització intersticial es pot veure com un canvi dinàmic de l'estructura renal a mesura que el dany renal progressa. Inicialment aquesta estructura és relativament inestable i susceptible a degradació. Amb el temps, aquestes unions afegeixen estabilitat i confereixen resistència relativa a l'activitat de les proteases. Els canvis en la composició de la matriu com la proporció de col·lagen I i col·lagen III poden contribuir al procés d'estabilització⁹⁶.

Altres constituents de l'interstici fibròtic inclouen proteoglicans, polisacàrids i glicoproteïnes. Igual que les proteïnes de la matriu aquests

constituents tenen altres funcions a part de donar suport estructural. El hialuronan s'acumula a l'interstici i el seu receptor cel·lular CD44 pot expressar-se en macròfags i túbuls renals. El hialuronan pot potenciar la inflamació intersticial estimulando la producció en la cèl·lula tubular d'MCP-1⁹⁷ i molècules d'adhesió cel·lular.

2.5.2 Desregulació del balanç degradació-producció de matriu extracel·lular

El procés de remodelació durant la fibrosi no només involucra canvis que estableixen l'estructura renal sinó també processos de trencament i degradació d'algunes proteïnes. Algunes proteases de degradació de la matriu són sintetitzades en cèl·lules residents del ronyó i es creu que ajuden a mantenir l'arquitectura normal del ronyó. Un pas clau en l'inici de la fibrosi és la producció d'inhibidors de les proteases. En el mateix moment en què la síntesis de matriu s'accelera, la maquinària enzimàtica que es prepara per regular aquest procés de remodelació degradativa s'inactiva. De fet les lesions fibròtiques primerenques poden ser totalment revertides, suposadament per activitat proteasa, si el procés primari s'atura. La fibrosi túbul-intersticial s'ha revertit en rates amb síndrome nefròtic agut⁹⁸ i també en humans amb nefropatia diabètica⁹⁹.

El ronyó normal produeix un nombre de proteases que tenen especificitat per proteïnes de la matriu. Les més importants són les metal·loproteïnases (MMPs) tot i que les serina proteïnases (plasmina i catepsina G) i les cisteïna proteïnases lisosomals (catepsina B, H i L) també poden ser actives. Les MMPs és una llarga família d'endopeptidases on cada enzim té com a substrat una fracció diferent de la matriu. Les MMPs solubles es divideixen en els subgrups: collagenases intersticials,

gelatinases, estromalisines i elastases. La seva activació pot ser enzimàtica però també per acció de metabolits reactius d'oxigen i peroxinitrat. S'han identificat 4 grans inhibidors de les MMPs que són TIMP (Tissue Inhibitors of MMPs) -1, -2, -3 i -4.

Una observació freqüent és l'inducció sobtada de TIMP-1 en la majoria de danys renals progressius tant en models animals com en humans. TIMP-1 pot ser sintetitzat pels macròfags, les cèl·lules tubulars epitelials i quasi totes les cèl·lules mesenquimals, incloent els fibroblasts. A part de TGF β altres factors de creixement poden induir l'expressió de TIMP-1 (EGF, PDGF, TNF α , TGF α), també citoquines (IL-1, IL-6, IL-10), oncostatina M, endotoxina i trombina.

Un altre sistema important en el balanç producció/degradació de la matriu extracel·lular és de la cascada depenent de plasmina. La seva habilitat per degradar fibrina, plasmina i altres components de la membrana basal i la matriu extracel·lular (fibronectina, laminina, tenascina-C) es suma a la capacitat d'activar MMPs latents.

El PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) s'ha associat a fibrosi intersticial en varis models experimentals de síndrome nefròtic, endotoxèmia, nefrotoxicitat, rebuig de l'alloempelt, nefropatia diabètica i altres. TGF β és un potent inductor de l'expressió de PAI-1. PAI-1 és produït a les cèl·lules tubulars, els fibroblasts i els miofibroblasts. Els models de ratolí deficient per PAI-1 desenvolupen significativament menys fibrosi renal que els ratolins no modificats genèticament¹⁰⁰.

2.6 Fase destructiva

A mesura que s'expandeix l'espai intersticial i s'acumulen les proteïnes de la matriu, aquestes comencen a tenir efectes perjudicials en l'estructura renal i per tant també en la seva funció. Els túbuls renals particularment, essent un 80% del volum renal, esdevenen víctimes del procés fibrogènic destructiu que en molts casos han contribuït a crear. L'atròfia tubular deixa a vegades nefrones amb glomèruls aparentment normals que no tenen el segment distal del túbul (glomèruls atubulars)¹⁰¹. L'apoptosi sembla tenir un paper rellevant en aquest procés.

La isquèmia tubular perpetua la mort de cèl·lules tubulars tant per apoptosi com per necrosi. La hipòxia pot influir directament l'expressió gènica amb conseqüències promotores de la fibrosi. Les cèl·lules tubulars *in vitro* exposades a hipòxia mostren una disminució de l'activitat d'MMP i una síntesis incrementada de col·lagen¹⁰². No només els túbuls són aïllats de la seva font d'oxigen per la matriu intersticial fibròtica, sinó també els capil·lars peritubulars postglomerulars són directament obliterats per destrucció provocada per la fibrosi. Igual que la pèrdua de túbuls, una disminució en l'àrea de superfície dels capil·lars peritubulars és un tret histològic que es relaciona amb la pèrdua de funció renal¹⁰³. L'apoptosi de la cèl·lula endotelial s'ha observat en models experimentals de dany renal progressiu¹⁰⁴.

2.7 Hipòxia i NCA

En un entorn nadiu o singènic i en absència d'altres agressions al teixit, la reacció inflamatòria tendeix a disminuir de forma natural al cap de pocs dies ja que el ronyó posseeix una notable capacitat regenerativa¹⁰⁵. Tot i això, en un entorn al·logènic com és el cas del transplantament renal la reacció inflamatòria incideix en l'activació de la resposta immunològica⁵¹ vigoritzant el cicle d'inflamació - inducció de lesió i convertint-se en un mecanisme autopropagatiu de retroalimentació positiva que portaria a la lesió crònica¹⁰⁶.

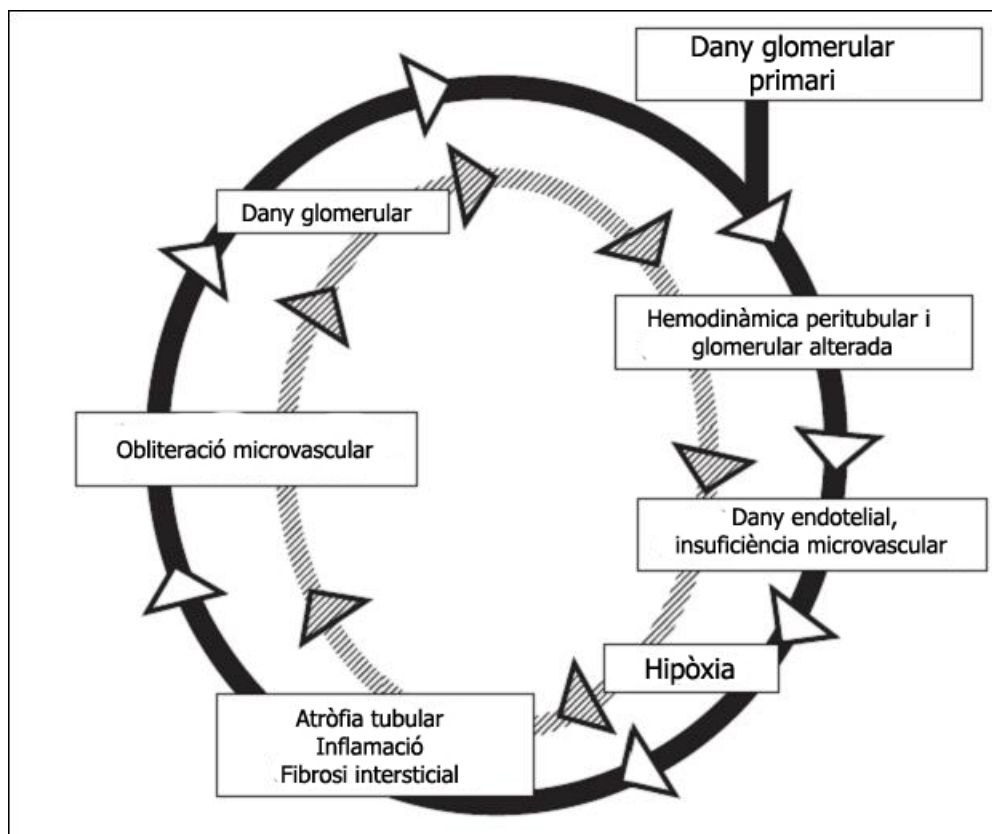
A part de l'obliteració de la microvasculatura hi ha altres factors que poden contribuir a la disminució de l'oxigenació tissular. Entre ells trobem anèmia (disminució en l'aportament d'oxigen), vasoconstricció com a resultat de la sobreproducció de vasoconstrictors com l'Ang II i l'ET-1, o un decrement en la producció de vasodilatadors com l'òxid nítric, disminució en el flux capil·lar, demanda metabòlica incrementada com a resultat de la hiperfiltració de les nefrones danyades i un augment de la distància de difusió d'oxigen degut a l'acumulació de MEC entre els vasos sanguinis i les cèl·lules adjacents^{107,108}.

En resposta a la baixa concentració d'oxigen, les cèl·lules regulen l'expressió d'un gran nombre de gens, tant directament per via transcripcional com indirectament a través de mediadors secundaris, involucrats en la supervivència cel·lular i l'adaptació¹⁰⁹.

Tot i que s'ha demostrat que el principal regulador de la resposta hipòxica és HIF-1 (Hipoxia Inducible Factor-1) hi ha més factors implicats en la resposta transcripcional a la hipòxia com Sp1, AP1, CREB, p53 i NFkB¹¹⁰.

2.7.1 Hipòxia i fibrosi renal.

La relació entre la hipòxia i la fibrosi renal sorgeix a partir de l'estudi dels mecanismes que relacionen el dany glomerular amb el dany túbulintersticial. La hipòtesis de la hipòxia crònica descrita per Fine et al^{111,112} proposa que el dany glomerular primari conduiria a un dany secundari en la microvasculatura peritubular.



FiguraVI: La teoria de la hipòxia crònica es basa en l'espiral de dany que es crea a partir d'un dany primari i es retroalimenta. Modificat de Norman¹⁰⁶

L'efecte sobre la microvasculatura crearia un ambient hipòxic que dispararia la resposta inflamatòria en les cèl·lules túbulintersticials. A la seva vegada aquesta resposta tindria un impacte en els capil·lars i nefrones adjacents, provocant una perpetuació de la destrucció i de la hipòxia, culminant en el fracàs renal. Prova de la veracitat d'aquesta hipòtesis és la relació directa entre la pèrdua de la microvasculatura i el desenvolupament de fibrosi glomerular i túbulintersticial^{113, 107}.

A part de l'expressió gènica regulada de forma directa, la hipòxia pot alterar l'expressió gènica de forma indirecta mitjançant mediadors secundaris. Els factors de creixement i citoquines induïts per hipòxia i els seus receptors poden fer un bucle autocrí o paracrí de regulació. Molts dels factors de creixement induïts per hipòxia estan implicats també en fibrosi, com TGF β , PDGF i CTGF¹¹⁴.

2.7.2 Cèl·lula túbulintersticial i hipòxia.

Els estudis *in vitro* de cèl·lula túbulintersticial (cèl·lula endotelial microvascular, tubular epitelial i fibroblast intersticial) sotmesa a hipòxia (0,5%-1% d'oxigen) demostren com inicia una sèrie de canvis ben definits en la fibrosi.

La pèrdua de la microvasculatura cortical en els ronyons fibròtics¹¹⁵ implica que la resposta predominant de la cèl·lula endotelial front a la hipòxia sigui la mort cel·lular. Una altra possibilitat és que per analogia amb la cèl·lula tubular, posseïssin la capacitat de transdiferenciar-se a (mio)fibroblast¹¹⁶ i que la hipòxia condueixi aquest procés portant a una disrupció de la microvasculatura, augmentant la hipòxia tissular, i augmentant el nombre de fibroblasts productors de matriu extracel·lular.

La majoria dels estudis *in vitro* amb cèl·lula epitelial tubular s'han centrat en la CETP. S'ha suggerit que la hipòxia pot induir canvis consistents amb el fenotip fibrogènic i que promourien l'acumulació de matriu extracel·lular amb un canvi cap a la producció de col·lagen I i suprimint la renovació de la matriu¹¹⁷. La hipòxia indueix transició epiteli - mesènquima¹¹⁸, i també apoptosi¹¹⁹, fets consistents amb la pèrdua de cèl·lules tubulars *in vivo*. La hipòxia també promou l'expressió de factors fibrogènics per aquestes cèl·lules com el TGFβ¹²⁰ o l'ET-1¹²¹ i també angiogènics com VEGF¹²².

Els fibroblasts són els productors de matriu extracel·lular majoritaris en l'interstici tubular^{114, 123}. La hipòxia *in vitro* promou el fenotip fibrogènic, amb un increment de la proliferació, de la diferenciació dels miofibroblasts i una producció de matriu alterada, que s'ha associat amb l'activació sostinguda de la via de senyalització MAPK^{124, 125}. La hipòxia sobrerregula els enzims involucrats en la modificació post-translacional del col·lagen¹²⁶, produint potencialment una matriu amb propietats mecàniques alterades i més resistent a la degradació. Sembla que alguns dels aspectes del fenotip fibrogènic induït en els fibroblasts per hipòxia poden ser deguts a les accions autocrines dels factors de creixement induïts per hipòxia.

Paral·lelament a l'increment de la producció de matriu extracel·lular, la hipòxia suprimeix la degradació de la matriu disminuint l'expressió i activitat de les MMPs, particularment de col·lagenasa intersticial MMP-1 i l'increment de l'expressió de TIMP-1 (la regulació gènica d'aquest depenent d'HIF¹²⁴). Una altra família de les metal·loproteases, les ADAMs, que s'encarreguen de l'alliberació de molècules de superfície, sembla que també tenen un rol en la fisiopatologia del fracàs renal per l'acció d'ADAM-17 sobrerregulada per Ang II¹²⁷.

La hipòxia també pot induir als fibroblasts a la generació de mediadors inflamatoris, tot i que és depenent del context i del tipus cel·lular¹²⁸.

Així, tot i que el dany renal crònic s'inicia majorment amb dany glomerular, és el grau de dany túbulintersticial el que ens donarà un millor indicador de la progressió del dany.

2.7.3 Hipòxia i inflamació.

A més de la resposta fibrogènica sobre les cèl·lules túbulintersticials, la hipòxia pot ser un important estímul per promoure la inflamació persistent que és un component intrínsec de la mateixa resposta fibròtica¹¹⁴. Així la hipòxia promouria la generació de factors pel reclutament de cèl·lules inflamatòries¹²⁹. La disminució d'oxigen dispararia l'expressió d'una àmplia bateria de gens inflamatoris que atraurien les cèl·lules inflamatòries, i al seu torn els macròfags infiltrants augmentarien el consum d'oxigen, fet que encara agreujaria la hipòxia local. (Fig.VII)

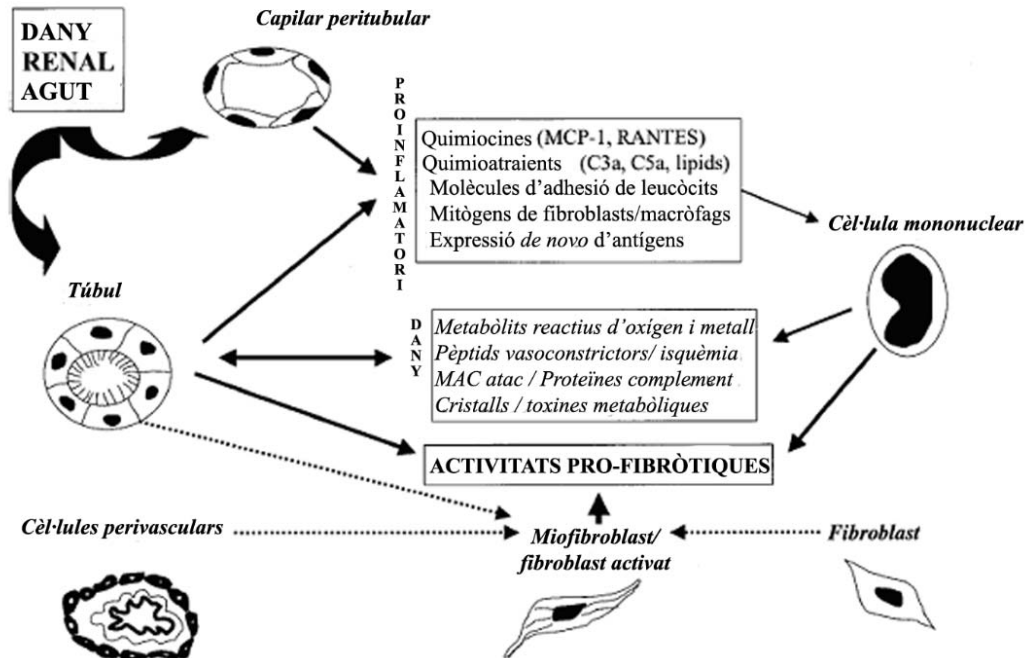


Figura VII. Activació cel·lular i fase de dany. L'insult renal inicial pot tenir efectes que portin a la producció i alliberació de molècules proinflammatòries i danyines portant a la inflamació intersticial i al dany túbulintersticial associat. L'activació dels capil·lars peritubulars facilita el reclutament de les cèl·lules mononuclears⁵⁴.

2.7.4 NFκB i hipòxia

NFκB és un factor de transcripció de resposta a la hipòxia i existeixen múltiples mecanismes d'activació, alguns dels quals estan també implicats en la fibrosi. S'ha demostrat que la hipòxia activa NFκB en varis estudis¹³⁰⁻¹³², tot i que els mecanismes implicats no s'han clarificat. Els gens activats per NFκB estimulat per hipòxia inclouen COX-2 (cyclooxigenase-2), TNFα, IL6, MIP-2.

Aquest factor de transcripció s'ha estudiat àmpliament pel seu rol en la immunitat innata, resposta a determinats estímuls nocius, supervivència cel·lular i desenvolupament, i es creu que juga un paper central com a mediador transcripcional de la resposta inflamatòria¹³³. És una família que consta de 5 membres: p65 (RelA), cRel i RelB que són els membres transcripcionalment actius, i p50 i p52 que deriven de les proteïnes més llargues p105 i p100 respectivament. Aquests membres poden unir-se en homodímers o heterodímers per formar complexos transcripcionals. El dímer més comú i actiu és p50-p65.

En absència d'estímul, el repressor I κ B segresta NF κ B al citosol. Quan hi ha un estímul, I κ B és marcat per ubiquitinització i degradació mitjançant fosforilació específica de serines. Així NF κ B és translocat al nucli on porta a terme la seva activitat transcripcional en els llocs específics κ B i promotors dels gens regulats. Entre aquests gens trobem els que codifiquen per citokines inflamatòries, quimiocines i molècules d'adhesió⁵³.

3. HGF

L'Hepatocyte Growth Factor és un factor cel·lular paracrí de creixement, motilitat i morfogènic. Actua principalment sobre cèl·lula endotelial i epitelial a través del seu receptor proto-oncogènic c-met activant la via de senyalització tirosina quinasa.

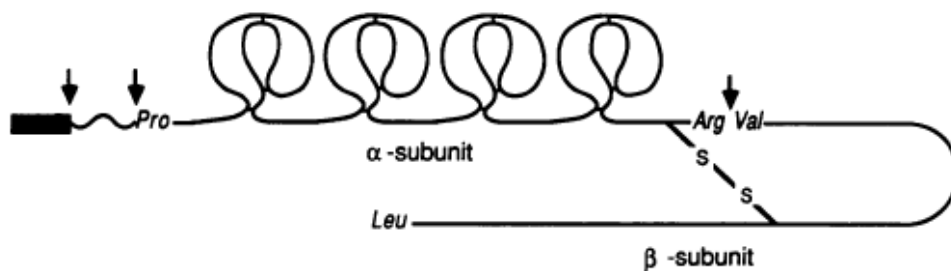
3.1 Estructura

És una glicoproteïna, derivada de mesènquima, d'unió a heparina que és secretada com a cadena única (pro-HGF) que és el precursor inert. Sota les condicions apropiades, com dany tissular, el pro-hgf es converteix en la forma bioactiva per digestió proteolítica en un lloc específic de la molècula. Aquesta digestió proteolítica pot ser mediada la urokinasa activadora del plasminogen (uPA) o per proteases homòlogues al factor XII.

L'HGF madur és un heterodímer que consisteix en una cadena alfa de 69 kDa i una cadena beta de 34 kDa que s'uneixen per un pont disulfid. Les seqüències nucleotídiques del ADNc (ADN còpia) humà, de rata, o de ratolí prediuen que les dues cadenes són codificades per un sol ORF (open reading frame) que resulta en un polipèptid de 728aa. La cadena alfa de

l'HGF conté un bucle (de 27aa) en el seu extrem amino i 4 dominis únics coneguts com a kringles (per la similitud en forma amb els pastissets escandinaus del mateix nom), mentre que la cadena beta conté estructures serina proteasa-like.

Cell Biology: Tashiro *et al.*



El motiu kringle és una estructura en doble hèlix de 80 aminoàcids formada per tres ponts disulfid interns, i va ser primerament descrit en enzims involucrats en coagulació i la fibrinòlisis. Així doncs es comprèn la semblança d'hHGF amb diferents proteïnes relacionades amb la coagulació i la fibrinòlisi com el plasminogen, però aquestes proteïnes no tenen activitat potenciadora del creixement comparable a HGF. Tampoc HGF té cap activitat proteasa coneguda ja que les aminoàcids normalment presents en el lloc catalític de les serina proteases, està mutat en l'HGF, mentre que les seqüències consens que normalment l'envolten estan conservades. Aquestes característiques estructurals úniques d'HGF l'han portat a ser el prototip d'una nova família de factors de creixement.

3.2 Descobrimet

Nakamura el 1984¹³⁴ aïllà aquest factor en el fetge de rates parcialment hepatotectomitzades, per la seva capacitat d'estimular la síntesis d'ADN en els hepatòcits de rata adulta i per aquest motiu se'l va anomenar factor de creixement dels hepatòcits (HGF). Altres investigadors corroboraren aquesta troballa en el sèrum de rates parcialment hepatotectomitzades^{135, 136} i també en plaquetes^{137, 138}. El 1989 aconseguiren clonar i expressar el gen d'HGF humà¹³⁹, i un any més tard Tashiro del grup de Nakamura estudia els diferents teixits de rata a la recerca de l'expressió de l'ARNm d'HGF. Així troba que aquest s'expressa en ronyó, cor, pulmó, cervell i també en el fetge danyat¹⁴⁰.

L'HGF no té especificitat d'espècie, així per exemple, l'HGF de rata estimula la síntesis d'ADN en cultiu primari d'hepatòcits humans, canins i porcins¹⁴¹.

3.2.1. Descobrimet a ronyó

En el ronyó, l' HGF és produït per fibroblasts, incloses les cèl·lules de l'interstici renal, i per les cèl·lules mesangials. A través de la unió al seu receptor el proto-oncogen c-met (una tirosina-quinasa transmembrana heterodimèrica) és capaç d'exercir un efecte mitogènic sobre les cèl·lules epitelials renals i endotelials. Recentment s'ha descrit que tant las cèl·lules mesangials com les endotelials glomerulars posseeixen ARNm per a l'HGF i el seu receptor c-met, el qual està present també en les cèl·lules epitelials

glomerulars i tubulars. La producció local d'HGF actua estimulant el creixement de les cèl·lules endotelials i epitelials, no així de les mesangials.

A partir d'aquí s'han fet molts estudis on es demostra la sobreexpressió d'aquest factor de creixement després d'un dany renal així com també la seva capacitat terapèutica.

En el ronyó HGF ha mostrat ser un factor regenerador *in vivo* (renotròpic en nefrectomia unilateral¹⁴²), factor tubulogènic¹⁴³, anti-apoptòtic^{144,145}, proliferador¹⁴⁶ i antiinflamatori tant *in vivo* com *in vitro*¹⁴⁵. És també un efectiu mitogen *in vitro* de TECs¹⁴⁷.

3.3 HGF i dany renal

3.3.1 HGF i FRA

S'ha demostrat també la seva sobreexpressió en diverses patologies renals com el fracàs renal agut (FRA) tòxic per cisplastina¹⁴⁸, per glicerol¹⁴⁹, per àcid fòlic¹⁵⁰, i en l'I/R en rates¹⁵¹. També en models animals de DRC s'ha vist una sobreexpressió d'HGF relacionada amb regulació del dany. i en el fracàs renal crònic en humans¹⁵², en nefropatia diabètica¹⁵³ i nefropatia per IgA⁹¹. TAULA 1

3.3.2 HGF i dany renal crònic

Els estudis inicials com els de Sugimura et al o el de Taniguchi et al observen com els nivells sèrics d'HGF en pacients amb nefropatia crònica

estan elevats correlacionant-se amb els de creatinina. Libetta et al però observa l'efecte oposat. Uns anys més tard Nishida et al relaciona l'augment de HGF amb les tubulopaties però observa una disminució d'aquests nivells en les glomerulopaties. Aquests resultats podrien mostrar-se incongruents amb l'efecte beneficiós demostrat en el segon treball. Cal observar, però, treballs com els de Liu et al en el que es realitza una cinètica d'expressió d'HGF en un model de nefrectomia 5/6. El pic d'expressió és a les 6h després de la cirurgia retornant als nivells basals a partir de les 48h i amb un lleu augment a partir de la setmana.

En el dany crònic HGF és activat transitòriament, però aquells models en que HGF és bloquejat amb anticossos específics promouen la generació i progressió de fibrosi i disfunció renal^{154, 155}. Aquests dos punts suggereixen que la inducció d'HGF en el dany renal crònic té una funció protectora.

Els estudis més importants estan resumits a la TAULA 1.

TAULA 1. HGF com a marcador de dany		
Models de fracàs renal agut		
Igawa et al ¹⁴⁸	Cisplatina - rata Isquèmia/reperfusió	-Augment HGF -Renotròpic/regenerador
Goto et al ¹⁴⁹	Glicerol	-Augment d'HGF a fetge i melsa 24h després del dany -Augment d'expressió gènica d'HGF i c-met a ronyó
Taman et al ¹⁵⁶	NTA, dany glomerular i malaltia policística – home	-Nivells d'HGF en orina baixos en pacients amb malaltia glomerular i policística -Nivells d'HGF en orina elevats en pacients amb NTA que declinaven en

		la fase de recuperació.
Libetta et al ¹⁵⁷	ARF – home	-Concentració d'HGF en sèrum augmenta en ARF
Liu et al ¹⁵⁰	Àcid fòlic – rata	-Ràpida inducció HGF -Proliferatiu de cèl·lules epitelials -Augment de l'expressió de c-met
Rabkin et al ¹⁵¹	Isquèmia/reperfusió bilateral 35' – rata	-Pic d'expressió de c-met i de síntesis de DNA a les 24h
Vaidya et al ¹⁵⁸	FRA – home	-Marcador urinari de dany
Models de dany renal crònic		
Sugimura et al ¹⁵²	Fracàs renal crònic – home	-Augment d'expressió d'HGF correlacionat amb els nivells de creatinina sèrica
Liu et al ¹⁵³	Cèl·lules mesangials sotmeses a estímuls pro-inflamatòris – rata	-Augment d'HGF sota estimulació amb IL-6 <i>in vitro</i>
Sugimura et al ¹⁵⁹	Nefrectomia 5/6 – rata	-Augment d'mRNA d'HGF a fetge i melsa
Taniguchi et al ⁹¹	Nefropatia IgA – home	-Augment expressió d'HGF localitzat en les cèl·lules epitelials
Libetta et al ¹⁵⁷	Fracas renal crònic - home	-Els nivells d'HGF en sèrum no augmenten en dialitzats ni en no-dialitzats.
Nishida et al ¹⁶⁰	Vàries patologies renals - home	-Augment dels nivells d'HGF sèric en les tubulopaties. -Disminució dels nivells en les glomerulopaties
Liu et al ¹⁵⁴	Nefrectomia 5/6 – rata + Ac α-HGF	-Pic d'expressió d'HGF i c-met a les 6h retornant a nivells basals a les 48h. -Bloqueig d'HGF produeix disfunció renal i fibrosi

		-HGF endogen és essencial pel fenotip epitelial
Mizuno et al ¹⁵⁵	Glomerulonefritis – ratolí ICGN + Ac α -HGF	-Pèrdua equilibri TGF β /HGF i col·lagen/col·lagenasa. -Relació directa amb fenotip fibròtic i expressió d' α SMA. -Augment d'apoptosi i disminució de PCNA -La neutralització d'HGF produeix augment de TGF β

3.4 HGF com a agent terapèutic

El tractament amb proteïna recombinant humana d'HGF (rhHGF), s'ha usat en models de dany renal agut i crònic, demostrant tenir efectes regeneradors del parènquima, antiapoptòtics, antiinflamatoris i antifibròtics.

