

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Las células dendríticas renales son necesarias para el desarrollo de Hipertensión Arterial en respuesta a Angiotensina II

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctorado en Farmacología:

PATRICIO ANDRÉS ARAOS SALAS

Director de Tesis: Dr. Luis Michea Acevedo

Santiago-CHILE

Julio 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado en Farmacología presentada por el candidato

PATRICIO ANDRÉS ARAOS SALAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Farmacología, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Luis Michea A. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Lavanderos G. _____

Dra. María Victoria Velarde A. _____

Dr. Javier Puente P. _____

Dr. Jorge Jalil M. _____

Dedicado a Matilda y Jessica

Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo a mi nueva familia, Jessica y Matilda, quienes en los últimos años se sumaron a mi camino de vida modificándola positivamente de manera radical. Con amor y mucha paciencia, Jessica ha sido con quien he compartido momentos de alegrías, tristezas y rabias (no tantos momentos) en lo cotidiano y en el ámbito científico encontrando en ella amor, sabiduría, y comprensión, muchas gracias por permitirme ser parte de tu vida, intento día a día demostrarte el amor y la alegría que me genera estar contigo.

Sin dudas el momento de mayor alegría ha sido la llegada de Matilda, quien revolucionó nuestras vidas y mantiene nuestro amor y atención *“Eight days a week”*. Hoy al termino de esta etapa, agradezco que estén a mi lado y comenzar otra aventura, pero como una gran familia junto a nuestra perra loca Mila.

Durante mi estadía en el laboratorio, he tenido la oportunidad de conocer muchas personas con quienes compartí gratos momentos y quisiera mencionarlos ya que de una u otra forma han participado en este largo proceso.

Daniel Hevia, Eugenia Fuentes (Kenita), Pablo Díaz (pájaro), Magdalena González (Mane), ustedes me recibieron en el laboratorio en mis inicios apoyando mis experimentos, discutiendo resultados, y por su puesto compartiendo momentos de vida fuera de lo laboral, muchas gracias por su amistad, consejos y palabras.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Diego Varela, les agradezco su buena onda y el ánimo de compartir un momento de esparcimiento fuera del laboratorio que fueron necesarios durante este largo camino.

En los últimos años pude conocer al Dr. Cristián Amador con quien desarrollé algunos experimentos de su proyecto que, de paso, permitieron estar hoy concluyendo mi doctorado. Sin embargo, hoy también agradezco mucho más tu apoyo y amistad.

En la parte técnica no puedo dejar de mencionar el apoyo del Dr. Rodrigo Alzamora quien siempre estuvo dispuesto a discutir resultados y transmitir sus conocimientos en el ámbito de la Fisiología. También debo destacar el importante

apoyo que he tenido de Macarena Rojas quien se ha encargado de ayudarme en la obtención de algunos resultados en esta tesis.

A Victor Barrientos, quien siendo hoy Dr. Barrientos, se ha convertido en un amigo dentro del laboratorio y con quien puedo contar en lo humano y en lo laboral, muchas gracias por tu apoyo en los momentos difíciles y por permitirme ser tu amigo.

A Eliana Pino (Señora Eli) y Francisco Alfaro (Panchito), quienes siempre han tenido un saludo cariñoso, una palabra de aliento, un comentario entretenido de la vida, una canción pegajosa, una discusión futbolística, una “sacada de vuelta”, ustedes han participado día a día en mi proyecto y les agradezco su alegría.

En la vida, fuera del laboratorio y de mi hogar, he tenido el apoyo y ayuda de otras personas que han entregado equilibrio a mi desarrollo como científico. Quisiera agradecer a mis padres, Cecilia y Patricio, mi hermano Felipe con su pareja Valery y mi sobrina Stefany, mis amigos del doctorado, Edi, Samir, Juanito, Javier y Pablo, a Los Patricio\$ (Edu, Felipe, Carlos y Claudio), a mis amigos de la vida, Ale, Pablo, Osvaldo, Cristobal, Calfún, Boris, David, Pablito y Krabian muchas gracias por ser ustedes y por apoyarme de distintas formas en este proceso.

Finalmente, quisiera agradecer a mi tutor, el Dr. Luis Michea. Primero, por darme la oportunidad de participar en su grupo de laboratorio y segundo por guiarme, “retarme”, aconsejarme y apoyarme en todos estos años a ser un mejor científico y lograr desarrollarme como un investigador. Muchas gracias por sus palabras y sabiduría, me llevo gratos momentos vividos durante mi estadía en su laboratorio como estudiante de doctorado, y espero en el futuro tener la dicha de colaborar con usted. Adicionalmente, quisiera agradecer a los proyectos Fondecyt 1130550 y 1171869 por haber financiado esta tesis.

Infinitas gracias a todos.

Índice

Resumen	9
Abstract	12
Introducción	15
1. Papel del Riñón en la regulación de la PA.....	15
2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) e hipertensión arterial.....	16
3. AngII y manejo renal del sodio en la HTA.....	18
4. RAS intrarenal y su efecto sobre la PA.....	18
5. Sistema inmune y HTA	19
6. Sistema inmune adaptativo en HTA.....	20
7. DCs y HTA	21
Hipótesis	24
Objetivo General	24
Objetivos específicos	24
Metodología	25
Resultados	40
1. Evaluar si la eliminación <i>in vivo</i> de DCs modifica el desarrollo de HTA, la modulación de la reabsorción renal de sodio y/o la reactividad vascular respuesta a la infusión de Angiotensina II.	40
2. Evaluar si la ausencia de DCs renales modifica la respuesta hipertensiva inducida por Angiotensina II.	59
3. Caracterizar el efecto <i>in vivo</i> de AngII sobre las DCs renales.....	71
Discusión	80
Referencias	94

Resumen

Aumentos de Angiotensina II (AngII) plasmática causan Hipertensión Arterial (HTA), inflamación y daño de tejidos blanco. Estudios recientes indican que el sistema inmune participa en la generación del aumento de presión arterial (PA) en respuesta AngII. El suministro de fármacos inmunosupresores que disminuyen el número y actividad de linfocitos, o la ausencia genética de linfocitos T (LT), previenen parcialmente desarrollo de HTA en respuesta AngII. Además, el bloqueo de la interacción entre células presentadoras de antígenos profesionales que controlan la diferenciación de LT, células dendríticas (DCs), y LT previene parcialmente el desarrollo de HTA en respuesta a AngII. Estudios de nuestro laboratorio mostraron que la eliminación de DCs previene el desarrollo de HTA inducida por dieta rica en sal y la infusión de AngII. Todos estos antecedentes sugieren que las DCs son necesarias para el desarrollo de HTA en respuesta a AngII. Sin embargo, nuestros estudios previos no permitieron establecer si el requerimiento de las DCs es debido al rol de la ingesta de sal como agente proinflamatorio, o bien si la acción de AngII como inductor de HTA requiere de las DCs. Además, considerando que el riñón presenta una abundante población DCs intersticiales y que citoquinas producidas por DCs modulan la actividad de transportadores del túbulo renal, es posible que DCs renales modifiquen la excreción urinaria de sodio regulando la función de las células tubulares. En consecuencia, la hipótesis de la presente tesis propone que las DCs renales son necesarias para el desarrollo de HTA en respuesta a AngII. El objetivo general fue estudiar si la presencia/ausencia de DCs renales modifica el desarrollo de HTA, la reabsorción de sodio renal y/o la reactividad vascular en respuesta a Angiotensina II.

Utilizamos ratones genotipo silvestre (WT) y genéticamente modificados (CD11c.DOG) que permiten la eliminación de DCs mediante la inyección de toxina diftérica (DT). Ambas cepas recibieron tres tipos de tratamiento (14 días; 6 grupos experimentales): Vehículo, AngII y AngII+DT. Realizamos estudios fisiológicos y moleculares en tejido cardiovascular y renal. Nuestros resultados muestran que la ablación de DCs en ratones CD11c.DOG previno el desarrollo de HTA en respuesta a la infusión de AngII. De acuerdo con los estudios fisiológicos, este efecto se asoció

a la preservación de la capacidad natriurética, particularmente a la menor reabsorción de NaCl en la rama gruesa del Asa de Henle. Además, se asoció a disminución en la abundancia del cotransportador sodio-potasio-cloruro-2 (NKCC2) de la rama gruesa del Asa de Henle y a la prevención en la inducción de transportadores de sodio del nefrón distal observada en los grupos de animales que sólo recibieron AngII (cotransportador de sodio y cloruro, NCC; Canal Epitelial de Sodio, ENaC). No encontramos diferencias en la función vascular de animales AngII al comparar grupos con vs. sin DCs. Posteriormente, para evaluar si las DCs renales (rDCs) vs. DCs esplénicas modulan la PA, realizamos transferencia adoptiva de DCs provenientes de animales WT tratados con vehículo o AngII. Observamos que la transferencia de rDCs de animales tratados con AngII causó el aumento de la PA (102.6 ± 2.9 (basal) hasta 123.3 ± 4.4 ; $P < 0.001$) 24h posterior a la transferencia, asociado a la disminución de la capacidad natriurética. El aumento de PA se mantuvo hasta el día 8. Estudios de marcaje de rDCs y seguimiento *in vivo* mostraron que las rDCs presentan destinación renal, independiente del tratamiento previo. Para probar si la acción inductora de aumento de la PA por rDCs de animales AngII requiere la presencia de LT realizamos la transferencia de rDCs AngII a ratones carentes de LT y LB (RAG1^{-/-}). Observamos que la transferencia de rDCs provenientes de animales tratados con AngII, no indujo un aumento en la PA en los animales receptores.

Finalmente, realizamos un estudio detallado del fenotipo de las rDCs provenientes de animales tratados con AngII, utilizando citometría de flujo para la detección de un panel de marcadores para células mieloides del sistema monocito/macrofágico y marcadores de actividad/maduración. En comparación a las rDCs de animales que recibieron infusión de vehículo, las rDCs de animales AngII mostraron inducción de los marcadores CD80, CD86, MHC-II. Mediante estudios moleculares encontramos que las rDCs presentaron aumento de la abundancia de transcritos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β , IL-23 e γ INF). El análisis del transcriptoma de las rDCs mostró cambios de abundancia de diversos transcritos con el tratamiento de AngII, que mediante análisis bioinformático pueden ser agrupados como moléculas pertenecientes a diversas funciones celulares. Estudios iniciales

(RT-PCR cuantitativo en tiempo real) en un grupo seleccionado de transcritos para proteínas que modulan la función del túbulo renal confirmaron los resultados ómicos.

Los resultados de esta tesis muestran que las DCs son necesarias para el aumento de la PA en respuesta a AngII. El aumento de AngII circulante produce un cambio fenotípico de las rDCs, que disminuyen la excreción urinaria de sodio. En el largo plazo, la acción inhibidora de la natriuresis de la AngII depende de las DCs, que son necesarias para que se modifiquen los niveles de expresión de transportadores de sodio de la membrana apical del túbulo renal. Este es el primer estudio que muestra que AngII, a través de la modulación del fenotipo de rDCs, modula la excreción urinaria de sodio y la PA.

Abstract

High Angiotensin II (AngII) plasma levels cause Hypertension (HBP), inflammation and target tissues damage. Recent studies indicate that the immune system participates in the generation of increased blood pressure (BP) in response to AngII. The administration of immunosuppressive drugs that decrease the number and activity of lymphocytes, or the genetic absence of T lymphocytes (LT), partially prevented AHT development in AngII infused rodents. In addition, blocking the interaction between professional antigen presenting cells that can modulate LT differentiation, dendritic cells (DCs), and LT partially prevented the development of HBP in response to AngII. Studies from our laboratory showed that the ablation of DCs prevented the development of HBP caused by high salt diet and AngII infusion. All these data suggested that DCs are necessary for the development of HBP in response to AngII. However, our previous studies did not allow us to establish if the requirement of the DCs is due to the role of salt intake as a proinflammatory agent, or if the action of AngII as an inducer of HBP requires DCs. In addition, considering that the kidney has interstitial DCs in abundance and that cytokines produced by DCs can modulate the activity of renal tubule transporters, it is plausible that renal DCs modify the urinary sodium excretion by modulating the function of renal tubule cells. Consequently, the hypothesis of this thesis proposes that renal DCs are necessary for the development of hypertension in response to AngII. The general objective was to study whether the presence/absence of renal DCs modifies the development of hypertension, renal sodium reabsorption and/or vascular reactivity in response to Angiotensin II.

We used genetically modified (CD11c.DOG) genotype mice that allow the ablation of DCs by diphtheria toxin (DT) injection and WT mice. Mice from both strains were allocated to one of three treatments (14 days, 6 experimental groups): Vehicle, AngII and AngII + DT. We performed physiological and molecular studies in cardiovascular and renal tissue. Our results showed that ablation of DCs in CD11c.DOG mice prevented the development of hypertension in response to AngII infusion. This effect was associated with the preservation of the natriuretic, particularly to a lower NaCl absorption in the thick ascending limb of the Henle's loop.

In addition, preserved natriuresis associated with lower abundance of the sodium-potassium-chloride cotransporter-2 (NKCC2) from the thick ascending limb of the Henle's loop and the prevention of the induction of distal nephron NaCl transporters that was observed in animals that received AngII only (sodium and chloride cotransporter, NCC; Sodium Epithelial Channel, ENaC). We did not find differences in vascular function of AngII animals when comparing groups with or without DCs. Subsequently, to evaluate whether renal DCs (rDCs) vs. Splenic DCs modulate BP, we performed adoptive transfer of DCs from WT animals treated with vehicle or AngII. We observed that rDCs transfer from AngII-treated animals increased BP (102.6 ± 2.9 (basal) to 123.3 ± 4.4 , $P < 0.001$) 24h after transfer, which was associated with lower natriuretic capacity. The increase in BP was maintained until day 8. Studies of rDCs labeling and in vivo follow-up showed that the rDCs present renal destination, independent of previous treatment. To test whether the increase in BP by rDCs from AngII mice required the presence of T cells, we transferred rDCs from AngII mice to mice lacking T and B cells (RAG1^{-/-}). We observed that the transfer of rDCs from animals treated with AngII did not induce an increase in BP in the recipient animals.

Finally, we conducted a detailed study of the phenotype of rDCs from animals treated with AngII, using flow cytometry with myeloid cells markers (monocyte/macrophage system) and activity/maturation markers. Compared to the rDCs from mice that received vehicle infusion, the rDCs of AngII-mice showed higher levels of CD80, CD86 and MHC-II. The transcriptome analysis of the rDCs showed that the treatment with AngII modified the abundance of several transcripts, which can be grouped by bioinformatic analysis as molecules belonging to several cell functions. Initial studies (quantitative RT-PCR in real time) in a selected group of transcripts for proteins known to modulate renal tubule function confirmed the omic results. The first molecular studies showed that AngII-rDCs had an increased in the abundance of pro-inflammatory cytokine transcripts (IL-6, IL-1 β , IL-23 and γ INF).

The results of this thesis show that DCs are necessary for the increase of BP in response to AngII. The increase of circulating AngII produces a phenotypic change of the rDCs, which decrease the urinary sodium excretion. In the long term, the

inhibitory action of AngII natriuresis depends on the DCs, which are necessary for modifying the expression levels of sodium transporters of the apical membrane of the renal tubule. This is the first study showing that AngII modulates the urinary excretion of sodium and PA through the modulation of the rDCs phenotype.

Introducción

La hipertensión arterial (HTA) es el principal factor de riesgo cardiovascular, y afecta al 26% de la población mundial¹. La prevalencia de HTA aumenta con la edad, presentándose aproximadamente en el 50% de las personas mayores de 50 años². La prevalencia de HTA en Chile es cercana al 28% en la población > 15 años HTA [ENS 2016-2017], y recientemente en la revista internacional *The Lancet* se comunicó que Chile se encuentra dentro del grupo de países con mayor prevalencia de HTA a nivel mundial².

Desde un punto de vista hemodinámico, la presión arterial (PA) es el producto del gasto cardíaco y la resistencia periférica total^{3,4,5}. Estos dos componentes están bajo la influencia de múltiples factores fisiológicos, que son regulados por mecanismos de retroalimentación neuro-endocrinos, que actúan sobre el sistema cardiovascular y el riñón.

Papel del Riñón en la regulación de la PA

Guyton y otros han demostrado que la HTA,^{3,6} se desarrolla como resultado del aumento del gasto cardíaco y/o la resistencia periférica total (RPT).⁷ Estos estudios también mostraron que el riñón juega un papel central en la producción de HTA, ya que el aumento en la excreción urinaria de NaCl y agua causado por el tratamiento con fármacos diuréticos permite el control de la HTA. Debido a que la excreción urinaria de NaCl y agua permiten el control de la volemia y el gasto cardíaco, ha sido postulado que en diversos tipos de HTA la disminución de la capacidad natriurética es un factor central en la mantención de cifras de PA elevadas. Según Guyton y cols., el riñón sano posee la capacidad de ajuste de la natriuresis frente a cambios de la ingesta de NaCl, con una ganancia infinita³. De acuerdo con esta hipótesis, frente a variaciones del aporte dietario de NaCl y libre acceso al agua para ingesta, la excreción urinaria de NaCl aumenta proporcionalmente, de modo de mantener la volemia constante. Este ajuste de la excreción urinaria de NaCl y agua en respuesta a cambios de la ingesta permite mantener los niveles de PA media en su punto de equilibrio, ≈ 100 mmHg. Así, en condiciones normales la curva de PA vs. ingesta/excreción urinaria de NaCl es casi vertical, con pendiente (ganancia) casi infinita (Figura 1). En contraste, la HTA es una

condición en que disminuye la capacidad del riñón de excretar NaCl, lo que causa la expansión de la volemia y el aumento de la PA como consecuencia de los aumentos de la ingesta de NaCl de la dieta. Es decir, la ganancia de la curva PA vs. ingesta/excreción urinaria de NaCl disminuye, lográndose el equilibrio de excreción urinaria de NaCl en función de la ingesta a valores de PA mayores a 100 mmHg (Figura 1).^{3, 6, 8, 9}

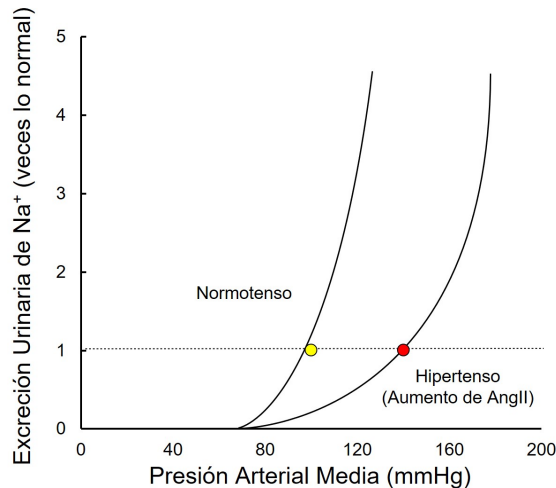


Figura 1. Curva natriuresis presión. Representación de la curva presión natriuresis para pacientes normotensos (amarillo) y pacientes hipertensos (rojo).

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) e hipertensión arterial

Aunque los mecanismos hemodinámicos que determinan la HTA son conocidos, en la mayor parte de los pacientes hipertensos no se logra identificar la etiología de la HTA. Entre los mecanismos hormonales que controlan la presión arterial se destaca el sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS).¹⁰ Estudios básicos y clínicos han demostrado que la inhibición farmacológica del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (RAAS) permite controlar la HTA, por lo que la inhibición farmacológica de los componentes del RAAS es ampliamente utilizada como estrategia terapéutica en pacientes con HTA esencial. Además, el efecto de los antagonistas del RAAS sugiere que, en relación a la volemia y niveles de PA, los pacientes hipertensos presentan una actividad inadecuada del RAAS.

El RASS es el principal regulador del volumen intravascular. Se activa de forma fisiológica por descensos de la PA o por baja del volumen circulante efectivo¹¹. La cascada del RAAS comienza por la biosíntesis de Renina en las células yuxtglomerulares de la arteriola aferente del glomérulo. Caídas en la PA, disminución de la cantidad de NaCl a las células de la mácula densa y/o la estimulación simpática, inducen la secreción de renina. La renina es una proteasa que produce Angiotensina I (Ang I) a partir del Angiotensinógeno (AGT), una glicoproteína proveniente del hígado. El decapeptido de Ang I es convertido en Angiotensina II (AngII), un octapéptido, por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) de tipo 1¹²⁻¹⁴.

Las acciones de AngII en sus tejidos diana dependen de su unión al receptor de tipo 1 y 2 (AT₁R y AT₂R, respectivamente). La activación del receptor de tipo 1 causa vasoconstricción, secreción de aldosterona desde la zona glomerulosa de la suprarrenal, reabsorción de sodio en distintos segmentos del túbulo renal entre otras. Por otra parte, la unión de AngII al AT₂R causa efectos antagónicos, como vasodilatación^{12, 15}. En el ser humano y en los roedores adultos existe un predominio de expresión de AT₁R en los tejidos, lo que explica el efecto pro-hipertensivo de AngII.