La injecció d'rhHGF ha estat efectiva en models de FRA induït per cisplastina, HgCl₂¹⁶¹ o per I/R¹⁶² degut als seus efectes antiapoptòtics i regeneradors.

TAULA 2. HGF com a agent terapèutic		
Kawaida et al ¹⁶¹	FRA Cisplastina – ratolí + rhHGF	-Prevenió del FRA (disminució de BUN) -Regeneració
Milleret al ¹⁶³	Isquèmia/reperfusió bilateral 75' – rata + rhHGF	-Prevenió de la NTA (disminució BUN i SCr) -Menys NTA histopatològica i mitogènica
Amaiike et al ¹⁶⁴	FRA tòxic per CsA – ratolí +rhHGF	-Augmenta supervivència és mitogènica i disminueix BUN i toxicitat -No afecta l'acció immunosupressora de la

		CsA
Mizuno et al ¹⁶⁵	DRC nefròtic – ratolí +rhHGF	-Disminueix dany i producció de: col·lagen I, fibronectina, PDGF, TGFβ i αSMA a túbuls i glomèruls. -Mitogènic
Yo et al ¹⁴⁵	<i>In vitro</i> cèl·lules epitelials, endotelials i mesangials +rhHGF	- Disminueix la mort cel·lular per privació de sèrum - Augmenta el nombre de cèl·lules endotelials
Vijayan et al ¹⁶²	I/R, ATN – rates +rhHGF	-Disminueix apoptosi
Mizuno et al ¹⁵⁵	ICGN- ratolí +rhHGF	- Augmenta l'activitat de col·lagenasa - Disminueixen els nivells de Col·lagen I i apoptosi
Azuma et al ¹⁶⁶	CAN – rata +rhHGF (14 dies o 32 Setmanes)	- <u>Primerenc</u> : disminueix apoptosi - <u>Tardà</u> : augmenta supervivència Disminueixen: SCr, proteinúria, esclerosis glomerular, obliteració arterial, αSMA, ICAM-1, Infiltrat de macròfags(ED-1), citokines (MCP-1, TNFα, TGFβ, iNOS, IL6)
Fornoni et al ¹⁶⁷	Cultiu de podòcits amb CsA +rhHGF	- Disminueix apoptosi
Mizuno et al ¹⁶⁸	UUO – ratolí +rhHGF	- Augmenta: PCNA (regeneració), HGF endogen - Disminueixen: Macròfags, dany tubular, TGFβ, col·lagen I, αSMA
Inoue et al ¹⁶⁹	Nefrectomia 5/6- ratolí Tg TGFβ +rhHGF	-Augmenta fibrosi en els transgènics respecte els no transgènics

Nagano et al ¹⁷⁰	NTA glicerol – rata +rhHGF	-Augmenta supervivència -Disminueixen: BUN, SCr, NTA
Yang et al ¹⁷¹	<i>In vivo</i> UUO – ratolí +rhHGF <i>In vitro</i> +rhTGFβ +rhHGF	-Augmenta E-cadherina -Disminueixen: Dany, TGFβ, TGFβRI, αSMA, Fibronectina, Vimentina, Col·lagen I, PCNA -Disminueixen: αSMA, Fibronectina -HGF contraresta l'acció anti-E-cadherina de TGFβ
Gong et al ¹⁷²	Nefrectomia 5/6 – rata +rhHGF o Ac αHGF	-rhHGF: menys col·lagen, TGFβ i TIMP-2 i augment PAI-1, MMP-9 i TIMP-3. - Ac αHGF: efecte invers a rhHGF
Mori et al ¹⁷³	Glomerulonefritis per verí de serp – rata +rhHGF	-Augmenta l'expressió d'HGF en cèl·lules endotelials augmentant la seva proliferació. - Recuperació del dany glomerular i menys proteinúria -Activació i proliferació cèl·lules mesangials
Yang et al ¹⁷⁴	UUO – ratolí +rhHGF (3 dies post-UUO)	-Disminueixen: TGFβ, TGFβRI, αSMA, Fibronectina i Col·lagen I
Dworkin et al ¹⁷⁵	Nefrectomia 5/6 – rata +rhHGF (2 setmanes post-Nx)	- Arquitectura cel·lular més preservada - Expressió d'αSMA només en els vasos -Disminueix apoptosi
Gong et al ¹⁷⁶	Nefrectomia 5/6 –rata +rhHGF o Ac αHGF (2 setm post-Nx)	- rhHGF: disminueix Proteinúria, fibrosi, inflamació (ED-1), RANTES, MCP-1 i NFκB. - Ac αHGF: augmenta esclerosi glomerular, Fibrosi, Col·lagen

Estudis com el de Zioncheck et al¹⁷⁷, però, demostren que l'aclariment d'aquesta proteïna és molt ràpid convertint-la en una administració poc adequada en terapèutica.

3.5 Teràpia gènica amb HGF

Com a aproximació per tal d'evitar la ràpida degradació de l'agent terapèutic (HGF) s'ha posat a punt la teràpia gènica en models *in vitro* i *in vivo* d'injecció d'ADN nuu intravenosament o complexat amb liposomes com el virus hemoaglutinant del Japó (HVJ), també s'han fet models de ratolí transgènic per HGF per observar les propietats d'un organisme que sobreexpressa aquest factor i s'ha usat l'electrotransferència tal com es resumeix a la TAULA 3

TAULA 3. Teràpia gènica amb HGF		
Liu et al ¹⁴⁴	<i>In vitro</i> cèl·lules epitelials transfectades amb hHGF + cisplastina	-Disminueix apoptosi
Yo et al ¹⁴⁵	<i>In vitro</i> cèl·lules epitelials de rata (NRK52E) transfectades amb hHGF liposomes HVJ	-Disminueix mort cel·lular després de privació de sèrum.
Liu et al ¹⁷⁸	<i>In vitro</i> cèl·lules epitelials transfectades amb hHGF	-Disminueix mort cel·lular després de privació de sèrum. 2 mecanismes: >Activació d'Akt que dona fosforilació de Bad via PI3K >Augmenta expressió Bcl-XL
Liu et al ¹⁵⁴	<i>In vitro</i> cèl·lules epitelials transfectades amb hHGF	-Disminueix l'acumulació de matriu extracel·lular -Augmenta l'expressió MMP-9
Yang et al ¹⁷⁹	UUO – ratolí pCMV-HGF nuu intravenós	-Augmenten els Nivells d'HGF al ronyó -Disminueix el dany, α SMA, Col·lagen I i TGF β
Dai et al ¹⁸⁰	Àcid fòlic – rata pCMV-HGF nuu intravenós	-Disminueixen SCr i l'apoptosi -Augmenta PCNA, pAkt, Bcl-XL

		-Més integritat del parènquima
Gao et al ¹⁸¹	UUO – rata pUC-SR α /HGF liposomes HVJ	-Augmenta HGF i c-met de rata, PCNA, Bcl-2, Bcl-XL i Bax -Disminueix la fibrosi i l'atròfia tubular, macròfags (ED-1), apoptosi, α SMA.
Yang et al ¹⁸²	UUO – ratolí pCMV-HGF nuu intravenós + Losartan	-Augmenta PCNA -Disminueix apoptosi, Col·lagen, Fibronectina, α SMA
Okada et al ¹⁸³	Àcid aristolòquic – ratolí Transgènic per HGF	-Disminueix fibrosi: expressió de col·lagen i TIMP-1 -Augmenta MMP-9
Dai et al ¹⁸⁴	Nefrectomia unilateral – ratolí diabètic (STZ) pCMV-HGF nuu intravenós cada setmana	-Disminueixen la glucosa en sang i la proteïnúria. -Disminueix el dany glomerular i l'apoptosi. -Menys fibrosi (TGF β , Col·lagen I, Fibronectina i α SMA)
Mizui et al ¹⁸⁵	Nefrotoxicitat per CsA – rata pCAGGS-HGF electroporació muscular	- Menys fibrosi: TGF β i α SMA. -Disminueix apoptosi: (disminueix Tunel, caspasa3), (augmenta Bcl-2, p-Akt, Bad-P) - Augmenta Ki67 (proliferació) - Disminueix inflamació ED-1
Yazawa et al ¹⁸⁶	Nefrotoxicitat per CsA – rata HGF plasmídic+ 3 polsos elèctrics	-Disminueix fibrosi: TGF β , α SMA i Col·lagen I. -Disminueix ED-1
Yang et al ¹⁸⁷	UUO – ratolí pCMV-HGF nuu intravenós dia -1, +3	-No inhibeix Smad2-P però augmenta SnoN

3.6 Mecanismes d'acció estudiats/proposats

Com ja s'ha comentat anteriorment l'HGF té reconeguts efectes terapèutics sobre el ronyó danyat: antiapoptòtics, anti-inflamatòris i anti-fibròtics. Els mecanismes d'acció implicats han estat estudiats al llarg d'aquests anys i s'han proposat diverses opcions.

Inicialment s'estudià el seu efecte antiapoptòtic establint la fosforilació de Bad i l'activació de Bcl-xL com a mecanismes de supervivència cel·lular¹⁷⁸. Recentment Zhang et al ha demostrat com el paper de Bcl-xL en la supervivència de l'epiteli renal després d'un estrès oxidatiu està estretament lligat amb l'acció d'HGF¹⁸⁸.

Més tard es demostrà la seva acció antagònica de TGF β 1 estabilitzant TGIF que és el corepressor transcripcional d'Smad¹⁸⁹ i resultant en una disminució de la fibrosi. L'inhibició de TGF β 1, també té un efecte bloquejador de la Transició Epiteli-Mesènquima. El bloqueig de la Transició Epiteli-Mesènquima és a través de l'activació de l'antagonista transcripcional SnoN¹⁸⁷.

HGF exerceix la seva acció antifibròtica antagonitzant les accions profibròtiques de TGF β ¹⁹⁰ (Fig. VIII).

A l'inici del dany crònic, l'expressió d'HGF es veu augmentada, produint-se una resposta regenerativa compensatòria. Un dany repetitiu resulta en la sobreexpressió de TGF β que indueix els processos fibròtics que ja s'han detallat anteriorment. TGF β té un efecte supressor de l'expressió d'HGF, donant lloc a un decrement d'HGF en una forma recíproca a l'augment dels nivells de TGF β (Fig VIII A).

L'efecte terapèutic de la suplementació amb HGF es veuria recolzat per aquest balanç i per la seva acció inhibidora de l'expressió de TGF β , que previndria de la fibrosi i disminuiria la mort cel·lular (Fig. VIII B).

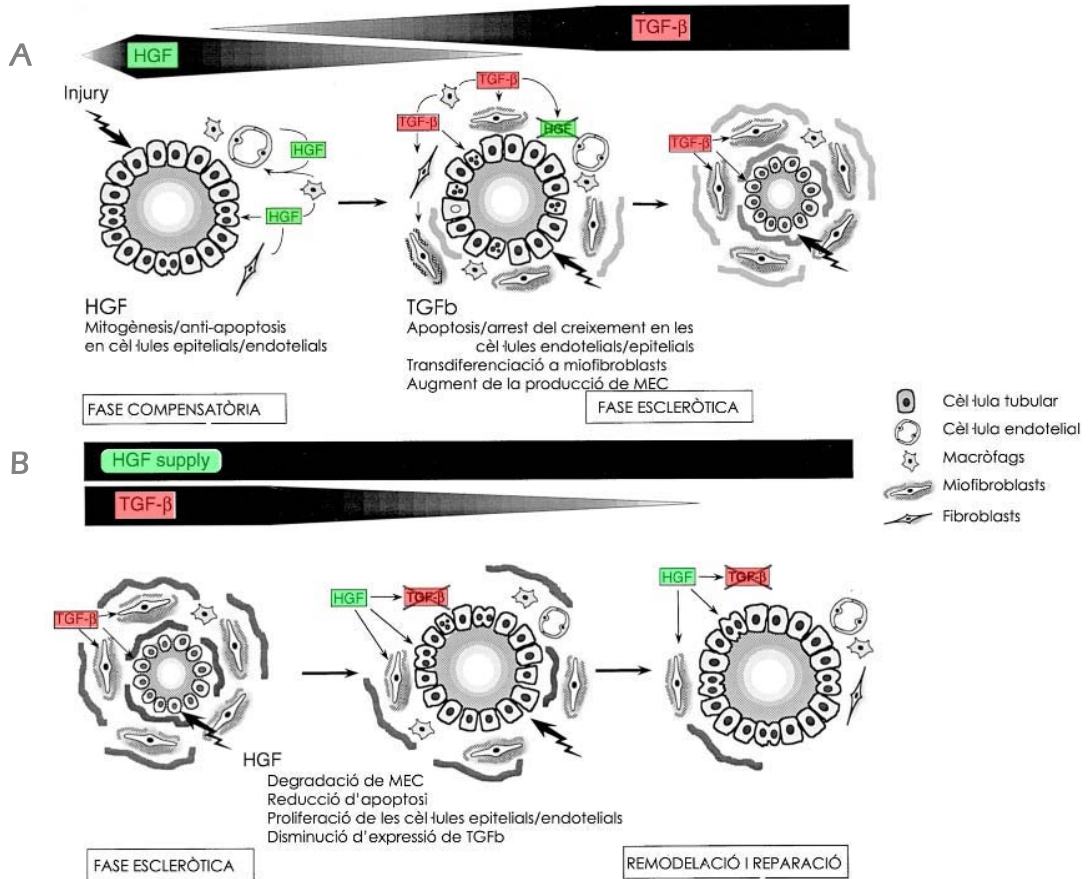


Figura VIII Efectes del balanç HGF/TGF β en la progressió de la fibrosi renal. Modificat de Matsumoto et al⁹⁰

Recentment s'ha estudiat un altre mecanisme antifibròtic en què HGF actuaria com a efector dels agonistes PPAR γ ¹⁹¹. Els lligands del receptor PPAR γ com TZDs no estan només relacionats amb la fibrosi sinó que indueixen increment en l'expressió d'HGF resultant en una disminució de l'apoptosi en el dany per isquèmia-reperfusió renal¹⁹².

Per altra banda l'acció antiinflamatòria d'HGF seria fruit de la modulació de l'expressió d'MCP1 i RANTES¹⁷⁶. Al seu torn, la inhibició de RANTES tindria relació directa amb l'activació de la via PI3K-Akt-GSK3 β ¹⁹³. La prevenció de l'extravasació de neutròfils, amb el tractament amb HGF, també tindria un paper important en l'acció antiinflamatòria en un model d'isquèmia renal¹⁹⁴.

S'ha estudiat la inhibició de la inflamació renal aguda per inhibició de la E-selectina endotelial¹⁹⁵ i com l'aplicació de la teràpia amb HGF disminueix la inflamació en un context de dany renal crònic tenint com a diana l'endoteli¹⁹⁶.

La supressió de l'activitat proinflamatòria de NF κ B a través de la inactivació de GSK3 β en les cèl·lules epitelials renals¹⁹⁷ i també la seva disrupció directa¹⁹⁸ és un dels mecanismes antiinflamatoris més recentment estudiats.

4. TERÀPIA GÈNICA NO VIRAL

La transferència de material genètic a les cèl·lules d'un individu amb finalitat terapèutica constitueix, en la actualitat, una aproximació per al tractament de les malalties humanes. Per aconseguir l'expressió d'un transgèn en una cèl·lula diana cal vèncer una sèrie de barreres cel·lulars que permetin introduir l'ADN intacte en el nucli cel·lular. Per optimitzar la introducció de l'ADN en las cèl·lules es requereixen vehicles, també denominats vectors gènics.

Els mètodes no vírics es divideixen en dues categories¹⁹⁹:

I. Els que es basen en l'ús de **macromolècules** (liposomes, polímers, etc.) capaces d'emular algunes de les característiques dels virus, com la seva facilitat de penetració a través de les membranes citoplasmàtiques. Aquests sistemes disposen d'una seguretat elevada i una major facilitat d'elaboració, caracterització, manipulació i escalat, en front als vectors vírics. Un altre avantatge inherent als sistemes de transferència no vírics és la seva flexibilitat, ja que disposen d'una capacitat il·limitada per acomodar seqüències gèniques grans i de diferent composició. Tot i així, la seva eficiència de transferència gènica és menor a la dels vectors virals²⁰⁰.

II. Basats en mètodes físics d'introduir el **DNA nuu**. Els dos mètodes principals usats són el xoc osmòtic i els polsos elèctrics (electroporació).

4.1. Electroporació

La base teòrica de l'electroporació modela un conjunt de membranes confluent que es comporta com un condensador quan s'aplica un voltatge. Els condensadors reals són mecanismes elèctrics de dos ports que mostren dues superfícies conductores aïllades l'una de l'altra per un material dielèctric (no conductor).

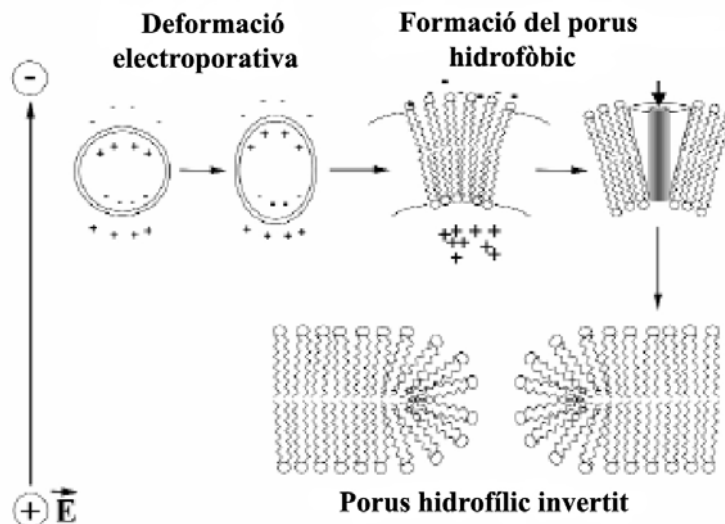


Figura 9. El camp elèctric generat obre porus transitòriament en la membrana cel·lular. *Modificat Somiari et al²⁰¹*

La membrana lipídica bipolar mimetitzava les propietats del condensador ja que el lípid actua com a dielèctric entre el citoplasma iònic, conductor i el fluid extracel·lular. Sota la influència d'un camp elèctric, aquests condensadors membranosos generen un potencial de membrana fins haver excedit el màxim dielèctric de la membrana i es dona la permeabilització, que resulta en un increment de la conductivitat

transmembrana. La contínua aplicació d'aquest camp elèctric després de la permeabilització manté aquesta estructura meta-estable de membrana i facilita el transport molecular. Aquests canvis en la membrana inclouen la formació de porus hidrofílics invertits i això incrementa la mida del porus i alhora permet el trànsit de macromolècules amb càrrega com els àcids nucleics²⁰².

El potencial transmembrana induït en una cèl·lula per un camp elèctric extern i generalment descrit per l'equació:

$$\Delta V_m = f E_{\text{ext}} r \cos\Phi$$

on V_m és el potencial transmembrana, f és un factor de forma que descriu l'impacte de la cèl·lula en el la distribució extracel·lular del camp elèctric, E_{ext} és el camp elèctric aplicat, r el radi de la cèl·lula i Φ l'angle polar respecte al camp elèctric extern.

Una consideració molt general per tant és que com més petit és el radi de la cèl·lula, més gran haurà de ser el camp elèctric per poder permeabilitzar la membrana cel·lular.

Mentre que la formació dels porus es produeix una fracció de temps d'1 microsegon, el re-segellament de la membrana requereix un rang de minuts. Estudis *in vitro* mostren com aquest tancament dels porus es produeix en aproximadament un minut, amb variacions depenent dels paràmetres elèctrics usats i la temperatura²⁰³. Les dades *in vivo* en muscle esquelètic de ratolí mostren com el temps de tancament del 63% dels porus és d'aproximadament 9 minuts²⁰⁴

El 1982 Neumann et al²⁰⁵ va demostrar que *in vitro* l'electroporació de les cèl·lules en presència d'ADN plasmídic resultava en la transferència d'aquest ADN i la seva expressió. Des de llavors, aquest mètode s'ha

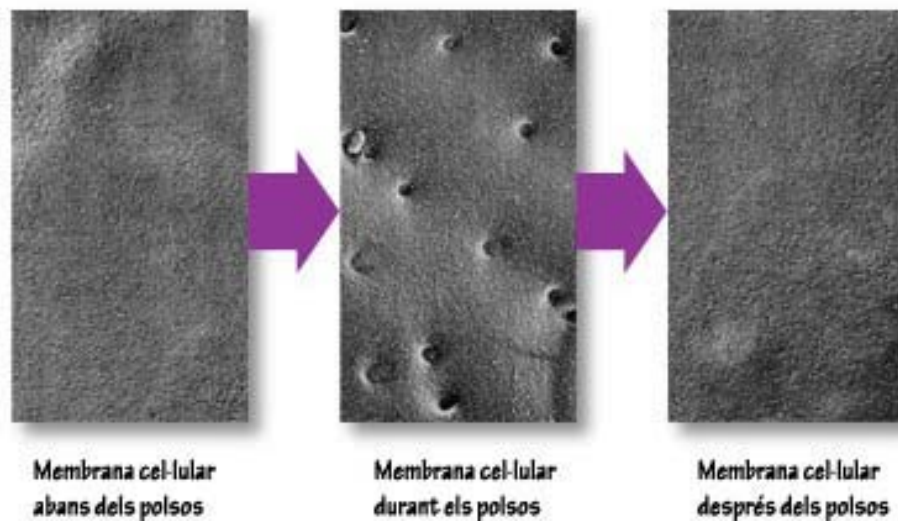
consolidat com una tècnica àmpliament usada en la transfecció *in vitro*. És a partir dels anys 90 que aquesta metodologia comença a usar-se per la transferència de material genètic *in vivo*. El 1991 Titomirov et al²⁰⁶ va transformar establement per electroporació cèl·lules de la pell de ratolins recent nascuts. El 1992 Buono i Linser²⁰⁷ publiquen l'expressió transitòria del RSVCAT (Rous Sarcoma Virus associat al gen de chloramfenicol acetiltransferasa, en l'electroporació de zebrafish. El 1996 Heller et al²⁰⁸ electroinjecten i aconseguen expressar gens associats a β -Gal o a luciferasa *in vivo* en el fetge d'un ratolí. El 1998 Rols et al²⁰³ fan una transferència gènica i proteica elèctricament, *in vivo*, en un model murí de melanoma. I aquest mateix any Aihara et al²⁰⁹ fan la primera transferència gènica *in vivo* a múscul, i Oshima et al²¹⁰ transfereix selectivament un gen a l'endoteli corni *in vivo* mitjançant polsos elèctrics.

El teixit muscular ofereix moltes possibilitats en el seu ús en teràpia gènica, ja sigui en malalties d'origen muscular com no-musculars que puguin beneficiar-se de l'acció de proteïnes circulants^{211, 212}. Les fibres musculars estriades que constitueixen les unitats estructurals del múscle esquelètic contenen múltiples nuclis i es troben en estat post-mitòtic, la qual cosa facilita l'eficiència de la transferència i el manteniment de l'expressió dels gens introduïts. Les cèl·lules musculars disposen d'una gran capacitat per la producció de proteïnes així com la seva secreció al sistema circulatori. L'elevada vascularització del teixit muscular facilita la secreció de proteïnes no musculars amb potencial acció terapèutica (factors de creixement, factor IX, eritropoetina, etc.).

La introducció en aquest camp dels generadors d'ona quadrada també ha estat un gran avenç per la possibilitat de controlar separatament la duració i l'amplitud del pols.



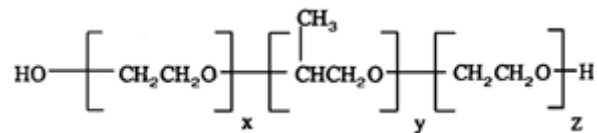
Una altra millora en l'eficiència de la teràpia gènica per electroporació ha estat l'ús de poloxàmers i polímers no iònics s'han usat com a mecanismes terapèutics en el tractament de pacients sotmesos a un xoc elèctric per la seva capacitat de segellar els porus oberts per electroporabilització²¹³ Així es mostra com l'electroporació del múscle amb ADN formula amb un polímer (PINC) és capaç de millorar els resultats d'expressió gènica així com protegir el múscle de las possibles lesions induïdes per l'electroporació²¹⁴.



L'electroporació directa a l'òrgan diana també és una realitat²¹⁵. Tsujie et al²¹⁶ injecten el DNA tractament directament a l'artèria renal i apliquen un camp elèctric al ronyó. L'eficiència d'aquesta metodologia resulta ser més efectiva en distribució i quantitat de proteïna generada que el mateix tractament usant el virus hemaglutinant de Japó (HVJ).

4.2 SP1017

És la combinació de dos poloxàmers (els plurònics L61 i F127) compostos de dos poli(òxid d'etilè)- poli(òxid de propilè) que segueixen la fórmula general:



on $y = 31$, $x = z = 4.5$ pel plurònic L61, i $y = 65.2$, $x = z = 200.4$ pel plurònic F127.

S'ha demostrat que el polímer SP1017 augmenta l'expressió del DNA plasmídic injectat *in vivo* en el múscle esquelètic quan es combinen²¹⁷. Aquesta eficiència és 10 vegades major que quan injectem el DNA nuu.

Aquest transportador no-iònic s'ha mostrat efectiu també incrementant l'eficiència de transfecció en l'electroporació muscular quan es complexa amb DNA respecte l'electroporació de DNA nuu²¹⁸.

III. HIPÒTESI I OBJECTIUS

La lesió per isquèmia/reperfusió renal aïllada, o bé associada al trasplantament, donen lloc a curt termini a una lesió ben descrita d'inflamació i necrosi/apoptosi tant tubular com vascular (com hem descrit a la introducció), que pot donar lloc a una lesió crònica caracteritzada per més infiltrat inflamatori, mort cel·lular i també fibrosi.

Per altra banda, com també s'ha descrit a la introducció, l'HGF és un factor de creixement amb un rol important en la recuperació del dany i la regeneració i ha demostrat ser un agent terapèutic protector. L'efecte terapèutic de la suplementació amb HGF es veuria recolzat pel balanç i per la seva acció inhibidora de l'expressió de TGF β , que previndria de la fibrosi i disminuiria la mort cel·lular. El principal problema d'aquesta proteïna és la seva curta vida mitja

La teràpia gènica ofereix una potencial solució ideal per solucionar el problema del ràpid aclariment d'aquest factor. Concretament l'electroporació, per la seva no oncogenicitat i no immunogenicitat (típica de vectors virals i complexos iònics/liposomes), s'ofereix com una possible opció terapèutica.

HIPÒTESI DE TREBALL

Basats en aquestes evidències, la teràpia gènica, mitjançant electroporació amb HGF permetria un efecte terapèutic sostingut sobre l'òrgan danyat gràcies a la constant sobreexpressió d'aquest factor. Aquest sistema superproductor d'HGF protegiria del dany renal per l'acció antiapoptòtica, antiinflamatòria, proregenerativa i antifibròtica, tant a curt com a mitjà/llarg termini.

OBJECTIUS PRINCIPALS

-Optimitzar la teràpia gènica mitjançant l'electroporació de DNA plasmídic (pCINeohHGF) complexat amb un polímer no iònic (SP1017) per obtenir elevats nivells d'HGF humà i endogen tant a nivell plasmàtic com renal.

-Testar l'eficiència terapèutica de l'electrotransferència d'HGF en diferents models de dany renal *in vivo*.

-Estudiar el rol de la cèl·lula tubular com a principal afectada però també iniciadora del dany: l'efecte de la manca d'oxigen *per se* dispararia l'inici de la cascada inflamatòria en la cèl·lula tubular i el possible efecte de reversió de l'HGF.

Objectius 1er treball

-Comparar l'eficiència de l'electroporació muscular versus a l'electroporació renal. Aquesta segona aproximació directa a l'òrgan pot ser més efectiva per la potencial possibilitat de crear un òrgan o un sistema cel·lular autocrí.

-Efecte de la sobreexpressió d'HGF en un model de dany agut per isquèmia/reperfusió renal.

Objectius 2n Treball

-Efecte de la sobreexpressió d'HGF en un model de dany crònic per nefropatia crònica del trasplantament.

-Comparar l'eficiència del tractament en etapes primerenques del dany front a l'efectuat en etapes més tardanes.

-Modulació dels mecanismes de progressió de la NCA mitjançant la teràpia gènica amb HGF

Objectius 3er Treball

-Establir un model de cèl·lula tubular que sobreexpressi HGF.

-Definir la cèl·lula tubular epitelial com a inductora de dany després d'una deprivació d'oxigen.

-Estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'HGF en la cèl·lula epitelial tubular sotmesa a deprivació d'oxigen.

IV. RESULTATS

LLISTA D'ARTICLES

Articles publicats inclosos en aquesta tesis

ARTICLE 1 Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Bolaños N, Fillat C, Rama I, Cruzado JM, Grinyó JM, Torras J. **Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure.** *Gene Therapy* (2005) 12, 1551-1558

ARTICLE 2 Herrero-Fresneda I, Torras J, Franquesa M, Vidal A, Cruzado JM, Lloberas N, Fillat C, Grinyó JM. **HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms.** *Kidney International* (2006) 70, 265-274

ARTICLE 3 Franquesa M, Riera M, Herrero-Fresneda I, Sola A, Hotter G, Lloberas N, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM. **Tubular epithelial cell overexpressing hHGF counteracts MCP-1 up-regulation after hypoxia/reoxygenation.** *Transplantation Proceedings* (2009) Jul-Aug;41(6):2069-72

Articles publicats no inclosos a la tesis

- Herrero-Fresneda I, **Franquesa M**, Torras J, Vidal A, Aran J, Pluvinet R, Lloberas N, Rama I, Cruzado JM, Gúlias O, Grinyó JM. **Role of cold ischemia in acute rejection: characterization of a humoral-like acute rejection in experimental renal transplantation.** *Transplant Proc.* 2005 Nov;37(9):3712-5.

- Lloberas N, Cruzado JM, **Franquesa M**, Herrero-Fresneda I, Torras J, Alperovich G, Rama I, Vidal A, Grinyó JM. **Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats.** *J Am Soc Nephrol.* 2006 May;17(5):1395-404. Epub 2006 Apr 5.

- Alperovich G, Rama I, Lloberas N, **Franquesa M**, Poveda R, Gomà M, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Bolaños N, Carrera M, Grinyó JM, Torras J. **New immunosuppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis.** *Lupus.* 2007;16(1):18-24.

- Rama I, Bruene B, Torras J, Koehl R, Cruzado JM, Bestard O, **Franquesa M**, Lloberas N, Weigert A, Herrero-Fresneda I, Gúlias O, Grinyó JM. **Hypoxia stimulus: An adaptive immune response during dendritic cell maturation.** *Kidney Int.* 2008 Apr;73(7):816-25. Epub 2008 Jan 23.

- Lloberas N, Torras J, Alperovich G, Cruzado JM, Giménez-Bonafé P, Herrero-Fresneda I, **Franquesa M**, Rama I, Grinyó JM. **Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats.** *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Oct;23(10):3111-9. Epub 2008 May 9.

- Torras J, Herrero-Fresneda I, Gúlias O, Flaquer M, Vidal A, Cruzado JM, Lloberas N, **Franquesa M**, Grinyó JM. **Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric**

experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage?. Nephrol Dial Transplant. 2009 Aug 11. [Epub ahead of print]

- Flaquer M, **Franquesa M**, Barquinero J, Lloberas N, Gutierrez C, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM. **Bone marrow transplantation induces normoglycemia in a type 2 diabetes mellitus murine model.** *Transplantation Proceedings* 2009 Jul-Aug;41(6):2282-5

ARTICLE 1

**Direct electrotransfer of hHGF gene into
kidney ameliorates ischemic acute renal
failure.**

**Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Bolaños N,
Fillat C, Rama I, Cruzado JM, Grinyó JM, Torras J.**

Gene Therapy (2005) 12, 1551-1558

Article 1: Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure. *Gene Therapy* (2005) 12, 1551-1558

Objectiu

Partint dels demostrats efectes antiapoptòtics, antiinflamatoris i regeneratius del suplement d'rhHGF en varis models animals i amb experiència prèvia en l'electroporació *in vivo*: l'objectiu d'aquest estudi és el de comparar l'eficiència terapèutica de dues metodologies d'electroporació en un model de FRA en rata que tenint com a diana el mateix òrgan s'aplicaren a diferents part de l'animal: múscle i ronyó. Aquesta teràpia s'aplica a un model d'isquèmia renal calenta en rata.

RESULTATS

-Expressió d'HGF humà en plasma i en teixit renal.

En el moment del sacrifici (10 dies post-electroporació) es va avaluar per tècniques d'ELISA els nivells de hHGF en plasma (Figura 1c). Els nivells d'hHGF en plasma en els 2 grups de tractament: electroporació muscular i electroporació renal, no són significativament diferents entre ells i trobant-se en el rang entre ~60-80 pg/ml de plasma.

Quant a l'expressió a nivell renal es van analitzar els nivells de hHGF també per ELISA al llarg del temps de seguiment (Figura 1d). Els nivells

d'expressió d'aquesta proteïna en teixit són de l'ordre de ~50 pg/ml el dia 3 post-electroporació i es mantenen al llarg dels 10 dies d'estudi.

La immunohistoquímica sobre el teixit renal per la detecció *in situ* de l'expressió d'hHGF mostra un patró d'expressió irregular i localitzat en les cèl·lules tubulars renals (Figura 1a i 1b). La totalitat dels animals electroporats directament al ronyó mostren aquest perfil d'expressió discontinua en el parènquima renal.

-Expressió de HGF i TGF β 1 de rata en el teixit renal

La quantificació de l'HGF de rata en teixit renal ens mostra un augment significatiu de l'expressió d'aquest després del dany isquèmic, però també una sobreexpressió en els animals electroporats (Taula 1). En l'anàlisi de la progressió del dany és de gran interès el quocient entre l'expressió de TGF β 1 i HGF en teixit (Figura 2). Aquest quocient ens informa sobre el balanç entre el factor profibròtic i l'antifibròtic. Observem una disminució del quocient de fibrosi en els dos grups d'animals electroporats, essent significativa en els animals electroporats directament al ronyó.

-Efectes de la teràpia gènica amb hHGF en la recuperació de la funció renal postisquèmia

El paràmetre utilitzat més habitualment per avaluar la funció renal és la creatinina sèrica. En els dies 1, 3 5 i 7 postisquèmia es varen recollir mostres de sang per al seguiment dels valors de creatinina i determinar un patró de funció renal de cada grup durant l'estudi (Figura 3). El perfil de nivells de creatinina sèrica en els animals sotmesos a isquèmia renal calenta

mostra un pic el dia 1 i 3 postisquèmia disminuint els nivells al llarg del temps i mostrant una funció renal normal als 7 dies després del dany. Els dos grups de tractament mostren nivells de creatinina per sota del perfil de dany en tots els temps d'estudi. Els animals electroporats directament al ronyó, a més, tenen una caiguda dràstica dels nivells de creatinina després del dia 1, recuperant els valors normals a partir del dia 3 després del dany.

-Anàlisi i quantificació de la mort cel·lular per necrosi i apoptosi.

Tant pel que respecta a la necrosi com a l'apoptosi als 7 dies postisquèmia en els animals sense tractament veiem un augment de la mort cel·lular tubular (Taula 2)

Els ronyons dels animals electroporats els trobem protegits de la necrosi tubular aguda típica d'aquest model de dany. Aquest valor va ser analitzat de forma semi-quantitativa per un patòleg cec per als grups de tractament, assignant una puntuació de 3 a la màxima necrosi tubular observada en el parènquima.

L'apoptosi es va valorar quantitativament (nº de cèl·lules marcades/camp, a 40 augments en un mínim de 20 camps comptats per mostra), tant en la tinció de TUNEL com en la tinció del fragment p85 de PARP. Els dos grups de tractament mostren nivells més baixos d'apoptosi en totes les determinacions però només són significativament disminuïts en ambdues en el grup dels electroporats renals.

Les diferències en la conservació del teixit i en la quantitat de cèl·lules tenyides pels marcadors d'apoptosi es poden observar més clarament en la Figura 4.

-Proliferació cel·lular i regeneració

L'efecte proliferatiu d'HGF es va mesurar semi-quantitativament valorant, de forma cega pels grups, de 0 a 3 la recelularització i mitosis en el teixit (Figura 5a), i també es va mesurar quantitativament l'expressió de PCNA per qPCR (PCR quantitativa) (Figura 5b).

L'anàlisi semi-quantitatiu de la regeneració en teixit ens mostra en els animals tractats un lleuger increment. Aquest increment és corroborat per qPCR amb l'augment d'expressió de PCNA en els mateixos grups (Figura 5b).

-Infiltrat cel·lular inflamatori

Es va valorar l'infiltrat inflamatori postisquèmic per immunotinció de macròfags (anticòs anti-ED1) i limfòcits T i B (anticòs anti-CD45RC, panleucocitari que no reconeix la línia mieloide). La valoració quantitativa (Taula 3) mostra una clara disminució en el nombre de cèl·lules inflamatòries infiltrants en ambdós grups de tractament indistintament. La presència de polimorfonuclears (PMNs) infiltrants es va determinar per quantificació de l'activitat mieloperoxidasa (MPO) en teixit. L'activitat neutròfil-específica d'MPO fou menys elevada en els animals tractats. (Taula 3).

El conjunt de resultats mostren un clar efecte beneficiós de la teràpia gènica amb HGF. Aquesta teràpia té un efecte immediat en la disminució de la creatinina sèrica, reflectida a nivell histològic en una major preservació tissular amb menys necrosi i apoptosi tubular i més regeneració. L'infiltrat

RESULTATS

inflamatori es veu reduït, observant encara diferències als 7 dies després de la isquèmia. El balanç HGF/TGF β mostra ja una tendència a l'increment que resultarà cabdal a llarg termini.

RESEARCH ARTICLE

Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure

M Franquesa¹, G Alperovich¹, I Herrero-Fresneda¹, N Lloberas¹, N Bolaños¹, C Fillat², I Rama¹, JM Cruzado¹, JM Grinyó¹ and J Torras¹

¹Laboratory of Experimental Nephrology, Department of Medicine, University of Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain; and

²Genes and Disease Program, Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona, Spain

In the early phase of kidney transplantation, the transplanted kidney is exposed to insults like ischemia/reperfusion, which is a leading cause of acute renal failure (ARF). ARF in the context of renal transplantation predisposes the graft to developing chronic damage and to long-term graft loss. Hepatocyte growth factor (HGF) has been suggested to support the intrinsic ability of the kidney to regenerate in response to injury by its morphogenic, mitogenic, motogenic and antiapoptotic activities. In the present paper, we examine whether human HGF (hHGF) gene electrotransfer helps in the recovery from ARF in a model of rat renal warm ischemia. We also assess the advantages of this form of gene therapy

by direct electroporation of the kidney, given that transplantation offers the possibility of manipulating the organ in vivo. We have compared the therapeutic efficiency of two electroporation methodologies in a rat ARF model. Although they both targeted the same organ, the two methods were applied to different parts of the animal: muscle and kidney. Kidney direct electrotransfer was shown to be more efficient not only in pharmacokinetic but also in therapeutic terms, so it may become a clinically practical alternative in renal transplantation.

Gene Therapy (2005) 12, 1551–1558. doi:10.1038/sj.gt.3302569; published online 16 June 2005

Keywords: ARF; ischemia/reperfusion; HGF; electroporation

Introduction

Ischemia is a leading cause of acute renal failure (ARF), but it is also an unavoidable step in renal transplantation. Ischemic renal failure is usually followed by recovery of renal function. However, experimental studies have shown that recovery is incomplete when acute injury is severe.¹ Moreover, ARF after ischemia/reperfusion in the context of renal transplantation predisposes the graft to developing chronic damage and to long-term graft loss.^{2,3}

In the early phase of kidney transplantation, when the transplanted kidney is exposed to insults as ischemia/reperfusion (I/R) or nephrotoxic doses of immunosuppressant, hepatocyte growth factor (HGF) protects against acute renal injury and may enhance regeneration.^{4–6}

HGF is a multifactorial cytokine. It has been suggested that it is the long-sought-for *renotropin* that supports the intrinsic ability of the kidney to regenerate in response to injury.^{7,8} HGF has multiple activities in a wide range of cells including morphogenic,⁹ mitogenic,¹⁰ motogenic¹¹ and antiapoptotic¹² functions, and has shown its therapeutic properties in a variety of pathological conditions such as tissue regeneration, tissue fibrosis and dysfunction under chronic disease conditions.^{12–14} However, exogenous HGF is extremely unstable in blood circulation: it has a half-life of 3–5 min¹⁵

making it almost impossible to reach optimal blood levels. Gene therapy appears to be the alternative that can avoid this half-life handicap.

Gene therapy is now moving from experimental studies to clinical applications,^{16–18} but gene transfer methodology is one of the limiting steps. Viral vector gene transfer has proved efficient but does not allow repetitive injection. In addition, though administration of naked plasmid DNA or liposome-formulated DNA is feasible, the levels of the therapeutic protein obtained are too low. However, DNA electrotransfer has greatly improved nonviral gene transfer efficiency. *In vivo* muscle electroporation has shown that consistently high levels of gene expression could be achieved for many genes.¹⁹ This gene therapy methodology is free from oncogenicity, cytotoxicity and immunogenicity of the viral vectors²⁰ and improves the transgene expression after plasmid suspension injection, by two or three orders of magnitude. To develop more specific and homogenous organ-targeted gene therapy, direct gene delivery to organ is currently being assayed.^{21–23}

In the present study, we examine whether human HGF (hHGF) gene electrotransfer helps in the recovery from ARF in a model of rat renal warm ischemia. We also assess the advantages of this new form of gene therapy by direct electroporation of the kidney, given that transplantation offers the possibility of manipulating the organ *in vivo*.

The aim of this study was to compare the therapeutic efficiency of two electroporation methodologies in a rat model of ARF, which, although they both targeted the same organ, were applied to different parts of the animal: muscle and kidney.

Correspondence: M Franquesa, Nephrology, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 4^a Planta Pavelló de Govern, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

Received 29 September 2004; accepted 2 May 2005; published online 16 June 2005

Results

Preliminary studies

We assayed three electroporation voltages to optimize the kidney electroporation protocol. We chose 100 V/cm because it was the highest voltage that had no harmful early macroscopic effects on renal tissue. We further followed this group for 1 week and found no abnormality in renal function or in histological studies (data not shown).

Human HGF plasma levels and expression of human HGF in renal tissue

To test the efficiency of gene therapy methodology, hHGF protein plasma levels were determined on day 7 after ischemia (10th day after electroporation) in all groups (see Figure 1c). Moreover, the time course kinetics of hHGF in plasma was assessed in ISCH (ischemic nontreated) and ISCH+KIDNEP (ischemic hHGF-electroporated kidney) groups (Figure 1d). As expected, hHGF was not detected in the ISCH group. ISCH+KIDNEP showed a considerable increase in hHGF levels on the 3rd day postelectroporation (just before ischemia) and reached the highest plasma levels on the 6th day, maintaining them until the end of the study. At that time point, ISCH+MUSCEP also promoted synthesis of hHGF protein in plasma, but not as much as ISCH+KIDNEP did. Plasma hHGF levels in ISCH+MUSCEP group on the 10th day are comparable to those previously reported by our group.²⁴

As observed (Figure 1a and b) hHGF was expressed in the cytoplasm of the epithelial tubular cells in a granular pattern. All kidneys of the ISCH+KIDNEP group showed positive immunostaining (Figure 1b), even though it was in a parcellar distribution. Only three of the six kidneys of ISCH+MUSCEP (ischemic kidney, hHGF muscle electroporated) rats were hHGF positive, while ISCH group did not show any tubular staining in any section.

Expression of rat HGF and rat TGF- β 1 in renal tissue
To evaluate whether exogenous hHGF affects the endogenous expression of rat HGF (rHGF), a rat-specific enzyme-linked immunosorbent assay was performed.

On the 7th day after ischemia rats were killed and kidneys processed to determine rHGF and rTGF- β 1 in renal tissue. These were also assessed in nonischemic kidneys used as controls (SHAM), to establish basal levels.

rHGF protein levels in renal tissue (Table 1) were significantly higher in ISCH+KIDNEP and ISCH+MUSCEP than in the ISCH group, which values were also significantly higher than those of SHAM. Although

no differences were observed in rTGF- β tissue levels, the ratio between the two values was significantly lower in ISCH+KIDNEP (Figure 2).

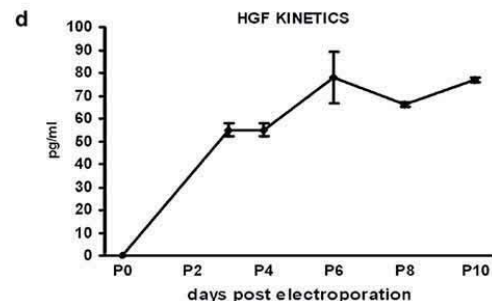
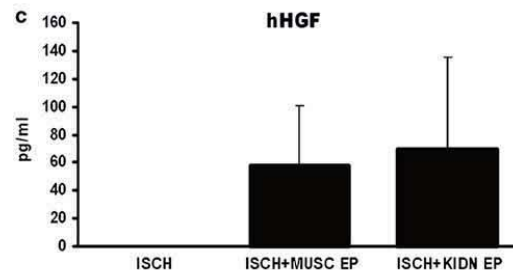
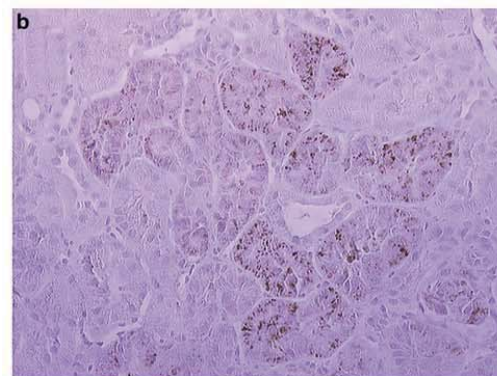
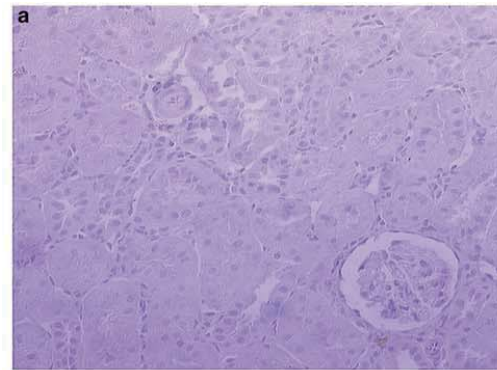


Figure 1 hHGF protein levels. Human HGF was undetectable in nontreated groups, neither in tissue (a) nor in plasma (c). The ISCH+KIDNEP group showed higher plasma levels of human HGF (c), even though we injected the same quantity of plasmidic DNA. hHGF immunostaining also revealed a parcellar pattern of expression (b). a, b and c refer to 10th day postelectroporation. Graph d represents the temporal profile of the ISCH+KIDNEP group and ISCH group. hHGF in ISCH group was not present at any time point evaluated ($\times 400$ hematoxylin counterstained).

Table 1 Endogenous HGF and TGF-β1 values in renal tissue

Group	ratHGF (ng/mg protein)	ratTGF-1H (ng/mg protein)
Sham	0.477 ± 0.93	0.055 ± 0.013
Isch	1.012 ± 0.117 [#]	0.53 ± 0.084
Isch+muscle Ep	1.570 ± 0.17 [*]	0.629 ± 0.093
Isch+kidney Ep	1.606 ± 0.147 [*]	0.497 ± 0.033

Rat protein levels measured by ELISA. ^{*}P ≤ 0.05 of both treated groups with respect to nontreated ischemic one. [#]P ≤ 0.001 of nontreated group with respect to nonischemic (sham) one.

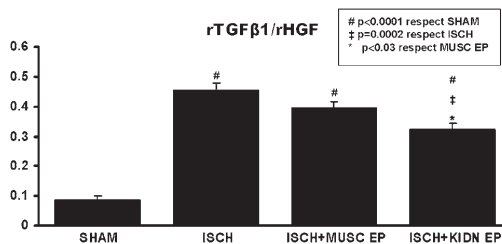


Figure 2 rTGF-β1/rHGF ratio in renal tissue. This ratio of proteins summarizes the efficiency of the therapy.

Effects of hHGF gene therapy on the recovery of renal function after ischemia

To assess whether injected hHGF affected the recovery of renal function after 45 min of warm ischemia and contralateral nephrectomy, blood creatinine levels were measured on days 1, 3, 5 and 7 after injury (Figure 3). Both treated groups showed lower creatinine levels than ischemic nontreated ones did soon after ischemic injury (Day 1: ISCH: 262.1 ± 32.2 μmol/l; ISCH+MUSCEP: 228.9 ± 25.6 μmol/l; ISCH+KIDNEP: 224.7 ± 18.7 μmol/l; P = NS). It should be pointed out that, as usual, ISCH animals showed much dispersed creatinine values due to individual variance in degrees of resistance to renal ischemia.

Thereafter, in the ISCH+KIDNEP group, an important change in the characteristic ischemic creatinine profile was observed. This group showed faster recovery of renal function, with significantly lower creatinine levels than the ISCH group (Day 3: 216.4 ± 48.5 versus 108.3 ± 8.18 μmol/l, P = 0.028; Day 5: 164.8 ± 55.5 versus 79.4 ± 4.34 μmol/l, P = 0.09). In contrast, renal function in ISCH+MUSCEP had a profile parallel to the ISCH group, but with lower values (Day 3: 186.6 ± 31.1 μmol/l; Day 5: 109.7 ± 18.6 μmol/l). All animals recovered renal function after 1 week (Day 7 ISCH: 78 ± 2.8 μmol/l, ISCH+MUSCEP: 87.4 ± 10.4 μmol/l, ISCH+KIDNEP: 75.5 ± 3.1 μmol/l; P = NS).

Analysis and quantification of necrotic and apoptotic cell death

To evaluate HGF structural protection against renal injury, we first examined the effect of HGF electrotransfer on tubular cell death.

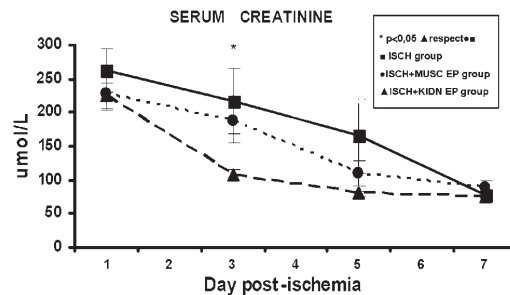


Figure 3 Serum creatinine. We can observe clear earlier recovery of the kidney hHGF-electroporated group, while the muscle-electroporated group expressed slightly better values than the nontreated group. We also observe a clear change in the typical ischemic creatinine profile. Normal levels of serum creatinine are 53 ± 9 μmol/l.

Table 2 Tubular necrosis and apoptosis

Group	Apoptosis (TUNEL) (+cels/FV)	Apoptosis (PARP) (score)	Necrosis (score)
Isch	7.257 ± 1.909	2.125 ± 0.427	2.250 ± 0.250
Isch+muscle Ep	2.849 ± 0.588 [*]	1.300 ± 0.200	1.875 ± 0.272
Isch+kidney Ep	2.106 ± 0.821 [*]	1.143 ± 0.237 [*]	1.300 ± 0.153 [*]

Tubular injury is lower in the treated groups, especially in the kidney-treated one. Apoptosis immunostaining (TUNEL and PARP) reveals similar results as tubular injury. Although there are no differences between both treated groups the number of stained apoptotic cells is significantly lower than in nontreated groups. ^{*}P ≤ 0.05.

The ISCH group showed the characteristic severe features of acute tubular necrosis. The tubular necrosis score was lower in both HGF-treated groups, but only significantly so in the ISCH+KIDNEP group in relation to the ISCH animals (Table 2). The tubular necrosis score of ISCH+KIDNEP group was clearly lower than ISCH+MUSCEP group.

For apoptosis, Apoptag[®] immunostaining revealed clear differences between both the treated groups and the nontreated group (Table 2). Control nontreated kidneys showed a wide range in the number of apoptotic tubular epithelial cells, corresponding to their interindividual resistance to ischemia. Contrarily, HGF-treated animals had more homogeneous and well-preserved kidney tissues (Figure 4). For a more complete analysis, apoptosis was also assessed with anti-PARP p85 fragment immunostaining, showing similar results to Apoptag technique, as depicted in Figure 4.

Cell proliferation and regeneration

The proliferating effects of hHGF gene therapy on kidney after I/R insult were measured in two ways. First, as described in the methodology, conventional histologies were analyzed and tissues were blind-determined from 0 to 3. These results showed more mitotic cells in both treated groups than in the nontreated one (Figure 5). Second, tissue PCNA was measured by real-time PCR, showing a large amount of this antigen in the ISCH+KIDNEP group compared to the ISCH one.

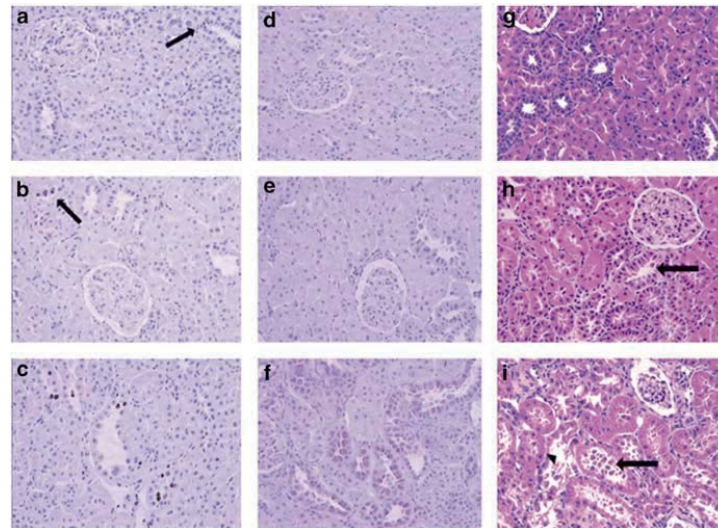


Figure 4 HGF protects from apoptotic cell death and tubular injury. (a–c) show apoptotic immunostained cells. The kidney-electroporated group (a) and muscle-electroporated group (b) show a low number of marked cells (arrow), while the ischemic nontreated group (c) has a wide spread of apoptosis through its parenchyma. (d–f) show PARP-immunostained kidney sections. Like in Apoptag, the kidney-electroporated group (d) shows less positive staining than the Ischemic nontreated group (f). Muscle-electroporated group (e) has less positive-stained cells than the Ischemic group (P = NS). (g–i) show hematoxylin/eosin-stained tissues. The kidney-electroporated group (g) shows well preserved tubules and interstitium, muscle electroporated group (h) shows minimal tubular injury (arrow), the ischemic nontreated group (i) has several tubular detritus (arrow) and casts and cellular detachment (arrowhead) ($\times 400$ hematoxylin counterstained).

Inflammatory cell infiltration

To evaluate postischemic inflammatory cell response, macrophage and T/B lymphocytes were quantified by ED1 and CD45RC immunohistochemistry. Moreover, polymorphonuclear presence was determined by MPO quantification. hHGF-treated groups had fewer macrophages and lymphocytes than the nontreated ischemic group (Table 3), as well as lower values of MPO activity.

Discussion

This study demonstrated the protective effect of HGF gene therapy on ARF induced by renal warm ischemia. Two methods of HGF gene electrotransfer were compared. First, a distant source of circulating hHGF in skeletal muscle was created by electroporation targeting the kidney and other organs. Second, the same electrotherapy was used directly on the kidney.

Electrotransfer is a classic technique used in *in vitro* studies that has recently been adapted to experimental *in vivo* gene therapy and it is normally applied after intramuscular injection.^{25–27} The original contribution of this paper is the direct gene therapy electroporation of the targeted organ. As few authors have recently employed electroporation on different kinds of organs with success,^{20–23} we decided to electroporate the kidney directly. In the preliminary study, we confirmed the absence of tissue and functional damage after kidney electroporation. This was important, since no therapeutic strategy that implies any kind of injury to a healthy kidney that might compromise its subsequent function is acceptable.

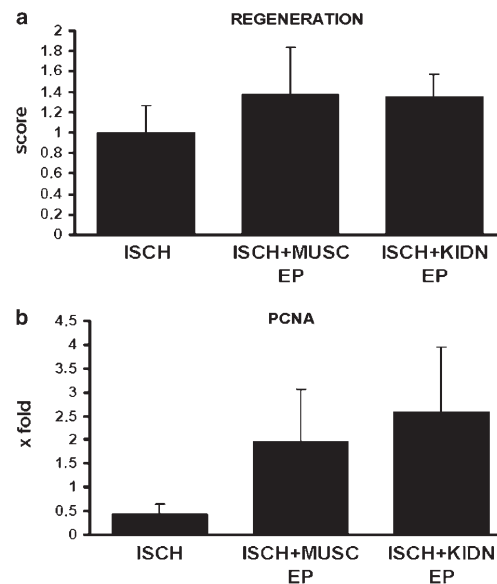


Figure 5 Regeneration and proliferation are enhanced by HGF. On the one hand, we measured regeneration by counting mitotic cells (a), and on the other, we confirmed it by real-time PCR measuring PCNA (b) (expressed by many fold with respect to sham group).