Los estudios de trasplante con riñones provenientes de animales genéticamente modificados permitieron probar la hipótesis de Guyton y evaluar la importancia de la activación de receptores de AngII renales para el desarrollo de HTA^{16,17, 18,19,20}. La ausencia de AT₁R renal confiere protección contra el desarrollo de HTA inducido por AngII: a la inversa, el trasplante de un riñón de un animal WT a un animal KO AT₁R restablece la respuesta hipertensiva al infundir AngII²¹. Estos resultados muestran que células renales (nefronales y/o no-nefronales) son efectoras de AngII, necesarias para la respuesta hipertensiva. Sin embargo, la ubicuidad del AT₁R en las células renales junto con sus complejas relaciones funcionales han dificultado la identificación de los componentes principales que median la HTA en respuesta a AngII.

AngII y manejo renal del sodio en la HTA

En el riñón, AngII genera vasoconstricción en las arteriolas aferentes y eferentes del glomerulo vía AT_{1R} , estimulando además la contracción mesangial. La infusión de AngII en altas dosis reduce el flujo sanguíneo renal y aumenta la resistencia vascular ²². A nivel tubular, la infusión crónica de AngII estimula el transporte de sodio en el túbulo proximal vía del intercambiador sodio/ H^+ (NHE3), el intercambiador Na^+/HCO_3^- basolateral y la bomba Na^+/K^+ ATPasa basolateral, por activación AT_{1R} . ^{10, 23, 24, 25, 26, 27} Aunque es controversial, algunos estudios muestran que la infusión crónica de AngII aumenta la abundancia del cotransportador sodio/potasio y 2 cloruro (NKCC2) en el asa de Henle, así como también, su fosforilación (indicador de actividad) ²⁸. En el nefrón distal, AngII induce un aumento en la actividad del cotransportador Na-Cl (NCC) en la membrana apical, vía AT_{1aR} . ^{29, 30, 28, 31}. Además, ratones carentes de AT_{1aR} , presentan una disminución en la abundancia de la subunidad alfa del Canal Epitelial de Sodio ($\alpha ENaC$) del túbulo colector, aunque presentan niveles circulantes normales de Aldosterona. Estos resultados sugieren que la señalización AT_{1aR} modula los niveles de $ENaC$ ³². Sin embargo, la eliminación específica del AT_{1aR} en el túbulo colector no disminuyó la abundancia de las subunidades de $ENaC$ ^{33, 34}. Finalmente, estudios recientes muestran que AngII también induce el intercambiador apical cloruro/bicarbonato del túbulo colector (Pendrina), tanto en células intercaladas tipo B y las No A-No B, aumentando la reabsorción de Cl^- ³⁵.

RAS intrarenal y su efecto sobre la PA.

Adicionalmente al sistema RAAS clásico, se ha descrito la presencia de un RAAS intrarrenal (iRAS) donde se encuentran todas las proteínas que conforman el RAAS sistémico ^{36, 16, 37, 38, 36}. Basta la activación inadecuada del iRAS para producir HTA, incluso con actividad del RAS sistémico normal ^{37,39, 40}. Además de la AngII circulante, la AngII generada de manera local (intra-renal) actúa sobre las células del túbulo renal, estimulando el transporte de sodio^{10,41}. La AngII renal se genera a partir de AGT proveniente del hígado y de AGT producido localmente por las células del túbulo proximal^{42 43,44}. La actividad del iRAS regula la hemodinamia renal y aumenta la reabsorción tubular de NaCl ^{45, 46}.

La evidencia actual indica que en la HTA inducida por AngII hay una inadecuada activación del sistema iRAS AT₁R-dependiente^{41, 47,48}. El aumento de AngII renal causado por la infusión de AngII es prevenido por bloqueadores del AT₁R¹⁰. Además de AngII, el AGT intra renal aumenta por la infusión de AngII^{41, 49, 50}. Tanto el incremento renal de AGT como la activación renal de ACE parecen ser necesarios para la caída de la natriuresis en la HTA dependiente de Ang II^{29, 37, 41-43}. Primero, en ratones transgénicos que sobre expresan AGT en el epitelio de las células del túbulo proximal desarrollan HTA sin cambios en el RAS sistémico⁴⁸. La mayor expresión de AGT renal después de la infusión de AngII también puede ser prevenida bloqueando los AT₁R^{50, 51}.

En resumen, los antecedentes disponibles muestran que el desarrollo de HTA en respuesta a AngII implica una disminución de la excreción urinaria de NaCl. La disminución de la natriuresis causada por AngII depende de la activación de AT₁R renales y el aumento de la actividad del iRAS. AngII modula la filtración glomerular, y la activación del iRAS y/o AngII circulante llevarían al aumento de actividad de transportadores de NaCl en diversos segmentos tubulares. Sorprendentemente, estudios de los últimos 10 años por grupos internacionales y nuestro grupo, muestran que el sistema inmune también participa en el desarrollo de HTA en respuesta a la infusión de AngII.

Sistema inmune y HTA

La idea de la participación del sistema inmune en la HTA, se remonta a los estudios de Grollman y White, que muestran que el uso de inmunosupresores disminuye la PA en ratas con infarto renal parcial⁵². En los siguientes años, se observó que ratas infundidas con AngII presentaron una marcada reacción inflamatoria de los vasos sanguíneos, predominantemente producto de la reacción de células mononucleares⁵³. El mismo grupo describió que la transferencia de esplenocitos provenientes de ratas hipertensas inducidas por DOCA-Sal, hacia ratas normotensas receptoras aumenta la PA⁵⁴. Por otro lado, Ba et al. demostraron que el trasplante de timo desde ratas Wistar-Kyoto disminuye la PA en ratas receptoras espontáneamente hipertensas (SHR)⁵⁵.

Sistema inmune adaptativo en HTA

Estudios realizados desde los años 60 han evidenciado que la inmunidad adaptativa y los LT participan en la HTA ⁵⁶. Por ejemplo, animales inmunodeficientes no desarrollan HTA en respuesta a mineralocorticoides, y la transferencia de células mononucleares obtenidas de nódulos linfáticos de ratas hipertensas causa HTA en ratas sanas receptoras⁵⁷. Estudios más recientes han demostrado que ratones que carecen de Linfocitos T (LT) y Linfocitos B (LB) maduros (RAG1^{-/-}) son resistentes al desarrollo de HTA en respuesta al tratamiento con AngII ^{58,59}, y la transferencia adoptiva de LT, pero no de LB, a los animales RAG1^{-/-} restablece la respuesta hipertensiva y el desarrollo de daño vascular inducido por la infusión con AngII ⁵⁸.

Los modelos experimentales y algunos estudios en pacientes han implicado la respuesta Th1 y Th17 en el desarrollo de HTA ⁶⁰⁻⁶¹. Animales KO para IL-6 presentan respuesta hipertensiva disminuida a la infusión crónica de AngII ^{62,63}. LT Th17 han sido implicados en el desarrollo de autoinmunidad ^{64, 65}, HTA, producción de superóxido y el reclutamiento de leucocitos proinflamatorios y profibróticos ⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁹. Ratones IL-17^{-/-} presentan menores niveles de presión arterial frente a infusión AngII y dieta rica en sal. Además, a diferencia de los ratones WT, los KO de IL-17 no presentaron aumentos en los niveles de anión superóxido a nivel vascular, aumento de LT infiltrantes o deterioro de la función endotelial en respuesta a la infusión de AngII ⁷⁰. En ratas hipertensas por AngII+ dieta rica en sal, el uso de inhibidores de la ECA y bloqueadores del AT₁R previene la generación de Th17 autoreactivos ⁷¹.

Además, se ha demostrado que la HTA experimental se asocia a una disminución de los mecanismos antiinflamatorios del SI. Los LTreg se encuentran disminuidos en ratas hipertensas sensibles a la ingesta sal (modelo Dahl SS) ⁷², así como también en roedores hipertensos inducidos con AngII y mineralocorticoides⁷³. ⁷⁴. Además, el bloqueo AT₁R favorece el aumento de Treg en HTA experimental⁷¹.

El desarrollo de un estado sub-inflamatorio crónico, caracterizado por la activación Th1, Th17 y la inhibición de la función Treg, sugieren que las DCs cumplen un rol inmunomodulatorio en la HTA en respuesta a AngII.

DCs y HTA

El riñón sano es un tejido no-linfoide rico en células dendríticas que generan una red de vigilancia en el espacio intersticial ^{75,76}. La literatura disponible ha descrito las DCs renales en base a sus marcadores de superficie y localización en el tejido renal, y actualmente se acepta que el riñón posee DCs heterogéneas ⁷⁷. Las DCs renales presentan marcadores de superficie como MHC-II⁺, CD11c⁺, F4/80⁺, CD11b⁺, CX₃CR₁⁺ y CD8⁻ entre otros ⁷⁷⁻⁷⁹. En cuanto a su morfología, las DCs renales CD11c⁺ (Marcador de superficie clásico para DCs murinas) y F4/80⁺ presentan forma estrellada clásica en médula; mientras que en el mesangio no se encuentran normalmente células CD11c⁺, y las células MHC-II⁺ presentan una forma globular y han sido consideradas precursoras de DCs renales ⁸⁰, no obstante lo anterior, *Brähler* et al, recientemente describieron 2 subtipos de DCs, DCs clásicas o mieloides con los marcadores de superficie; MHC-II⁺/CD11c⁺/CD64^{Low}/F4/80^{Low}/CD11b⁺, y DCs plasmocitoides con los marcadores de superficie; MHC-II⁺/CD11c⁺/CD64^{Low}/F4/80^{Low}/CD103⁺, las cuales, compartirían un factor de transcripción llamado *Zbtb46*, dando lugar a una mejor descripción de DCs en el riñón ⁸¹. Las DCs renales pueden migrar a nódulos linfáticos y activar mecanismos proinflamatorios a nivel intersticial, mediante el reconocimiento de antígenos y la posterior estimulación de LT ⁷⁸. Se ha observado que estos procesos serían dependientes de un receptor de quimioquina CX₃CR₁ (receptor de fractalkina), presente en DCs. Además, se cree que este receptor permitiría el *homing* renal a las DCs ^{82, 83}.

Uno de los primeros estudios que identificó la participación de las DCs en la HTA fue el estudio de Vinh y cols., que mostraron que el bloqueo farmacológico y la ablación genética de la sinapsis inmunológica (interacción entre moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en las DCs con el co-receptor CD28 del LT), previene parcialmente la HTA inducida por AngII en ratones WT⁸⁴. Recientemente, Kirabo y cols., han demostrado que las DCs participan en el mecanismo de mantención de HTA, debido a la presentación de un neoantígeno a los LT ⁸⁵. Estos neoantígenos se generan debido a un aumento de la producción de superóxido y la peroxidación

lipídica ⁸⁶ y podrían ser generados al interior de las DCs o bien ser captados por las DCs desde los tejidos ^{85, 86}.

Como iniciadoras de una respuesta inmune adaptativa, pensamos que las DCs renales podrían tener un papel etiopatogénico primario en el desarrollo de HTA^{75, 77, 87}. La HTA inducida por infusión de AngII provoca un aumento en la expresión CD86 en DCs ⁸⁴, lo que indicaría la activación y maduración de las DCs. En este mismo trabajo, el bloqueo de la interacción CD86/CD28 redujo la HTA inducida por DOCA-sal y AngII, mientras que animales KO para B7 (CD80 CD86) son resistentes a la generación de HTA inducido por AngII⁸⁴. También sabemos que las DCs favorecen el desarrollo de polarización linfocitaria de Th17 en respuesta a aldosterona, sugiriendo que hormonas del RAAS pueden modular la función de las DCs⁸⁸.

Estudios recientemente publicados por nuestro laboratorio mostraron que la eliminación de DCs (células mieloides CD11c^{high}), previene la HTA, la inflamación y el daño en tejido blanco, en ratones que reciben la infusión de AngII y una dieta rica en sal. Más aun, la eliminación de DCs después de 14 días del establecimiento de HTA por AngII+dieta rica en sal también permite normalizar la presión arterial, aun en presencia de la infusión de AngII y dieta rica en sal. El efecto de la eliminación de las DCs se asoció a la mantención de la capacidad natriurética renal, y a la normalización del perfil de expresión de diversos transportadores de sodio del túbulo renal. Estos resultados demostraron que las DCs son necesarias para el desarrollo de HTA por AngII+sal. Sin embargo, nos llevaron a plantearnos una serie de interrogantes: ¿el papel de las DCs es dependiente de la presencia del mayor aporte de sal en la dieta, o es una característica de la respuesta a la AngII?; dado que el riñón es un tejido rico en DCs, ¿es la eliminación de DCs sistémicas y/o la eliminación de DCs renales la causa de la pérdida de la acción prohipertensiva de AngII+sal (o AngII)?; ¿La modificación de la abundancia de transportadores de NaCl tubulares en respuesta a AngII, sin aumento de la sal dietaria, requiere de la presencia de DCs?; ¿el tratamiento prohipertensivo con AngII y/o AngII+sal produce una modificación fenotípica de la DCs estable y suficiente para inducir aumentos de

la PA?. En consecuencia, esta tesis representa un segundo paso para poder aproximarnos a entender los mecanismos que explican el papel de las DCs en el desarrollo de HTA en respuesta a la infusión de AngII.

Hipótesis

Las células dendríticas renales son necesarias para el desarrollo de HTA en respuesta a Angiotensina II.

Objetivo General

Estudiar si la presencia/ausencia de células dendríticas renales modifica el desarrollo de HTA, la reabsorción de sodio renal y/o la reactividad vascular en respuesta a Angiotensina II.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar si la eliminación *in vivo* de DCs modifica el desarrollo de HTA, la modulación de la reabsorción renal de sodio y/o la reactividad vascular respuesta a la infusión de Angiotensina II.
2. Evaluar si la ausencia de DCs renales modifica la respuesta hipertensiva inducida por Angiotensina II.
3. Caracterizar el efecto *in vivo* de AngII sobre las DCs renales

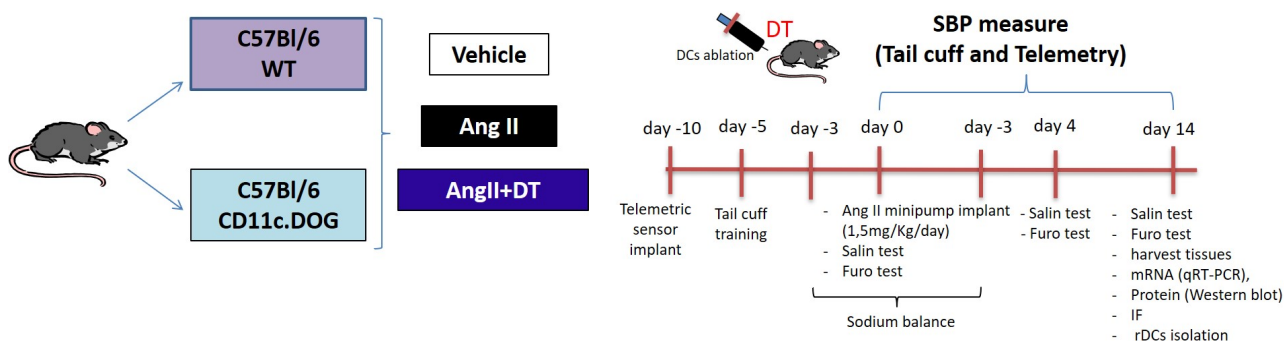
Metodología

Animales y Tratamientos Hipertensivos

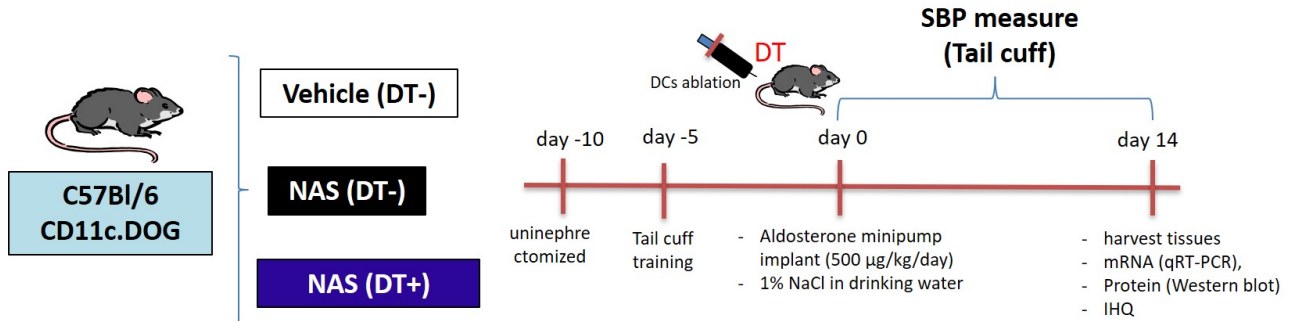
En este estudio se utilizaron ratones machos de la cepa C57Bl/6, genotipo silvestre (WT) y CD11c.DOG, de 9-12 semanas.

Los ratones CD11c.DOG son ratones genéticamente modificados que expresan el receptor humano de la toxina diftérica (DTR) bajo el control del promotor CD11c. Por lo tanto, aquellas células que expresen CD11c, como las DCs, expresarán también el DTR y serán sensibles a la administración de toxina diftérica (DT). La unión de la DT a su receptor inhibe la síntesis de proteínas, siendo citotóxica al punto que sólo una molécula de DT es suficiente para eliminar una célula⁸⁹. De acuerdo con el trabajo de Hochweller y col y nuestro estudio previo⁹⁰, para eliminar las células CD11c^{high}, en los animales CD11c.DOG, se les administraron 8 ng/g peso corporal de DT diariamente durante 14 días (Sigma, St Louis, MO).

Esquema del diseño experimental Animales infundidos con AngII



Esquema del diseño experimental Animales infundidos con Aldosterona



Infusión de Angiotensina II.

Para la infusión continua de Ang II se utilizaron mini bombas osmóticas (Alzet, DURECT Corporation, Cupertino, CA), implantadas en el tejido subcutáneo de la región dorsal de la región interescapular. Brevemente, los ratones WT y CD11c.DOG fueron anestesiados mediante inhalación continua de Isoflurano 2% en oxígeno puro (300 mL/min, mascarilla nasal). Mediante técnica aséptica se implantó una mini bomba por animal, cargada con solución 150 mM NaCl y 1mM ácido acético (grupo control) o esta misma solución más Angiotensina II (grupo Ang II; GL Biochem, Shanghai). La dosis de Ang II suministrada fue de 1,5mg/Kg/día, durante 14 días. La eutanasia y recolección de las muestras de tejido y sangre se realizó al completar 14 días de infusión.

Infusión de Aldosterona.

A los animales CD11c.DOG, se les realizó una uninefrectomía lateral izquierda, y posterior a 10 días de la operación, se les infundió Aldosterona + NaCl 1% en el agua de bebida⁹¹. Para la infusión continua de Aldosterona se utilizaron mini bombas osmóticas (Alzet, DURECT Corporation, Cupertino, CA), implantadas en el tejido subcutáneo de la región dorsal de la región interescapular. El implante de la mini bomba se realizó como se mencionó anteriormente, cargada con solución de PBS

(grupo Vehículo (DT-)) o esta misma solución más Aldosterona (Sigma-Aldrich) (grupo NAS (DT-)). Para la ablación de DCs, se inyectó la DT en igual dosis y tiempo que los animales AngII, (grupo NAS (DT+)). La dosis de Aldosterona suministrada fue de 500µg/Kg/día, durante 14 días. La eutanasia y recolección de las muestras de tejido y sangre se realizó al completar 14 días de infusión.

Medición de Presión Arterial

Manguito en la cola:

La presión arterial sistólica (PAS) fue medida por el método del manguito en la cola (*tail cuff*), en animales conscientes. Previo al inicio de los estudios, los ratones fueron entrenados durante una semana. Se realizaron las determinaciones de PAS utilizando un transductor de onda de pulso en la cola, conectado a conversor análogo digital (PowerLab 4/30 ADInstrument CO). El análisis de los registros de la onda de pulso y de presión del manguito se realizó con el programa LabChart Reader (ADInstrument CO): brevemente, una vez que el animal está en el cono de restricción de movimiento, la cola se ajusta al sensor de pulso, observándose la onda de pulso en el monitor; al momento de apretar el manguito, se genera un aumento de presión sobre la vena de la cola, apareciendo una curva de presión y la desaparición transitoria de la onda de pulso; a medida que quitamos aire del manguito, la PA comienza a caer al igual que la curva de PA hasta que aparece nuevamente la onda de pulso, momento en el cual se registra cual es la PA. Se realizaron las mediciones de PAS necesarias según el protocolo de estudio, como se indica en la sección resultados y en las figuras.