Table 3 Inflammatory cell infiltration and MPO quantification

Group	ED-1 (+cells/FV)	CD45RC (+cells/FV)	MPO (mg/g of tissue)
Isch	8.98 ± 2.19	1.18 ± 0.14	5.66 ± 3.21
Isch+muscle Ep	5.94 ± 0.71	0.80 ± 0.15	2.19 ± 0.17
Isch+kidney Ep	6.12 ± 1.01	0.88 ± 0.18	3.04 ± 0.15

This table resumes the number of infiltrating cells in the different treated groups.

Muscle- and kidney-electroporated animals produced similar levels of plasma hHGF, so both electroporation protocols are comparable in terms of efficiency. Probably kidney, like muscle,²⁴ is a source of hHGF, in that cells, when efficiently transfected with the plasmid, are converted into hHGF protein producers. We²⁵ and other authors²⁸ showed previously that exogenous hHGF induces endogenous production of rHGF. In the present study, both hHGF-treated groups not only showed high levels of plasma hHGF but increased endogenous rHGF levels, corroborating that gene hHGF electrotransfer clearly increases rat renal HGF production. It is questionable whether the increase in rHGF is directly induced by ischemia.²⁹ In fact, although we demonstrate this ischemic-induced physiological response, we also show supraphysiological rHGF production in the treated groups. Serum and kidney hHGF expression confirmed that the gene was efficiently transfected, and rHGF in renal tissue proved the effective induction of the endogenous protein in the target organ. The values reported in this work are much higher than those reported by other authors that in fact showed heterogeneous levels of rat and human HGF in both renal tissue and serum.^{30–34}

Interestingly, even though endogenous rHGF levels of both treatments are similar, the renal rTGF- β 1/rHGF ratio is significantly lower in ISCH+KIDNEP, demonstrating the well-known antagonistic effect of HGF and TGF- β 1.³⁵ The different ratios of the two treated groups summarize the different efficiency of each therapy, since, as has been described,^{36,37} an increase in TGF- β 1 or a decrease in local HGF expression may be responsible for renal fibrosis and tubular destruction. Why the renal rTGF- β 1/rHGF ratio is lower when the plasmid is locally injected into the kidney is a matter of debate. A probable explanation is the proximity between therapeutic agent producer cells (renal cells converted into autocrine or paracrine secretors) and those ischemia-insulted cells lacking the therapy.

ARF occurs with a fall of renal function (for hours or a few days) acute tubular necrosis (combined apoptosis and cell desquamation), and inflammation (cellular infiltration). With hHGF electrotransfer, these symptoms are ameliorated. The recovery in both treated groups was much better than in ischemic nontreated kidneys, but it was especially clear when therapy was directly applied into the kidney. This was for two main reasons. First, early postischemic creatinine levels never reached the high levels of the nontreated group. Moreover, from the first day, the kidney-treated group showed a more pronounced recovery of the renal function, changing the typical creatinine profile displayed by the other two groups.

This earlier functional recovery is parallel to the significant amelioration observed in the histological study, in which those treated with HGF were much better preserved from ischemic insult: less tubular apoptosis and necrosis along with greater cellular regeneration. Note that there was clearly less tubular cell necrosis with the direct kidney approach than with the distant intramuscular approach. As it has been demonstrated, the HGF antiapoptotic effect aids early renal recovery, since less I/R-induced apoptosis prevents the development of inflammation and organ dysfunction.³⁸ Even though ischemia-induced HGF is physiologically synthesized as a natural repair process, its overexpression induced by gene therapy supports cytoprotective actions through that antiapoptotic effect. As our results show, this gene therapy reduced apoptotic cells: the only apoptotic cells were tubular cells. As described,³⁵ in HGF-treated animals, endogenous rHGF may induce the expression of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xl and may also inactivate the proapoptotic Bad protein. Both lead to reduced cell apoptosis. Related to the anti-apoptotic effect is that prosurvival properties of HGF are corroborated in treated groups by slightly higher levels of PCNA corresponding to increased tubular epithelial regenerative cells.

In a model of inflammatory bowel disease,³⁹ HGF showed anti-inflammatory effects through the decrease of the expression of TNF- α and IFN- γ , suggesting that HGF may work directly or indirectly to reduce these inflammatory mediators. Moreover, *in vitro*, the suppression of TNF- α -induced E-selectin expression has been shown.⁴⁰ In our study, the antiinflammatory effect of HGF was not clearly expressed, although we observed the tendency in both treated groups. There are two possible explanations for this. First, ischemic nontreated kidneys varied greatly in almost all parameters studied, including inflammation. Second, since the inflammatory response to I/R injury peaks 3–10 days after injury,^{41,42} there is no guarantee that the 7th day after I/R is the optimal moment when inflammation is fully expressed.

For a long time, attempts to reduce the deleterious effects induced by ischemic insult have had varied success. The aim of this study was to compare the efficacy of two electroporation methodologies. Although they both targeted the same organ, the two methods were applied to different parts of the animal: muscle and kidney. Although intramuscular HGF gene electrotransfer appears to be a promising therapy, kidney direct electrotransfer was shown to be more efficient not only in pharmacokinetic but also in therapeutic terms, so it may become a clinically practical alternative in renal transplantation. Two different applications of that therapy can be set: muscle electroporation in native kidney pathologies, applied as soon as they are detected, and kidney electroporation *ex vivo* at the moment of organ harvesting in renal transplantation.

Materials and methods

Plasmid construction

The hHGF expression vector used in the present study was constructed and optimized as previously described by our group.²⁴ In that study, we reported an efficient

gene therapy approach formulating plasmid DNA with the nonionic carrier SP1017 (Supratek-Pharma, Laval, Canada), and demonstrating it to be more efficient than naked DNA electroporation. Briefly, the hHGF cDNA was excised from the pBluescript-SK by digestion with *Sall* and *SacI* and cloned at the same restriction sites of the pSP72 (Promega). A Flag sequence from the pCMV-tag4 was introduced into the *Sall* site of the pSP72. Finally, hHGFflag sequence was removed from pSP72hHGFflag by *NotI* digestion and subcloned into the pCIneo plasmid. The resultant vector was named pCMV/hHGF.

Plasmids were expanded into the *Escherichia coli* strain JM-109 and purified using the EndoFree plasmid Giga kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). DNA was dissolved in Endofree TE buffer at a concentration of 4 µg/µl.

Equal volumes of plasmid DNA and SP1017 (0.02%) were gently mixed to a final DNA concentration of 2 µg/µl and 0.01% wt/vol of SP1017.

Animals and in vivo electroporation

Recommendations for the proper care and use of laboratory animals were followed.

Animals were divided into three groups: ISCH: 45 min of warm ischemia and no pretreatment ($n=8$); ISCH+MUSCEP: hHGF muscle injection and subsequent electroporation, 3 days before 45 min of renal warm ischemia ($n=8$); and ISCH+KIDNEP: renal artery injection of hHGF and kidney electroporation 3 days before 45 min of renal warm ischemia ($n=11$).

Electroporation was performed 3 days before ischemia because, in previous intramuscular studies,²⁴ hHGF plasma levels peaked between 3 and 5 days after gene electrotransfer.

All rats were Sprague–Dawley weighing between 250–300 mg and were anesthetized i.p. by a combination containing ketamine (30 mg/kg), atropine (0.25 mg/kg) and diazepam (0.625 mg/kg).

Muscle electroporation. Legs were shaved and moistened with 70% ethanol. Plasmid was injected into the tibialis anterior muscle by a 28-gauge needle in a proximal to distal direction inside the tissue. The injected volume was 200 µl per leg. Following the intramuscular injection of plasmid DNA, an electrical field was applied to the area around the injection. Muscles were held by caliper electrodes composed of two 1.5 cm² steel plates, and electric pulses were delivered to the muscle by pulse generator (BTX ECM830 electroporator Genetronics Inc., San Diego, CA, USA). Eight pulses of 20 ms each at a frequency of 2 Hz were delivered with a voltage of 175 V/cm (optimized recently in our group). A conductive gel on the shaved leg ensured electrical contact with the skin. To improve plasmid DNA diffusion, 25 U of bovine hyaluronidase (Sigma) in 60 µl saline was injected into the muscle 2 h before the administration of plasmid DNA and the electroporation.⁴³

Kidney electroporation. Left kidney and pedicle were surgically exposed with a midline abdominal incision and the renal artery was clamped proximal to the aorta. We injected 400 µl of plasmid containing hHGF with a sterile insulin syringe (100-U). Immediately, the renal pedicle was clamped in order to avoid the leak of liquid, and an electric field was applied to the kidney, held with

a tweezers-type electrode (same mechanism as in muscle). Then, the renal artery was sutured with a 9/0 filament and unclamped in less than 12 min (to avoid ischemic damage). In preliminary studies, three electroporation voltages (75, 100 and 125 V/cm) were assayed and 100 V/cm was applied to all kidneys: six pulses of 50 ms each at a frequency of 1 Hz, following the protocol of Tsujie.²⁰

Ischemia. 3 days after electrotransfer, animals were anesthetized as described above and the left kidney was surgically exposed with a midline laparotomy. The renal artery and vein were clamped in block to induce kidney ischemia for 45 min, during which animals were kept at 37°C and a contralateral nephrectomy was carried out. Then, clamps were released and the animals were housed for a week. On days 1, 3, 5 and 7 the animals were weighed and blood obtained from tail vein, used for measuring creatinine levels (µmol/l) by Jaffe's reaction on an autoanalyzer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Kidneys were processed for histological and molecular studies on day 7 after ischemia.

Determination of human plasma HGF

Blood samples were collected in EDTA tubes, centrifuged at 900 g for 30 min at 4°C and kept in polypropylene vials. The amount of human plasma HGF was measured using a commercially available ELISA kit (Quantikine KitTM, Research & Diagnostics Systems, Minneapolis, USA). Blood samples of kidney-electroporated animals of days 1, 3, 5 and 7 after ischemia were used to create a kinetic profile of expression.

Determination of renal TGF-β1 levels

Renal tissue was homogenized in 10 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) containing 2 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and 0.01% Tween 80. The samples were centrifuged at 19 000 g for 30 min, an aliquot of the supernatant was taken and the supernatant was stored at -80°C till analysis. After homogenization, total protein concentration was measured by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). TGF-β1 levels in tissue homogenate supernatants were measured in a 96-well microplate in a commercially available assay ELISA kit (Quantikine KitTM, Research & Diagnostics Systems, Minneapolis, USA). The levels of TGF-β1 in kidneys were expressed as ng/mg total protein.

Determination of rat kidney HGF

For measurements of tissue HGF level, tissue was homogenized in HGF extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M NaCl, 0.1% Tween-80, 1 mM EDTA and 1 mM PMSF, as described previously.⁴⁴ The homogenates were centrifuged at 19 000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant was recovered for HGF quantification and total protein concentration. HGF was determined by a commercially available ELISA kit (Rat HGF EIA, Institute of Immunology, Tokyo, Japan). Total protein concentration was measured by Bradford's method (Bio-Rad); tissue HGF concentration was expressed in ng/mg protein.

This rHGF antibody does not crossreact with hHGF.²⁸

Histological studies

For light microscopy, 3–4 μm thick tissue sections were placed in 4% formaldehyde for paraffin embedding and subsequent staining with hematoxylin–eosin and periodic acid–Schiff (PAS). A score from 0 to 3 was given for each tubular profile of necrosis and regeneration by a pathologist who was blind to the material: 0, normal histology; 1, less than 1/3 of the specimen affected; 2, 1/3 to 2/3 of tissue injured; and 3, the whole section damaged. Tubular injury was assessed by cellular swelling and lysis, luminal cast formation, loss of cellular adhesion and brush border loss. Tubular regeneration was defined by the presence of nuclear mitosis.

Immunohistochemical analyses

Representative tissue sections were immunostained by the immunoperoxidase technique (Normal serum Horse 3:100 diluted, ABC 1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) as described.⁴⁵ As primary antibodies, we used a 1:100 diluted monoclonal mouse antirat antibody for ED-1 macrophages (Oxford Biomarketing, Oxford, UK), 1:200 diluted mouse monoclonal antirat antibody for leukocyte T and B protein CD45RC (Serotec, Oxford, UK) and 1:25 diluted goat polyclonal antihuman HGF antibody. As secondary antibodies, we used horse antimouse IgG (1:200; kit of Pierce Biotechnologies, Rockford, USA) and a horse antigoat IgG (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). They were revealed using DAB (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Apoptotic cells were stained using the Apoptag peroxidase kit (Labclinics, Barcelona, Spain) with a 50% diluted primary antibody and revealed with DAB, and by antiPARP p85 Fragment pAb (Promega, Madison, USA) 1:50 diluted and with an antirabbit IgG (1:200; Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Positive ED1 and Cd45Rc-stained and apoptotic cells in kidneys were counted and expressed as mean \pm s.e.m. of cells per field of view (+cells/FV, $\times 40$, ≥ 20 counted fields/kidney). PARP staining was analyzed by a blinded pathologist from 0 to 3 as explained above.

Quantification of renal HGF and PCNA by real-time PCR

RNA extraction and reverse transcription were performed in a total volume of 40 μl , as previously described.⁴⁵ Tissue cDNA proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was amplified and quantified by real-time PCR (ABI Prism[®] 7700, Applied Biosystems, Spain), using the comparative C_T (threshold cycle) method. We validated the method for our pair of amplicons (rat PCNA and rat rRNA 18S) (results not shown), so that the comparative C_T method could be used. For rat 18S PCR reaction, 1 μl of each cDNA sample was mixed with 2 \times TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (12.5 μl)+20 \times target primers and Probe (1.25 μl) in a total reaction volume of 25 μl . For rat PCNA PCR reaction, 1 μl of each cDNA sample was mixed with primers and probe in a total reaction volume of 25 μl to reach a final concentration of 900 nM for both forward and reverse primers and 200 nM for the probe. Amplification followed the universal amplification program proposed by Applied Biosystems and previously described.⁴⁵ Values of normal kidneys were pooled and used as the reference value.

Results were expressed as 'many fold of the unknown sample' with respect to the sham group values.

Tissue myeloperoxidase assay

Neutrophil infiltration in rat kidneys was assessed by measuring the activity of the neutrophil-specific MPO. A modification of Bradley's kinetic method, previously described in our group, was used.⁴⁶ Frozen tissue (0.1–0.2 g) was homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide. It was subsequently snap-frozen in liquid nitrogen and thawed in three consecutive steps and then underwent 30 s sonication, and a final 2 h incubation at 60°C. After centrifugation, the supernatant was collected for MPO measurement. The assay consisted of determining the rate at which the colored product was formed during the MPO-dependent reaction of 0.167 mg/ml *o*-dianisidine and 0.0005% hydrogen peroxide, measured at 460 nm in spectrophotometer (Beckman). One unit of MPO activity was defined as that which degrades 1 μmol of peroxide/min at 25°C. The MPO activity values are the mean levels after duplicate determinations and are expressed as a change in OD per minute per gram of tissue.

Statistical analysis

The StatView[®]5 program (SAS Institute Inc.) was used for the statistical analysis. Quantitative data were compared using ANOVA followed by the Scheffe test. To compare groups for serum creatinine throughout the follow-up, this was compacted and compared by ANOVA for repeated measures. For histological data, the nonparametric Kruskal–Wallis test and then Conover's test were used. All *P*-values were two-tailed, with <0.05 taken as statistically significant. Data are shown as mean \pm s.e.m.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III/FIS (PI01/3071, PI03/0082, FIS 01/0097-01), Sociedad Española de Nefrología 2002 and Fundació Marató TV3 00/4030. Marcel·la Franquesa, Gabriela Alperovich and Núria lloberas are in receipt of fellowships from IDIBELL Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Fundació Catalana de Transplant and Red de Transplantes, respectively. Immaculada Herrero-Fresneda and Inés Rama are researchers from ISCIII/FIS. We also thank Supratek Pharma Inc. (Laval, QC, Canada) for providing us the SP1017 carrier.

References

- 1 Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F887–F899.
- 2 Lu CY et al. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int* 1999; **55**: 2157–2168.
- 3 Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 2004; **66**: 523–527.

- 4 Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4357–4361.
- 5 Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol* 1994; **266**: F129–F134.
- 6 Takada S et al. Effect of hepatocyte growth factor on tacrolimus-induced nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Transplant Int* 1999; **12**: 27–32.
- 7 Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001; **59**: 2023–2038.
- 8 Igawa T et al. Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am J Physiol* 1993; **265**: F61–F69.
- 9 Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **239**: 639–644.
- 10 Yo Y et al. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: antiapoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int* 1998; **54**: 1128–1138.
- 11 Furlong RA et al. Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J Cell Sci* 1991; **100** (Part 1): 173–177.
- 12 Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int* 2000; **57**: 1426–1436.
- 13 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; **276**: 60–66.
- 14 Matsumoto K, Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease and potential therapeutics. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; **9**: 395–402.
- 15 Liu ML, Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver. *Am J Pathol* 1994; **144**: 129–140.
- 16 Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; **10**: 585–589.
- 17 Mir LM et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; **77**: 2336–2342.
- 18 Rodriguez-Cuevas S et al. Electrochemotherapy in primary and metastatic skin tumors: phase II trial using intralesional bleomycin. *Arch Med Res* 2001; **32**: 273–276.
- 19 Mir LM et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4262–4267.
- 20 Tsujie M et al. Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 949–954.
- 21 Wang Y et al. Combination of electroporation and DNA/dendrimer complexes enhances gene transfer into murine cardiac transplants. *Am J Transplant* 2001; **1**: 334–338.
- 22 Liu F, Huang L. Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1116–1119.
- 23 Dean DA et al. Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Therapy* 2003; **10**: 1608–1615.
- 24 Riera M et al. Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med* 2004; **6**: 111–118.
- 25 Cruzado JM et al. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004; **53**: 1119–1127.
- 26 Wang XD et al. Mice body weight gain is prevented after naked human leptin cDNA transfer into skeletal muscle by electroporation. *J Gene Med* 2003; **5**: 966–976.
- 27 Tupin E et al. Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by *in vivo* electroporation. *Gene Therapy* 2003; **10**: 569–579.
- 28 Ueki T et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; **5**: 226–230.
- 29 Goto T et al. Hepatocyte growth factor in glycerol-induced acute renal failure. *Nephron* 1997; **77**: 440–444.
- 30 Gao X et al. Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2002; **62**: 1238–1248.
- 31 Mizui M et al. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004; **65**: 2041–2053.
- 32 Dai C et al. Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2637–2647.
- 33 Yang J, Dai C, Liu Y. Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1470–1479.
- 34 Yazawa K et al. Direct transfer of hepatocyte growth factor gene into kidney suppresses cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 812–816.
- 35 Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F7–F16.
- 36 Mizuno S et al. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000; **57**: 937–948.
- 37 Florquin S, Rouschop KM. Reciprocal functions of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta1 in the progression of renal diseases: a role for CD44? *Kidney Int Suppl* 2003; **86**: S15–S20.
- 38 Daemen MA et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999; **104**: 541–549.
- 39 Arthur LG, Schwartz MZ, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Surg* 2004; **39**: 139–143; discussion 139–143.
- 40 Makondo K et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor suppresses TNF-alpha-induced E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 9–15.
- 41 Ysebaert DK et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**: 1562–1574.
- 42 Takada M et al. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1199–1203.
- 43 McMahon JM et al. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase – increased expression with reduced muscle damage. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1264–1270.
- 44 Liu Y et al. Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Int* 1999; **55**: 442–453.
- 45 Herrero-Fresneda I et al. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; **162**: 127–137.
- 46 Lloberas N et al. Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J* 2002; **16**: 908–910.

ARTICLE 2

HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms.

Herrero-Fresneda I, Torras J, Franquesa M, Vidal A, Cruzado JM, Lloberas N, Fillat C, Grinyó JM

Kidney International (2006) 70, 265-274

Article2 HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms. *Kidney International* (2006) 70, 265-274

Objectiu

L'objectiu d'aquest segon treball és testar la hipòtesis d'un potencial efecte terapèutic de l'electrotransferència amb HGF sobre la fibrosi i la inflamació característiques de la NCA o FIAT. Per assolir aquest objectiu, en un model experimental d'al·lotrasplantament renal amb rata, s'han realitzat dos temps d'administració d'HGF. Per una banda una administració primerenca per oferir protecció inicial a l'òrgan trasplantat; i una administració tardana, a les 8 i a les 10 setmanes post-trasplantament per la prevenció dels mecanismes crònics.

RESULTATS

-HGF en la NCA

Quasi el 40% (10 de 26) dels animals trasplantats no tractats amb HGF (NoHGF) no van sobreviure el període d'estudi (Figura 1) i van morir d'IRC. Les rates supervivents van desenvolupar proteïnúria progressiva (Figura 2b) al llarg del seguiment amb insuficiència renal a partir de la setmana 16 (gràfic creatinina sèrica).

Els grups d'animals trasplantats tractats tant a l'inici de l'estudi (IniHGF) com a les 8 i a les 10 setmanes post-trasplantament (DeiHGF) estan protegits de la insuficiència renal valorat pels paràmetres funcionals de proteïnúria, creatinina sèrica i aclariment de creatinina.

Els nivells d'HGF de rata en plasma en aquest model de trasplantament al·logènic resultaren ser inferiors als de les rates no trasplantades (figura S1B). El perfil dels nivells d'HGF de rata en plasma en les rates noHGF decreixia amb la progressió de la NCA. Els nivells trobaven els seu punt màxim als 4 dies i decreixien al llarg de l'estudi (Figura 3).

Al final del seguiment (24 setmanes) la histologia convencional (Taula 1a), revela fibrosi intersticial, atròfia tubular, un percentatge elevat de glomèruls esclerosats així com un elevat nombre de cèl·lules positives per α SMA i per CTGF (Figura 4). A part d'aquest augment en la fibrosi, la inflamació es veié representada per un augment dels macròfags i els limfòcits T infiltrant el teixit renal. Aquest infiltrat el trobem ja a les 12 setmanes.

La quantificació gènica per PCR a temps real mostra com els nivells de HGF de rata no variaven entre les setmanes 12 i 24 (Taula 3). Hi ha una disminució en l'expressió gènica en els NoHGF respecte els controls (animals sans). L'expressió de rHGF en el teixit renal dels NoHGF era més baixa al final de l'estudi que a les 12 setmanes, tot i que les diferències no eren estadísticament significatives.

-Efecte de la teràpia gènica inicial amb HGF en la NCA

Els animals del grup IniHGF tenen una taxa de supervivència més alta que els del grup NoHGF. Així la mortalitat en els animals dels grup IniHGF

es veu retardada 8 setmanes, després de les quals només el 25% (4 de 16) varen morir d'insuficiència renal (Figura 1). Les rates del grup IniHGF varen desenvolupar només una lleu proteinúria i insuficiència renal (Figura 2).

En aquest grup una sola intervenció d'electroporació muscular amb hHGF permet obtenir nivells d'hHGF en plasma elevats (460 pg/ml el dia 6; 90 pg/ml el dia 11).

El perfil dels nivells de HGF de rata en plasma en el grup IniHGF durant la primera setmana no va caure tan dràsticament com en el grup NoHGF, però va seguir una progressió decreixent al llarg del temps (Figura 3). L'expressió en teixit tant del gen com de la proteïna de l'HGF de rata foren similars en els grups IniHGF i noHGF (Taula 3).

A les 24 setmanes, l'observació de la histologia convencional del grup IniHGF no ens mostrava vasculopatia, ni glomeruloesclerosi, i tan sols alguns signes lleus de fibrosi i infiltrat cel·lular (Taula 1a i Figura 4)

-Efecte del tractament retardat amb hHGF en la progressió de la NCA

El grup DelHGF mostrava una taxa de supervivència més elevada que el grup NoHGF, amb una mortalitat de menys del 20% (3 de 16) (Figura 1). Cap de les morts es va produir en les 8 setmanes posteriors a l'electrotransferència d'hHGF, seguint el mateix patró del grup IniHGF. Les rates del grup DelHGF tenien funció renal normal i estable durant tot el seguiment, de forma similar al grup IniHGF. Tot i no trobar diferències estadísticament significatives, a les 24 setmanes la creatinina sèrica i la proteinúria eren menors en el grup DelHGF que en el grup IniHGF (Figura 2).

Dues tandes d'electrotransferència gènica varen resultar efectives en la detecció de nivells d'hHGF en plasma a les 12 setmanes (DelHGF: 141 ± 99 pg/ml; NoHGF: 0 ± 0 pg/ml, $P < 0,05$).

Els nivells d'HGF endogen de rata en plasma del grup DelHGF incrementen significativament després de l'electrotransferència amb hHGF, contràriament al que passava amb els grups IniHGF i NoHGF (Figura 3a). Així, els nivells plasmàtics de rHGF mostren una disminució paral·lela als altres dos grups. Al final del seguiment, l'expressió gènica i proteica de rHGF en els empelts del grup DelHGF era més elevada que en els altres grups (Taula 3).

A les 24 setmanes (més de 12 setmanes després del tractament), l'observació histològica dels ronyons DelHGF mostrava poques lesions en l'estructura renal, sense vasculopatia, glomerulosclerosi o fibrosi i tan sols algunes cèl·lules infiltrants (Taula 1, Figura 4)

-Modulació del mecanismes de progressió de la NCA mitjançant la teràpia gènica amb HGF.

Els trets histològics característics de la NCE es comencen a desenvolupar entre les setmanes 8 i 12 (Taula 1). La valoració histològica a les 8 setmanes dels ronyons no tractats no mostrava signes de dany túbulointersticial, vascular o glomerular i tan sols un nombre petit de cèl·lules infiltrants. En la valoració a les 12 setmanes, els glomèruls i les estructures tubulointersticials ja estaven danyades i amb un important component d'infiltrat cel·lular inflamatori i fibrosi (Taula 1a, Figures 4 i 5). A part de l'infiltrat inflamatori intersticial, les citoquines inflamatòries IL12b, TNF α i IFN γ estaven també sobreexpressades a les 12 setmanes (Taula2).

En el grup DelHGF, el teixit renal un mes després del tractament (12-14 setmanes post-trasplantament) mostra, no tan sols menys fibrosi intersticial, sinó també, un nombre reduït de tots els tipus cel·lulars inflamatoris infiltrants, exhibint valors similars als que trobàvem en el grup NoHGF a les 8 setmanes (Taula 1, Figures 4 i 5). Paral·lelament a les poques cèl·lules inflamatòries infiltrants observades en el parènquima renal els ronyons dels animals tractats, mostraven a les 12 setmanes menys expressió de citoquines inflamatòries que el grup NoHGF (Taula2). Amb l'objectiu d'analitzar més profundament els mecanismes implicats en aquest procés, es va avaluar l'expressió de NFκB. En els ronyons d'animals no tractats, la subunitat p65 del NFκB (RelA) era present en la major part de les cèl·lules epitelials tubulars, tant a nivell citoplasmàtic com nuclear, mentre que sols podem observar una lleu expressió citoplasmàtica i no nuclear en els ronyons del grup DelHGF (Figura 5). Les diferències es veuen també a nivell d'expressió gènica tot i que no hi ha una diferència significativa (Taula2, Figura S1A)

A les 12 setmanes, l'electrotransferència de hHGF aconseguí reduir l'expressió de TGFβ, i lleument incrementà l'expressió de rHGF, resultant en un major quocient HGF/TGFβ (Taula3). En aquest punt, la glomerulosclerosi i les cèl·lules positives per CTGF en els túbuls o en els glomèruls no es diferenciaven entre animals tractats i no tractats (Taula 1b), cosa que indica que a les 12 setmanes la deposició de matriu extracel·lular era moderada i que el tractament amb HGF no oferia una modificació important. En canvi a les 24 setmanes l'expressió de TGFβ (Taula 3) es veu reduïda en els DelHGF, i l'expressió de CTGF s'observava només en els NoHGF (Taula 1b, Figura 4). A més a més l'acumulació d'αSMA ja es manifestava a les 12 setmanes i, clarament, el tractament amb HGF reduïa el nombre de cèl·lules positives per αSMA tant a 12 com a 24 setmanes (Figura 4). Més enllà d'aquests efectes sobre la fibrosi, també observem un

efecte sobre la regeneració a les 12 setmanes. L'expressió gènica de PCNA es veié reduïda en el grup NoHGF mentre que es mostrava significativament augmentat en els animals tractats amb HGF (Taula 3).

La teràpia gènica amb HGF es mostra, doncs, efectiva en la prevenció de la fibrosi de l'alloempelt renal. Tot o que l'administració tardana es mostra significativament més efectiva, l'administració primerenca ofereix resultats anti-fibròtics i antiinflamatoris molt òptims tot i el temps transcorregut entre teràpia i anàlisi.

HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms

I Herrero-Fresneda¹, J Torras^{1,2}, M Franquesa¹, A Vidal³, JM Cruzado^{1,2}, N Lloberas¹, C Fillat⁴ and JM Grinyó^{1,2}

¹Laboratory of Experimental Nephrology, Department of Medicine, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain; ²Nephrology Ser., H.U.Bellvitge, Barcelona, Spain; ³Pathology Ser., H.U.Bellvitge, Barcelona, Spain and ⁴Centre de Regulació Genòmica-CRG, Passeig Marítim, Barcelona, Spain

Inflammatory processes and tissue scarring are characteristic features of chronic allograft nephropathy. Hepatocyte growth factor (HGF) has beneficial effects on renal fibrosis and it also ameliorates renal interstitial inflammation as it has been recently described. Contrarily to protein administration, intramuscular gene electrotransfer allows sustained release of HGF. So, here we hypothesized that gene therapy with human HGF would diminish the characteristic scarring of chronic allograft nephropathy either by antagonizing tissue fibrosis mechanisms or by reducing inflammation. Lewis rats transplanted with cold preserved Fischer kidneys received vehicle (NoHGF) or intramuscular plasmid DNA encoding HGF plus electroporation either before transplantation (IniHGF, early post-transplant cytoprotection of tubular cells) or 8/10 weeks after transplantation (DelHGF, delayed prevention of chronic mechanisms). Serum creatinine and proteinuria were measured every 4 weeks for 24 weeks. Grafts at 12 or 24 weeks were evaluated for glomerulosclerosis, fibrosis inflammatory cells and mediators, cell regeneration and tubulo-interstitial damage. Nontreated animals developed renal insufficiency, progressive proteinuria and fibrosis among other characteristic histological features of chronic allograft nephropathy. Treatment with human HGF, especially when delayed until the onset of fibrogenic mechanisms, reduced renal failure and mortality, diminished tubule-interstitial damage, induced cell regeneration, decreased inflammation, NF- κ B activation, and profibrotic markers at 12 weeks and prevented late interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. The effectiveness of HGF-gene therapy in the prevention of renal allograft scarring is related with the halt of profibrotic inflammatory-induced mechanisms.

Kidney International advance online publication, 17 May 2006;
doi:10.1038/sj.ki.5001510

Correspondence: I Herrero-Fresneda, Lab.4122 Experimental Nephrology, Department of Medicine, 4^a Pl. Pavelló Govern, Campus Bellvitge, E-08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain. E-mail: iherrero@ub.edu

Received 1 September 2005; revised 13 February 2006; accepted 22 February 2006

KEYWORDS: CAN; cold ischemia; fibrosis; gene electrotransfer; HGF; inflammation

Hepatocyte growth factor (HGF) has multiple biological activities in a wide variety of cells, including renal tubular and endothelial.¹ Its expression is upregulated at early stages of chronic processes as a natural repair mechanism but sustained injury throughout these processes results in the overexpression of other growth factors that have antagonistic effects to HGF. The equilibrium between HGF and profibrotic factors is then imbalanced in favor of the latter, thereby resulting in extracellular matrix accumulation and progression to renal fibrosis.^{1,2} Protein HGF supply has been shown to prevent the onset of renal scarring by inhibiting the morphologic transformation of tubular epithelial cells.^{3,4}

Recently, it has been reported that HGF is a potent anti-inflammatory cytokine that decreases the RNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ), two inflammatory cytokines⁵ and directly suppresses pro-inflammatory membrane co-factor protein 1 (MCP-1) and RANTES expression, probably via nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in tubular epithelial cells.^{6,7} HGF also offers protection in acute ischemic and inflammatory injuries by its antiapoptotic and proangiogenic effects^{8,9} by attenuating ischemia-induced cell death¹⁰ and ischemia- or toxic-induced acute renal failure.¹¹⁻¹⁴ In human critical limb ischemia, HGF has been safely applied in phase I/early phase IIa, which indicates its usefulness as a sole therapy.¹⁵

Gene therapy is now moving from experimental studies into clinical applications,¹⁶⁻¹⁸ but gene transfer methodology is one of the limiting steps. Viral vector gene transfer has proved efficient but does not allow repetitive injection. In addition, although the administration of naked plasmid DNA or liposome formulated DNA is feasible, the levels of the therapeutic protein obtained are too low. Recently, DNA electrotransfer has greatly improved nonviral gene transfer efficiency. Electrotransfer is a classic technique used *in vitro*

that has been adapted to experimental *in vivo* gene therapy. *In vivo*, electroporation shows consistently high levels of gene expression for many genes¹⁹ and is normally applied after intramuscular injection (20-23, reviewed in André and Mir²⁴). Our group previously reported that HGF gene electrotransfer is effective to treat late stages of diabetic nephropathy.²⁵

Chronic allograft nephropathy (CAN) is a multifactorial process that leads to late allograft loss in renal transplantation. The joint association of nonalloreactive factors, as cold ischemia, plus allogenicity significantly increases cellular infiltration at both early and late stages, aggravating the progression of experimental CAN.²⁶⁻²⁸

Here we tested the hypothesis that HGF electrotransfer provides protection against the inflammatory and fibrotic processes that finally leads to the characteristic features of CAN. As HGF electrotransfer allows up to 14 days increase in endogenous HGF,²⁵ preventive gene therapy was applied following two distinct timings: before renal transplantation for the early post-transplant cytoprotection from ischemia-reperfusion injury, or at 8 and 10 weeks after transplantation for the delayed prevention of chronic mechanisms.

RESULTS

HGF in CAN

Ten out of 26 NoHGF rats did not survive the study period (Figure 1) and died of renal insufficiency. The surviving rats developed progressive proteinuria (Figure 2b) along the follow-up with renal insufficiency from the 16th week (Figure 2a).

Rat HGF plasma levels in this model of kidney transplant were found lower than those in rats with two native kidneys (Figure S1B) (week 16: 7.29 ± 1.68 ng/ml; week 32: 6.20 ± 1.80 ng/ml).²⁵ The profile of plasma rat HGF level in

NoHGF rats decreased with the progression of CAN. Levels were higher at 4 weeks and dropped afterwards (Figure 3), reaching the lowest values at 24 weeks when CAN was already established.

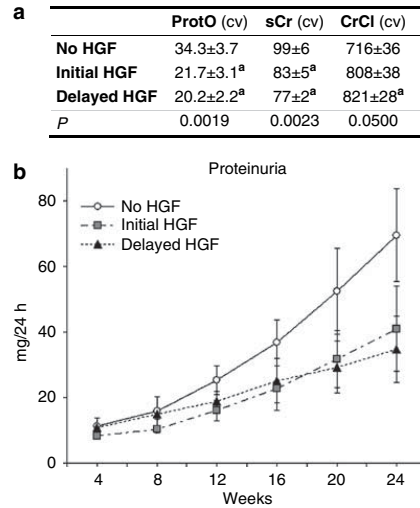


Figure 2 | Renal function. (a) Proteinuria (ProtO, mg/24 h), serum creatinine (sCr, μmol/l), and creatinine clearance (CrCl, μmol/min) values obtained throughout the follow-up were compacted using the StatView[®] 5 program (SAS Institute Inc.) in a single variable (cv = compacted variable) and compared with analysis of variance. ^aP < 0.05 vs NoHGF group. Serum creatinine and proteinuria were clearly reduced by HGF treatment. Renal insufficiency was present only in the NoHGF group. (b) Monthly values of ProtO revealed that NoHGF rats displayed progressive proteinuria along the follow-up whereas treatment with HGF prevented this proteinuria, especially in the DelHGF group.

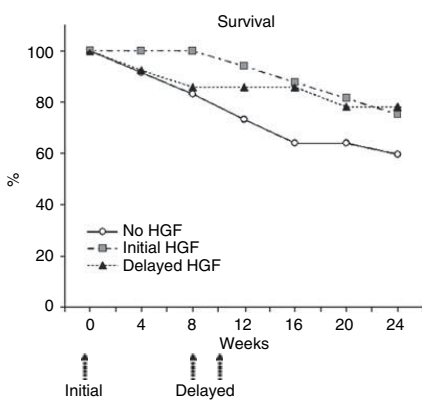


Figure 1 | Survival. HGF-treated groups showed improved survival with respect to the nontreated one. The two treated groups showed lower mortality rates. P < 0.05 NoHGF vs IniHGF and DelHGF; Kaplan-Meier and log-rank methods.

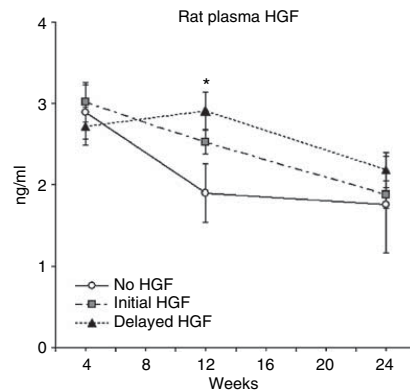


Figure 3 | Plasma rat HGF protein kinetics. Here, the NoHGF group showed an initial rapid decrease in rat HGF plasma levels, while in the IniHGF group these levels decreased slowly and progressively. In the DelHGF group, plasma rat HGF increased after treatment and reached the highest levels at the end of the study compared with the other groups. Analysis of variance, Fisher's test, *P = 0.0025 NoHGF vs DelHGF.

Table 1 | Histology

	NoHGF			IniHGF 24 weeks	DelHGF	
	8 weeks	12 weeks	24 weeks		12 weeks	24 weeks
<i>(a) Conventional histology</i>						
Tubular atrophy	0.89 ± 0.20	1.87 ± 0.55	1.25 ± 0.37	0.82 ± 0.35	0.50 ± 0.35	0.50 ± 0.25
Interstitial fibrosis	0.89 ± 0.20	3.12 ± 0.37	2.61 ± 0.27	1.95 ± 0.29	1.50 ± 0.54 ^a	1.50 ± 0.25 ^b
Cellular infiltrate	1.56 ± 0.18	3.00 ± 0.35	1.89 ± 0.38	1.32 ± 0.34	1.25 ± 0.52 ^a	0.92 ± 0.34
Tub-Int score	3.33 ± 0.50	8.00 ± 1.21	5.75 ± 0.98	4.09 ± 0.94	3.25 ± 1.33 ^a	2.92 ± 0.82 ^b
Vasculopathy	0.22 ± 0.15	0.25 ± 0.25	0.36 ± 0.22	0.09 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
% Glomerulosclerosis	1.51 ± 0.51	2.22 ± 1.57	12.77 ± 3.79	2.39 ± 2.09 ^b	0.95 ± 0.66	3.05 ± 1.54 ^b
<i>(b) Immunohistochemistry</i>						
ED1+		20.44 ± 4.62	8.63 ± 1.57	6.26 ± 1.68	8.79 ± 1.23 ^a	6.33 ± 1.35
CD45RC+		17.06 ± 3.36	3.21 ± 0.89	2.59 ± 0.76	5.24 ± 1.49 ^a	2.27 ± 0.74
CD3+		44.7 ± 13.3	13.41 ± 3.99	12.56 ± 0.66	10.2 ± 4.30 ^a	9.61 ± 1.37
α-SMA		12.07 ± 1.33	13.03 ± 3.62	4.20 ± 1.94 ^b	3.40 ± 1.19 ^a	4.22 ± 1.40 ^b
<i>CTGF</i>						
Tubuli		1.62 ± 0.69	2.0 ± 0.47	0.57 ± 0.23 ^b	0.75 ± 0.32	1.00 ± 0.27 ^b
Glomeruli		3.53 ± 1.02	7.47 ± 1.21	2.17 ± 0.76 ^b	4.17 ± 1.32	3.94 ± 0.79 ^b

(a) Conventional histology: Tubular atrophy, interstitial cell infiltration, interstitial fibrosis and vasculopathy were evaluated on H&E and PAS sections and semiquantitatively graded (0: no abnormalities; +1: abnormalities affecting <1/3 of the sample; +2: between 1/3 and 2/3; +3: >2/3 of the sample). Tubulo-interstitial score=tubular atrophy+interstitial cell infiltration+interstitial fibrosis. Glomerulosclerosis (%)=global sclerosed glomeruli/total glomeruli number.

Kruskall-Wallis; ^aat 12 weeks, $P < 0.05$ vs NoHGF. ^bat 24 weeks, $P < 0.05$ vs NoHGF.

(b) Immunohistochemistry: CD45RC+, CD3+, ED1+ cells infiltrating kidneys, α-SMA+ interstitial cells and CTGF+ cells in glomeruli were counted and expressed as mean ± s.e.m. of cells per field of view or per glomerulus (cells/FV or cells/glom at ×400 magnification, ≥20 counted fields or glomeruli per kidney). Tubuli CTGF staining was semiquantitatively scored from 0 to +4.

At 12 weeks, ED1+, CD45RC+, CD3+ and α-SMA+ immunostaining were lower in DelHGF group. At 24 weeks both treated groups showed lower α-SMA and CTGF immunostaining.

H&E, hematoxylin and eosin; HGF, hepatocyte growth factor; PAS, periodic acid Schiff; α-SMA, α-smooth muscle actin; Tub-Int, tubulo-interstitial.

At 24 weeks, conventional histology (Table 1a, Figure 4) revealed interstitial fibrosis, tubular atrophy, a considerable percentage of sclerosed glomeruli as well as a high number of interstitial α-smooth muscle actin (α-SMA) (Figure 4) and tubular and glomerular connective tissue growth factor (CTGF)-positive cells (Table 1b, Figure 4). In addition to these fibrotic changes, inflammation was also present, with macrophages and T cells infiltrating kidneys. This cell infiltration was already notable at 12 weeks (Figure 5).

The reverse transcription-polymerase chain reaction results showed that tissue expression of the rHGF gene did not vary between 12 and 24 weeks (Table 3). As results were expressed as many fold with respect to nontransplanted healthy kidneys (data not shown), values <1 in NoHGF samples indicate that rat HGF gene expression was reduced in CAN. Tissue rHGF protein in NoHGF grafts was lower at the end of the study than at 12 weeks, although differences did not reach statistical significance.

Effect of initial treatment with hHGF gene therapy on CAN

Animals from the IniHGF group had a higher survival rate than those from the NoHGF group. Interestingly, initial treatment with HFG delayed death by 8 weeks, after which time only four of the 16 rats died, from renal insufficiency (Figure 1). Rats in the IniHGF group developed only slight proteinuria or renal insufficiency (Figure 2).

Here, one single intervention with our gene therapy approach allows high human HGF plasma levels (460 pg/ml day 6; 90 pg/ml day 11) as previously shown.²²

The profile of endogenous rat HGF plasma levels in the IniHGF group during the first weeks did not drop as dramatically as in the NoHGF group but continued decreasing along time (Figure 3). The tissue expression of rat HGF gene and rat HGF protein content was similar in the IniHGF and NoHGF groups (Table 3).

At 24 weeks, the conventional histology showed neither vasculopathy nor glomerulosclerosis in any of them and few signs of both fibrosis and infiltrating cells (Table 1a, Figure 4). Immunohistochemistry revealed a clear reduction in the deposition of the fibrotic markers α-SMA and CTGF (Table 1b, Figure 4).

Effect of delayed treatment with hHGF gene therapy on CAN

The DelHGF group had a better survival rate than the NoHGF group as only three out of 16 rats died from renal insufficiency (Figure 1). Interestingly, there was no mortality during the 8 weeks after HGF electrotransfer, similarly to IniHGF group. Rats in the DelHGF group displayed normal and stable renal function throughout the entire follow-up, in a similar manner to the IniHGF group. Despite no statistical difference, at 24 weeks, creatinine and proteinuria were lower in the DelHGF than in the IniHGF group (Figure 2).

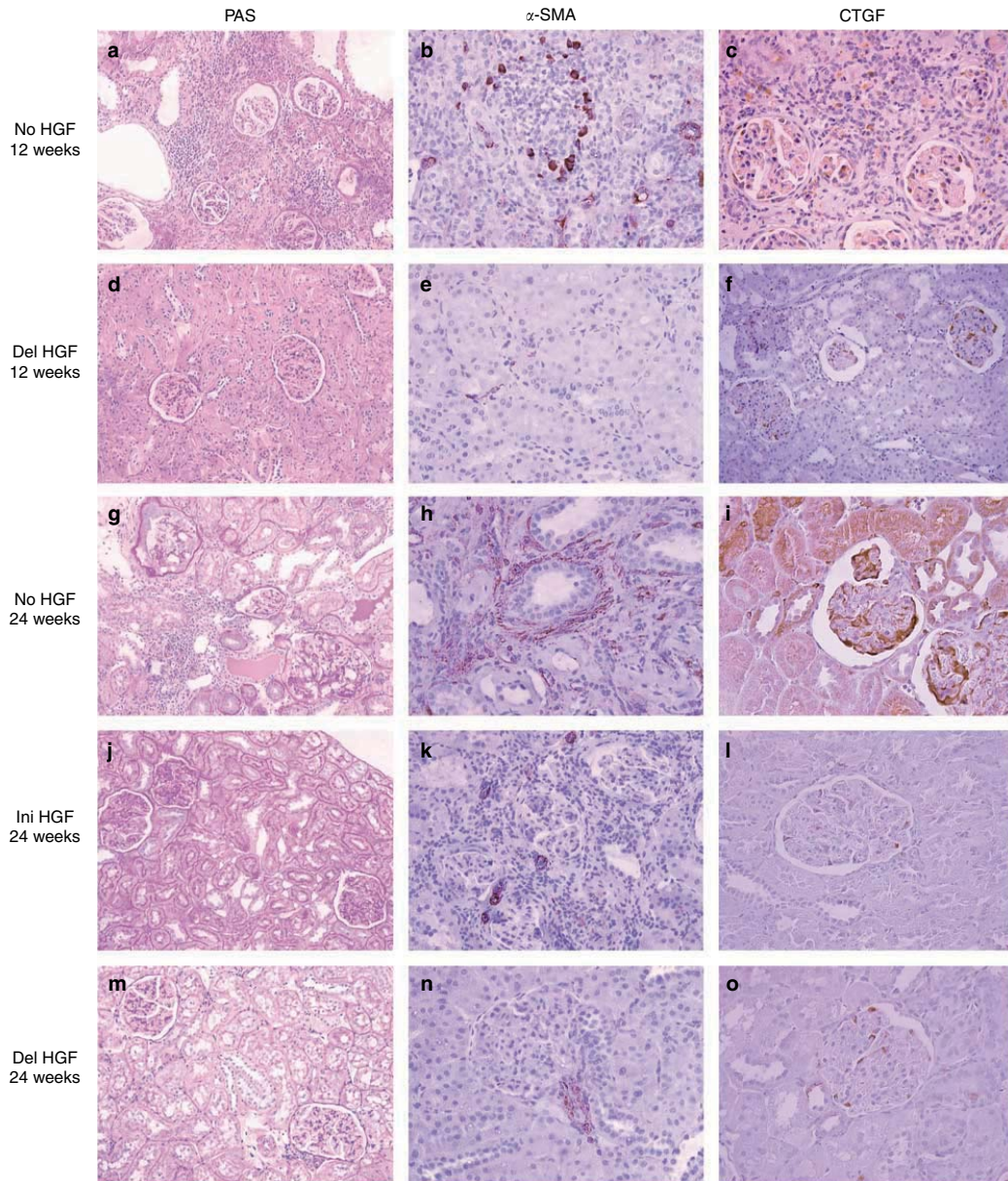


Figure 4 | Representative photomicrographs. (a-f): 12-week grafts (a-c: NoHGF; d-f: DelHGF); (g-o): 24-week grafts (g-i: NoHGF; j-l: IniHGF; m-o: DelHGF). a, d, g, j, m: periodic acid Schiff (original magnification $\times 200$); b, e, h, k, n: α -SMA + (original magnification $\times 400$); c, f, i, l, o: CTGF (original magnification $\times 400$). One month after treatment with HGF, kidneys showed better preserved structures and scarce signs of fibrosis ((d, e, f) DelHGF vs (a, b, c) NoHGF). At 24 weeks this difference was more notable, especially in relation with glomerulosclerosis, α -SMA, and CTGF deposition ((g, h, i) NoHGF vs (j, k, l) IniHGF, and (m, n, o) DelHGF). In DelHGF kidneys, α -SMA was observed only in vessel smooth muscle cells.

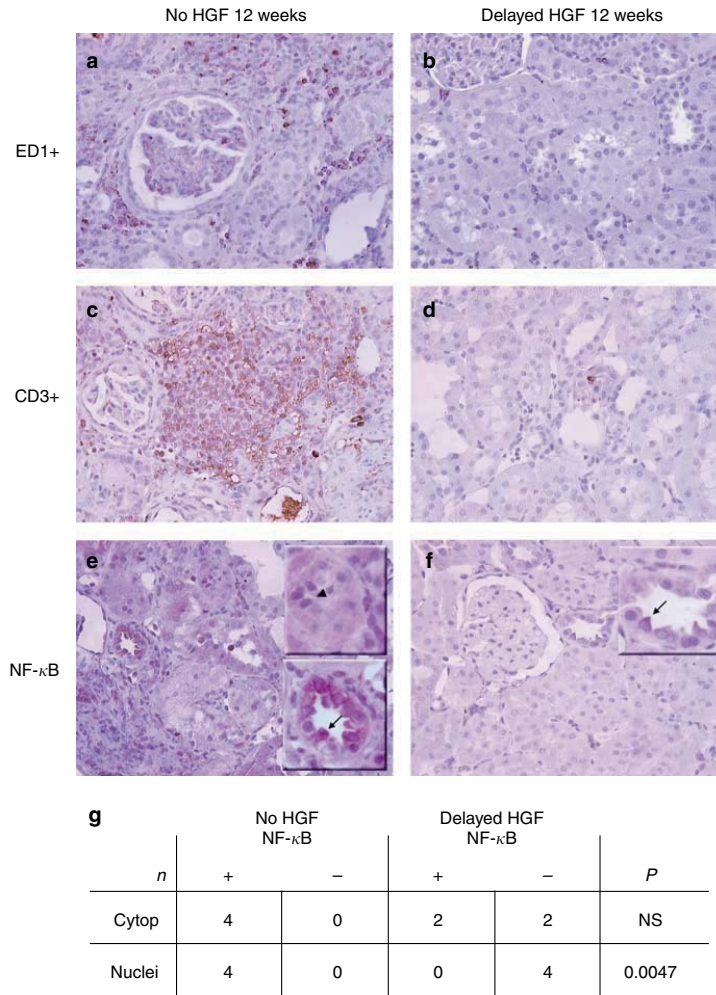


Figure 5 | Inflammatory markers at 12 weeks. (a-f) representative photomicrographs of ED1 (a, b: original magnification × 400), CD3 (c, d: original magnification × 400), and NF-κB (e, f: original magnification × 400 and original magnification × 1000). (a, c, and e): NoHGF kidneys; (b, d and f): DelHGF kidneys. The nuclear factor NF-κB was localized in (e, arrowhead) nuclei and (e, arrow) cytoplasm of tubular epithelial cells of NoHGF kidneys. (f, arrow) Treatment with HGF reduced NF-κB staining and confined it to the cytoplasm. In accordance with this lack of NF-κB nuclei translocation, cell infiltration was notably reduced (b, d vs a, c) 1 month after HGF gene therapy. (g) Contingency table for NF-κB location. For NF-κB staining location and evaluation, a contingency table was constructed and compared with χ^2 test. All four NoHGF kidney samples have NF-κB positive staining, located in both the cytoplasm and nucleus. Contrarily, only two DelHGF kidneys were positive for NF-κB, which was exclusively located in the cytoplasm, and there was no nucleus staining in any of these samples.

Two courses of gene electrotransfer effectively resulted in detectable human HGF plasma levels at 12 weeks (DelHGF: 141 ± 99 pg/ml; NoHGF: 0 ± 0 pg/ml, $P < 0.05$).

In contrast to the NoHGF and IniHGF groups, endogenous rat HGF plasma levels in the DelHGF group increased significantly after human HGF electrotransfer (Figure 3a). Thereafter, plasma rat HGF in this group experienced a parallel decrease to the other two groups. At the end of

the follow-up, rat HGF gene expression and protein content in DelHGF grafts were higher than in the other groups (Table 3).

At 24 weeks (>12 weeks after HGF treatment), microscopic observation of DelHGF kidneys showed scarce lesions in renal structures without vasculopathy, glomerulosclerosis or fibrosis and only a few infiltrating cells (Table 1, Figure 4).

Modulation of intermediate mechanisms of CAN by HGF gene therapy

The characteristic histological features of CAN began to develop between 8 and 12 weeks (Table 1). Histological assessment of nontreated kidneys at 8 weeks showed no signs of tubulo-Interstitial, vascular, or glomerular damage and only a small number of infiltrating cells. When assessed at 12 weeks, glomeruli and tubulo-Interstitial structures were already damaged with an important component of inflammatory interstitial cellular infiltrate and fibrosis (Table 1a, Figures 4 and 5). In addition to interstitial infiltrate, the inflammatory cytokines IL12b, TNF- α , and INF- γ were overexpressed at 12 weeks (Table 2).

In the DelHGF group, renal tissue 1 month after treatment not only showed less interstitial fibrosis but a reduced number of all kinds of infiltrating cells, and displayed similar values to those observed at 8 weeks in nontreated kidneys (Table 1, Figures 4 and 5). In parallel with the few infiltrating cells, HGF-treated kidneys at 12 weeks had clearly less expression of inflammatory cytokines than NoHGF kidneys (Table 2). To further assess inflammatory mechanisms, we evaluated NF- κ B expression. In nontreated kidneys, NF- κ B p65 subunit was widely found in epithelial tubular cells following both a nuclear and cytoplasmic pattern, whereas there was only faint cytoplasmic staining in DelHGF kidneys and no nuclear staining (Figure 5). Differences were also seen at mRNA level (RelA), although here there was no statistical significance (Table 2, see Figure S1A).

Table 2 | Proinflammatory mediators at 12 weeks

	RelA	IL-12b	TNF- α	INF- γ
NoHGF	1.87 \pm 0.48	17.24 \pm 4.40	82.29 \pm 20.19	280 \pm 105
DelHGF	1.17 \pm 0.28	6.95 \pm 2.04 ^a	38.53 \pm 2.73 ^a	102 \pm 22

The gene expression of NF- κ B p65 subunit (RelA), interleukin-12b (IL-12b), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon-gamma (INF- γ) were quantified by RT-real-time PCR on 12-week tissue samples and results expressed as "many fold" with respect to control healthy nontransplanted kidneys (see Figure S1A). t-Test, ^a $P < 0.05$ vs NoHGF.

RelA expression was 1.6 fold-reduced by HGF electrotransfer. The assessed proinflammatory cytokines were over-expressed in all kidney allografts but this expression was 2–3-fold reduced in treated kidneys.

Table 3 | Regeneration vs fibrosis

	NoHGF		IniHGF 24 weeks	DelHGF	
	12 weeks	24 weeks		12 weeks	24 weeks
<i>mRNA (fold/normal)</i>					
PCNA	0.40 \pm 0.10			1.14 \pm 0.25 ^a	
c-Met	0.33 \pm 0.14			0.72 \pm 0.14	
HGF	0.01 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.27 \pm 0.07 ^b
TGF- β	6.67 \pm 2.79	9.43 \pm 2.84	9.77 \pm 3.33	0.85 \pm 0.61 ^a	5.92 \pm 1.10
HGF/TGF- β	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	2.32 \pm 2.27 ^a	0.14 \pm 0.08
<i>Protein (ng/mg Protein)</i>					
HGF	1.50 \pm 0.20	1.61 \pm 0.19	1.20 \pm 0.17	2.19 \pm 0.5	2.13 \pm 0.27 ^c

Rat PCNA (proliferation cellular nuclear antigen), c-Met (HGF-receptor), HGF and TGF- β mRNA expression was quantified by reverse transcription-real-time polymerase chain reaction on 12-week tissue samples. HGF and TGF- β were also quantified at 24 weeks. Rat HGF protein was measured by ELISA on tissue samples.

ANOVA, ^aat 12 weeks $P < 0.05$ vs NoHGF; ^bat 24 weeks $P < 0.05$ vs NoHGF; ^cat 24 weeks $P < 0.05$ vs IniHGF.

The expression of the profibrotic factor TGF- β was reduced early after HGF treatment, at 12 weeks, resulting in an increase of HGF/TGF- β , suggestive of regeneration. This is confirmed by the PCNA expression, a cell proliferation marker, which was significantly increased in HGF-treated animals.

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HGF, hepatocyte growth factor; TGF- β , transforming growth factor.