Telemetría:

A los ratones CD11c.DOG se les implantará un sensor telemétrico para medición de PA (sistólica, diastólica y media) y frecuencia cardíaca. El sensor telemétrico consta de un catéter pre-llenado con solución anticoagulante conectado a un transductor de presión (sensor) con transmisor de radiofrecuencia subcutáneo (sensor telemétrico de presión arterial, DSI, modelo PA-C10, Dinamarca). Los registros telemétricos se realizan ubicando la jaula que contiene al animal en

proximidad del radio-receptor, el que, a su vez, está conectado a un computador con software de propósito específico (DSI, Dinamarca). La implantación del catéter en la arteria carótida común izquierda, con lumen abierto hacia cayado aórtico permite el registro de presión arterial en tiempo real, en animales conscientes, sin manipulación por parte de experimentador humano. El estudio de la onda de presión permite además medir la frecuencia cardíaca (frecuencia de presión aórtica máxima). Los sensores se implantaron 5-7 días antes del inicio de los estudios (previo a implante de min-bomba osmótica), y se mantuvieron implantados hasta el día de término del protocolo. Brevemente, la implantación del catéter se realizó, mediante abordaje cervical anterior y disecando la carótida izquierda (15 mm paratraqueal) con bisturí n°10, disecando por plano y posteriormente disección roma con pinza quirúrgica fina n°5 (para minimizar traumatismo tisular y respetando el nervio vago); la que se ocluyó por debajo de la bifurcación. Se realizó canulación de la carótida común izquierda con catéter conectado a transductor de presión/radiotransmisor (DSI, Dinamarca). Se introdujo el catéter 0,9 cm y se aseguró con nudos de sutura. Se implantó el sensor/radiotransmisor en el flanco ventral posterior izquierdo, en plano subcutáneo mediante disección roma, aprovechando sitio de incisión cervical, finalizando con cierre por planos de la herida cervical.

Balance de sodio

Previo al inicio de los estudios, los animales WT y CD11c.DOG fueron habituados a la jaula metabólica durante tres días, periodo en el que tuvieron libre acceso al agua y comida. El inicio de la recolección de orina comenzó 3 días antes (día -3) de la implantación de la mini bomba osmótica y la administración de DT, para el caso de los animales CD11c.DOG, y concluyó al día 3 post implantación de la mini bomba. Las muestras recolectadas (día -3 al día 3) corresponderán a la orina emitida por un animal (jaula exclusiva) en un periodo de 24 h. Se registró el volumen total de orina emitida en el periodo y la concentración de electrolitos urinarios (Na^+ , K^+) mediante fotometría de llama (Instrumentation Laboratory, modelo 943, Italy). Con estos datos se calculó la natriuresis (excreción urinaria de sodio, en μEq de sodio/g

de peso del animal/24h). Además, se registró diariamente el consumo de alimento y agua de cada uno de los sujetos experimentales.

Test Salino

Para evaluar la capacidad natriurética frente a una carga aguda de sodio y agua los animales WT y CD11c.DOG fueron sometidos a test salino. Esta prueba consiste en una sobrecarga aguda de volumen (NaCl y agua) extracelular e intravascular, que es excretada principalmente por disminución de la reabsorción de sodio del túbulo proximal y el Asa de Henle. A cada animal se le inyectó solución NaCl 0.9% (p/v) a 37°C por vía i.p, en un volumen=10% del peso corporal. Inmediatamente posterior a la inyección se trasladó al ratón a una jaula metabólica, sin comida ni agua. Se recolectó la orina durante 4h y posteriormente el animal fue transferido a su jaula habitual (Uni-Cage). Se registró el volumen total de orina emitida en el periodo y la concentración de electrolitos urinarios (Na⁺, K⁺) mediante fotometría de llama (Instrumentation Laboratory, modelo 943, Italy). Con estos datos se calculó la natriuresis (excreción urinaria de sodio, en μEq de sodio/g de peso del animal/4h). Para caracterizar los cambios en la capacidad natriurética causados por la infusión de Ang II en animales WT y CD11c.DOG, se realizaron test salinos previo al implante de la mini bomba osmótica (basal), el día 4 y 14 posterior a la implantación.

Test Furosemida

Animales CD11c.DOG fueron sometidos a test furosemida (Test Furo), para evaluar la actividad *in vivo* del NKCC2. A cada animal se le inyectó solución Furosemida (Lab. Sanderson S.A; ampolla de 20 mg/mL) en dosis de 20 mg/Kg del peso del animal, vía i.p. Inmediatamente posterior a la inyección se trasladó al ratón a una Jaula metabólica, sin comida ni agua. Se recolectó la orina durante 2h y posteriormente el animal fue transferido a su jaula habitual (Uni-Cage). Se registró el volumen total de orina emitida en el periodo y la concentración de electrolitos urinarios (Na⁺, K⁺) mediante fotometría de llama (Instrumentation Laboratory, modelo 943, Italy). Con estos datos se calculó la natriuresis (excreción urinaria de sodio, en

μEq de sodio/g de peso del animal/2h). Para caracterizar los cambios en la función del NKCC2 causados por la infusión de Ang II y la eliminación de DCs en animales CD11c.DOG, se realizó el test Furo previo al implante de la mini bomba osmótica (basal), el día 4 y 14 posterior a la implantación.

Estudios de reactividad arterial (aorta)

Luego de la eutanasia, se extrajo la sección descendente de la aorta torácica, mediante disección quirúrgica cuidadosa, evitando la manipulación (excepto extremos distales del segmento arterial). La sección aórtica (20 mm longitud) se traspasó a una placa de petri con buffer Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) a 37°C (KCl 4.2 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, NaCl 120 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 1.3 mM, Glucosa 5 mM, Na_2CO_3 25 mM y Piruvato 1.2 mM). Se lavó y limpió el segmento aórtico para eliminar la grasa adventicial y sangre. Para los registros de desarrollo de tensión isométrica, se cortaron anillos aórticos de 3-5 mm de longitud, que fueron montados en ganchos de acero inoxidable, anclados a baño con chaqueta de agua (37°C, termorregulada por perfusión a baño de circulación continua), con perfusión interna continua. El gancho superior fue anclado al transductor de fuerza, el cual está conectado a un conversor análogo-digital, para el registro de tensión. Las señales de salida del amplificador se registraron con un sistema de adquisición de datos (LabChart Reader, ADInstrument CO). Los anillos intactos (con endotelio) fueron equilibrados en el baño de tejido (37°C y gas carbógeno 95% O_2 -5% CO_2). Luego de un periodo de estabilización (tensión basal = 1.5 mg), se comprobó la viabilidad de la preparación mediante contracción evocada por solución despolarizante por 3 minutos (KCl 70 mM en KRB modificado, isotónico). Luego se realizaron los ensayos de respuesta vascular (contractilidad) a agonista alfa-adrenérgico (Fenilefrina) y la respuesta vasodilatadora frente a Carbacol (liberador NO endotelial), y nitroprusiato de sodio (donante de NO).

Obtención de Células dendríticas

Se obtuvieron DCs a partir de tejido renal y de Bazo, mediante digestión enzimática del tejido, seguida por aislamiento con microesferas magnéticas anti-

CD11c (selección positiva) a partir de la suspensión de células renales y esplénicas. Luego de sacrificar al ratón, se extirpó el riñón y el bazo, se lavaron con PBS y el riñón se descapsuló. Se realizó la digestión enzimática con 0,25 mg/mL de DNAasa I (AppliChem, Alemania) y 1 mg/mL de Colagenasa IV (Invitrogen) disuelto en RPMI y se incubaron a 37°C durante 45 min. Luego de la digestión de los tejidos, la suspensión celular, se filtró por una membrana porosa de 40 µm (Falcon), y se centrifugó 5 min a 1800 rpm y el pellet fue lavado con ACK (Ammonium-Chloride-Potassium buffer) para eliminar los glóbulos rojos. Luego del lavado, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS 1X. La suspensión celular fue llevada a columnas de empaquetamiento y mediante separación magnética se obtuvieron células CD11c⁺ (selección positiva, sistema MACS®). Brevemente, las células mononucleares fueron incubadas con bolitas de acero conjugadas a un anticuerpo anti-CD11c (microesferas anti-CD11c) y luego se eluyó las células CD11c⁻ lavando la columna de microesferas adheridas por campo magnético constante. De esta forma, en la columna permanecieron unidas a las microesferas magnéticas las células CD11c⁺. Luego, se eluyó las DCs con solución tampón isotónico del *kit*. Las cuales fueron evaluadas por citometría de flujo (viabilidad, mediante marcación con Zombie Aqua™ (Biolegend), pureza mediante la evaluación de la fracción positiva post columna, con marcación de superficie MHC-II y CD11c, y fenotipo evaluando marcadores de superficie clásicos de maduración como MHC-II, CD80 y CD86). Las DCs esplénicas y renales fueron caracterizadas (ver sección siguiente) y se utilizaron para realizar experimentos de transferencia adoptiva, para la extracción de RNA total y estudios de transcriptoma.

Caracterización de DCs

Las DCs fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: α-CD45 (clon 30-F11) conjugado a Pe-Cy7, α-MHC-II (clon M5/114.15.2) conjugado con PerCP, α-CD80 (clon 2D10.4), α-CD86 (clon HB15e), conjugados con PE; y α-CD11c (clon N418) conjugado con APC, todos de BD Pharmingen, y CX3CR1 (clon SA011F11) conjugado a PE, Biolegend. Las Células fueron teñidas durante 20 min en agitación a

4°C en oscuridad. Luego se lavó con PBS y se centrifugarán a 2400 rpm. Las células serán fijadas con p-formaldeído al 1%. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo (FACS Canto; BD Pharmingen), los datos obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo versión 7.6.1.

Transferencia Adoptiva de DCs y seguimiento de la PAS

DCs obtenidas *ex vivo* (desde riñones y Bazo de animales WT sanos e Hipertensos) fueron obtenidas de igual forma como se mencionó anteriormente. Una vez que se obtuvieron las células, estas fueron inyectadas a través de la vena de la cola a animales WT sanos, en cantidades de 1×10^6 células/120 μ L/ inyección. Luego de la inyección, se registró la PAS durante los siguientes 4 días, día 6, 8 y 14 mediante el manguito en la cola, en animales previamente entrenados.

Seguimiento de DCs in vivo

Par lograr el seguimiento *in vivo* de DCs después de transferencia adoptiva (inyección en vena de la cola) se realizó tinción con un fluoróforo que emite en la región de rojo lejano del espectro electromagnético, y análisis de imágenes de animal completo y tejidos aislados al fin del seguimiento. Brevemente, las DCs purificadas mediante microesferas magnéticas anti-CD11c a partir de riñones de animales control (infusión vehículo) o tratados por 14 días con AngII, fueron incubadas con un colorante lipofílico, DiR (Ex 750 y Em 780; Invitrogen, cod D12731) que se incorpora en la membrana celular. Previamente a la utilización del fluoróforo en los animales, se realizó una estandarización de la cantidad de fluoróforo necesaria, así como también las longitudes onda más indicada para obtener una mayor eficiencia de la fluorescencia, en base a la disponibilidad de filtros que posee el equipo. En consecuencia, las DCs fueron incubadas con DiR (3.5 μ g/ml) por 30 minutos en agitación (37°C). Tras la incubación se realizaron 3 lavados con PBS (10 min c/u). Para su inyección las células fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/120 μ L de PBS. Luego, los 120 μ L de la suspensión de DCs, fueron inyectados a ratones WT controles (EV, vena de la cola).

Para seguimiento de la señal fluorescente (equipo In vivo FX Pro, Bruker). los animales fueron depilados (Crema depilatoria Vitis, bajo anestesia con isofluorano). La longitud de onda de excitación fue 720 nm de excitación, registrándose la emisión de fluorescencia a 790 nm. El seguimiento de la fluorescencia fue a las 2h 30 min y a las 24h post inyección de las DCs (exposición por 5 min ventral y dorsal, bajo anestesia continua de isofluorano). Tras la obtención de las imágenes *in vivo*, se realizó eutanasia por dislocación cervical, y los tejidos (corazón, bazo, pulmón y riñón) fueron extraídos para realizar análisis de la fluorescencia a 790 nm.

Obtención de Células dendríticas renales para análisis Transcriptómico

Para el estudio del transcriptoma de DCs renales provenientes de animales control o hipertensos por infusión de AngII utilizamos la estrategia de purificación previamente descrita (selección positiva de CD11c⁺, por MACS). *Brevemente*, las DCs de aisladas por microesferas anti-CD11c a partir de riñones de animales WT infundidos con vehículo (control) o AngII por 14 días. Las células CD11c⁺ se recolectaron para extracción de RNA total (TRizol, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante, para luego, tratar las muestras con DNase (Ambion Applied Biosystem), para eliminar eventual contaminación con DNA genómico. Posteriormente las muestras fueron enviadas para análisis de integridad y pureza (Fragment Analyzer™ Automated CE System, Advanced Analytical Technologies Inc., Ankeny, IA). El RNA total fue sometido a un último paso de purificación, para la eliminación de RNA ribosomal (Ribozero removal rRNA kit, Epicentre) y posteriormente se realizó la construcción de genoteca, y después de la secuenciación, los datos fueron filtrados para remover las secuencias de adaptadores, contaminación y lecturas de baja calidad (Illumina sequencing was performed at Genoma Mayor, Universidad Mayor, Chile.).

Inmunofluorescencia

Animales WT e Hipertensos, fueron sacrificados y perfundidos completamente por vía aórtica con el fijador, Paraformaldehído al 4%. La perfusión se realizó a un flujo constante de 4 ml/min durante 30 min y se prepararon secciones de riñón (transversales y longitudinales, 2 mm espesor) que fueron sometidas a deshidratación (sacarosa 30% en agua destilada; a 4 °C, 72 horas) hasta su inclusión. Luego de la deshidratación, el tejido se incluyó en OCT para realizar criosecciones de 18 µm. Las secciones de tejido se montaron en portaobjetos previamente silanizados, se lavó con solución fisiológica durante 15 seg para eliminar el exceso de OCT, luego se bloquea con BSA 3% en PBS1X-Tritón X100, al 0,1% durante 1 h, y se realizará la inmunofluorescencia indirecta para pNCC, en donde la incubación del ab primario se realizó durante 16h (en una dilución de 1:100), para posteriormente, lavar la muestra con en PBS1X-Tritón X100, al 0,01%, y luego incubar durante 2h a T° ambiente el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo. Para apreciar núcleos se marcará con DAPI. Luego se montó con *Fluorsave* (CALBIOCHEM®, cat# 345789) y se dejó secar por 24h para luego observar los cortes mediante microscopio confocal.

Obtención de mRNA y Transcripción Reversa

Se extrajo RNA total a partir de 5mg de tejido o bien desde 1×10^6 rDCs o sDCs, utilizando TRIzol (GIBCO™, Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se trataron con DNasa (TURBO DNA-free™ Kit, Thermo Fisher Scientific) para eliminar eventual contaminación con DNA genómico. Para verificar la integridad del RNA, se utilizó el método de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,2% (p/v), en tampón desnaturalante MOPS1x. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA), utilizando 0.2 µg de RNA total como templado. El cDNA obtenido se utilizó como templado en reacciones de polimerasa en cadena cuantitativas (qPCR) en equipo de PCR en tiempo real, empleando partidores específicos.

PCR en Tiempo Real

El qPCR fue realizado en termociclador Applied Biosystems Step One, método SybrGreen® y curva de calibración. Se determinó la abundancia de 18S ribosomal (transcrito constitutivo) para todas las muestras. La determinación de la abundancia de todos los transcritos se realizó empleando partidores específicos. En todas las reacciones se incluyó curva estándar con diluciones conocidas del producto PCR de interés. Los resultados se expresaron como la razón del transcrito de interés/18S.

Para la realización de este proyecto se utilizaron los siguientes partidores:

Proteína	Gen	Nºde Acceso	Secuencia de primers (5'→3')
18S	<i>Rn18s</i>	NR_003278.3	Fwd: CGGCTACCACATCCAAGGAA Rev: GCTGGAATTACCGCGGCT
ACE	<i>Ace</i>	NM_207624.5	Fwd: GTGCCAAGATCCCAAGGTGACTTT Rev: TCCCTGCTTCCTTGGATTGGTAGA
AGT	<i>Agt</i>	NM_007428.3	Fwd: ACCCCTTCCATCTCCTTTACCACA Rev: CACTTCCTGCCTCATTACAGCATCT
AT ₁ Ra	<i>Agtr1a</i>	NM_177322.3	Fwd: GCCCATAACCATCTGCATAGCGTA Rev: TGCCAGCAAGCTTTGAACCTGT
MR	<i>Nr3c2</i>	NM_001083906.1	Fwd: ACTCATGTTTCAGGCGCCTCTTT Rev: GGGATGCTGGTTTCAGGGAAAT
IL-1 β	<i>Il1b</i>	NM_008361.4	Fwd: CAAATCTCGCAGCAGCACA Rev: TCATGTCCTCATCCTGGAAGG
IL-6	<i>Il6</i>	NM_031168.2	Fwd: AGGATACCACTCCCAACAGACCT Rev: CAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC
IL-23	<i>IL23</i>	NM_031252.2	Fwd: TGCTGGATTGCAGAGCAGTAA Rev: GCATGCAGAGATTCCGAGAGA
γ IFN	<i>IFNg</i>	NM_008337.4	Fwd: GGTGCAACTGGGATCGCTACATAA Rev: AGAGCCTGATTCCTTTCC TTCCCT
TNF- α	<i>Tnfa</i>	NM_013693.3	Fwd: TGTGAAAACGGAGCTGAGCTGT Rev: GCCTGGTCACCAAATCAGCGTTAT
Nox1	<i>Nox1</i>	NM_172203.2	Fwd: TGCCTTTGCCTGGTTCAAGA Rev: TGGGGGTGGGCAGTAGCTAT
Nox2	<i>Cybb</i>	NM_007807.5	Fwd: GCCCAACTGGGATAACGAGTTCAA Rev: TCCTGGTGAAAGAGCGGAGTTAGA
Nox3	Nox3	NM_198958.2	Fwd: TGATATGGGCACAACCACTGA Rev: CGAATGATGCGACCTCCTC
Nox4	<i>Nox4</i>	NM_015760.5	Fwd: TGCTCATTTGGCTGTCCCTAAACG Rev: AGGACTGTCCGGCACATAGGTA

Western Blot

A partir de 60 mg de tejido renal se obtuvieron homogenados proteicos. Para ello, las muestras fueron disgregadas mecánicamente en presencia de Buffer Sacarosa (50mM Tris; 5mM MgCl₂, 250mM Sacarosa; pH 7,6), junto a un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4400 g por 15min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante (proteínas totales) o bien se realizó una ultracentrifugación (Thermo Fisher Scientific, modelo WX +100) a 100000 rpm durante 1h a 4°C, para obtener proteínas de membrana. Las proteínas se cuantificaron por método de Bradford (BioRad, Hercules, CA) y después fueron sometidas a electroforesis desnaturante en gel al 10% (SDS-PAGE), mientras que la transferencia se realizó sobre membranas nitrocelulosa (PROTRAN; PerkinElmer, Waltham, MA) durante 90 min a 300 mAmp. El bloqueo se realizó por incubación en buffer 5% p/v - leche descremada en TBS1X, a temperatura ambiente por 1hr. Luego, se incubó con el anticuerpo primario específico en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados con TBS 1X+0.1% Tween-20, la membrana se incubará con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por 1hr a temperatura ambiente. Para visualizar la detección de las proteínas de interés se detectó la emisión de quimioluminiscencia utilizando EZ-ECL Kit (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). La inmunodetección fue capturada mediante el sistema de foto documentación ChemiScope Series 3200-Mini (Clinx Science Instruments, Shanghai, China).

Tabla de anticuerpos utilizados para *Western blot*

Proteína	Compañía	N° Cat	Especie	Clon	Dilución
ACE	Santa Cruz Biotechnology	SC23908	Mo	Mono	1:250
AGT	Inmuno-Biological Laboratory	28101IBL	Mo	Poly	1:250
AT ₁ R	Santa Cruz Biotechnology	SC1175	Rb	Poly	1:250
AT ₂ R	Santa Cruz Biotechnology	SC9040	Rb	Poly	1:1000
Renina	Santa Cruz Biotechnology	SC133145	Mo	Mono	1:250
PRR	Sigma aldrich	HPA003156	Rb	Poly	1:250
NHE3	EMD Millipore	AB3085	Rb	Poly	1:1000
pS552-NHE3	Santa Cruz	SC-53962	Mo	Mono	1:1000
NCC	MRC-PPU Reagents	S965B	Sh	Poly	1:1000
pT60-NCC	MRC-PPU Reagents	S995B	Sh	Poly	1:1000
NKCC2	MRC-PPU Reagents	S378C	Sh	Poly	1:1000
pT105- NKCC2	MRC-PPU Reagents	S378C	Sh	Poly	1:1000
α-ENaC	StressMarq Biosci.	SPC-403D	Rb	Poly	1:1000
γ-ENaC	StressMarq Biosci.	SPC-405D	Rb	Poly	1:1000
Pendrin	Santa Cruz	SC-515230	Mo	Poly	1:1000
NDBCE	Proteintech	12531-1AP	Rb	Poly	1:1000
β-actin	Santa Cruz	SC-130656	Rb	N-21	1:5000
HRP- conjugated Donkey anti- rabbit	Jackson ImmunoResearch	711-036- 152	Do	Poly	1:5000
HRP- conjugated donkey anti- sheep	Life Technologies	A16041	Do	Poly	1:5000

Rb: Rabbit, Sh: Sheep, Do: Donkey, Mo: Mouse Poly: Policlonal, Mono: Monoclonal Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX); Abcam (Cambridge, MA); StressMarq Biosciences Inc. (Victoria, BC, Canada); MRC-PPU Reagents (Dundee, United Kingdom); EMD Millipore (Billerica, MA); Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA); Life Technologies (Carlsbad, CA).

Análisis Estadísticos

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SD de cada grupo experimental. Las comparaciones entre dos y múltiples grupos se realizaron mediante el test T de Student y por ANOVA, respectivamente. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor *P* fue $<0,05$.

Resultados

1. Evaluar si la eliminación *in vivo* de DCs modifica el desarrollo de HTA, la modulación de la reabsorción renal de sodio y/o la reactividad vascular respuesta a la infusión de Angiotensina II.

Primero evaluamos si la inyección de DT a ratones CD11c.DOG causa una eliminación de DCs. Para ello, ratones CD11c.DOG recibieron una dosis diaria de DT durante 14 días^{89, 90}. Se evaluó la abundancia de DCs renales viables, obtenidas después de la purificación con columnas de microesferas, para selección positiva de CD11c y citometría de flujo. En riñones de ratones CD11c.DOG tratados con DT observamos un $4,4 \pm 1.5\%$ en promedio de células CD11c^{Hi} remanente ($p < 0.01$). La inyección de DT a los animales WT no produjo cambios en la abundancia de células CD11c^{Hi}. Consistente con los datos publicados previamente^{89, 90}, no observamos cambios en las poblaciones CD11c^{Lo} o CD11c^{Int} en ratones WT o CD11c.DOG que recibieron inyección de DT (Figura 2).

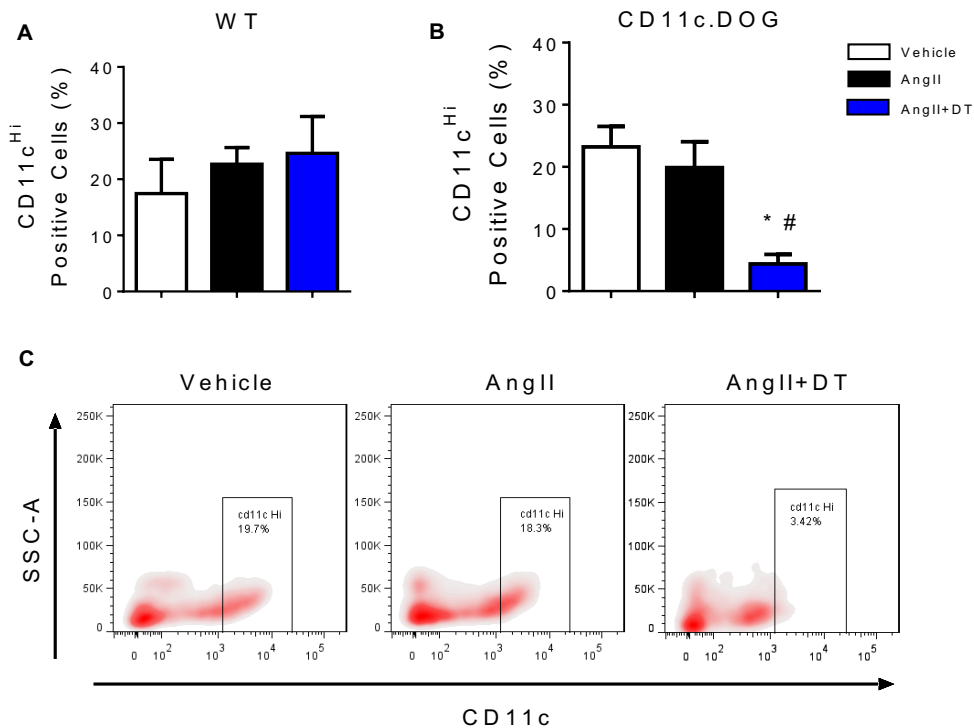


Figura 2. Eliminación de DCs por administración diaria de DT. Análisis de poblaciones CD45⁺Zombie⁻CD11c⁺ renales provenientes de ratones tratados Veh, AngII y AngII+DT. **(A)** Representación gráfica obtenida para tejido renal de ratones WT. **(B)** Representación gráfica obtenida para tejido renal de ratones CD11c.DOG.

(C). *Dot plots* representativos de gráfico en B. Figuras representativas de 4 experimentos independientes. Los valores representan promedio \pm DS, * $P < 0.05$ vs Veh; # $P < 0.05$ vs AngII.

Efecto de la eliminación de DCs sobre la PA

Para evaluar si la ausencia de DCs (CD11c^{Hi}) modifica el aumento de PA resultante de la infusión continua de AngII, realizamos 6 grupos experimentales: infusión de vehículo, AngII, o AngII+DT durante 14 días; animales WT y CD11c.DOG. El tratamiento con DT se realizó mediante inyección subcutánea diaria. La figura 3 muestra que para animales WT la infusión de AngII elevó la presión arterial sistólica (PAS) en comparación con el grupo control (WT+AngII = 148.3 \pm 5.2 mmHg (n=8); WTvehículo=102.6 \pm 3.8 mmHg, n=8; $P < 0.001$); observamos un efecto similar en los animales WT AngII+DT (142.5 \pm 6.0 mmHg, n=4, $P < 0.001$). Estos resultados muestran que en animales WT, el desarrollo de HTA en respuesta a la infusión de AngII no se afecta por la coadministración diaria de DT. Los ratones CD11c.DOG tratados con AngII mostraron un aumento de la PAS similar al que observamos en los animales WT (CD11c.DOG=147.9 \pm 5.9 mmHg vs. 148.3 \pm 5.2 mmHg, n.s.). Sin embargo, la coadministración de DT con la infusión de AngII previno el aumento de PAS en ratones CD11c.DOG (104.4 \pm 5.8 mmHg vs. 147.9 \pm 5.9mmHg, n=4 y 5 respectivamente, $P < 0.001$), mostrando niveles de PAS similares a los animales control (CD11c.DOG vehículo=102.4 \pm 2.9 mmHg, n=5, n.s.). Estos resultados muestran que las células dendríticas (células mieloides CD11c^{high}) son necesarias para el aumento de la presión arterial en respuesta a la infusión de AngII.

De manera adicional, se implantó un sensor radiotelemétrico en animales CD11c.DOG para confirmar lo observado mediante la técnica *tail cuff*. Se observó que animales CD11c.DOG infundidos con AngII, presentan un aumento en la presión arterial media (MAP) estadísticamente distinta de los AngII+DT, desde el día 4 de tratamiento (Figura 4), manteniéndose esta diferencia hasta el final del tratamiento (118.9 \pm 10.7 mmHg vs. 89.8 \pm 5.2 mmHg, n=3-4, $P < 0.01$). Confirmando que la eliminación de DCs previene el aumento de la PA, inducida por AngII.

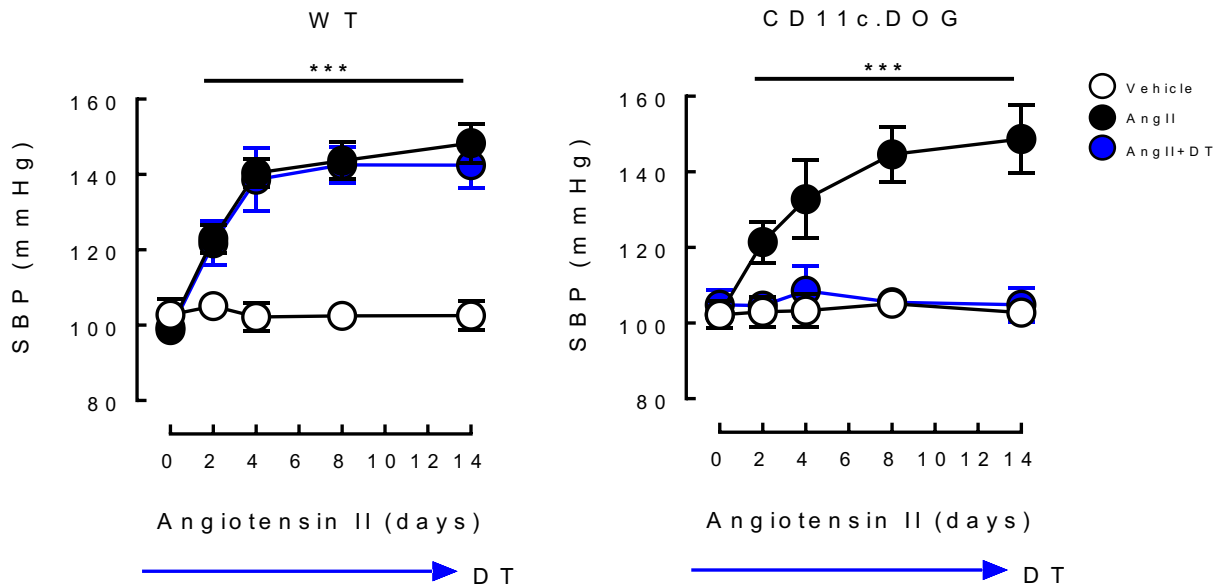


Figura 3. Presión arterial sistólica (PAS) de ratones tratados con AngII. Ratones WT y CD11c.DOG fueron tratados durante 14 días con Vehículo, AngII y AngII+DT. La inyección de DT fue diaria durante 14 días. Los valores representan promedio \pm DS, n=4-5 *** $P < 0.001$ vs Vehículo.

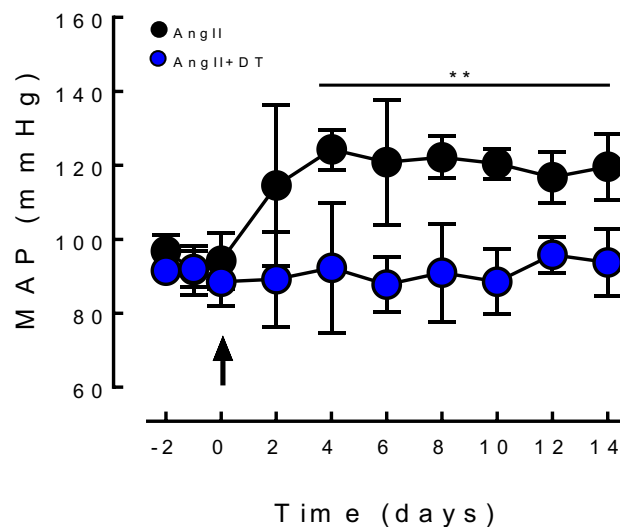


Figura 4. Presión arterial media (MAP) de ratones CD11c.DOG tratados con AngII. Ratones CD11c.DOG fueron tratados durante 14 días con AngII y AngII+DT. La inyección de DT fue diaria durante 14 días indicado con la flecha. Los valores representan promedio \pm DS, n=4-5; ** $P < 0.01$ vs AngII.

Como un indicador sustitutivo del desarrollo de HTA se evaluó la presencia de hipertrofia cardíaca (morfometría). Consistente con los datos de evolución de la PAS, observamos que la infusión de AngII generó hipertrofia cardíaca en ambas cepas de ratones (Figura 5). Sin embargo, la administración de DT previno el desarrollo de hipertrofia cardíaca en los ratones CD11c.DOG (Figura 5), sin afectar el desarrollo de la hipertrofia cardíaca de ratones WT.

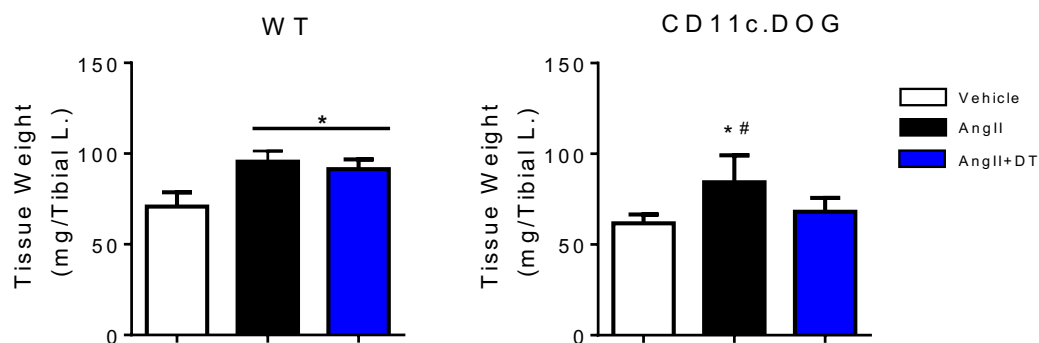


Figura 5. Hipertrofia cardíaca de ratones tratados con AngII. Los valores representan promedio \pm DS, n=4-5; * $P < 0.05$; vs Vehículo, # $P < 0.05$ vs AngII+DT

Medimos los niveles de sodio, potasio y cloruro en los animales WT tratados con AngII y vehículo al día 14 (término del tratamiento, Figura 6A) y animales CD11c.DOG tratados con vehículo, AngII y AngII+DT (Figura 6B). No observamos cambios estadísticamente significativos en ambos grupos de ratones, en ninguno de los tratamientos utilizados (Figura 6).

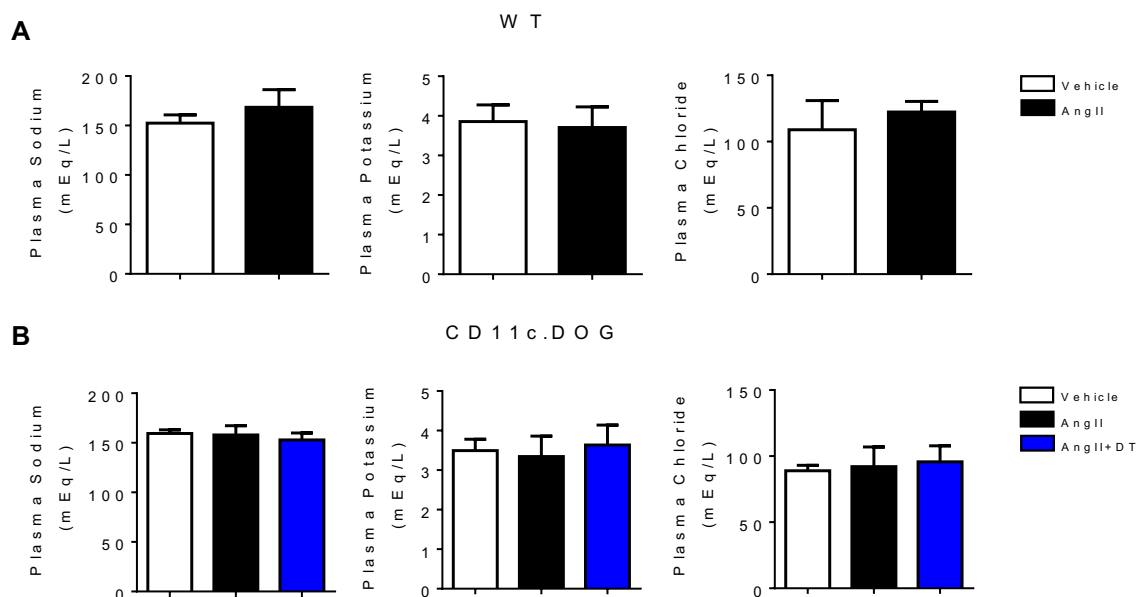


Figura 6. Niveles plasmáticos de electrolitos en animales WT y CD11c.DOG tratados con AngII. Se evaluó concentración plasmática de sodio, potasio y cloruro en animales tratados con Vehículo y AngII en animales WT y vehículo, AngII (A) y AngII+DT en animales CD11c.DOG (B) durante 14 días. Los valores representan promedio \pm DS. n=5-7.

Dado los resultados anteriormente descritos, quisimos evaluar si la eliminación de DCs prevenía el aumento de la PA inducida por aldosterona y sal. Para esto utilizamos ratones CD11c.DOG a los cuales se les realizó una nefrectomía lateral izquierda y se les infundió aldosterona (500 μ g/kg/día + 1% NaCl en el agua de bebida) durante 14 días. Los animales fueron randomizados en los grupos vehículo (DT-), NAS (DT-) y NAS (DT+).

Los ratones CD11c.DOG tratados con NAS (DT-) mostraron un aumento de la PAS en comparación a los animales vehículo (NAS (DT-)=116.6 \pm 3.8 mmHg vs. Vehículo (DT-) = 98.3 \pm 1.1 mmHg; n=4 P <0.05). Sin embargo, en los animales NAS (DT+), se previno este aumento de PAS (92.9 \pm 13.4 mmHg n=4, P <0.05), mostrando niveles de PAS similares a los animales control (Figura 7A). Estos resultados muestran que las células dendríticas (células mieloides CD11c^{high}) son necesarias para el aumento de la PA en respuesta a la infusión de Aldosterona al igual que con la infusión de AngII.

Se evaluó la presencia de hipertrofia cardíaca realizando análisis morfométrico e histológico (tinción Hematoxilina&Eosina) de los grupos NAS⁹¹. Se observó un aumento en la hipertrofia cardíaca en los animales NAS (DT-) en comparación con el grupo vehículo (DT-) ($P < 0.01$; Figura 7B), mientras que la eliminación de DCs, previno este aumento ($P < 0.05$; Figura 7B). Estos resultados fueron consistentes con el aumento del área de sección transversal de los cardiomiocitos observados en los animales NAS (DT-) en comparación a los animales vehículos (DT-) (290.8 ± 33.5 y $177.1 \pm 8.4 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $P < 0.01$; $n = 4$), mientras que la eliminación de DCs, previno este aumento observado en animales NAS (DT-) (NAS (DT+) = 176.7 ± 14.0 vs NAS (DT-) $290.8 \pm 33.5 \mu\text{m}^2$ respectivamente, $P < 0.05$; $n = 4$) (Figura 7C-D).

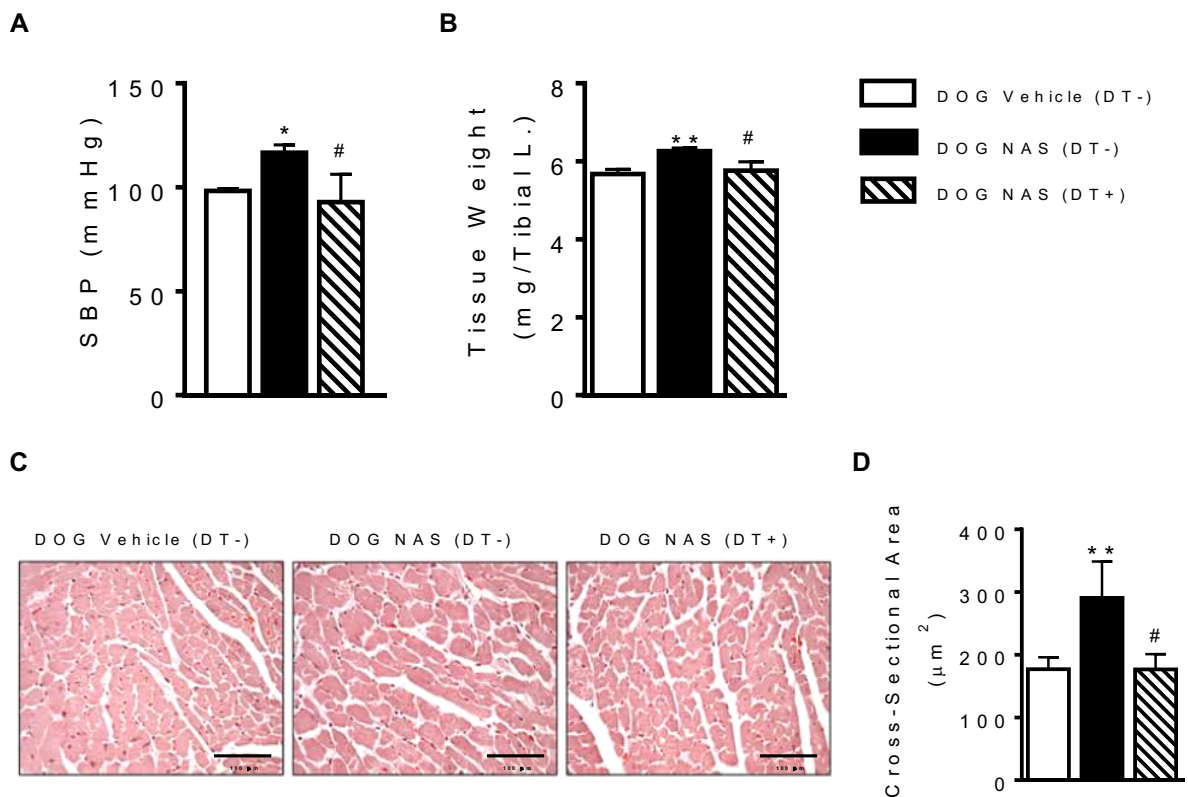


Figura 7. Hipertrofia cardiaca de ratones tratados con Aldosterona y sal. Se realizó medición de la PAS (A), hipertrofia cardiaca (B) y morfometría cardiaca por medición del área de sección transversal en cortes de corazón teñidos con H&E (C y D), en animales CD11c.DOG, Vehículo (DT-), NAS (DT-) y NAS (DT+). Los valores representan promedio \pm DS, n=4; * $P < 0.05$ vs Vehículo; $P < 0.01$ vs vehículo; # $P < 0.05$ vs NAS (DT-).