At 12 weeks, hHGF gene electrotransfer reduced transforming growth factor- β (TGF- β) expression while slightly increased rHGF, all resulting in a greater HGF/TGF- β ratio (Table 3). At this moment, glomerulosclerosis and CTGF-positive cells in tubuli or in glomeruli did not differ between treated and nontreated kidneys (Table 1b), which indicates that at 12 weeks extracellular matrix deposition was moderate and it was not modified by HGF treatment. In contrast, at 24 weeks, TGF- β expression (Table 3) was reduced in DelHGF kidneys and CTGF deposition was observed only in NoHGF grafts (Table 1b, Figure 4). In addition, α -SMA deposition was already manifested at 12 weeks in nontreated kidneys and, importantly, HGF treatment clearly reduced the number of α -SMA-positive cells both at 12 and 24 weeks (Figure 4). Besides this clear difference in fibrotic markers, there also exists difference with respect to regeneration at 12 weeks. The PCNA gene expression was reduced in the NoHGF group whereas it was significantly increased in HGF-treated kidneys (Table 3).

DISCUSSION

We have shown that treatment with HGF modifies the natural outcome of chronic allograft nephropathy. One of the contributions of the present study is the innovative nonviral intramuscular gene electrotransfer used rather than the classical HGF protein supplement.²⁹ Gene therapy appears to be the alternative to avert the half-life handicap of protein HGF.³⁰ One single intervention with our gene therapy approach allows high human HGF plasma levels up to 14 days²² and increases endogenous rat HGF plasma and tissue levels.²⁵ The normal creatinine kinase levels of our electro-pored rats ruled out the possibility of muscle damage indicating the safety of the *in vivo* electroporation.

As a physiological mediator of tissue repair, endogenous HGF increases after ischemic insult or acute rejection³¹ and decreases in chronic processes.^{1,32} In our CAN model, the highest rat HGF plasma levels were found early after transplantation, when the kidneys were still under the late effects of acute ischemic-induced inflammatory processes. A rapid decrease in plasma HGF was observed as renal

damage became apparent and, at 24 weeks, endogenous HGF gene expression fell below normal values. The decrease in HGF is closely related to the destruction of tubular epithelial cells,³³ so the chronic renal fibrosis and tubular atrophy observed may, in part, account for the decrease in HGF. Thus, the rationale of HGF supplementation to exert a therapeutic action in CAN is justified.

The other novelty is the treatment delivery following two distinct timing schedules, before transplantation for early post-transplant cytoprotection of tubular cells during ischemic injury, and delayed delivery for the prevention of chronic mechanisms. The natural course of human CAN begin as early as a few weeks after transplantation.³⁴ Clinical protocol biopsies at 4 months have detected a significant number of stable allografts that histologically have characteristic features of CAN.³⁵ As protocol biopsies allow the recognition of early affected kidneys, they offer the possibility to initiate early treatment. We did not attempt to turn back advanced CAN because the treatment of established nephropathies with severe renal insufficiency, proteinuria, and scarring is rarely successful. Instead, we applied preventive treatment in an attempt to find a therapy with potential clinical benefits.

The profile of cytokine expression in experimental CAN has been well described.^{36,37} After the initial inflammatory burst, a relative period of quiescence occurs. Thereafter a progressive macrophage infiltration between 12 and 16 weeks reappears with macrophage-associated products such as TNF- α and INF- γ . Simultaneously, functional and structural chronic changes begin to manifest.³⁷ When we performed HGF gene electrotransfer just before transplant, we aimed to diminish ischemia-reperfusion mechanisms and, effectively, late renal protection was achieved. Some studies report the potential mechanisms of early beneficial effect of HGF on ischemic injury. Nakamura *et al.*⁸ and Jayasankar *et al.*⁹ demonstrated the cardioprotective effect of HGF by reducing ischemia-induced angiogenesis and apoptosis. Arthur *et al.*⁵ showed that HGF reduced microscopic bowel inflammation, which indicates that the beneficial effect of HGF is attributable to a direct anti-inflammatory action. We have previously shown in a model of renal warm ischemia that HGF gene therapy prevents the early postischemic damage by reducing apoptosis and inflammation and by fostering regenerative processes at 1 week.²³ Here, we show that the treatment of initial ischemia-reperfusion injury with HGF electrotransfer also offers late benefits on CAN.

Like initial treatment, delayed hHGF electrotransfer effectively attenuated the development of CAN because in addition to reduced mortality and better renal function, chronic renal damage was notably diminished at 24 weeks. Interestingly, glomerulosclerosis, tubular atrophy, and interstitial infiltrate did not differ between 24 and 12 weeks, just after gene therapy, indicating that renal scarring had already been arrested at 12 weeks by HGF-delayed treatment. The exact mechanism by which this delayed HGF administration counteracts the progression of CAN is a matter of

discussion. In concordance with current data, here we abrogate for two nonexcluding hypotheses. On the one hand, through the proregenerative effects of HGF, which acts in a reciprocal manner to TGF- β , which favors the fibrotic mechanisms,^{1-4,38} and, on the other, through its beneficial effects on inflammatory injury.^{5-10,23}

As early as 12 weeks, TGF- β , α -SMA, and tubular CTGF were already enhanced in nontreated kidneys but no glomerulosclerosis or vasculopathy were observed. Delayed hHGF electrotransfer clearly decreased TGF- β , increased HGF/TGF- β ratio and PCNA expression indicating that cell regeneration has been activated. Simultaneously, the number of transforming cells expressing α -SMA as well as CTGF was reduced. Interestingly, this reduction was still present at 24 weeks. Transformation to α -SMA+ cells from tubular cells is believed to be a central event in the progression of chronic renal fibrosis⁸ as myofibroblast activation is a predictor of renal disease progression. Therefore, it is reasonable to conjecture that HGF preserved the tubular epithelial cell phenotype by blocking epithelial-to-mesenchymal transition. In addition to tubulo-interstitial fibrosis, glomerular CTGF was also enhanced at 12 weeks in NoHGF kidneys, with a further increase at 24 weeks in parallel to glomerulosclerosis. Again, we found a consistent therapeutic effect of HGF because a downregulation of glomerular CTGF and subsequent extracellular matrix deposition in glomeruli had occurred, as reported in diabetic nephropathy.²⁵

In addition to the antifibrotic effect, a novel action has been attributed to HGF, the amelioration of renal interstitial inflammation.⁶ Our results show that, at 12 weeks, delayed HGF treatment inhibited inflammatory cell infiltration, reducing macrophages, CD3+, B- and T-cell lymphocytes, and their related cytokines IL12, TNF- α , and IFN- γ . Other authors^{6,7} have reported this anti-inflammatory effects showing that HGF directly suppresses proinflammatory cytokine expression via NF- κ B in tubular epithelial cells. Our results also indicate that HGF reduces NF- κ B activation as it hindered its overexpression and its translocation to the nuclei in tubular epithelial cells of treated kidneys. Mononuclear cells are crucial sources of profibrotic molecules, products that may alter the function of contractile mesangial cells in the glomeruli, thereby causing the overproduction of the mesangial matrix³⁷ and also activating interstitial resident fibroblasts, thus promoting epithelial-to-mesenchymal transition leading to renal scarring. Blockade of this cell infiltration in the DelHGF group effectively controlled later profibrotic mechanisms and these animals showed less glomerulosclerosis and interstitial fibrosis, thereby resulting in the attenuation of CAN. Despite the spontaneous reduction of cell infiltration at 24 weeks, renal damage progressed in NoHGF kidneys, indicating that the beneficial effects of HGF also reside in the blockade of profibrotic inflammatory-induced mechanisms.

In conclusion, here we show that HGF gene therapy is consistently effective in the prevention of renal allograft fibrosis. It could be said that this is especially true when

administration is delayed until the onset of fibrogenic mechanisms. Someone can argue that the difference could be derived from two HGF courses vs one. However, the rationale of the study was to cover two phenomena that differ in time and in duration: one initial usually brief period, and a later, longer, and undefined one. This amelioration is related, at least in part, to the reduction of profibrotic inflammatory processes. The opportunity offered by accurate clinical follow-up or protocol biopsies to identify patients who present incipient features of CAN allows a more personalized treatment of this chronic kidney disease. Thus, the delayed safety gene electrotransfer used here should be clinically more applicable than a systematic pretransplant approach.

MATERIALS AND METHODS

Animals and renal transplantation

For renal transplantation, inbred male Lewis rats received a kidney from Fischer rats (250 g BW, Charles River by Harlan UK Limited, Bicester, UK) as previously described.²⁶ Kidneys were preserved for 2.5 h in EuroCollins at 4°C. Animals received a single daily dose of 5 mg/kg cyclosporine (Sandimmun Neoral, Novartis, Spain) by oral gavage for 15 days. On day 7, right native nephrectomy was performed. All the procedures and housing conditions were in accordance with the Guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals and Good Laboratory Practice.

Gene therapy

The HGF expression vector was constructed as previously described.²² Rats were anesthetized and plasmid was injected in SP1017 vehicle (200 μ l/leg) into the tibialis anterior muscle as previously described.^{22,25} As controls, NoHGF rats were injected with an inactive plasmid in SP1017 vehicle (200 μ l/leg). Afterward, an electrical field was applied to the area around the injection.^{22,23,25} Eight pulses (20 ms, 2 Hz) were delivered at 175 V/cm. Using this methodology, human HGF plasma levels arose for 12 days (460 pg/ml day 6; 90 pg/ml day 11) and were overexpressed in renal tissue up to 15 days after electroporation.²²

Sham or therapeutic interventions were performed in a single course, 3 or 4 days before kidney transplantation in initial treatment or two courses in the delayed treatment group, at 8 and 10 weeks after transplantation.

Plasma creatinine kinase levels (creatinine kinase = 81.1 ± 13.5 U/l) measured in 10 rats randomly selected from all groups were found among the normal range (22–198 U/l).

Study design and follow-up

Before transplantation and then monthly until the end of the study at 24 weeks, rats were weighed and placed in metabolic cages for 24 h urine and tail-vein-blood collection. Urine and serum creatinine (μ mol/l) were determined by Jaffe's reaction (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA), creatinine clearance (μ l/min) by standard formula, and proteinuria (mg/24 h) by Ponceau's method (Bayer Diagnostics). At the end of the study, the grafted kidney was processed for histological and molecular studies.

Rats were divided into three groups: NoHGF: control group of kidney transplant injected with an inactive plasmid ($n = 26$); IniHGF: an initial single course of HGF gene therapy delivered 3–4 days before transplantation ($n = 16$); and DelHGF: two delayed courses of HGF gene therapy delivered on weeks 8 and 10 post-

transplantation ($n = 16$). Additional animals ($n = 8$) included in the nontreated group were killed at 8 weeks to assess the histological progression of CAN. One month after gene therapy (3 months post-transplantation), some animals from the NoHGF and DelHGF groups ($n = 4$, each group) were killed to further study the early mechanisms involved. The high number of animals included in the NoHGF group corresponded to the elevated post-transplant mortality.

Histology

Tissue sections (3–4 μ m) were stained with hematoxylin and eosin and periodic acid Schiff methods. A pathologist, blind to the treatment groups, examined all sections for glomerular, vascular, and tubulo-interstitial lesions. For glomerulosclerosis quantification (%), the global sclerosed glomeruli of each kidney section were counted and divided by the total number. Tubular atrophy, interstitial cell infiltration, interstitial fibrosis, and vasculopathy were graded following a semiquantitative scale from 0 to +3 (0 denoted no abnormalities; +1, less than 1/3; +2, between 1/3 and 2/3; +3, more than 2/3 of the sample). A total tubulo-interstitial score was obtained by the addition of the three individual tubulo-interstitial parameters.

Immunohistochemistry

Representative tissue sections were immunostained using the immunoperoxidase technique. As primary antibodies, we used monoclonal mouse anti-rat CD45RC for T/B cells (Serotec), CD3 for T cells (Serotec, Bionova científica, Spain), ED1 for monocyte/macrophage (Oxford Biomarketing, Kidlington, UK), MS-113 for α -SMA (NeoMarkers, Lab Vision Ltd, UK), a rabbit polyclonal-IgG for CTGF (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), and rabbit polyclonal anti-NF- κ B p65 subunit (Abcam plc, Cambridge, UK). Horse anti-rabbit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and anti-mouse (Pierce Biotechnology Inc., Caltex SL, Madrid, Spain) IgG were used as secondary antibodies. Samples were revealed with ABC-DAB and counterstained with hematoxylin. No primary antibodies were used for negative controls.

Positive CD45RC, CD3, and ED1 cells infiltrating kidneys, α -SMA+ interstitial cells, and CTGF+ cells in glomeruli were counted and expressed as mean \pm s.e.m. of cells per field of view or per glomerulus (cells/FV or cells/glom at $\times 400$ magnification, ≥ 20 counted fields or glomeruli per kidney). Tubuli CTGF staining was semiquantitatively scored from 0 to +4. Positive staining of NF- κ B p65 was assessed in the cytoplasm and nucleus of tubular epithelial cells.

Determination of human and rat HGF protein levels

Human plasma HGF was measured using a commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) as previously described.²⁵ Rat HGF was determined by a commercially available ELISA kit (Institute of Immunology, Japan) in plasma samples (ng/ml) and renal tissue extracts (ng/mg prot) as previously described.^{23,25} Total protein concentration was measured by Bradford's method (BioRad Laboratories GmbH, München, Germany). The rat HGF antibody does not cross-react with human HGF.³⁹

Quantification of renal rat gene expression by reverse transcription-real-time-polymerase chain reaction

Total RNA extraction and reverse transcription was performed as previously described.²⁶ Tissue cDNA HGF was amplified and

Table 4 | Rat hepatocyte growth factor (HGF) primers and probe

Oligonucleotide	Fluor. reporter and quencher dyes	Sequence
Forward primer	FAM	5'-AGGCTCAGATTGGTTTT ACTGAAG-3'
Reverse primer	FAM	5'-AGCCGTAATACTGCAAGT AGTCTTTT-3'
MGB probe	TAMRA	5'-TGCTCGCCCTGCAATC CTGGAT-3'

The primers and probe to detect the target sequence of rat HGF were previously designed with the Primer Express™ software on the Gene Bank sequence X54400, and afterwards their concentrations were optimized following the manufacturer's instructions. For rat HGF, 1 µl of each cDNA sample was mixed in a total volume of 25 µl to reach a final concentration of 900 nM for both forward and reverse primers and 200 nM for the probe.

quantified by RT-real time-PCR (ABI Prism® 7700, Applied Biosystems) using the comparative C_T method.³⁰ The primers and probe (Table 4) to detect the target sequence of rat HGF were designed and optimized following the manufacturer's instructions.⁴⁰ The PDAR (predeveloped TaqMan assay reagents) methodology⁴¹ was used for rat PCNA, c-met, TGF-β, TNF-α, INF-γ, IL-12b, RelA, and 18S polymerase chain reactions starting from 1 µl of each cDNA sample. Pooled values of healthy nontransplanted kidneys were used as the reference value. Results were expressed as 'many fold of the unknown sample' with respect to the reference value (arbitrary units). No polymerase chain reaction products were detected using reverse-transcribed negative controls as template.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the StatView®5 program (SAS Institute Inc., Barcelona, Spain). Survival was analyzed using the Kaplan-Meier and log-rank methods. Quantitative data were compared using analysis of variance – Scheffe's test for more than two groups and *t*-test for two groups. To compare groups for proteinuria, serum creatinine, and creatinine clearance throughout the follow-up, variables were compacted (*cv* = compacted variable) and compared with analysis of variance. For histological data, Kruskal-Wallis and Conover's tests were used. For NF-κB staining evaluation, a contingency table was constructed and compared with χ^2 test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are presented as mean ± s.e.m.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by ISCIII/FIS (PI01/3071, PI03/0082) and SEN 2002. Immaculada Herrero-Fresneda is a researcher from FIS (PI01/3071). Marcel-la Franquesa and Núria Lloberas have grant fellowships from IDIBELL and 'Red de Transplantes', respectively. We thank Núria Bolaños for technical support and Miguel Viribay for assistance with primer design and optimization.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Quantification of RelA expression on renal samples at 1 week (A) and rat HGF plasma levels in normal rats (B).

REFERENCES

- Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001; **59**: 2023–2038.
- Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 68–78.
- Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 96–107.
- Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999; **250**: 273–283.
- Arthur LG, Schwartz M, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Surg* 2004; **39**: 139–143.
- Gong R, Rifai A, Tolbert EM et al. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2868–2881.
- Min JK, Lee YM, Kim JH et al. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-κB pathway. *Cir Res* 2005; **96**: 96300–96307.
- Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 2000; **106**: 1511–1519.
- Jayasankar V, Woo J, Bish LT et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor attenuates postinfarction heart failure. *Circulation* 2003; **108**(Suppl II): II-230–II-236.
- Date I, Takagi N, Takagi K et al. Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 1152–1158.
- Kawada K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 4357–4361.
- Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol* 1994; **266**(1 Part 2): F129–F134.
- Fiaschi-Taesch NM, Santos S, Reddy V et al. Prevention of acute ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: the efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 112–125.
- Nagano T, Mori-Kudo I, Tsuchida A et al. Ameliorative effect of hepatocyte growth factor on glycerol-induced acute renal failure with acute tubular necrosis. *Nephron* 2002; **91**: 730–738.
- Morishita R, Aoki M, Hashiya N et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 2004; **44**: 203–209.
- Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; **10**: 585–589.
- Mir LM, Glass LF, Sersa G et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; **77**: 2336–2342.
- Rodríguez-Cuevas S, Barroso-Bravo S, Almanza-Estrada J et al. Electrochemotherapy in primary and metastatic skin tumors: phase II trial using intralesional bleomycin. *Arch Med Res* 2001; **32**: 273–276.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4262–4267.
- Wang XD, Liu J, Yang JC et al. Mice body weight gain is prevented after naked human leptin cDNA transfer into skeletal muscle by electroporation. *J Gene Med* 2003; **5**: 966–976.
- Tupin E, Poirier B, Bureau MF et al. Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by *in vivo* electroporation. *Gene Therapy* 2003; **10**: 569–579.
- Riera M, Chillón M, Aran JM et al. Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med* 2004; **6**: 111–118.
- Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I et al. Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure. *Gene Therapy* 2005; **12**: 1551–1558.
- André F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy* 2004; **11**: 533–542.
- Cruzado JM, Lloberas N, Torras J et al. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004; **53**: 1119–1127.
- Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM et al. Do alloreactivity and cold ischemia cause different elementary lesions on chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; **162**: 127–137.

27. Herrero-Fresneda I, Torras J, Vidal A *et al.* Reduction of post-ischemic immune-inflammatory response: an effective strategy to attenuate chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; **79**: 165–173.
28. Baan C, Van Gelder T, Peeters A *et al.* Living kidney donors and hypoxia-inducible factor 1- α . *Transplantation* 2002; **75**: 570–571.
29. Azuma H, Takahara S, Matsumoto K *et al.* Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1280–1292.
30. Liu ML, Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver. *Am J Pathol* 1994; **144**: 129–140.
31. Laping NJ. Hepatocyte growth factor in renal disease: cause or cure? *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 371–377.
32. Libetta C, Rampino T, Esposito C *et al.* Stimulation of hepatocyte growth factor in human acute renal failure. *Nephron* 1998; **80**: 41–45.
33. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T *et al.* Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000; **57**: 937–948.
34. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2326–2333.
35. Seron D, Moreso F, Bover J *et al.* Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; **51**: 310–316.
36. Azuma H, Nadeau K, Takada M *et al.* Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; **64**: 190–197.
37. Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8729–8733.
38. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F7–F16.
39. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H *et al.* Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; **5**: 226–230.
40. User Bulletin 2 ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems, Quantitative Assay Design and Optimization.
41. User Bulletin 2 ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantification of Gene Expression.

ARTICLE 3

**Tubular epithelial cell overexpressing
hHGF counteracts MCP-1 up-regulation
after hypoxia/reoxygenation.**

Franquesa M, Riera M, Herrero-Fresneda I, Sola A, Hotter G, Lloberas N, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM.

Transplantation Proceedings (2009) Jul-Aug;41(6):2069-72

Article 3 Tubular epithelial cell overexpressing hHGF counteracts MCP-1 up-regulation after hypoxia/reoxygenation. Transplantation Proceedings (2009)

Objectiu

L'objectiu d'aquest tercer treball és analitzar el paper de la cèl·lula tubular epitelial en la creació de l'entorn inflamatori en la isquèmia/reperfusió, així com també el paper de l'HGF en aquest ambient i en la cèl·lula tubular especialment. Per assolir aquest objectiu s'ha dissecat l'efecte de la isquèmia aplicant un ambient hipòxic a la cèl·lula tubular en cultiu *in vitro*, i la seva posterior reoxigenació. La cèl·lula tubular usada és la línia cel·lular de rata NRK52E sotmesa a transfecció estable d'hHGF.

RESULTATS

En aquest treball es mostren els resultats preliminars de l'efecte protector d'HGF en un model *in vitro* de cèl·lula tubular renal sotmesa a hipòxia.

Les cèl·lules tubulars transfectades amb HGF expressen nivells sostinguts d'HGF significativament més elevats que les cèl·lules no transfectades.

Quan aquestes cèl·lules són sotmeses a una atmòsfera amb una reduïda pressió parcial d'oxigen i retornades subsegüentment a normòxia (emulant el procés *in vivo* d'I/R) la quimiocina inflamatòria MCP-1 es veu sobrerregulada significativament tant a nivell gènic com proteic. Quan aquestes cèl·lules sobreexpressen HGF canvien el seu mecanisme proinflamatori i deixen de produir MCP-1.



Tubular Epithelial Cells Transfected With hHGF Counteracts Monocyte Chemotactic Protein-1 Up-regulation After Hypoxia/Reoxygenation Insult

M. Franquesa, M. Riera, I. Herrero-Fresneda, A. Sola, G. Hotter, N. Lloberas, J.M. Cruzado, J. Torras, and J.M. Grinyó

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) which is mainly produced by nephrotoxic or ischemic insults is correlated with a high mortality and morbidity. Proximal tubular epithelial cells (PTEC) play a major role. They are the main target of ischemia/reperfusion injury. PTECs have also been proposed as the effectors of AKI reversibility, but also as the creator of the inflammatory milieu: cytokine, chemokine, and complement expression. An important chemokine implicated in this process is monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) due to its ability to recruit and activate monocytes. Hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic factor with mitogenic, anti-apoptotic, and proliferative effects which has recently been studied for its anti-inflammatory and antifibrogenic effects. Our aim was to evaluate the potential inflammatory effect of hypoxia and reoxygenation on rat PTECs. We created a stable human HGF (hHGF) expressing PTEC line that emulated *in vivo* transfection and analyzed the role of this cell type in the induction and reversibility of AKI. Our results showed the efficiency of transfection with the hHGF gene to promote sustained expression of the protein in the medium (7627.13 ± 1144.078 to 8211.3 ± 795.37 pg/mL). When rat PTECs were under a hypoxia/reoxygenation insult, MCP-1 was highly overexpressed (4479.3 ± 154.3 pg/mL of protein and 5.099 ± 1.23 times control gene expression). Transfected cells abrogated this effect (288.7 ± 13.5 pg/mL and 1.169 ± 0.0759 times control). In conclusion, we observed that the hypoxia/reoxygenation insult stimulated MCP-1 protein secretion in PTECs and that PTECs which were stably transfected and overexpressing hHGF abrogated the inflammatory reaction mediated by hypoxia/reoxygenation, being a suitable model for later studies.

PROXIMAL TUBULAR epithelial cells (PTEC) are known to play a major role as the main target of renal ischemia/reperfusion injury.¹ They have also been proposed as the effectors of the reversibility of acute kidney injury (AKI). In contrast, studies have shown that ischemia/reperfusion injury is an inflammatory disease, wherein PTECs play a major role to create the inflammatory milieu: cytokine, chemokine, and complement expression.^{2,3}

Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) is a small cytokine belonging to the CC family that is also named monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). MCP-1 recruits monocytes, memory T cells, and dendritic cells to sites of tissue injury and infection. It is also known that MCP-1 deficiency reduces tubular macrophage infiltration and tubular injury.⁴ The effect of hypoxia on MCP-1 expression is

still controversial and depends on the cell type. While MCP-1 expression is down-regulated in macrophages⁵ and human PTECs⁶ under hypoxic conditions, it appears to be up-regulated in human dermal fibroblasts.⁷

From the Experimental Nephrology (M.F., I.H.-F., N.L., J.M.C., J.T., J.M.G.), Hospital Universitari de Bellvitge-UB-IDIBELL, Barcelona, Spain; Experimental Nephrology (M.R.), Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain; and Experimental Pathology (A.S., G.H.), IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

This work was supported by FIS06/0230, and European project Proligen-2006-036813 (STREP) and Fundación Senefro 2007. M. Franquesa is contracted by Proligen funding.

Address reprint requests to M. Franquesa, Lab 4122 Experimental Nephrology, 4^aPl. Pav. Govern, Campus de Bellvitge, 08907, L'Hospitalet, Barcelona, Spain. E-mail: mfranquesa@ub.edu

Table 1. Clone 3 Was Selected as the Most Efficient Transfection With the Highest Expression

	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 7	Clone 2/1
NRK52E	25.57	6112.80	276.14	22.73	107.95

Data are expressed in pg/mL.

Hepatocyte growth factor (HGF) is a pleiotropic factor with mitogenic, anti-apoptotic, and proliferative effects which has recently been studied for its anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects.^{8,9} Once we probed the efficiency of *in vivo* and *in vitro* gene therapy with human HGF (hHGF) plasmid,¹⁰ we observed that the main target of the therapy *in vivo* was the tubular epithelial cell.¹¹ Therefore, to investigate the role of PTEC in the inflammatory milieu after an ischemic insult and the possible therapeutic effects of HGF overexpression in this cell line, we created an *in vitro* model of PTEC constitutively overexpressing hHGF to observe the effects of hypoxia and reoxygenation on the expression of inflammatory cytokines.

MATERIALS AND METHODS

Stable Transfection and Clone Selection

Rat PTECs (NRK52E from ECACC) cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), 2 mmol/L glutamine, and 1% nonessential amino acids (Gibco, Invitrogen Corp, Paisley, UK) were transfected with 10 µg of pCMV/hHGF plasmid¹⁰ with Superfect transfection reagent (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Cells plated in 100 mm² cell culture dishes were subjected to G418 (Sigma, Poole, UK) selection (800 µg/mL) for 14 days. G418-resistant clones were isolated by ring cloning.

Cell Culture Maintenance and Hypoxia Induction

Selected high-expression clones were maintained with periodic G418 addition to the media (600 µg/mL). Plates at 80% confluency were placed in a controlled oxygen atmosphere incubator (BINDER) exposing cells to hypoxia (H): 0.5% O₂ and 5% CO₂ for 7 or 18 hours. Some groups were subjected to hypoxia followed by a reoxygenation period (H/R) when cells returned to a normoxic incubator (5% CO₂ and atmospheric pO₂) for 7 hours. At each assay time, snap-frozen supernates were kept at -80°C until protein determinations, or further cell processing for gene expression assays.

Gene Expression Assay

RNA was extracted by adding 0.5 mL of TriZol reagent (Invitrogen) to each well, recovered in a polypropylene tube and purified with PureLink Micro-to-Midi RNA Purification Kit (Invitrogen). Retrotranscription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) starting with 500 ng of total RNA. Taqman technology (Applied Biosystems) quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze gene expression of rat MCP-1 (Rn00580555_ml) and eukaryotic 18S

rRNA (4319413E); the results were further processed using the comparative Ct (Threshold Cycle) method.

hHGF Protein Levels in Culture Media

hHGF protein levels were assayed with an ELISA kit (Quantikine Kit, Research & Diagnostics Systems, Minneapolis, Minn, United States).

MCP-1 Protein Levels in Culture Media by FACS Analysis

MCP-1 levels in the culture media were analyzed with a fluorescent bead immunoassay for quantitative detection by flow cytometry (Bender Medsystems). This assay is based on fluorescent microbeads coated with monoclonal antibody specifically reacting with rat MCP-1. Primary biotin-conjugated antibody was added followed by Streptavidin phycoerythrin (PE) which binds biotin to emit fluorescent signal. Quantification was based on extrapolation of standard curve analysis.

Statistical Analysis

The StatView 5 program (SAS Institute Inc) was used for statistical analysis. Quantitative data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffe test. All *P* values were 2-tailed, with *P* < .05 considered to be significant.

RESULTS

HGF Is Stably Up-regulated at All Times in Transfected Cells

Cell culture supernatant was analyzed for hHGF protein expression in transfected and nontransfected cells. Clone 3 was chosen as the one with the highest expression to be used for the experiments (Table 1). Transfected cells secreted 5495 to 9890.2 pg/mL of hHGF in 24-hour cell culture, while nontransfected cells did not produce this protein. The amount of secreted hHGF in transfected cells was not different when the cells were exposed to a hypoxic insult or upon subsequent reoxygenation (Table 2).