Efecto de la eliminación de DCs sobre la función vascular

Cambios de la resistencia periférica total, secundarios al aumento de la contractilidad y/o disfunción endotelial pueden ser factores contribuyentes al desarrollo de aumentos de la PAS. Para evaluar la contractilidad y función endotelial de las arterias de los animales WT y CD11c.DOG, se realizó el estudio de contractilidad isométrica en anillos aórticos aislados. En la figura 8 podemos apreciar (panel A) que no existen diferencias significativas en la tensión máxima promedio en respuesta a solución despolarizante (KCl 70mM) de los anillos aórticos de los ratones WT y CD11c.DOG, independientemente a la infusión de AngII o el tratamiento con AngII+DT. Posteriormente, evaluamos la respuesta contráctil a Fenilefrina (agonista alfa-adrenérgico, curva dosis-respuesta) Figura 8. Los animales WT y CD11c.DOG tratados con Vehículo tuvieron una respuesta similar (Tabla 1). No observamos diferencias significativas de la respuesta contráctil máxima a fenilefrina con el tratamiento AngII (Tabla 1). Finalmente, la administración de DT junto con la infusión de AngII a ratones WT no modificó la respuesta contráctil a Fenilefrina en los ratones WT. Sin embargo, la inyección de DT en ratones CD11c.DOG junto con la infusión de AngII disminuyó significativamente la contracción máxima en respuesta a fenilefrina (Tabla 1; Figura 8B). Además, la inyección de DT junto a la infusión de AngII aumentó el EC_{50} en los animales CD11c.DOG (Figura 8 y Tabla 1). Estos resultados muestran una disminución de la respuesta contráctil alfa-adrenérgica como resultado de la eliminación de DCs en ratones CD11c.DOG.

Finalmente evaluamos la respuesta vasodilatadora dependiente de NO endotelial. Para inducir la liberación de NO utilizamos carbacol (agonista

muscarínico). Observamos una respuesta vasodilatadora similar al comparar ratones WT y CD11c.DOG del grupo control (vehículo). Los anillos provenientes de ratones WT o CD11c.DOG tratados con AngII presentaron una disminución de la respuesta a carbacol (Tabla 1, Figura 8; n=4-6, $P < 0.05$). La inyección de DT no modificó la disminución de la respuesta vasodilatadora en anillos aórticos de animales WT o CD11c.DOG (efecto máximo de $44.6 \pm 2.6\%$ y $50.4 \pm 3.0\%$ de vasodilatación y un EC_{50} 0.08 y 0.08 μM respectivamente; n=4-8, $P < 0.05$) (Figura 8, C). Estos resultados sugieren que la función endotelial se ve disminuida por la infusión de AngII, independientemente de la presencia de DCs y del desarrollo de HTA.

		Contracción Fenilefrina		Vasodilatación Carbacol	
		Efecto máximo	EC_{50} (μM)	Efecto máximo	EC_{50} (μM)
WT	Veh	$122 \pm 6.7\%$	0.166	$75.3 \pm 2.4\%$	0.026
	AngII	$103.6 \pm 5.01\%$	0.149	$48.6 \pm 3.5\%$	0.08
	AngII+DT	$90.4 \pm 7.8\%$	0.272	$44.6 \pm 2.6\%$	0.08
CD11c.DOG	Veh	$102.3 \pm 6.1\%$	0.167	$81.8 \pm 2.6\%$	0.017
	AngII	$93.5 \pm 2.6\%$	0.191	$48.4 \pm 2.5\%$	0.03
	AngII+DT	61.1 ± 4.7	1.25	$50.4 \pm 3.0\%$	0.08

Tabla 1. Evaluación de contractibilidad y vasodilatación de anillos aórticos en animales tratados con AngII. Los valores representan promedio \pm DS, n=4-6 $**P < 0.01$ vs Vehículo; $*P < 0.01$ vs AngII+DT.

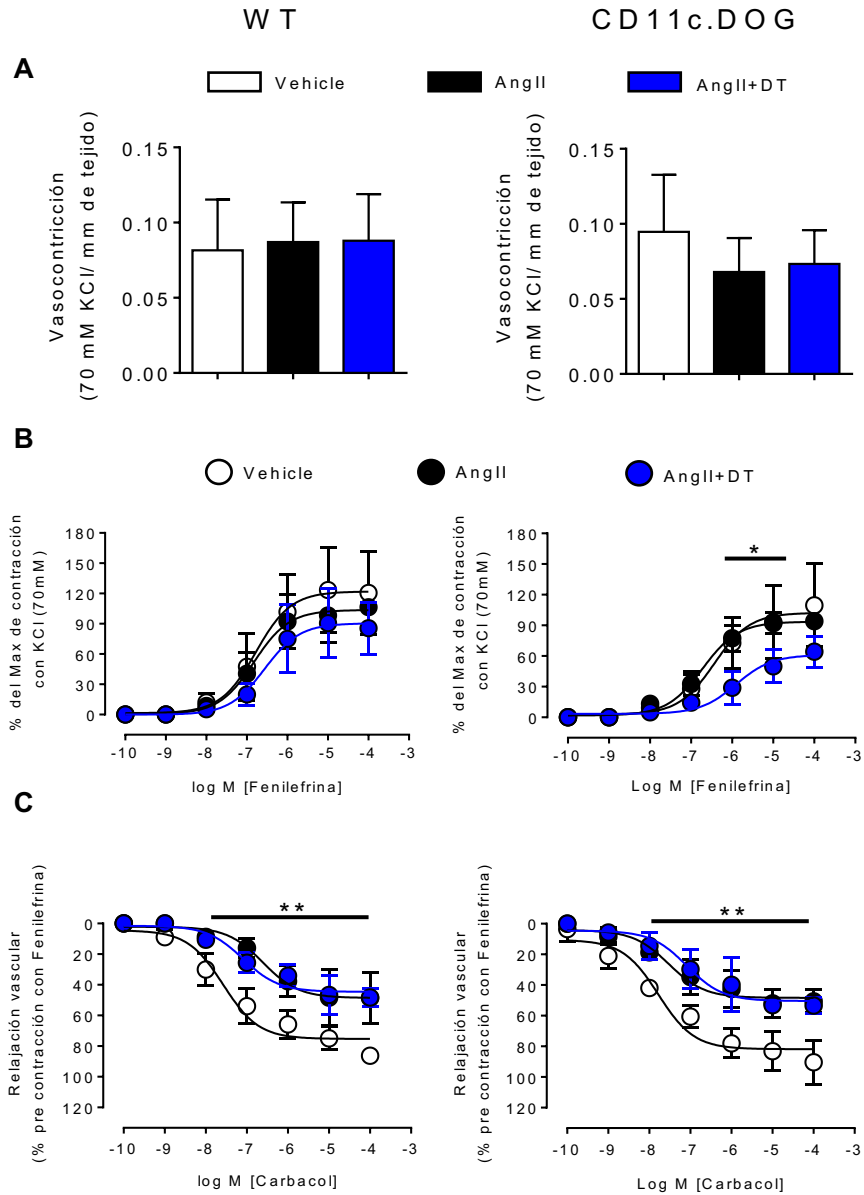


Figura 8. Estudio vascular en ratones WT y CD11c.DOG tratados con Ang II. Anillos aórticos de ratones WT y CD11c.DOG tratados durante 14 días con AngII con y sin DT, fueron sometidos a estudios de contracción máxima con KCl (**A**), curva concentración-respuesta de Fenilefrina (**B**) y relajación vascular (con endotelio) (**C**) en animales WT (panel izquierdo) y animales CD11c.DOG (Panel derecho). Los valores representan promedio \pm DS, $n=4-6$ $**P < 0.01$ vs Vehículo; $*P < 0.01$ vs AngII+DT.

Efectos de la eliminación de DCs sobre la función renal.

Un factor que podría contribuir al efecto protector del desarrollo de la eliminación de DCs es la mantención de la natriuresis, aun en presencia de altos niveles de AngII plasmática. Por ello, evaluamos si la eliminación de las DCs mejora/previene el efecto de AngII sobre la natriuresis y el balance de sodio. Realizamos estudios metabólicos desde el día -3 (3 días previos a la implantación de la mini bomba osmótica con AngII) hasta el día 3 posterior a la implantación de la bomba. Como muestra el gráfico de la Figura 9, (Panel A, izquierda), ratones WT tratados con AngII presentaron una menor natriuresis al día 3, en comparación con los animales Vehículo (2.4 ± 0.4 y 4.2 ± 1.0 $\mu\text{Eq}/24\text{h/g bw}$ respectivamente). La inyección de DT no modificó la natriuresis, que fue similar a los animales AngII (1.8 ± 0.7 $\mu\text{Eq}/24\text{h/g bw}$). En los ratones CD11c.DOG, el tratamiento con AngII también disminuyó la natriuresis (1.1 ± 0.3 $\mu\text{Eq}/24\text{h/g bw}$). Sin embargo, la eliminación de DCs con DT previno la disminución de la natriuresis en ratones CD11c.DOG. Además, la infusión de AngII produjo un balance de sodio acumulado (3 días post infusión de AngII) positivo en los animales WT (AngII= 7.0 ± 0.6 vs. vehículo= 4.7 ± 0.9 $\mu\text{Eq}/72\text{h/g bw}$; $n=4-6$; $P<0.05$) Figura 9B, (panel inferior izquierdo), y la inyección de DT en ratones CD11c.DOG previno el desarrollo de balance de sodio acumulado positivo, en comparación a los animales tratados solo con AngII (AngII+DT= 3.4 ± 0.9 vs. AngII= 7.2 ± 1.5 $\mu\text{Eq}/24\text{h/g bw}$; $n=4-6$; $P<0.05$) (Figura 9B, panel inferior derecho).

Estos resultados muestran que la eliminación de DCs en ratones CD11c.DOG previene la disminución de natriuresis y el desarrollo de balance positivo de sodio.

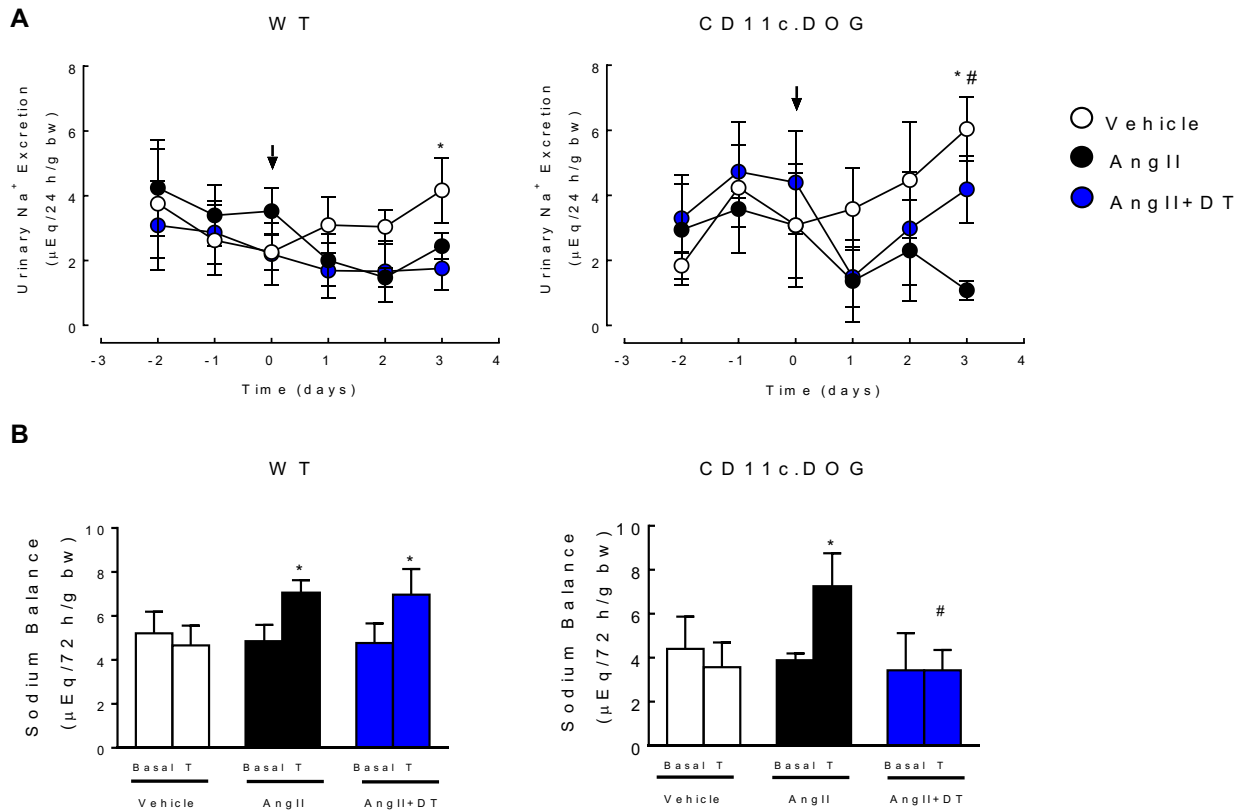


Figura 9. Eliminación de DCs mejora la natriuresis y el balance de sodio en ratones CD11c.DOG. (A) Natriuresis en animales WT (panel izquierdo) y CD11c.DOG (panel derecho). **(B)** Balance de sodio acumulado de 72h, de animales WT (panel izquierdo) y CD11c.DOG (panel derecho) desde el día -2 al 0 (basal) y desde el día 1 al 3 (tratamiento), post implante de mini bomba osmótica con AngII. Los valores representan promedio \pm DS, * $P < 0.05$ AngII vs Vehículo; # $P < 0.05$ AngII+DT vs AngII; n=4-6.

Para evaluar la capacidad natriurética de los ratones WT en respuesta a AngII y en ratones CD11c.DOG en respuesta a AngII y AngII+DT, realizamos el test de sobrecarga aguda de solución fisiológica en condiciones basales (día=0), después de 4 y 14 días de tratamiento (Figura 10). La prueba consiste en la inyección de solución NaCl fisiológica intraperitoneal (0.9% p/v, volumen=10% del peso corporal) y la medición de la natriuresis en jaula metabólica por 4 horas⁹⁰.

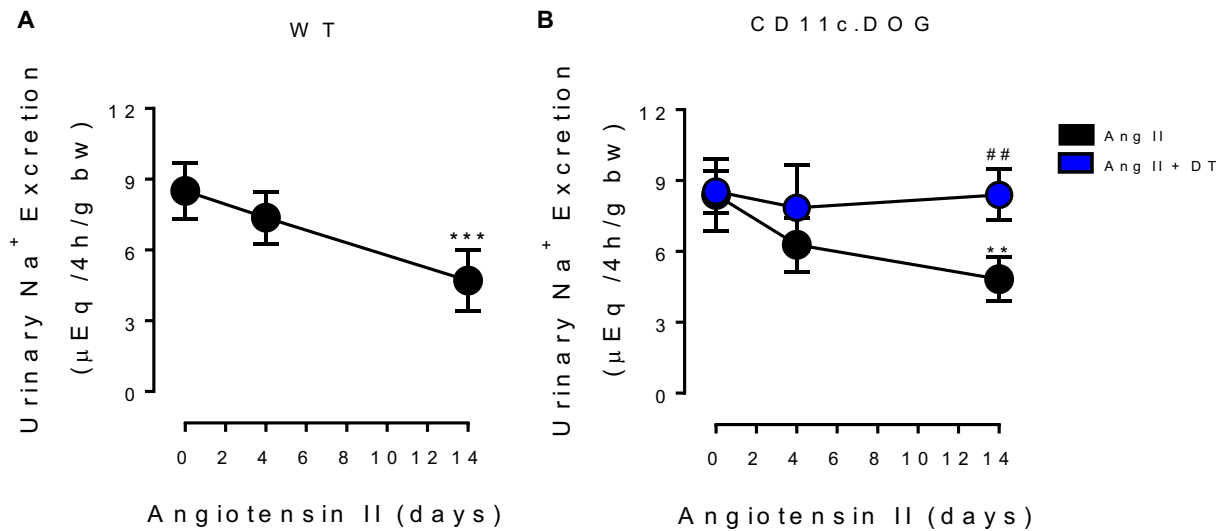


Figura 10. Test salino en animales WT y CD11c.DOG tratados con AngII. (A) Evolución de la capacidad natriurética frente a una carga salina en animales WT tratados con AngII durante 14 días. **(B)** Evolución de la capacidad natriurética frente a una carga salina en animales CD11c.DOG tratados con AngII y AngII+DT durante 14 días. Los valores representan promedio \pm DS n=4-11, *** $P < 0.001$ vs el basal de los animales WT; ** $P < 0.01$ AngII vs basal y ## $P < 0.05$ entre AngII y AngII+DT día 14 en los animales CD11c.DOG.

Se observó que, tras 4 días de tratamiento, la capacidad natriurética de los animales WT tratados con AngII disminuye respecto la excreción basal (AngII= 7.4 ± 1.1 μ Eq/4h/g bw vs. Basal= $8.5 \pm 1.2 \pm$ μ Eq/4h/g bw; n=11; ns. Figura 10A); y esta caída en la natriuresis, es mayor al día 14 de tratamiento con AngII en comparación al basal (AngII= 4.7 ± 1.3 μ Eq/4h/g bw; n=11; $P < 0.001$). En animales CD11c.DOG, tratados con AngII, se observa un comportamiento similar a la caída en la natriuresis de los animales WT (basal= 8.4 ± 1.5 ; día 4= 6.3 ± 1.1 ; día 14= 4.8 ± 0.9 μ Eq/4h/g bw n=4-6; $P < 0.01$ Figura 10B). Sin embargo, en los animales CD11c.DOG, tratados con AngII+DT, no se observaron diferencias significativas entre los distintos días de tratamiento (basal= 8.5 ± 0.9 ; día 4= 7.9 ± 1.8 ; día 14= 8.4 ± 1.1 μ Eq/4h/g bw n=4-6; Figura 10B), Observándose la prevención en la caída de la natriuresis inducida por AngII, siendo estadísticamente distinto que los animales CD11c.DOG tratados con

AngII al día 14 de tratamiento (AngII+DT=8.4±1.1 $\mu\text{Eq}/4\text{h/g bw}$ vs. AngII= 4.8±0.9 $\mu\text{Eq}/4\text{h/g bw}$; $P<0.01$; Figura 10B).

Dado que la eliminación de las DCs en los ratones CD11c.DOG, provocó un efecto natriurético en respuesta a la carga salina, (una prueba que refleja la actividad del nefrón proximal) quisimos evaluar la actividad del transportador NKCC2 (como reflejo de la actividad del asa de Henle, parte del nefrón proximal) *in vivo*. Para esto, inyectamos Furosemida (un inhibidor farmacológico de este transportador) de forma aguda y evaluamos la capacidad natriurética de los animales tratados con vehículo, AngII y AngII+DT en los días previos al implante de la minibomba osmótica con AngII, al día 4 y 14 post implante.

Como se observa en la figura 13, la capacidad natriurética de los animales CD11c.DOG tratados con AngII, aumenta la respuesta a la inyección de Furosemida en los días 4 y 14 respecto del basal (basal =3.81±0.26 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; día 4= 4.79±0.62 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; día 14= 5.03±0.54 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; $P<0.05$ vs basal. n=4 Figura 13). Sin embargo, la eliminación de las DCs disminuye significativamente la natriuresis en respuesta a Furosemida desde el día 4 de infusión de AngII+DT (basal= 4.29±1.00 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; día 4= 1.79±0.59 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; $P<0.001$; n= 3-4 Figura 13) hasta el día 14 (día 14= 1.79±0.67 $\mu\text{Eq}/2\text{h/g bw}$; $P<0.001$; n= 3 Figura 13) en comparación a los animales tratados solamente con AngII. Estos resultados indican que los animales CD11c.DOG tratados con AngII+DT, presentan un transportador menos activo en comparación a los tratados con AngII y por lo tanto la inhibición del NKCC2 con furosemida, genera una menor excreción urinaria de sodio en los animales CD11c.DOG tratados con AngII+DT.