H/R Induced Inflammatory Cytokine MCP-1

To test the potential inflammatory effects of H/R, PTECs underwent hypoxia followed by 7 hours of reoxygenation. MCP-1 protein excreted to the medium, as quantified by flow cytometry, was observed to be reduced after the hypoxic insult, although there was an increase when normoxia was restored. Cells overexpressing hHGF abrogated MCP-1 secretion into the medium at all times (Fig 1A). To further analyze whether the up- or down-regulation of protein secretion was a transcriptional or posttranscriptional regulation, we assessed MCP-1 gene expression. In the

Table 2. Transfected Cells Expressed Stable Levels of hHGF Before and After Hypoxia and H/R Insults

	Control	Hypoxia	H/R
NRK-hHGF	8211.3 ± 795.37	7627.13 ± 1144.078	7637.5 ± 635.8

Data are expressed in pg/mL.

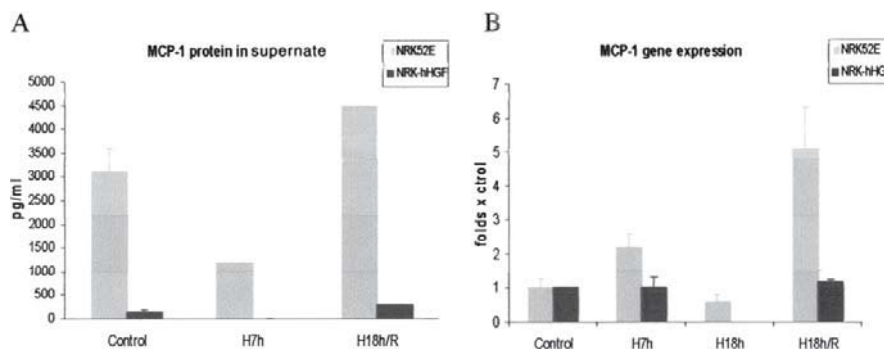


Fig 1. (A) MCP-1 protein levels in supernate decreased in PTEC after hypoxia ($P = .0003$, Control vs H7h), increased after H/R ($P = .055$, Control vs H18h/R), and hHGF overexpression abrogated this increment ($P < .0001$, NRK52E vs NRK-hHGF). (B) MCP-1 gene expression was increased after H/R ($P < .001$, vs Control), and hHGF completely suppressed the induction of this expression ($P \leq .01$, vs NRK52E H7h and H18h/R).

wild-type PTECs, gene expression was increased after 7 hours of hypoxia, but returned to basal values after 18 hours of hypoxic injury. After 7 hours of reoxygenation in 18 hour hypoxic cells, MCP-1 gene expression was highly increased (Fig 1B). In hHGF-transfected PTECs MCP-1 gene expression was also abrogated.

DISCUSSION

This study posed 2 main questions. On the one hand, we wanted to test whether the hypoxic insult itself promoted the generation of the inflammatory mediator MCP-1. On the other hand, we sought to create an in vitro model of hHGF-transfected PTECs that simulated the situation created by in vivo gene therapy and to analyze the mechanisms involved in its protective effect.

Our results showed induction of a proinflammatory chemokine as MCP-1 was up-regulated in PTECs after a hypoxic insult only when the injured cells returned to a normoxic environment. PTECs constitutively secreted MCP-1 as Gerritsma et al¹² had shown in human PTECs. We observed that it was not the hypoxic insult that triggered this protein secretion but the reoxygenation.

We analyzed the cytokine gene expression to assess the regulation level. After 7 hours of hypoxia, MCP-1 transcription was slightly up-regulated and decreased when the hypoxic insult was sustained for 18 hours. This result led us to consider transcriptional regulation, and furthermore to observe how increased protein secretion was regulated by restoration of normoxic conditions and to a sustained hypoxic injury. We demonstrated that hHGF overexpression was also effective at the transcriptional level abrogating gene expression of MCP-1 at all times.

This therapeutic effect was consistent with HGF suppression of nuclear factor kappa B (NF κ B) activation.^{8,13} NF κ B plays a key role in the development of inflammation and MCP-1 expression, although at these times we did not

observe significant up- or down-regulation of RelA (p65 NF κ B subunit) gene expression (data not shown).

This is an interesting model due to its potential use for study of the mechanisms involved in the induction of inflammatory mediators after H/R insults. Furthermore, the transfected cells allow us to study the mechanisms underlying the protective effects of HGF in ischemic kidney disease. This work demonstrated an important anti-inflammatory action of HGF to down-regulate MCP-1 expression.

ACKNOWLEDGMENT

We thank M. Angeles Muñoz for the technical support.

REFERENCES

- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *N Engl J Med* 334:1448, 1996
- Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 66:479, 2004
- Thurman JM: Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol* 123:7, 2007
- Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest* 103:73, 1999
- Bosco MC, Puppo M, Pastorino S, et al: Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 induction by macrophages. *J Immunol* 172:1681, 2004
- Li X, Kimura H, Hirota K, et al: Hypoxia reduces constitutive and TNF- α -induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human proximal renal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1026, 2005
- Galindo M, Santiago B, Alcami J, et al: Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL8 in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 123:36, 2005
- Herrero-Fresneda I, Torras J, Franquesa M, et al: HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms. *Kidney Int* 70:265, 2006

9. Cruzado JM, Lloberas N, Torras J, et al: Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 53:1119, 2004
10. Riera M, Chillon M, Aran JM, et al: Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med* 6:111, 2004
11. Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I, et al: Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure. *Gene Ther* 12:1551, 2005
12. Gerritsma JS, van Kooten C, Gerritsen AF, et al: Transforming growth factor-beta 1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 53:609, 1998
13. Gong R, Rifai A, Tolbert EM, et al: Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 15: 2868, 2004

V. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

El conjunt de resultats mostrats en aquests tres treballs intenten traçar una línia per unir tres blocs. Per una banda l'efecte de la sobreexpressió d'HGF en la prevenció i/o regressió del dany i per l'altra lligar els conceptes de dany crònic i dany agut amb la hipòxia cel·lular com a promotora d'aquest procés. Per últim introduir la teràpia gènica no-viral *in vivo* com a arma terapèutica amb una possible aplicació a la clínica.

La teràpia gènica té com a objectiu promoure la sobreexpressió d'una proteïna de forma sostinguda durant el màxim temps possible i així disminuir el règim d'administració del fàrmac o proteïna (sobretot en aquelles proteïnes amb una curta vida mitja com és el cas de l'HGF). En aquest sentit l'electroporació *in vivo* ofereix avantatges respecte altres metodologies (vectors virals, DNA nuu, ODNs) quant a la seva no-oncogenicitat, no-citotoxicitat, no-immunogencitat i una elevada eficiència en producció proteica a més de l'oportunitat d'usar directament l'òrgan diana.

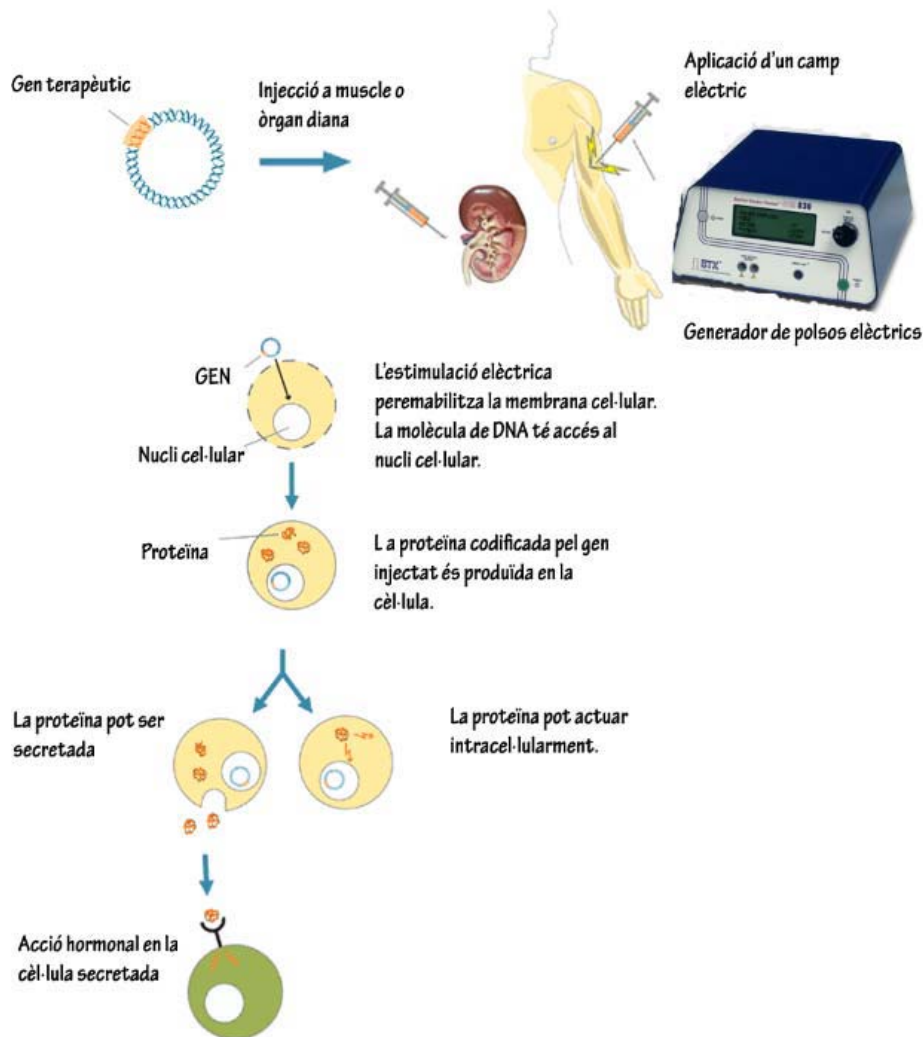
Tot i que recentment s'ha publicat que el transportador no-iònic SP1017 podria augmentar la immunogenicitat d'aquesta teràpia produint un augment d'IL12 per part de les cèl·lules dendrítiques²¹⁹, també està demostrat com la combinació de l'electroporació amb el transportador SP1017 ofereix un augment de l'eficiència de transfecció²¹⁸. S'ha observat com la inflamació generada per l'activació de la immunitat innata que es

genera a l'injectar DNA plasmídic, degut als residus CpG no metilats, es veu incrementada quan aquest DNA és complexat amb liposomes (transportadors catiónics). Zhou et al.²²⁰ mostren com l'activació de la immunitat innata (mesurada mitjançant nivells de TLR9 i IL-8) que s'afavoreix quan s'injecta DNA complexat amb liposomes o polímers es redueix de forma significativa quan la transferència gènica es realitza per electroporació. El DNA nuu no activa la immunitat perquè és introduït a la cèl·lula en petita quantitat, mentre el DNA lipoplexat sí. Això indicaria la necessitat d'endocitosis del DNA per causar la reacció inflamatòria. Per contra, la generació d'un camp elèctric obre porus cel·lulars que eviten l'endocitosis permetent l'entrada directa del DNA al nucli. A més a més, els polioxàmers i polímers no iònics ajuden a la millor i més ràpida recuperació de les cèl·lules a la normalitat després d'haver estat sotmeses a un camp elèctric²¹³.

Una de les contribucions d'aquests estudis és l'electrotransferència gènica intramuscular (no-viral) utilitzada com a alternativa a l'administració clàssica de suplement proteic d'HGF. La teràpia gènica s'ofereix com una alternativa ideal per evitar la curta vida mitja de la proteïna HGF. Una sola intervenció amb la teràpia gènica permet obtenir elevats nivells d'HGF humà circulants fins a 14 dies i incrementa els nivells plasmàtics i tissulars d'HGF de rata. El risc de l'electroporació *in vivo* i el possible dany muscular s'han descartat mitjançant la mesura de nivells de creatinina quinasa²¹⁸.

Per altra banda, l'electroporació directa a l'òrgan diana és una realitat factible i provada en diferents patologies^{221, 222, 223, 224} i ofereix una possibilitat de tractament més selectiva. Disminuïm la circulació sistèmica de la proteïna/tractament i convertim, a més a més, el receptor de la teràpia en l'òrgan paracri/productor de l'agent terapèutic. Tsujie et al.²¹⁶ demostra com l'electroporació directa al ronyó amb un DNA nuu injectat a l'artèria renal

és més efectiva en la transferència gènica al glomèrul que la transferència amb el HVJ.



En la comparació entre l'electroporació muscular i la directa al ronyó s'observa que els nivells expressats de proteïna tant a teixit com a plasma no són diferents, essent per tant comparables en termes d'eficiència. En ambdues aproximacions quan analitzem per immunohistoquímia la distribució proteica veiem un patró no uniforme (clapejat) d'expressió.

L'avantatge que ofereix l'electroporació directa al ronyó respecte a la teràpia intramuscular és palès, però, en la ràpida millora dels nivells de creatinina sèrica. Tot i que l'electroporació directa a l'òrgan és una aproximació invasiva, pot ser de gran utilitat en el dany isquèmic originat durant el procés quirúrgic, com és el cas del trasplantament renal.

L'efectivitat de la teràpia gènica amb HGF ha estat també provada per altres grups posteriorment a la publicació del primer treball. Isaka et al²²⁵ mostren com l'electroporació directa al ronyó *ex vivo*, en un model de trasplantament renal amb isquèmia renal calenta en porc, redueix la nefropatia de l'empelt. També Kagawa et al²²⁶ utilitzen adenovirus per introduir el gen de l'HGF a ratolins Db/Db aconseguint una millora en la progressió de la nefropatia diabètica. Xue et al²²⁷ transfecten els animals, mitjançant lentivirus, amb un vector fusió HGF-MSP (Macrophage Stimulating Protein) i observen com els ronyons estan protegits de l'apoptosi i de l'infiltrat macrofàgic després d'un dany per isquèmia/reperfusió renal.

Un dels punts interessants de discussió és com la teràpia amb el vector que codifica pel gen de l'HGF humà (hHGF) produeix un augment en els nivells d'HGF endogen (rata). Ueki et al²²⁸ va demostrar en un model de cirrosis en rates com la teràpia gènica amb HGF humà usant liposomes HVJ augmentava els nivells en teixit d'HGF humà però també l'HGF endogen de rata. Així el balanç entre TGF β i HGF endògens també es veu afectat després de la teràpia gènica. Aquest paràmetre ens permet especular sobre una possible explicació en l'augment de l'HGF endogen post-electroporació amb HGF humà. Així la sobreexpressió d'hHGF disminuiria l'expressió de TGF β i aquesta disminució promouria una activació de la maquinària endògena per la sobreexpressió d'HGF endogen²²⁹.

A més a més el percentatge d'homologia entre la seqüència d'aminoàcids de l'HGF de rata amb l'humà és molt gran, essent d'un 91,6% en la cadena alpha i d'un 88,9% en la cadena beta. Aquest factor ens podria induir a pensar en un error en la determinació dels nivells d'HGF endogen que s'ha de tenir en compte però que la fiabilitat de la determinació del test i la corroboració mitjançant microarrays ens ajuden a descartar.

Com a mediador fisiològic de la reparació tissular, l'HGF endogen incrementa després d'un insult isquèmic o fracàs agut²³⁰ i també en les primeres 48h després de reducció de massa renal (nefrectomia 5/6)¹⁵⁴ i en els processos crònics s'ha observat una disminució^{157, 190} però també un augment^{152,159,91} tal i com es resumeix a la TAULA 1 de la introducció. Aquests resultats podrien mostrar-se incongruents amb l'efecte beneficiós demostrat en el segon treball. Cal observar, però, treballs com els de Liu et al¹⁵⁴ en el que es realitza una cinètica d'expressió d'HGF en un model de nefrectomia 5/6. El pic d'expressió és a les 6h després de la cirurgia retornant als nivells basals a partir de les 48h i amb un lleu augment a partir de la setmana. A més demostren com l'injecció d'anticossos anti-HGF augmenta la fibrosi en aquest model. Aquestes dues fases d'expressió de l'HGF s'han de tenir en compte doncs a l'hora de decidir el protocol d'administració terapèutica.

Després de la teràpia gènica obtenim uns nivells suprafisiològics d'aquesta proteïna. Aquesta sobreexpressió es correlaciona, a curt termini amb el dany per isquèmia/reperfusió renal amb una millor funció, una disminució de la mort cel·lular tant per necrosi com per apoptosi, un increment en la regeneració del parènquima i menor infiltrat inflamatori.

Nakamura et al²³¹ i Jayasankar et al²³² demostren l'efecte cardioprotector d'HGF reduint l'angiogènesi i l'apoptosi induïda per

isquèmia. Arthur et al²³³ demostrà que l'HGF reduïa la inflamació intestinal, donant una pista sobre un possible mecanisme antiinflamatori d'HGF en la prevenció del dany isquèmic. I en el primer dels treballs presentats es demostra, en un model d'isquèmia renal calenta, que la teràpia gènica amb HGF prevé el dany post-isquèmic reduint l'apoptosi, la inflamació i promovent els processos regeneratius a una setmana.

La reducció de l'apoptosi mesurada per TUNEL i per immunotinció de la fracció p85 de PARP ens mostra com les cèl·lules afectades són principalment cèl·lules tubulars. L'HGF ha contribuït a una disminució del dany o probablement a una major celeritat en la recuperació. Els mecanismes implicats en la reducció de l'apoptosi s'ha vist que estan relacionats amb l'augment d'expressió de Bcl-2 (proteïna antiapoptòtica) i Bcl-xL promogut per HGF^{234, 188}. Aquest efecte pro-supervivència va lligat a l'augment de la regeneració observat a través dels nivells de PCNA (antigen nuclear de les cèl·lules en proliferació) i un lleuger augment en el nombre de mitosis observades per histologia convencional.

La reducció de la inflamació inicial és de cabdal importància per l'assoliment de la recuperació. Nombrosos estudis demostren la relació entre la reducció del nombre de neutròfils i la reducció del dany per I/R²³⁵. La teràpia amb HGF disminueix els nivells de Mieloperoxidasa (MPO) en teixit respecte els animals no tractats. Aquesta reducció de l'infiltrat neutrofilic és clau, tal com també han demostrat altres grups¹⁹⁴, en la prevenció de l'apoptosi tubular i la disfunció renal. També els marcadors de macròfags i de limfòcits són menys presents en els ronyons dels animals tractats amb HGF. La I/R, i en particular la hipòxia, provoca una important resposta inflamàtoria²³⁶. El coneixement de les senyals que inicien la inflamació és important perquè pot resultar més efectiu el tractament

profilàctic dels iniciadors de la cascada inflamatòria que dels efectors posteriorment implicats²³⁷.

Aquests dos efectes immediats (tant l'antiapoptòtic com l'antiinflamatori) del tractament amb HGF es tradueixen en una disminució del dany agut però també del crònic (24 setmanes de seguiment post-trasplantament, demostrat en el segon treball), provant la importància de la prevenció del FRA per millorar el pronòstic a llarg termini.

Per aquest motiu l'administració del tractament en el model de dany crònic s'ha realitzat en dues pautes temporals diferents: una abans de trasplantament per oferir una protecció cel·lular primerenca durant el dany per isquèmia (com veiem que es produeix en el primer estudi), i una altra tardana per la prevenció de l'activació dels mecanismes crònics.

El curs natural de la NCA humana comença a les poques setmanes del trasplantament²³⁸. Les biòpsies de protocol clíniques als 4 mesos han detectat un nombre significatiu d'alloempelts estables que histològicament mostraven trets característics de la NCA²³⁹. Les biòpsies de protocol permeten el reconeixement dels ronyons danyats de forma primerenca i per tant ofereixen l'oportunitat d'iniciar un tractament. Partint del fet que el tractament de les nefropaties ja establertes amb insuficiència renal severa, proteïnúria i cicatrització és rarament exitosa, aquest segon treball és una aproximació a l'aplicació d'un tractament preventiu/primerenc per tal de trobar una teràpia amb beneficis potencialment aplicables a la clínica. Aquesta idea és compartida pel grup de Y. Liu¹⁹¹, que, amb una extensa experiència en l'estudi de l'efecte anti-fibròtic i antiinflamatori d'HGF, ha escrit un editorial del treball comentant la seva senzillesa i gran aplicabilitat clínica, passant obligatòriament per assaigs clínics ben dissenyats.

En el segon estudi es demostra, doncs, com el tractament amb HGF modifica la progressió natural de la nefropatia crònica de l'alloempelt. En aquest model de NCA, els nivells més alts d'HGF de rata en plasma es trobaven just després del trasplantament, quan els ronyons encara estaven sota l'efecte tardà dels processos inflamatoris aguts induïts per isquèmia. Una ràpida disminució en l'HGF plasmàtic s'observà a mesura que el dany renal es feia aparent i, a les 24 setmanes, l'expressió d'HGF endogen va caure per sota dels nivells normals. Aquest decrement d'HGF està íntimament relacionat amb la destrucció de les cèl·lules epitelials tubulars¹⁵⁵; la fibrosi renal crònica i l'atròfia tubular poden ser degudes parcialment a aquesta disminució d'HGF. Sembla doncs plausible el raonament sobre el potencial efecte terapèutic de la suplementació amb HGF en la NCA.

En aquest treball es mostra com aquesta teràpia amb HGF sobre el dany per I/R pot tenir efectes beneficiosos a llarg terme en la NCA.

El tractament inicial té efectes a curt i a llarg termini. Durant les 8 primeres setmanes post-trasplantament obtenim un 100% de supervivència i absència de proteïnúria. A llarg termini és interessant comprovar com els nivells de fibrosi intersticial observada tant en histologia convencional com per tinció específica d' α SMA com de CTGF són comparables als del grup tractat tardanament i ambdós significativament reduïts respecte els animals no tractats.

El perfil d'expressió de citoquines en la NCA experimental ha estat ben descrit^{240,241}. Després de la reacció inflamatòria inicial hi ha un període relatiu de quiescència. Així reapareix una infiltració progressiva de macròfags entre les 12 i les 16 setmanes, amb la subsegüent detecció de productes associats a macròfag: TNF α i IFN γ . Simultàniament, es comencen a mostrar els primers canvis crònics funcionals i estructurals²⁴¹. Quan realitzem l'electrotransferència d'HGF just després del trasplantament tenim

com a objectiu disminuir els mecanismes d'isquèmia/reperfusió. En la literatura trobem varis treballs on es mostren els mecanismes potencials dels efectes beneficiosos del tractament primerenc amb HGF sobre el dany per isquèmia.

A les 12 setmanes, el tractament tardà amb HGF inhibeix també l'infiltrat inflamatori, reduint els macròfags, les cèl·lules CD3+, els limfòcits T i B, i les seves citocines associades IL12, TNF α i IFN γ . Altres autors^{176,242} han descrit aquest efecte antiinflamatori mostrant com l'HGF suprimeix l'expressió de citocines inflamatòries via NF κ B en les cèl·lules tubulars epitelials. Els resultats d'aquest estudi també indiquen que l'HGF redueix l'activació, sobreexpressió i translocació al nucli d'NF κ B. Les cèl·lules mononuclears són crucials en el subministrament de molècules profibròtiques que poden alterar la funció contràctil de la cèl·lula mesangial en el glomèrul i donar lloc a una sobreproducció de matriu extracel·lular mesangial²⁴¹ i també activar els fibroblasts residents intersticials i promoure la transició epiteli-mesènquima que dona cicatrització tissular. El bloqueig d'aquesta infiltració cel·lular en el grup tractat tardanament es tradueix en un control efectiu dels mecanismes profibròtics posteriors i en que aquests animals mostren menys esclerosi glomerular i fibrosi intersticial, resultant en una atenuació de la progressió de la NCA. Tot i la reducció espontània de la infiltració cel·lular a les 24 setmanes, el dany renal en els animals no tractats progressa negativament, indicant que l'efecte beneficiós d'HGF també resideix en el bloqueig dels mecanismes profibròtics induïts per inflamació.

TGF β és un dels factors clau en la progressió de la fibrosi tissular⁵⁴. L'augment progressiu dels nivells de TGF β tissulars va lligat a la progressió de la fibrosi. Com ja s'ha comentat a la introducció i com s'observa en els treballs presentats, HGF té la capacitat d'invertir aquesta progressió disminuint el quocient TGF β /HGF i mantenint-lo al llarg del temps. Aquest

quocient és important en el model crònic per les conseqüències que en deriven (acumulació de matriu extracel·lular, aparició de miofibroblasts α SMA, CTGF²⁴³ però és interessant veure com en el model agut d'isquèmia renal ja hem aconseguit una reducció d'aquest desequilibri.

En el model de NCA, a les 12 setmanes, el TGF β , l' α SMA i el CTGF tubular ja estaven augmentats en els ronyons no tractats, tot i que no s'observava esclerosi glomerular ni vasculopatia. L'electrotransferència tardana d'HGF disminueix clarament TGF β , incrementa el quocient HGF/TGF β i l'expressió de PCNA indicant que la regeneració cel·lular està activada. Simultàniament, el nombre de cèl·lules transformades que expressen α SMA i també CTGF es veu reduït. Aquesta reducció és encara evident a les 24 setmanes. La transformació de les cèl·lules tubulars a cèl·lules α SMA+ és un procés central en la progressió de la fibrosi renal crònica, ja que l'activació miofibroblàstica és un predictor de la progressió del dany renal. El balanç entre factors pro- i anti-fibròtics és d'importància cabdal en la progressió del dany.

Així doncs, sembla raonable conjecturar que la preservació fenotípica de la cèl·lula epitelial tubular per HGF és deguda al bloqueig de la transició epiteli-mesènquima. A més de la fibrosi túbulintersticial, el CTGF glomerular també es veu augmentat a les 12 setmanes en el ronyons no tractats amb HGF amb un increment a les 24 setmanes en paral·lel a l'esclerosi glomerular. Aquestes dades també demostren un efecte terapèutic d'HGF consistent amb una disminució de CTGF glomerular i la subsegüent deposició de matriu extracel·lular en els glomèruls, igual que ja es va demostrar en el model de nefropatia diabètica²⁴⁴.

Aquesta teràpia gènica tardana sembla més efectiva que la primerenca en els seus efectes a les 24 setmanes, tot i que es pot qüestionar

si és efecte de la doble dosi de tractament (una injecció a les 8 i una altra a les 10 setmanes, resultant en 4 setmanes seguides amb uns nivells sostinguts d'HGF circulants). Independentment d'aquest factors el fet però de veure reversió del dany en un tractament tardà ofereix més possibilitats d'aplicació a la clínica en models de dany crònic d'origen no controlat temporalment. La idea de cobrir dos fenòmens separats en el temps i en la durada: un període inicial que sol ser breu, i un de tardà més llarg i indefinit, obre les portes a un ampli espectre d'aplicació. La millora es relaciona, almenys parcialment, amb la reducció dels processos inflamatoris i profibròtics. L'oportunitat que ens ofereixen els acurats seguiments clínics o les biòpsies de protocol d'identificar pacients que presenten trets incipients de NCA ens permet un tractament més personalitzat d'aquest dany renal crònic. Així la seguretat que ofereix l'electrotransferència tardana seria de major aplicabilitat clínica que el tractament sistemàtic pre-trasplantament.

La modelització d'aquest dany *in vitro* podria ser abordat mitjançant diferents tipus cel·lulars i estímuls. El sistema d'elecció ha estat el cultiu *in vitro* de cèl·lules tubulars epitelials proximals sotmeses a hipòxia/reoxigenació. La hipòxia túbulepitelial contribuiria al desenvolupament de la nefropatia crònica promovent la fibrosi túbulintersticial²⁴⁵. Aquesta afirmació es basa en l'evidència de l'activitat proinflamatòria de la cèl·lula epitelial tubular³² i en la teoria de la hipòxia crònica, en la que es proposa que el dany glomerular primari porta a un dany en la microvasculatura peritubular. Es crea un ambient hipòxic que dispara la resposta fibròtica en les cèl·lules túbulintersticials. Aquesta fibrosi afecta els capil·lars i nefrones adjacents establint un cicle de destrucció que s'autoperpetua i que culmina en la insuficiència de l'òrgan¹⁰⁶.

Orphanides et al¹⁰² demostraren com la cèl·lula tubular sotmesa a hipòxia genera matriu extracel·lular per mecanismes independents a TGF β . Aquest estudi doncs plantejaria el dubte sobre el mecanisme d'acció anti-fibròtica d'HGF.

Un altre factor descrit en la transició inflamació-fibrosi és MCP-1. La importància de la disminució o fins i tot eliminació de l'expressió d'MCP-1 rau en el paper clau d'aquesta quimiocina per intervenir en el dany crònic. Models experimentals de nefropatia diabètica demostren com la deficiència d'MCP-1 es tradueix en una prevenció de l'albuminúria que coincideix amb una marcada reducció en el dany histològic i en el nombre de macròfags CD68+ intersticials i glomerulars²⁴⁶.