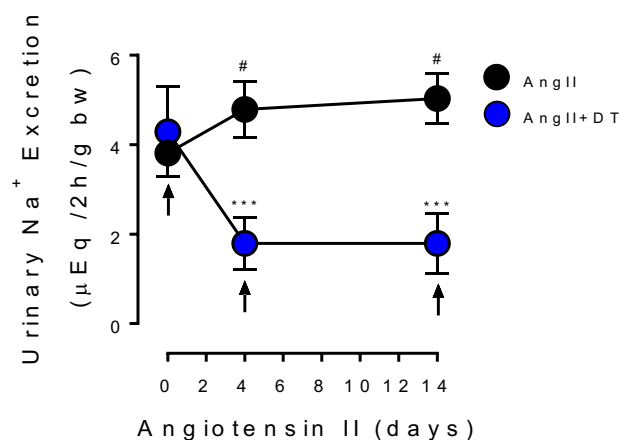


Figura 13. Test Furosemida en animales CD11c.DOG tratados con AngII. Se evaluó la capacidad natriurética en los animales CD11c.DOG tratados con AngII y AngII+DT durante 4 y 14 días, inyectando, de forma aguda, Furosemida (20 mg/Kg de peso del animal, ip) en los días que se indican con flechas. Los valores representan promedio \pm DS n=3-4, # $P < 0.05$ vs basal de los animales AngII. *** $P < 0.001$ vs AngII.

Efecto de la ablación de DCs en los transportadores renales de NaCl

Nuestros resultados muestran que uno de los efectos importantes de la eliminación de DCs es la prevención de la caída de la natriuresis en respuesta a AngII. Por ello, evaluamos mediante *western blot* el perfil de los transportadores renales de sodio y cloruro en animales WT y CD11c.DOG, tratados con vehículo y AngII durante 14. Para cada grupo experimental se prepara una fracción cruda de proteínas de membrana, mediante la ultracentrifugación de homogenados proteicos totales. Del túbulo proximal se evaluó la abundancia relativa del intercambiador sodio/protón tipo 3 (NHE3); del asa de Henle, el cotransportador sodio/potasio/cloruro (NKCC2, transportador fosforilado y total). En el nefrón distal evaluamos el cotransportador sodio/cloruro del túbulo distal (NCC, transportador fosforilado y total), el canal epitelial de sodio (ENaC, subunidades α y γ), el intercambiador de bicarbonato/cloruro (Pendrina) y el intercambiador de bicarbonato/cloruro dependiente de sodio (NDCBE), estas últimas proteínas presentes en el túbulo colector.

En los animales WT, se observó, que tras 14 días de infusión con AngII, en el nefrón proximal (túbulo proximal y Asa de Henle), solo disminuyó el NKCC2-t ($p < 0.05$), sin encontrar cambios estadísticamente significativos en NHE3 y NKCC2-p (Figura 11, A-B). Por otro lado, en el nefrón distal (túbulo contorneado distal y túbulo colector), los animales infundidos con AngII durante 14 días, presentan un aumento estadísticamente significativo en la abundancia de los transportadores, NCC-t, NCC-p, un aumento en la actividad del NCC (medido como la razón NCC-p/NCC-t), γ ENaC-clv, Pendrina y NDCBE (Figura 11, C-D). Mientras que los transportadores y α ENaC-full, disminuyeron significativamente su abundancia en los animales tratados con AngII vs los vehículos (Figura 9). No se observaron diferencias en los valores de abundancia promedio de los transportadores, NKCC2-p/NKCC2-t, α ENaC-clv, γ ENaC-full al comparar los animales AngII versus los vehículos (Figura 11).

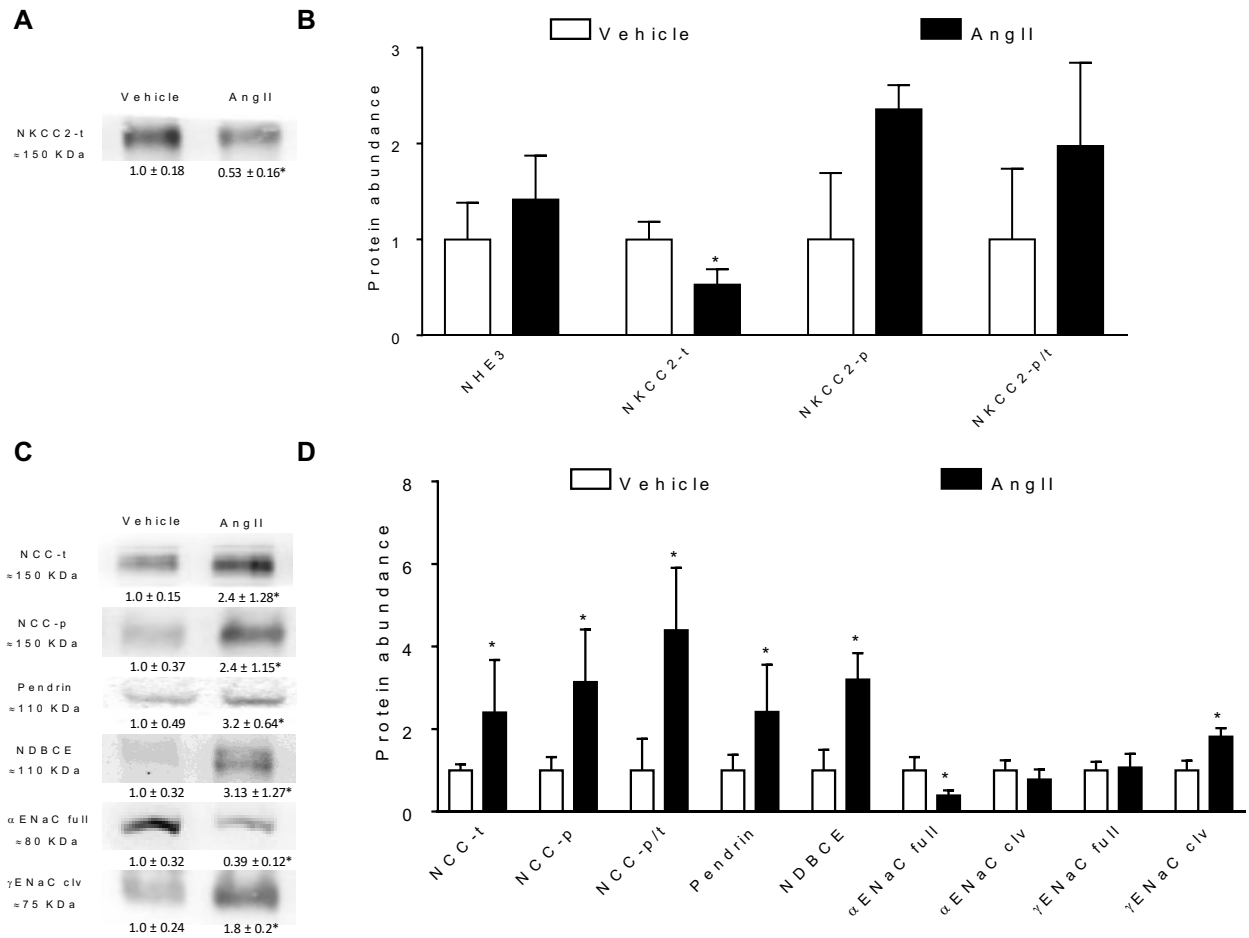


Figura 11. Perfil proteico de transportadores renales de sodio en animales WT tratados con AngII. Se evaluó la abundancia proteica de los transportadores renales en animales tratados con vehículo y AngII en la fracción de membrana total. **(A y B)** inmunoblot representativo y cuantificación de la abundancia de proteína (respectivamente) de transportadores renales de sodio que cambiaron de manera estadísticamente significativa luego de 14 días de infusión con AngII en el nefrón proximal. **(C y D)**. inmunoblot representativo y cuantificación de la abundancia de proteína (respectivamente) de transportadores renales de sodio que cambiaron de manera estadísticamente significativa luego de 14 días de infusión con AngII en el nefrón distal. Los valores representan promedio ± DS, normalizados contra rojo Ponceau. n=4-11, * $P < 0.05$.

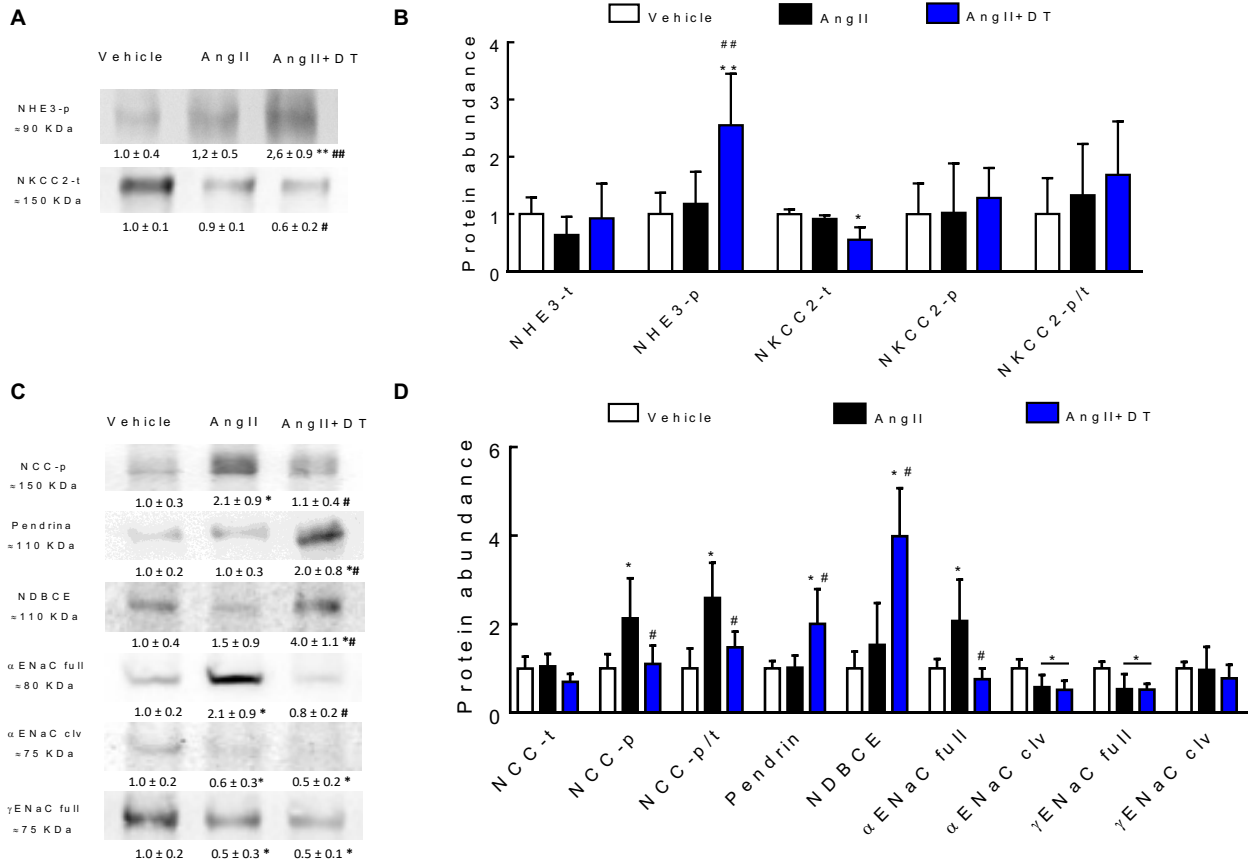


Figura 12. Perfil proteico de transportadores renales de sodio en animales CD11c.DOG tratados con AngII. Se evaluó la abundancia proteica de los transportadores renales en animales tratados con vehículo, AngII y AngII+DT en la fracción de membrana total. **(A y B)** inmunoblot representativo y cuantificación de la abundancia de proteína (respectivamente) de transportadores renales de sodio que cambiaron de manera estadísticamente significativa luego de 14 días de infusión con AngII en el nefrón proximal. **(C y D)** inmunoblot representativo y cuantificación de la abundancia de proteína (respectivamente) de transportadores renales de sodio que cambiaron de manera estadísticamente significativa luego de 14 días de infusión con AngII en el nefrón distal. Los valores representan promedio ± DS, normalizados contra rojo Ponceau. n=4-11, **P* <0.05 vs Vehicle; ***P* <0.01 vs Vehicle; #*P* <0.05 vs AngII; ## *P* <0.05 vs AngII.

Por otro lado, en el nefrón proximal de los animales CD11c.DOG, se observó que el tratamiento con AngII+DT provocó un aumento en la fosforilación del NHE3 (sitio de fosforilación inhibitoria; $P<0.01$) y una disminución en el transportador NKCC2-t ($P<0.05$), en comparación a los grupos vehículo y AngII. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la abundancia de los transportadores NHE3-t, NKCC2-p, NKCC2-p/t, (Figura 12, A-B). En el nefrón distal, el tratamiento con AngII provocó un aumento estadísticamente significativo en la abundancia de los transportadores NCC-p, NCC-p/t y el canal α ENaC full con respecto al vehículo ($P<0.05$, Figura 12, C-D), mientras que la ablación de DCs, previno esta inducción ($P<0.05$, Figura 12, C-D). En los animales AngII y AngII+DT se observó una disminución estadísticamente significativa en el canal α ENaC clv y γ ENaC full con respecto al vehículo ($P<0.05$, Figura 12, C-D), sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Mientras que la ablación de DCs, provocó un aumento de Pendrina y NDBCE, en el grupo tratado con AngII+DT, con respecto a los grupos vehículo y AngII ($P<0.05$ Figura 12, C-D).

Tras lo observado, en los animales CD11c.DOG, podemos indicar que la eliminación de las DCs, mediante la inyección de la DT, modula la reabsorción de sodio en el nefrón proximal (disminuyendo la actividad de NHE3 y disminuyendo la fracción total del NKCC2), así como también previene la inducción de transportadores renales de sodio y cloruro (NCC y α ENaC full), que darían cuenta de la prevención del aumento de la PA inducida por AngII.

Como se mencionó en la introducción, existe amplia evidencia que los efectos antinatriuréticos de AngII están mediados por el AT₁R y a su vez, la participación del SI en la modulación del RAS intrarenal. Es por esto que decidimos analizar la abundancia de los receptores de AngII AT₁R y AT₂R en los animales CD11c.DOG tratados con AngII en presencia o ausencia de DCs. Como se observa en la figura 14 A-B, la infusión de AngII provocó una disminución en la abundancia del AT₁R ($p<0.05$), en comparación a los animales vehículo, mientras que la eliminación de DCs no previno esta disminución en la abundancia del AT₁R ($p<0.05$), en comparación a los animales vehículo. Por otro lado, no se observaron cambios

estadísticamente significativos en la abundancia del AT₂R entre los grupos experimentales (Figura 14 C).

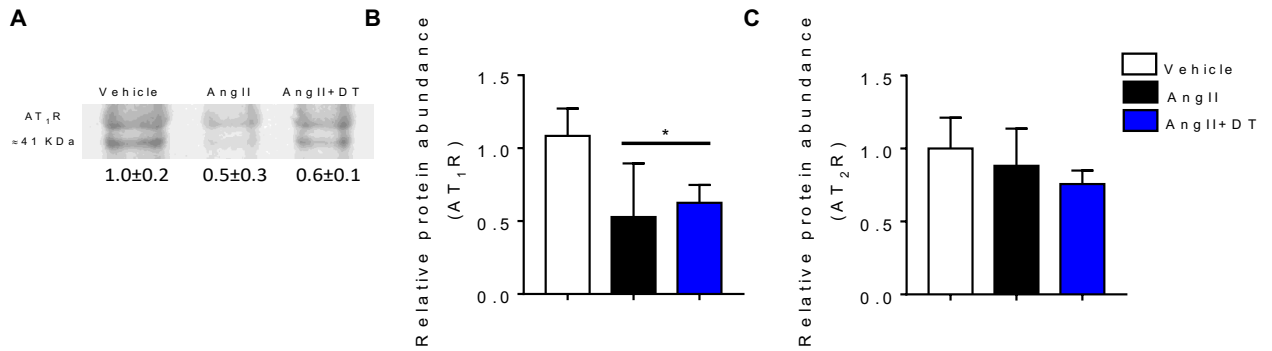


Figura 14. Receptores de AngII en tejido renal de animales CD11c.DOG tratados con AngII. Se evaluó la abundancia proteica de AT₁R y AT₂R renal en animales tratados con vehículo, AngII y AngII+DT en la fracción de membrana total. **(A)** inmunoblot representativo del AT₁R. **(B y C)** cuantificación de la abundancia de proteína de AT₁R y AT₂R renal luego de 14 días de infusión con AngII (respectivamente). Los valores representan el promedio ± DS, normalizados contra rojo Ponceau. n=4-6, **P* <0.05 vs Vehículo.

2. Evaluar si la ausencia de DCs renales modifica la respuesta hipertensiva inducida por Angiotensina II.

Estudiamos si la infusión de AngII confería la capacidad de modular la presión arterial y/o la función renal de las DCs, y si esta potencial capacidad era específica de DCs renales. Para este estudio aislamos células dendríticas (CD11c⁺) renales (rDCs) y esplénicas (sDCs) provenientes de ratones WT tratados con vehículo y AngII durante 14 días. Las células (1×10^6 /animal) fueron inyectadas en animales receptores WT normotensos previamente entrenados para la toma de presión. Realizamos seguimiento de la PAS, durante los siguientes 4 días y luego cada 2 días, hasta completar 14 días de estudio. Como se aprecia en la figura 15A, la transferencia de rDCs vehículo no modificó la PAS. En contraste, la transferencia de rDCs AngII aumentó la PAS de manera significativa a las 24h (123.3 ± 4.4 vs rDCs Vehículo 99.5 ± 2.7 $P < 0.001$ $n=5$). El aumento de PAS fue transitorio, hasta alcanzar valores normales de PAS al día 8. Por otro lado, la transferencia de sDCs, ya sean provenientes de animales AngII o control, no modificó la PAS al animal receptor de las sDCs (Figura 15B). Este resultado muestra que el fenotipo pro-hipertensivo lo presentan las rDCs después del tratamiento con AngII.

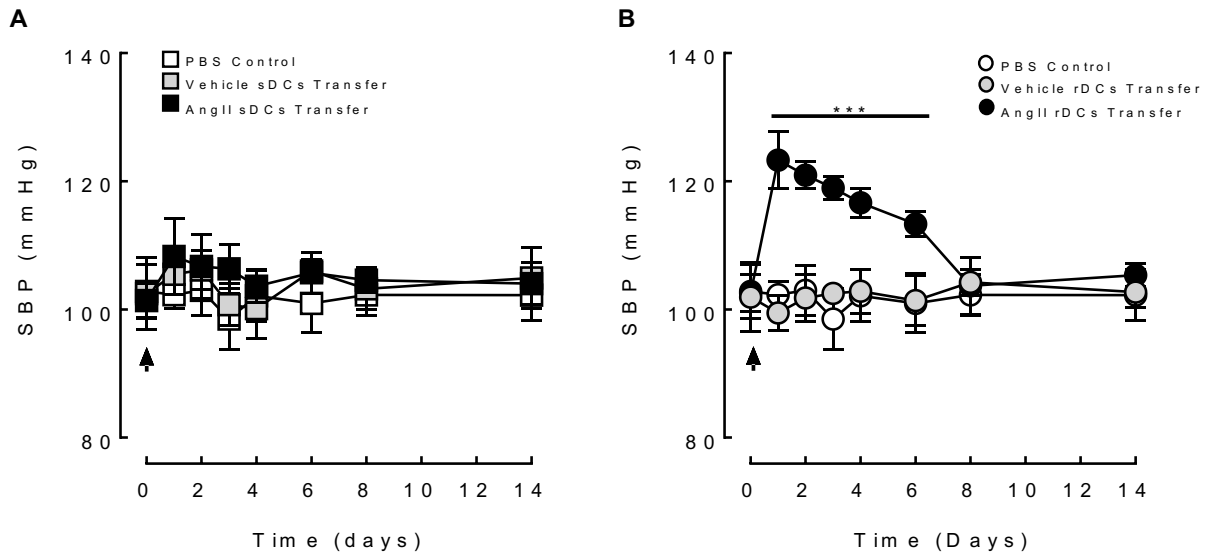


Figura 15. La transferencia de DCs renales provenientes de ratones infundidos con AngII por 14 días causan un aumento de PA. Se realizó una transferencia de DCs renales y de bazo (1×10^6 células por la vena de la cola, indicado con una flecha negra), desde animales tratados con Vehículo y AngII hacia animales receptores WT controles, previamente entrenados para la toma de PAS. Se tomó la PAS los siguientes 4 días post transferencia y luego cada 2 días hasta el día 8 y luego el día de término del seguimiento de la PAS que fue el día 14. **(A)** Seguimiento de la PAS en animales transferidos con sDCs. **(B)** Seguimiento de la PAS en animales transferidos con rDCs. Los valores representan promedio \pm DS, $n=5$; $***P < 0.001$ vs Vehículo.

De manera adicional, evaluamos si rDCs tratadas *in vitro* con AngII, podían inducir aumentos de la PA en ratones WT. Para esto, extrajimos rDCs provenientes de un animal control, las cuales fueron incubadas durante 24h con AngII 100nM o vehículo (En incubadora 37°C, 5%CO₂). Posterior a las 24h de incubación, las rDCs fueron aisladas mediante centrifugación a baja velocidad, resuspendidas en PBS e inyectadas a un animal receptor WT, previamente entrenado para la toma de PA. En la Figura 16 se puede apreciar que las rDCs tratadas *in vitro* con AngII, no son capaces de inducir el aumento de la PA en el ratón receptor.