Tesch et al²⁴⁷ estableixen la relació entre MCP-1 i fibrosi en un model progressiu de nefropatia diabètica. La sobreexpressió d'MCP-1 promouria el reclutament de monòcits que infiltrarien el parènquima i s'activarien expressant MCP-1 que reclutaria més monòcits i també TGF β que promouria la generació de miofibroblasts (Transició Epiteli Mesènquima, transdiferenciació dels monòcits). S'ha vist que MCP-1 pot estimular directament els macròfags a secretar elevats nivells de TGF β que al seu torn promouen l'augment de producció de matriu extracel·lular.

L'estudi *in vitro* aïllant la cèl·lula epitelial tubular com a afectada/efectora del dany hipòxic i com a productora/receptora d'HGF ens mostra com aquesta teràpia permet modular l'expressió gènica i proteica d'un dels tipus cel·lulars més involucrats en el dany renal.

La cèl·lula epitelial tubular expressa MCP-1 ràpidament després de l'inici de la hipòxia però quan aquesta es cronifica els nivells d'MCP-1 cauen. L'expressió d'MCP-1 és, doncs, un estímul primerenc amb conseqüències a llarg termini.

Per altra banda l'observació del mecanisme disparat en la reoxigenació ens permet estudiar el dany generat durant la reperfusió de l'òrgan postisquèmia. En el cas del trasplantament és especialment interessant aquest punt. En la reperfusió és produeix un pic més important que el d'activació per hipòxia, corroborant l'acció primerenca d'MCP-1 sobre els efectes crònics.

En la cèl·lula epitelial tubular aïllada la sobreexpressió d'HGF és capaç d'abolir l'activació d'MCP-1 activada per la hipòxia i la reoxigenació.

El conjunt dels tres treballs presentats evidencien l'activitat terapèutica d'HGF tant en processos de dany agut com crònic. En el dany agut la protecció és conseqüència, principalment, d'una disminució de l'apoptosi tubular i també d'una disminució de l'infiltrat inflamatori. Aquesta protecció del dany agut té efectes a llarg termini, com es pot observar en el model de NCA, reduint la inflamació i la fibrosi associada a aquest tipus de nefropatia. El tractament d'aquest dany abordant-lo en el moment de l'activació dels processos fibròtics ofereix també excel·lents expectatives amb un augment de la supervivència associat a una marcada reducció també de la fibrosi i la inflamació. L'estudi dels mecanismes involucrats implica l'activació de la via d'NFkB i el balanç de TGFb/HGF, però també la cèl·lula epitelial tubular com a una important diana de tractament per la seva important implicació en la progressió d'aquest dany i especialment en la inflamació promoguda per hipòxia i/o reoxigenació.

A la vista d'aquests resultats, i tenint en compte l'aplicabilitat de les vies d'administració, sembla factible l'aplicació clínica d'aquesta teràpia en el context del trasplantament renal.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1- La sobreexpressió d'hHGF a través de l'electroporació (renal o muscular) produeix una sobreexpressió d'HGF endogen en la circulació. La teràpia gènica amb el gen de l'hHGF protegeix del dany, ja sigui per l'acció directa de la proteïna expressada o bé per l'augment en la proteïna endògena induïda.
- 2- L'electroporació muscular i també renal són una forma altament efectiva i segura de teràpia gènica *in vivo*. L'electroporació renal presenta avantatges sobre l'electroporació muscular, al tenir un efecte més ràpid sobre la funció renal i evitar la circulació sistèmica de la proteïna, i representa una opció raonable en el context del trasplantament renal.
- 3- La protecció exercida per la teràpia gènica amb hHGF en el model de FRA isquèmic es manifesta a diferents nivells: una millora primerenca de la funció renal, una disminució de l'apoptosi i de la necrosi tubular, disminució de l'infiltrat cel·lular inflamatori i un augment de la regeneració del parènquima.
- 4- Aquesta protecció del dany agut té efectes a llarg termini augmentant la supervivència i disminuint la inflamació i la progressió de la fibrosis en un model de NCA.

- 5- La teràpia gènica amb HGF aplicada en el moment d'aparició del segon pic d'inflamació post-trasplantament (8-10 setmanes) mostra major protecció front a la progressió del dany.
- 6- L'HGF té un efecte modulador de l'expressió de molècules fibrogèniques i inflamatòries reduint la progressió de la cicatrització i la fibrosi.
- 7- La cèl·lula epitelial tubular de rata transfectada amb hHGF és un bon sistema productor d'aquesta proteïna *in vitro*.
- 8- L'expressió gènica d'MCP-1 en les cèl·lules epitelials tubulars *in vitro* és induïda lleument a les primeres hores després de l'inici de l'insult hipòxic tot i que cau quan l'insult és sostingut. La reoxigenació d'aquestes cèl·lules produeix un augment significatiu de l'expressió gènica i proteica d'aquesta quimiocina.
- 9- L'HGF frena la sobreexpressió d'MCP-1 tant a nivell gènic com proteic.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 Barretti P, Soares VA. Acute renal failure: clinical outcome and causes of death. *Ren Fail* 1997; **19**: 253-257.
- 2 Torras J, Cruzado JM, Grinyo JM. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2217-2218.
- 3 Sheridan AM, Bonventre JV. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Contrib Nephrol* 2001: 7-21.
- 4 Humes HD, Krauss JC, Cieslinski DA, Funke AJ. Tubulogenesis from isolated single cells of adult mammalian kidney: clonal analysis with a recombinant retrovirus. *Am J Physiol* 1996; **271**: F42-49.
- 5 Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest* 1972; **51**: 118-126.
- 6 Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res* 2009; **77**: 4-7.
- 7 Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest* 1971; **25**: 635-643.
- 8 Hellberg PO, Bayati A, Kallskog O, Wolgast M. Red cell trapping after ischemia and long-term kidney damage. Influence of hematocrit. *Kidney Int* 1990; **37**: 1240-1247.
- 9 Mason J, Torhorst J, Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int* 1984; **26**: 283-293.
- 10 Mason J, Welsch J, Torhorst J. The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int* 1987; **31**: 65-71.
- 11 Bayati A, Christofferson R, Kallskog O, Wolgast M. Mechanism of erythrocyte trapping in ischaemic acute renal failure. *Acta Physiol Scand* 1990; **138**: 13-23.
- 12 Hellberg PO, Kallskog O, Wolgast M. Nephron function in the early phase of ischemic renal failure. Significance of erythrocyte trapping. *Kidney Int* 1990; **38**: 432-439.
- 13 Hellberg PO, Kallskog OT, Ojteg G, Wolgast M. Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils. *Am J Physiol* 1990; **258**: F1018-1025.

- 14 Barranco Ruiz F (ed). *Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos*, 1999.
- 15 Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2002; **62**: 1539-1549.
- 16 Ishibashi N *et al.* Modulation of chemokine expression during ischemia/reperfusion in transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. *J Immunol* 1999; **163**: 5666-5677.
- 17 Donnhoo KK *et al.* Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. *J Urol* 2000; **163**: 1328-1332.
- 18 Donnhoo KK *et al.* Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; **277**: R922-929.
- 19 De Greef KE *et al.* Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol* 1998; **11**: 110-122.
- 20 Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 2199-2210.
- 21 Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; **66**: 486-491.
- 22 Ysebaert DK *et al.* Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**: 1562-1574.
- 23 Rabb H *et al.* Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**: F525-531.
- 24 Takada M *et al.* The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1199-1203.
- 25 Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3522-3530.
- 26 Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol* 2007; **248**: 4-11.
- 27 Ortiz A *et al.* Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 2000; **57**: 969-981.
- 28 Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F608-627.
- 29 Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; **11**: 301-308.

- 30 Oberbauer R *et al.* Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 2006-2013.
- 31 Schwarz C *et al.* Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function. *Lab Invest* 2002; **82**: 941-948.
- 32 Daha MR, van Kooten C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15 Suppl 6**: 41-43.
- 33 Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; **66**: 480-485.
- 34 Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 152-176.
- 35 Li H, Nord EP. CD40 ligation stimulates MCP-1 and IL-8 production, TRAF6 recruitment, and MAPK activation in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **282**: F1020-1033.
- 36 Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002; **61**: 51-60.
- 37 Chakravorty SJ *et al.* Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion. *Clin Exp Immunol* 2002; **129**: 150-159.
- 38 Deckers JG *et al.* IL-4 and IL-13 augment cytokine- and CD40-induced RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 1187-1193.
- 39 De Vries B *et al.* Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation. *Transplantation* 2003; **75**: 375-382.
- 40 Zhou W *et al.* Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1363-1371.
- 41 Miura M *et al.* Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2001; **159**: 2137-2145.
- 42 Cugini D *et al.* Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2005; **67**: 1753-1761.
- 43 Kelly KJ *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1056-1063.
- 44 Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *Faseb J* 2000; **14**: 48-54.

- 45 Wolfs TG *et al.* In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002; **168**: 1286-1293.
- 46 Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *Faseb J* 2006; **20**: 217-226.
- 47 Thurman JM *et al.* Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 2006; **116**: 357-368.
- 48 Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; **81**: 643-654.
- 49 Nankivell BJ *et al.* Histological injury and renal transplant outcome: the cumulative damage hypothesis. *Transplant Proc* 2001; **33**: 1149-1150.
- 50 Solez K *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; **7**: 518-526.
- 51 Herrero-Fresneda I *et al.* Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; **162**: 127-137.
- 52 de Groot-Kruseman HA *et al.* Intragraft platelet-derived growth factor-alpha and transforming growth factor-beta1 during the development of accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transpl Immunol* 1999; **7**: 201-205.
- 53 Cummins EP *et al.* Hypoxic regulation of NF-kappaB signaling. *Methods Enzymol* 2007; **435**: 479-492.
- 54 Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000; **15**: 290-301.
- 55 Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1448-1456.
- 56 Chen L, Boadle RA, Harris DC. Toxicity of holotransferrin but not albumin in proximal tubule cells in primary culture. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 77-84.
- 57 Benigni A *et al.* Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy. *Kidney Int* 1998; **54**: 353-359.
- 58 Wang Y *et al.* Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**: 1537-1545.
- 59 Tang S, Lai KN, Sacks SH. Role of complement in tubulointerstitial injury from proteinuria. *Kidney Blood Press Res* 2002; **25**: 120-126.

- 60 Ricardo SD, Levinson ME, DeJoseph MR, Diamond JR. Expression of adhesion molecules in rat renal cortex during experimental hydronephrosis. *Kidney Int* 1996; **50**: 2002-2010.
- 61 Okada H *et al*. Osteopontin expressed by renal tubular epithelium mediates interstitial monocyte infiltration in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **278**: F110-121.
- 62 Weiss RA, Madaio MP, Tomaszewski JE, Kelly CJ. T cells reactive to an inducible heat shock protein induce disease in toxin-induced interstitial nephritis. *J Exp Med* 1994; **180**: 2239-2250.
- 63 Wang SN, Hirschberg R. Tubular epithelial cell activation and interstitial fibrosis. The role of glomerular ultrafiltration of growth factors in the nephrotic syndrome and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**: 2072-2074.
- 64 Grande MT, Lopez-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; **5**: 319-328.
- 65 Fan JM *et al*. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; **56**: 1455-1467.
- 66 Tang WW *et al*. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1169-1180.
- 67 Jernigan S, Eddy AA (ed). *Experimental insights into the mechanisms of tubulo-interstitial scarring*. In: El Nahas M, Harris K, Anderson S (eds). *Mechanisms and clinical management of chronic renal failure*. Oxford University Press: Oxford, 2000.
- 68 Kopp JB *et al*. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996; **74**: 991-1003.
- 69 Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2697-2713.
- 70 Ito Y *et al*. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; **53**: 853-861.
- 71 Riser BL *et al*. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 25-38.
- 72 Ruiz-Ortega M *et al*. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 16-20.
- 73 Harris RC, Cheng HF. The intrarenal renin-angiotensin system: a paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis. *Exp Nephrol* 1996; **4 Suppl 1**: 2-7.

- 74 Szabo A *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int* 2000; **57**: 982-991.
- 75 Junaid A, Rosenberg ME, Hostetter TH. Interaction of angiotensin II and TGF-beta 1 in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**: 1732-1738.
- 76 Fern RJ *et al.* Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest* 1999; **103**: 39-46.
- 77 Campistol JM *et al.* Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16 Suppl 1**: 114-116.
- 78 Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; **52**: 1497-1510.
- 79 Zoja C *et al.* Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 1995; **26**: 934-941.
- 80 Kon V, Hunley TE, Fogo A. Combined antagonism of endothelin A/B receptors links endothelin to vasoconstriction whereas angiotensin II effects fibrosis. Studies in chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 1995; **60**: 89-95.
- 81 Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin A receptor antagonist on murine lupus nephritis. *Kidney Int* 1995; **47**: 481-489.
- 82 Herrero I *et al.* Prevention of cold ischaemia-reperfusion injury by an endothelin receptor antagonist in experimental renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**: 872-880.
- 83 Orth SR *et al.* The ET(A) receptor blocker LU 135252 prevents chronic transplant nephropathy in the "Fisher to Lewis" model. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 387-391.
- 84 Benigni A. Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int* 2000; **57**: 1778-1794.
- 85 Hocher B *et al.* Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1380-1389.
- 86 Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 12-23.
- 87 Kriz W, Hahnel B, Rosener S, Elger M. Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1995; **48**: 1435-1450.

- 88 Guo G *et al.* Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F777-785.
- 89 Jones LK *et al.* IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009.
- 90 Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, El Nahas AM. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int* 1999; **56**: 2116-2127.
- 91 Taniguchi Y *et al.* Localization of hepatocyte growth factor and tubulointerstitial lesions in IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 1997; **17**: 413-416.
- 92 Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renotrophic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci* 2008; **13**: 7072-7086.
- 93 Chevalier RL *et al.* Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int* 2000; **57**: 882-890.
- 94 Hirschberg R. Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions: evidence for a role for insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 1996; **98**: 116-124.
- 95 Tang WW, Van GY, Qi M. Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 1997; **51**: 926-931.
- 96 Johnson TS *et al.* Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 2146-2157.
- 97 Beck-Schimmer B, Oertli B, Pasch T, Wuthrich RP. Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9**: 2283-2290.
- 98 Jones CL *et al.* Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 1992; **141**: 1381-1396.
- 99 Fioretto P *et al.* Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 1998; **339**: 69-75.
- 100 Oda T *et al.* PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 2001; **60**: 587-596.
- 101 Marcussen N. Atubular glomeruli and the structural basis for chronic renal failure. *Lab Invest* 1992; **66**: 265-284.
- 102 Orphanides C, Fine LG, Norman JT. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int* 1997; **52**: 637-647.

- 103 Seron D *et al.* Number of interstitial capillary cross-sections assessed by monoclonal antibodies: relation to interstitial damage. *Nephrol Dial Transplant* 1990; **5**: 889-893.
- 104 Konda R *et al.* Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and its potential role in up-regulation of angiogenesis in scarred kidneys secondary to urinary tract diseases. *Am J Pathol* 1999; **155**: 1587-1597.
- 105 Padanilam BJ, Lewington AJ. Molecular mechanisms of cell death and regeneration in acute ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; **8**: 15-19.
- 106 Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33**: 989-996.
- 107 Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 17-25.
- 108 Eckardt KU *et al.* Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2005; S46-51.
- 109 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 721-732.
- 110 Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 2005; **450**: 363-371.
- 111 Fine LG, Bandyopadhyay D, Norman JT. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int Suppl* 2000; **75**: S22-26.
- 112 Fine LG, Orphanides C, Norman JT. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl* 1998; **65**: S74-78.
- 113 Mackensen-Haen S, Bader R, Grund KE, Bohle A. Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol* 1981; **15**: 167-171.
- 114 Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005; **12**: 353-365.
- 115 Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol* 2002; **161**: 239-248.
- 116 O'Riordan E *et al.* Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **292**: H285-294.
- 117 Li X *et al.* Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells. *Kidney Int* 2005; **68**: 569-583.

- 118 Manotham K *et al.* Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int* 2004; **65**: 871-880.
- 119 Tanaka T *et al.* Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **309**: 222-231.
- 120 Nakagawa T *et al.* Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F658-664.
- 121 Ong AC *et al.* An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney Int* 1995; **48**: 390-401.
- 122 Kim BS *et al.* VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2027-2036.
- 123 Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1-12.
- 124 Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 2000; **58**: 2351-2366.
- 125 Nakagawa T *et al.* Role of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in the regulation of thrombospondin-1 by TGF-beta1 in rat proximal tubular cells and mouse fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 899-904.
- 126 Hofbauer KH *et al.* Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 4515-4522.
- 127 Lautrette A *et al.* Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* 2005; **11**: 867-874.
- 128 Galindo M *et al.* Hypoxia induces expression of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in human dermal fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2001; **123**: 36-41.
- 129 Kong T *et al.* Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 10440-10445.
- 130 Koong AC *et al.* Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res* 1994; **54**: 5273-5279.
- 131 Matsui H *et al.* Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 1999; **42**: 104-112.

- 132 Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000; **165**: 1013-1021.
- 133 Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 1999; **18**: 6845-6852.
- 134 Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 1450-1459.
- 135 Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Leutteke NC. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* 1984; **44**: 4414-4419.
- 136 Diaz-Gil JJ *et al.* Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J* 1986; **235**: 49-55.
- 137 Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* 1984; **119**: 183-192.
- 138 Paul D, Piasecki A. Rat platelets contain growth factor(s) distinct from PDGF which stimulate DNA synthesis in primary adult rat hepatocyte cultures. *Exp Cell Res* 1984; **154**: 95-100.
- 139 Nakamura T *et al.* Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; **342**: 440-443.
- 140 Tashiro K *et al.* Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3200-3204.
- 141 Okajima A, Miyazawa K, Kitamura N. Primary structure of rat hepatocyte growth factor and induction of its mRNA during liver regeneration following hepatic injury. *Eur J Biochem* 1990; **193**: 375-381.
- 142 Nagaike M *et al.* Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *J Biol Chem* 1991; **266**: 22781-22784.
- 143 Santos OF, Moura LA, Rosen EM, Nigam SK. Modulation of HGF-induced tubulogenesis and branching by multiple phosphorylation mechanisms. *Dev Biol* 1993; **159**: 535-548.
- 144 Liu Y, Sun AM, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246**: 821-826.

- 145 Yo Y *et al.* Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int* 1998; **54**: 1128-1138.
- 146 Stracke S *et al.* Differentiating and proliferative effects of HGF in renal proximal tubular cells are mediated via different signalling pathways. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13**: 1398-1405.
- 147 Igawa T *et al.* Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 831-838.
- 148 Igawa T *et al.* Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am J Physiol* 1993; **265**: F61-69.
- 149 Goto T *et al.* Hepatocyte growth factor in glycerol-induced acute renal failure. *Nephron* 1997; **77**: 440-444.
- 150 Liu Y *et al.* Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Int* 1999; **55**: 442-453.
- 151 Rabkin R *et al.* Hepatocyte growth factor receptor in acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 531-540.
- 152 Sugimura K *et al.* Serum hepatocyte growth factor levels in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1995; **70**: 324-328.
- 153 Liu Y, Tolbert EM, Sun AM, Dworkin LD. Primary structure of rat HGF receptor and induced expression in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 1996; **271**: F679-688.
- 154 Liu Y, Rajur K, Tolbert E, Dworkin LD. Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney Int* 2000; **58**: 2028-2043.
- 155 Mizuno S *et al.* Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000; **57**: 937-948.
- 156 Taman M, Liu Y, Tolbert E, Dworkin LD. Increase urinary hepatocyte growth factor excretion in human acute renal failure. *Clin Nephrol* 1997; **48**: 241-245.
- 157 Libetta C *et al.* Stimulation of hepatocyte growth factor in human acute renal failure. *Nephron* 1998; **80**: 41-45.
- 158 Vaidya VS *et al.* Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clin Transl Sci* 2008; **1**: 200-208.
- 159 Sugimura K *et al.* Production of hepatocyte growth factor is increased in chronic renal failure. *Nephron* 1997; **75**: 7-12.
- 160 Nishida M *et al.* Serum hepatocyte growth factor levels in patients with renal diseases. *Am J Nephrol* 1999; **19**: 509-512.

- 161 Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 4357-4361.
- 162 Vijayan A *et al.* Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis after ischemic renal injury in rats. *Am J Kidney Dis* 2001; **38**: 274-278.
- 163 Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol* 1994; **266**: F129-134.
- 164 Amaike H, Matsumoto K, Oka T, Nakamura T. Preventive effect of hepatocyte growth factor on acute side effects of cyclosporin A in mice. *Cytokine* 1996; **8**: 387-394.
- 165 Mizuno S *et al.* Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1827-1834.
- 166 Azuma H *et al.* Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1280-1292.
- 167 Fornoni A *et al.* Hepatocyte growth factor, but not insulin-like growth factor I, protects podocytes against cyclosporin A-induced apoptosis. *Am J Pathol* 2001; **158**: 275-280.
- 168 Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001; **59**: 1304-1314.
- 169 Inoue T *et al.* Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *Faseb J* 2003; **17**: 268-270.
- 170 Nagano T *et al.* Ameliorative effect of hepatocyte growth factor on glycerol-induced acute renal failure with acute tubular necrosis. *Nephron* 2002; **91**: 730-738.
- 171 Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 96-107.
- 172 Gong R *et al.* Hepatocyte growth factor modulates matrix metalloproteinases and plasminogen activator/plasmin proteolytic pathways in progressive renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 3047-3060.
- 173 Mori T *et al.* Hepatocyte growth factor-stimulating endothelial cell growth and accelerating glomerular capillary repair in experimental progressive glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2003; **94**: e44-54.

- 174 Yang J, Liu Y. Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F349-357.
- 175 Dworkin LD *et al.* Hepatocyte growth factor ameliorates progression of interstitial fibrosis in rats with established renal injury. *Kidney Int* 2004; **65**: 409-419.
- 176 Gong R *et al.* Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2868-2881.
- 177 Zioncheck TF *et al.* The pharmacokinetics, tissue localization, and metabolic processing of recombinant human hepatocyte growth factor after intravenous administration in rats. *Endocrinology* 1994; **134**: 1879-1887.
- 178 Liu Y. Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol* 1999; **277**: F624-633.
- 179 Yang J, Dai C, Liu Y. Systemic administration of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal fibrosis in mice. *Gene Ther* 2001; **8**: 1470-1479.
- 180 Dai C, Yang J, Liu Y. Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 411-422.
- 181 Gao X *et al.* Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2002; **62**: 1238-1248.
- 182 Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2464-2477.
- 183 Okada H *et al.* Transgene-derived hepatocyte growth factor attenuates reactive renal fibrosis in aristolochic acid nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 2515-2523.
- 184 Dai C *et al.* Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2637-2647.
- 185 Mizui M *et al.* Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004; **65**: 2041-2053.
- 186 Yazawa K *et al.* Direct transfer of hepatocyte growth factor gene into kidney suppresses cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 812-816.
- 187 Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 68-78.

- 188 Zhang J, Yang J, Liu Y. Role of Bcl-xL Induction in HGF-mediated Renal Epithelial Cell Survival after Oxidant Stress. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; **1**: 242-253.
- 189 Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1402-1412.
- 190 Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001; **59**: 2023-2038.
- 191 Liu Y *et al.* hepatocyte growth factor is a downstream effector that mediates the antifibrotic action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 54-65.
- 192 Doi S *et al.* Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand on apoptosis and hepatocyte growth factor induction in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2007; **84**: 207-213.
- 193 Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Activation of PI3K-Akt-GSK3beta pathway mediates hepatocyte growth factor inhibition of RANTES expression in renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **330**: 27-33.
- 194 Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol* 2005; **166**: 1895-1905.
- 195 Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor suppresses acute renal inflammation by inhibition of endothelial E-selectin. *Kidney Int* 2006; **69**: 1166-1174.
- 196 Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2464-2473.
- 197 Gong R *et al.* Hepatocyte growth factor suppresses proinflammatory NFkappaB activation through GSK3beta inactivation in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; **283**: 7401-7410.
- 198 Giannopoulou M *et al.* Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-kappaB signaling. *Am J Pathol* 2008; **173**: 30-41.
- 199 Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 861-870.
- 200 Hodgson CP. The vector void in gene therapy. *Biotechnology (N Y)* 1995; **13**: 222-225.

- 201 Somiari S *et al.* Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000; **2**: 178-187.
- 202 Neumann E, Kakorin S, Toensing K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem Bioenerg* 1999; **48**: 3-16.
- 203 Rols MP *et al.* In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 168-171.
- 204 Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1569**: 51-58.
- 205 Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; **1**: 841-845.
- 206 Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1088**: 131-134.
- 207 Buono RJ, Linser PJ. Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992; **1**: 271-275.
- 208 Heller R *et al.* In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* 1996; **389**: 225-228.
- 209 Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 867-870.
- 210 Oshima Y *et al.* Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse. *Gene Ther* 1998; **5**: 1347-1354.
- 211 Svensson EC, Tripathy SK, Leiden JM. Muscle-based gene therapy: realistic possibilities for the future. *Mol Med Today* 1996; **2**: 166-172.
- 212 van Deutekom JC, Hoffman EP, Huard J. Muscle maturation: implications for gene therapy. *Mol Med Today* 1998; **4**: 214-220.
- 213 Lee RC *et al.* Surfactant-induced sealing of electroporated skeletal muscle membranes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 4524-4528.
- 214 Fewell JG *et al.* Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol Ther* 2001; **3**: 574-583.
- 215 Jaichandran S *et al.* In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 362-375.
- 216 Tsujie M *et al.* Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 949-954.
- 217 Lemieux P *et al.* A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 2000; **7**: 986-991.

- 218 Riera M *et al.* Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med* 2004; **6**: 111-118.
- 219 Ratanamart J, Huggins CG, Kirby JA, Shaw JA. In vitro and in vivo evaluation of intrinsic immunogenicity of reporter and insulin gene therapy plasmids. *J Gene Med* 2007; **9**: 703-714.
- 220 Zhou R, Norton JE, Zhang N, Dean DA. Electroporation-mediated transfer of plasmids to the lung results in reduced TLR9 signaling and inflammation. *Gene Ther* 2007; **14**: 775-780.
- 221 Hao J, Li SK, Kao WW, Liu CY. Gene delivery to cornea. *Brain Res Bull* 2009.
- 222 Takabatake Y, Isaka Y, Imai E. In vivo transfer of small interfering RNA or small hairpin RNA targeting glomeruli. *Methods Mol Biol* 2009; **466**: 251-263.
- 223 Aspalter M *et al.* Modification of Schwann cell gene expression by electroporation in vivo. *J Neurosci Methods* 2009; **176**: 96-103.
- 224 Trezise AE, Palazon L, Davies WL, Colledge WH. In vivo gene expression: DNA electrotransfer. *Curr Opin Mol Ther* 2003; **5**: 397-404.
- 225 Isaka Y *et al.* Electroporation-mediated HGF gene transfection protected the kidney against graft injury. *Gene Ther* 2005; **12**: 815-820.
- 226 Kagawa T *et al.* Hepatocyte growth factor gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephron Physiol* 2006; **102**: p92-102.
- 227 Xue F *et al.* HGF-MSP chimera protects kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **363**: 451-456.
- 228 Ueki T *et al.* Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; **5**: 226-230.
- 229 Naim R *et al.* Transforming growth factor-beta1-antisense modulates the expression of hepatocyte growth factor/scatter factor in keloid fibroblast cell culture. *Aesthetic Plast Surg* 2008; **32**: 346-352.
- 230 Laping NJ. Hepatocyte growth factor in renal disease: cause or cure? *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 371-377.
- 231 Nakamura T *et al.* Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 2000; **106**: 1511-1519.
- 232 Jayasankar V *et al.* Gene transfer of hepatocyte growth factor attenuates postinfarction heart failure. *Circulation* 2003; **108 Suppl 1**: II230-236.

- 233 Arthur LG, Schwartz MZ, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Surg* 2004; **39**: 139-143; discussion 139-143.
- 234 Hammerman MR. Growth factors and apoptosis in acute renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; **7**: 419-424.
- 235 Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney Int* 2009; **75**: 674-676.
- 236 Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; **114**: 5-14.
- 237 Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol* 2007; **123**: 7-13.
- 238 Nankivell BJ *et al*. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2326-2333.
- 239 Seron D *et al*. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; **51**: 310-316.
- 240 Azuma H *et al*. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; **64**: 190-197.
- 241 Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 8729-8733.
- 242 Min JK *et al*. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-kappaB pathway. *Circ Res* 2005; **96**: 300-307.
- 243 Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F7-16.
- 244 Cruzado JM *et al*. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004; **53**: 1119-1127.
- 245 Wiggins KJ *et al*. Perindopril attenuates tubular hypoxia and inflammation in an experimental model of diabetic nephropathy in transgenic Ren-2 rats. *Nephrology (Carlton)* 2008; **13**: 721-729.
- 246 Chow FY *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006; **69**: 73-80.
- 247 Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **294**: F697-701.