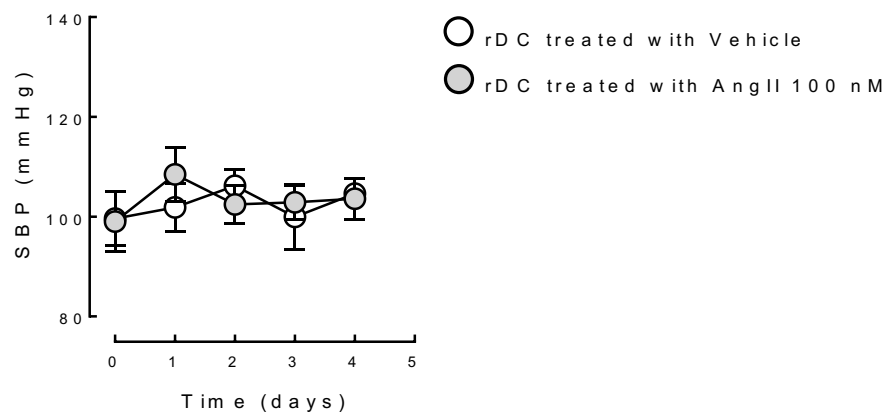


Figura 16. rDCs tratadas *in vitro* con AngII no transfieren la hipertensión. Se extrajeron rDCs provenientes de un animal vehículo, y se incubaron durante 24h con AngII 100nM y otro grupo de células con el vehículo. Se realizó una transferencia de rDCs (1×10^6 células por la vena de la cola), hacia animales receptores WT controles, previamente entrenados para la toma de PAS. Se tomó la PAS los siguientes 4 días post transferencia. Los valores representan promedio \pm DS, n=3.

Este resultado sugirió que las rDCs podrían modular la función renal actuando desde el intersticio peritubular. Para poder apreciar la destinación de las rDCs inyectadas realizamos experimentos de seguimiento de rDCs *in vivo* y en tejidos aislados. Para esto, previo a la inyección, marcamos las DCs con un fluoróforo con emisión infrarroja (ex=720; em=790; DiR). Realizamos el seguimiento midiendo la fluorescencia tanto en ratones vivos como en tejidos aislados de los animales receptores. En la imagen 17A se muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de los animales inyectados con DCs renales con una imagen de rayos

X. En los animales transferidos con rDCs, observamos una señal retroperitoneal difusa, mayoritaria en la zona correspondiente a la fosa renal. El estudio ex vivo de tejidos mostró (Figura 17B) que los riñones de animales transferidos con sDCs independiente de su origen, presentan niveles de fluorescencia similares entre ellos; la fluorescencia observada en los riñones de animales transferidos con rDCs fue el doble de lo observado en los riñones transferidos con sDCs, independiente de su origen (vehículo o AngII; $p < 0.05$, figura 17C). Estos resultados muestran el *homing* preferencial de las rDCs vs. sDCs al riñón, el que es independiente del tratamiento con AngII.

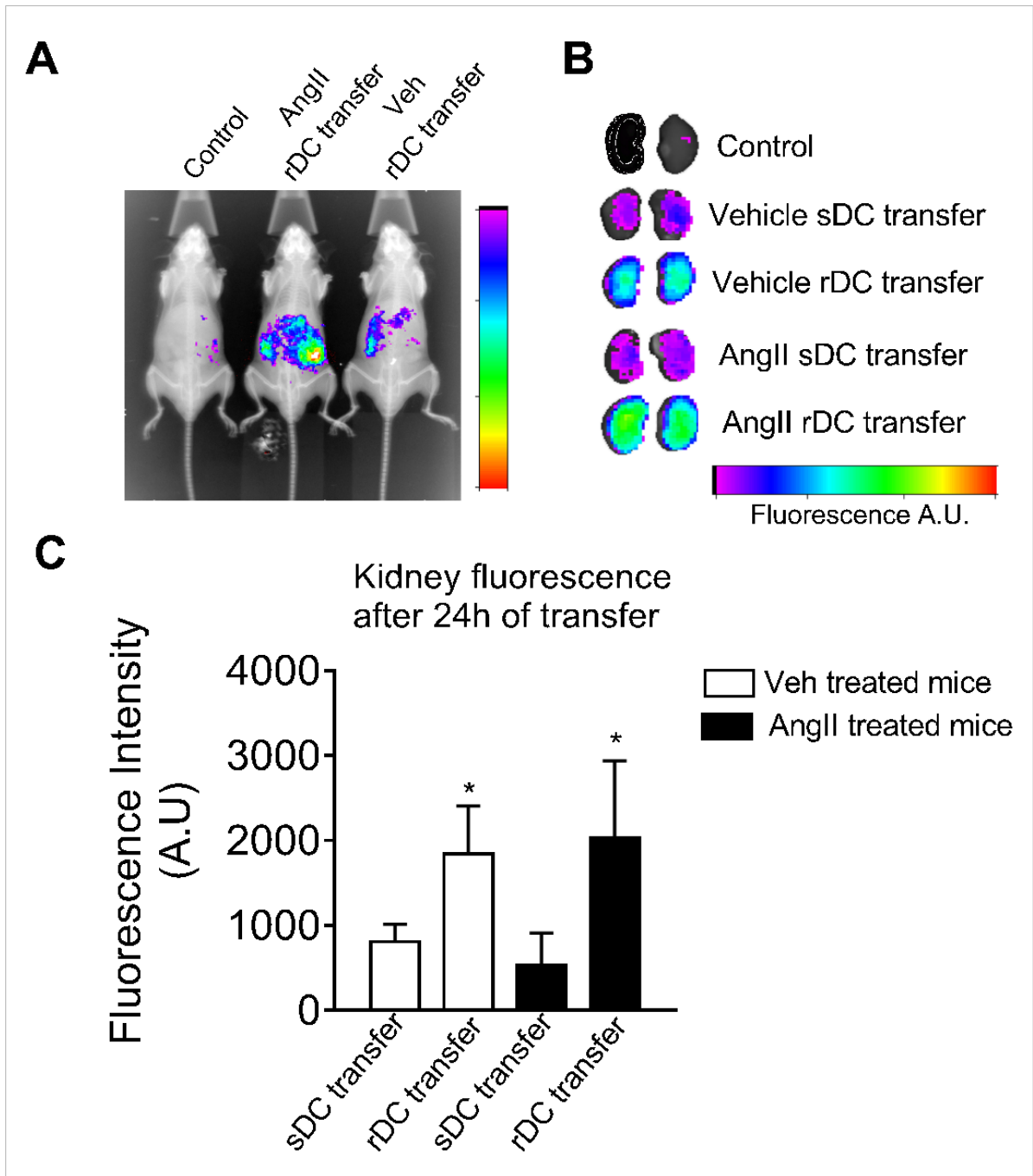


Figura 17. Imagen representativa de ratones WT, inyectados con DCs con fluoróforo IR. Seguimiento in Vivo de DCs renales y esplénicas marcadas con DiR (fluoróforo emisión IR; *in vivo* FX Pro system, Bruker). **(A)** Fluorescencia in Vivo con animal completo 24h posterior a transferencia de rDCs. **(B)** Imágenes representativas de fluorescencia en tejidos aislados 24h posterior a la transferencia de rDCs y sDC. **(C)** Integral Fluorescencia en Riñón 24h posterior a la transferencia rDCs y sDC. Los valores representan el promedio \pm DS. $n=4$; $*P < 0.05$ vs sDC transfer.

Efecto de las rDCs control y AngII sobre la función renal

Los resultados anteriormente descritos, indican que las rDCs provenientes de un animal AngII migran al riñón y aumentan la PAS. Por ello, evaluamos si el manejo renal de sodio de un ratón WT es modificado por la inyección de rDCs AngII. Para esto, valoramos la capacidad natriurética de los animales frente a una sobrecarga aguda de sodio (NaCl 0.9%). Se realizó el test salino para determinar la capacidad basal de excreción de sodio, 2 días previos a la transferencia de rDCs, y posterior a las 24h de la transferencia de las DCs renales "hipertensas", en los mismos animales (test pareado). Como se aprecia en la figura 18A, luego de la transferencia de las rDCs hipertensas, se observó una disminución en la natriuresis de manera significativa respecto de la natriuresis basal (basal= $9.25 \pm 0.76 \mu\text{Eq/g/4h}$; 24h post transferencia= $7.88 \pm 0.4 \mu\text{Eq/g/4h}$; $P < 0.05$; $n = 5$). Al graficar los datos de PAS y de natriuresis (Figura 18B), se observó un claro desplazamiento hacia la derecha de la curva presión-natriuresis.

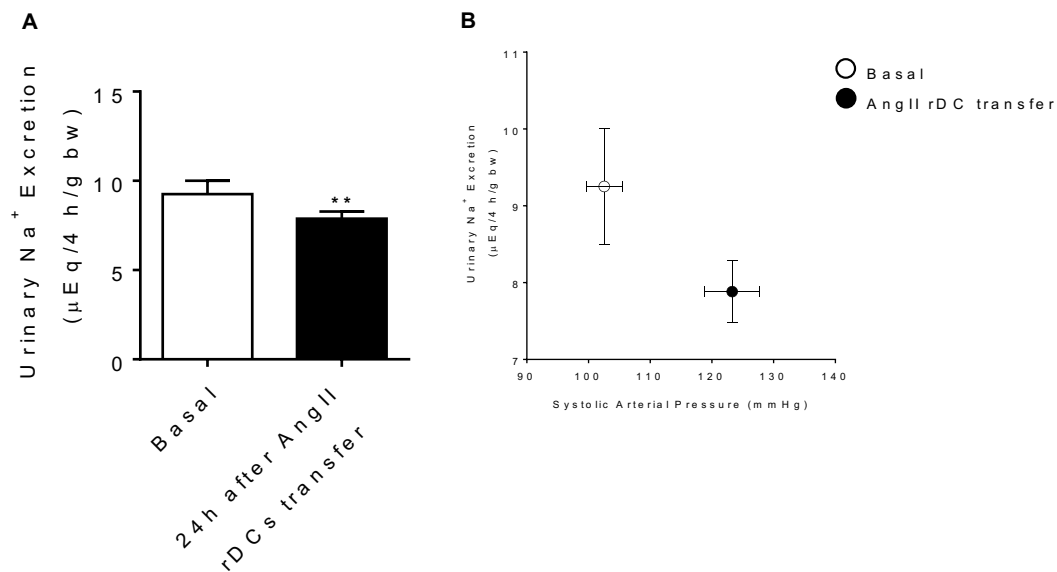


Figura 18. rDCs de animales hipertensos disminuyen la natriuresis. Se evaluó la excreción urinaria de sodio luego de la inyección de una solución de NaCl (0.9%, i.p, 10% del peso del animal, 4h en jaula metabólica) en animales que fueron transferidos con rDCs provenientes de un animal AngII. Se realizó el test basal (previo a la transferencia) y 24h post transferencia de rDCs, para luego medir el Sodio urinario (A). (B) Se integraron los datos de PAS basal y 24h post transferencia

de rDC provenientes de animales AngII en conjunto con los datos de Natriuresis basal y 24h post transferencia de rDC provenientes de animales AngII. Los valores representan el promedio \pm DS. $n=5$; $**P < 0.01$ vs basal.

Luego de observar que la transferencia de rDCs provenientes de un animal hipertenso, transfieren la hipertensión y disminuyen la natriuresis en el animal receptor, evaluamos si esta disminución en la natriuresis se debe a cambios en la abundancia de algún transportador de sodio en el nefrón. Para esto se evaluaron transportadores de sodio de relevancia en el control de la PA (mencionados anteriormente) y en el manejo renal de sodio, potasio y cloruro y se midieron los niveles de proteína mediante *western blot* de los mismos transportadores anteriormente descritos. Luego de 24h de la transferencia de las rDCs solo se observó una disminución en el NHE3-p (indicando que el intercambiador está más activo) a nivel proximal en los ratones transferidos con rDCs AngII en comparación a los transferidos con rDCs Vehículo ($P < 0.01$), sin observar cambios en la abundancia ni actividad en el NKCC2. En el nefrón distal, se observó una disminución en la abundancia del NCC-t y NCC-p, así como también de α ENaC full, γ ENaC full y clv en los animales que fueron transferidos con rDCs AngII vs las rDCs vehículo ($P < 0.05$; $n=5-7$ Figura 19 C-D). No se observaron cambios en la abundancia de los transportadores NHE3, NKCC2-t, NKCC2-p, la razón NKCC2-p/t, α ENaC clv y NDCBE entre los dos grupos experimentales. Sin embargo, evidenciamos un pequeño aumento en la actividad del NCC, dado como la razón del transportador fosforilado y la porción total, sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 19 C-D; ns).

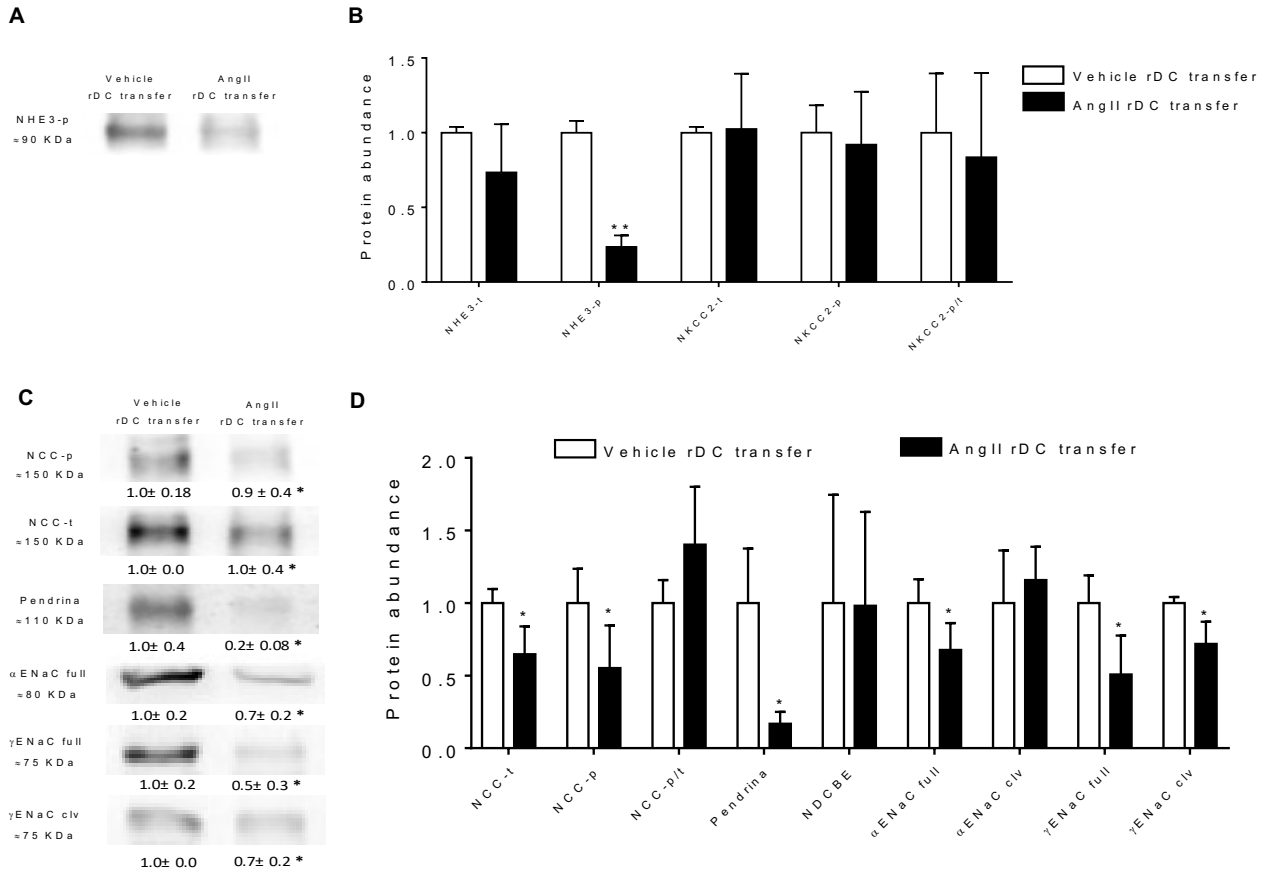


Figura 19. Perfil proteico de transportadores renales de sodio en animales WT transferidos con rDCs. 24h posterior a la transferencia de rDCs vehículo y rDCs AngII, se evaluó la abundancia de los transportadores renales de sodio, mediante *western blot*. En la fracción de membrana del homogenado renal. **(A y B)** inmunoblot representativo cuantificación de la abundancia de proteína de transportadores renales de sodio luego de 24h post transferencia en el nefrón proximal. **(B y c)** inmunoblot representativo y cuantificación de la abundancia de proteína (respectivamente) de transportadores renales de sodio luego de 24h post transferencia en el nefrón distal. Full (canal completo), clv (canal clivado). Los valores representan el promedio ± DS, normalizados contra rojo Ponceau. n=5-7, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs vehicle rDC transfer.

Adicionalmente, estudios preliminares de la localización del pNCC, analizados mediante Inmunofluorescencia, indican que la transferencia de rDCs hipertensas favorecen que este transportador se encuentre en mayor proporción en la membrana apical del túbulo colector, en comparación a los ratones tratados con rDCs controles (Figura 20).

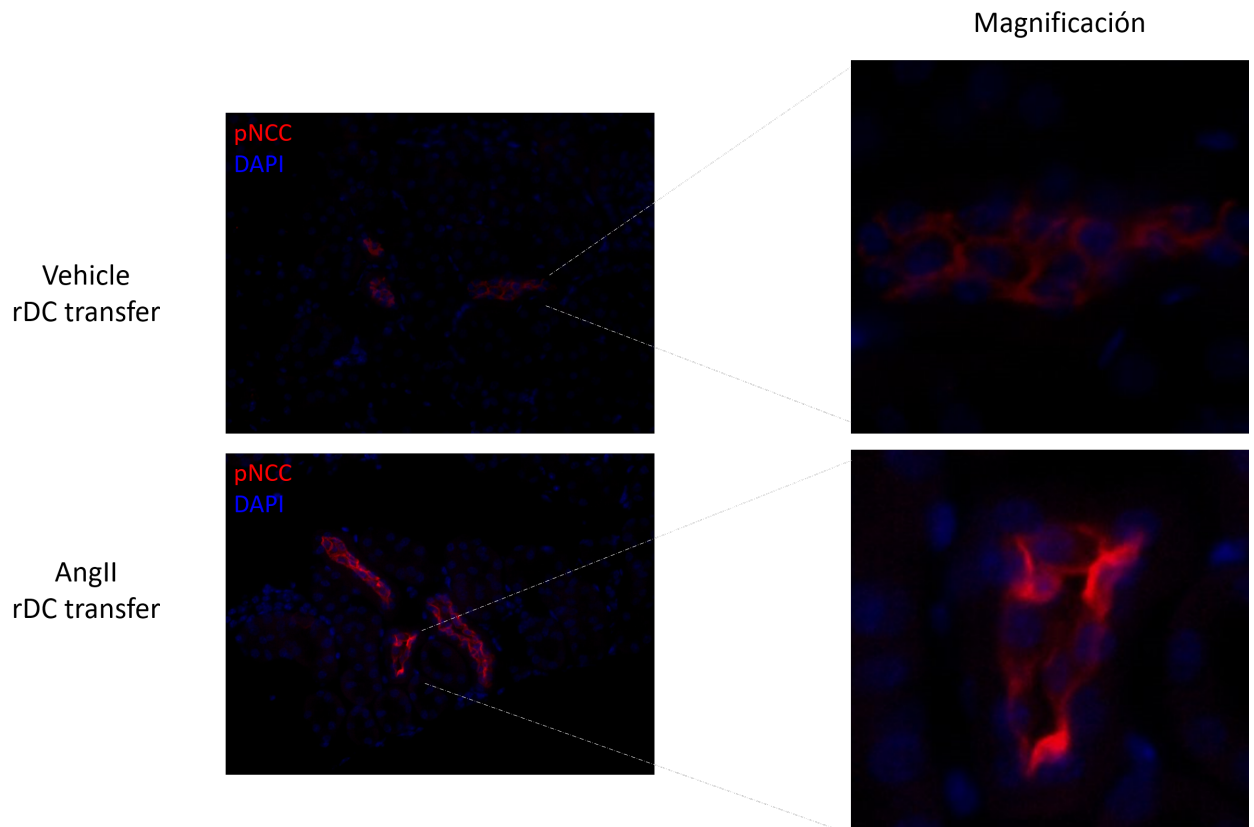


Figura 20. DCs renales provenientes de ratón hipertenso aumentan la localización de pNCC en la membrana apical de las células tubulares. 24h posterior a la transferencia de rDCs vehículo y rDCs AngII, se evaluó la localización del pNCC en criosecciones renales de 18 μm de grosor. En rojo se aprecia pNCC en el túbulo distal cortical (Alexa-594) y en azul se aprecia la tinción nuclear con DAPI. n=3.

En base a los antecedentes de nuestro laboratorio y otros, se sabe que el RAS intrarenal (iRAS) participa activamente en el control y regulación de la PA y del manejo renal del sodio^{48, 90, 92, 93}. Es por esto que quisimos evaluar si el aumento de la PA y cambio en la actividad del NCC puede estar influenciado por el iRAS, luego

de la transferencia de rDCs. Para esto, medimos los niveles proteicos de los componentes del iRAS (Angiotensinógeno AGT, renina, receptor de pro-renina PRR, receptor de angiotensina II de tipo 1 AT₁R, y enzima convertidora de angiotensina II ACE), en riñones de animales WT transferidos con rDCs vehículo o AngII. Solo observamos un aumento estadísticamente significativo en el AGT, en los animales transferidos con rDCs AngII vs los animales transferidos con rDCs vehículo ($P < 0.05$, Figura 21A), sin observar cambios en los otros componentes del iRAS entre la transferencia de rDCs vehículo o AngII, Figura 21B-E.

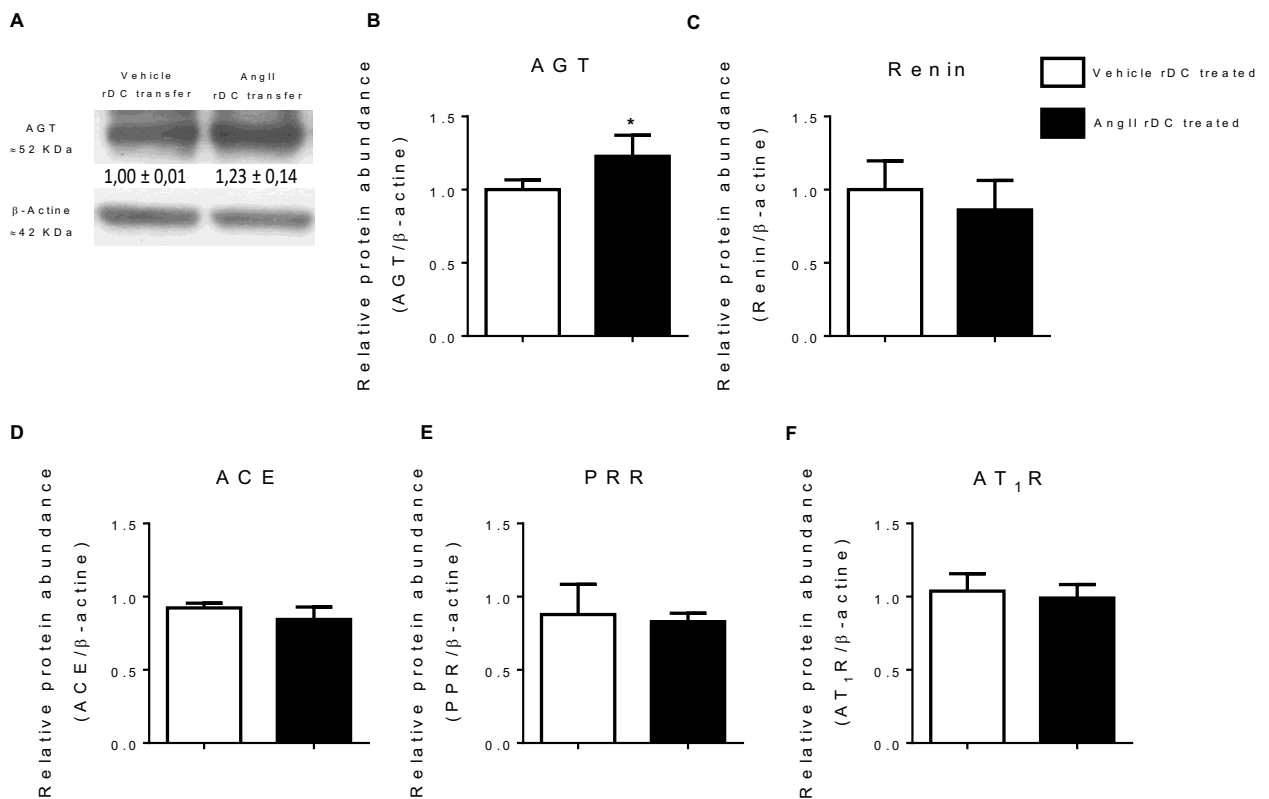


Figura 21. DCs renales provenientes de ratón hipertenso previenen el aumento del Angiotensinógeno en riñón. 24h posterior a la transferencia de rDCs vehículo y rDCs AngII, se evaluó la abundancia de los componentes del iRAS; **(A)** inmunoblot representativo del AGT y cuantificación de la abundancia de proteína **(B)** AGT, **(C)** Renina, **(D)** ACE, **(E)** PRR, y **(F)** AT₁R, mediante *western blot*. Los valores representan el promedio ± DS normalizados contra β-actina. n=4-5, * $P < 0.05$ vs vehicle rDC treated.

Evaluamos además los niveles plasmáticos de sodio, potasio y cloruro, en los animales transferidos con rDCs provenientes de animales tratados con AngII o vehículo durante 14 días. No se observaron cambios estadísticamente significativos entre ambos grupos experimentales. (Figura 22A-C).

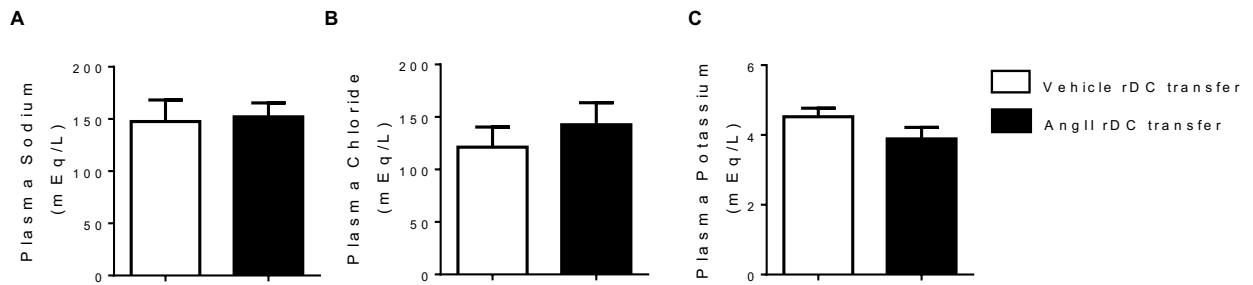


Figura 22. Niveles plasmáticos de electrolitos 24h post transferencia de DCs renales. Se evaluó concentración plasmática de sodio, potasio y cloruro luego de la transferencia con rDCs provenientes de un animal Veh y AngII 24h post transferencia de DCs. Se midió **(A)** Sodio, **(B)** Potasio y **(C)** Cloruro. Los valores representan el promedio \pm DS. n=3-7.

Las rDCS requieren de la presencia de linfocitos para aumentar la presión arterial.

Guzik et al. demostraron que la ausencia de linfocitos T disminuye el aumento de la presión arterial en respuesta a la infusión de AngII, resultado que indica la participación de los LT para la generación de HTA por aumento de la actividad del RAAS⁵⁸. Quisimos estudiar si la transferencia de rDCs AngII es suficiente para inducir hipertensión en animales carentes de LT y LB. Para ello realizamos la transferencia adoptiva de rDCs de animales que recibieron infusión de Ang II por 14 días a animales carentes de LT y LB (RAG1^{-/-}).

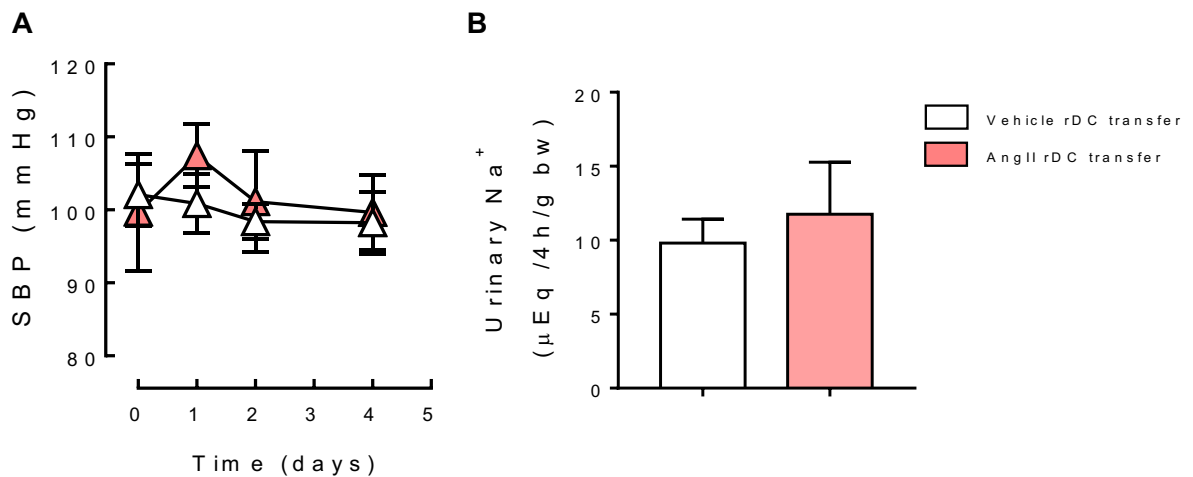


Figura 23. Transferencia de rDCs AngII no altera la PA, ni modifica la natriuresis en ratones RAG1^{-/-}. Se realizó una transferencia de rDCs renales (1×10^6 células por la vena de la cola), desde animales tratados con vehículo y AngII a receptores RAG1^{-/-} normotensos, previamente entrenados para la toma de PAS. Se tomó la PAS los siguientes 4 días post transferencia (**A**). Test salino 24h posterior a la transferencia de rDCs (**B**). Los valores representan el promedio \pm DS. n=4-7.

Sorprendentemente, observamos que la transferencia de rDCs AngII a ratones RAG1^{-/-} no generó un aumento significativo en la PAS (Figura 23A).

Por otro lado, los estudios de capacidad natriurética de los animales RAG1, evaluada como la excreción urinaria de sodio en el test salino realizado 24h posterior a la transferencia de rDCs AngII, no mostró cambios en la capacidad natriurética de los animales RAG1^{-/-} receptores de rDCs provenientes de un animal AngII (Figura 23B), la que fue similar a la de ratones que recibieron rDCs de un animal control normotenso (infusión de vehículo; Figura 23).

3. Caracterizar el efecto *in vivo* de AngII sobre las DCs renales

Evaluamos el fenotipo de rDCs, mediante el estudio de marcadores de maduración clásicos (MHC-II, CD80 y CD86) y a un receptor de *homing* renal, (receptor de Fractalkina CX₃CR₁^{83, 94}) mediante citometría de flujo. Comparamos rDCs provenientes de animales sanos y tratados con AngII durante 14 días. Las rDCs AngII presentaron un aumento significativo de intensidad de fluorescencia media (MFI) del marcaje para el receptor CX₃CR₁ (CD45⁺, Zombie⁻, CD11c⁺) respecto de las rDCs vehículo (Figura 24).

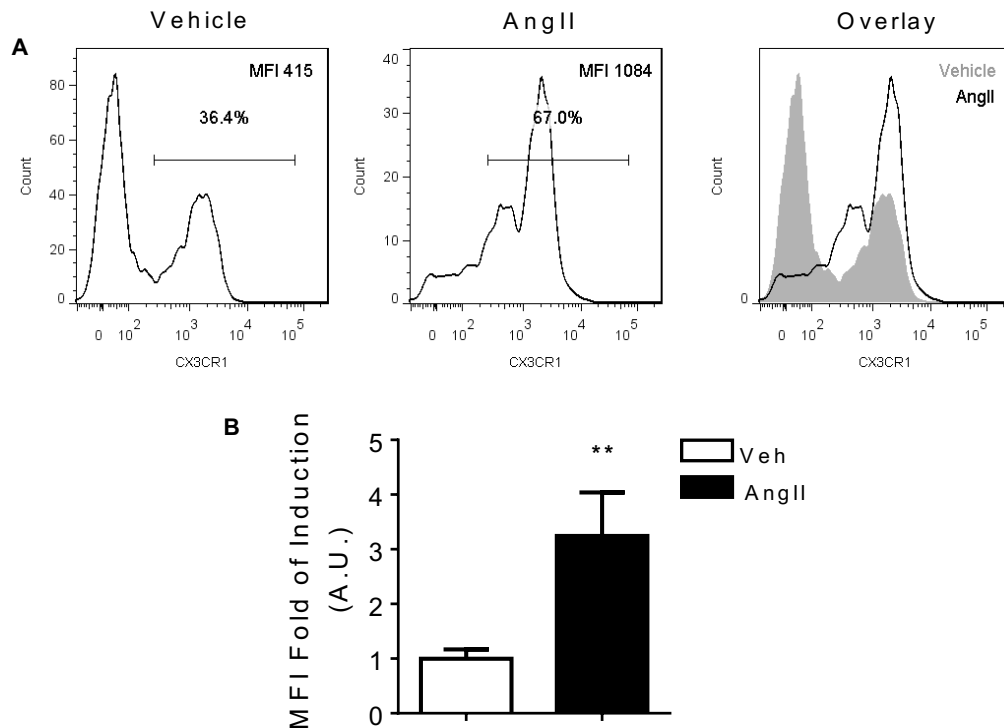


Figura 24. DCs renales provenientes de ratones hipertensos presentan un aumento en la expresión del receptor de *homing* renal CX₃CR₁. Se extrajeron rDCs desde animales tratados durante 14 días con AngII o vehículo y se realizó citometría de flujo para CX₃CR₁ (CD45⁺, Zombie⁻, CD11c⁺). **(A)** Histogramas representativos para CX₃CR₁ en DCs tratados con vehículo, AngII y el solapamiento de ambos histogramas (de izquierda a derecha respectivamente). **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media para CX₃CR₁ en ambos tratamientos. Los valores representan el promedio \pm DS. n=4-5, ***P* < 0.01 vs vehículo.

Para evaluar si el tratamiento con AngII causaba cambios en el fenotipo de las DCs, se evaluó la expresión de MHC-II, CD80 y CD86, marcadores de maduración y fenotipo proinflamatorio, en rDCs de ratones WT que recibieron la infusión de vehículo o AngII durante 14 días. Como se observa en la figura 25, la infusión con AngII aumentó significativamente la MFI para los tres marcadores presentes en la membrana de células CD11c^{Hi} en comparación a las rDCs tratadas con vehículo, sugiriendo que AngII promueve maduración de DCs a un fenotipo proinflamatorio.

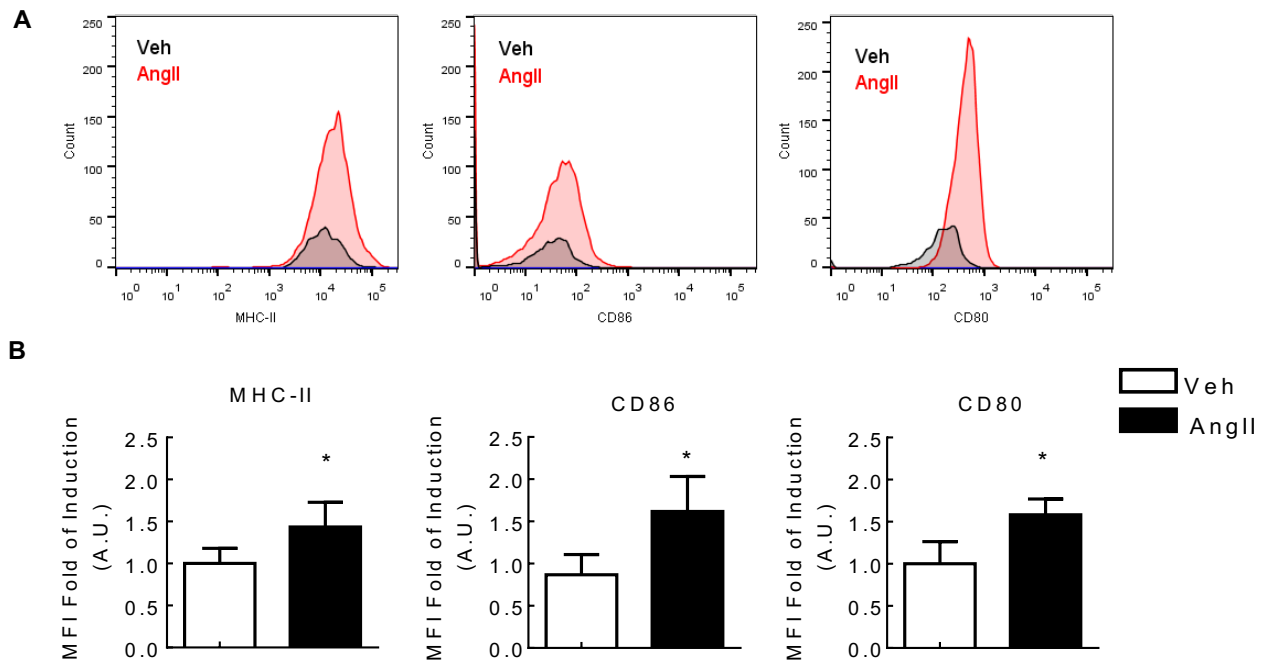


Figura 25. DCs renales provenientes de ratón hipertenso presentan un perfil proinflamatorio. Se extrajeron DCs renales desde animales tratados durante 14 días con AngII o vehículo y se realizó citometría de flujo para marcadores de maduración (CD45⁺, Zombie⁻, CD11c⁺). **(A)** Histogramas representativos para MHC-II, CD80 y CD86 en rDCs tratados con vehículo, AngII (de izquierda a derecha respectivamente). **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media para estos marcadores en ambos tratamientos. Los valores representan el promedio \pm DS. n=5, *P < 0.05 vs vehículo.

Análisis transcriptómico de rDCs

En base a los resultados observados, se aprecia un evidente cambio fenotípico de las rDCs al provenir de un animal tratado con AngII en comparación a uno tratado con vehículo, es por esto, que decidimos realizar un análisis transcriptómico de RNA aislado de rDCs, vehículo y AngII para identificar que transcritos estarían involucrados en los efectos sobre la PA que describimos previamente.

Se obtuvo muestras de RNA desde las rDCs, como se mencionó anteriormente (sección de métodos), y se envió a secuenciar al centro de secuenciación, Genoma Mayor, de la Universidad Mayor.

Para realizar análisis de transcriptómica mediante RNAseq. Se consideraron genes que presentaran una fracción de cambio (FC) versus el control, menor a 0.5 (FC-0,5) o mayor a 2 FC (FC+2). Se realizó análisis de ontología (programa PANTHERdb) y análisis de enriquecimiento para evaluar set de genes estadísticamente sobre representados (programa BINGO). El análisis de ontología informó que 315 genes presentaron un FC-0.5 y 124 genes un FC+2 (Figura 28 y 29). Al observar la ontogenética se evidenció 1 población mayoritaria de genes con FC-0.5, que están relacionados con procesos celulares (135 genes, Figura 29A) y 2 poblaciones con FC+2, que se relacionan con procesos celulares (48 genes) y procesos metabólicos (43 genes) (Figura 28A). El análisis de enriquecimiento indicó que los genes con FC-0.5 están relacionados con múltiples procesos celulares (Figura 29B), mientras que los genes con FC+2 se relacionan principalmente, con metabolismo de hormonas y biosíntesis de lípidos y glucocorticoides (Figura 28B). Dentro de la lista de genes con FC-0.5 el menor es la ribonucleasa P RNA-like 3 (Rprl3) con un FC 0.002; por otro lado, dentro de los genes que presentan un FC+2 el mayor es Stanniocalcin-1 (Stc1) con un FC 119 (Figura 27).

Genes codificantes	22.533
Transcritos analizados	46.078
Transcritos que cambiaron significativamente	4694
Transcritos FC>2	124
Transcritos FC<0,5	315

Tabla 4. Tabla resumen de expresión de transcritos desde el genoma de referencia del ratón (GRCm38.p6) en muestras de DCs renales tratadas con AngII y vehículo.

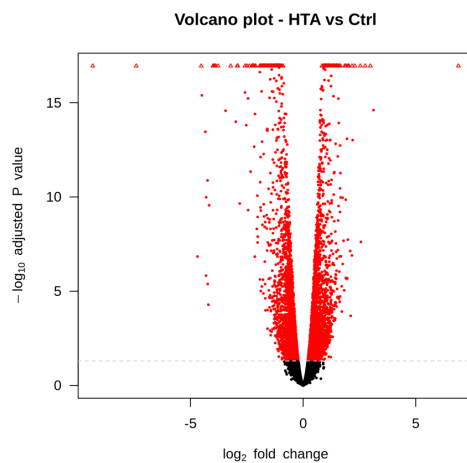


Figura 26. Gráfico de Volcano, indicando dispersión de las veces de cambios en los transcritos de DCs renales tratadas con AngII y Vehículo. En rojo se muestran los transcritos que tienen significancia estadística. $n = 3$; $p < 0,05$, Análisis estadístico de distribución binomial invertida ajustada.

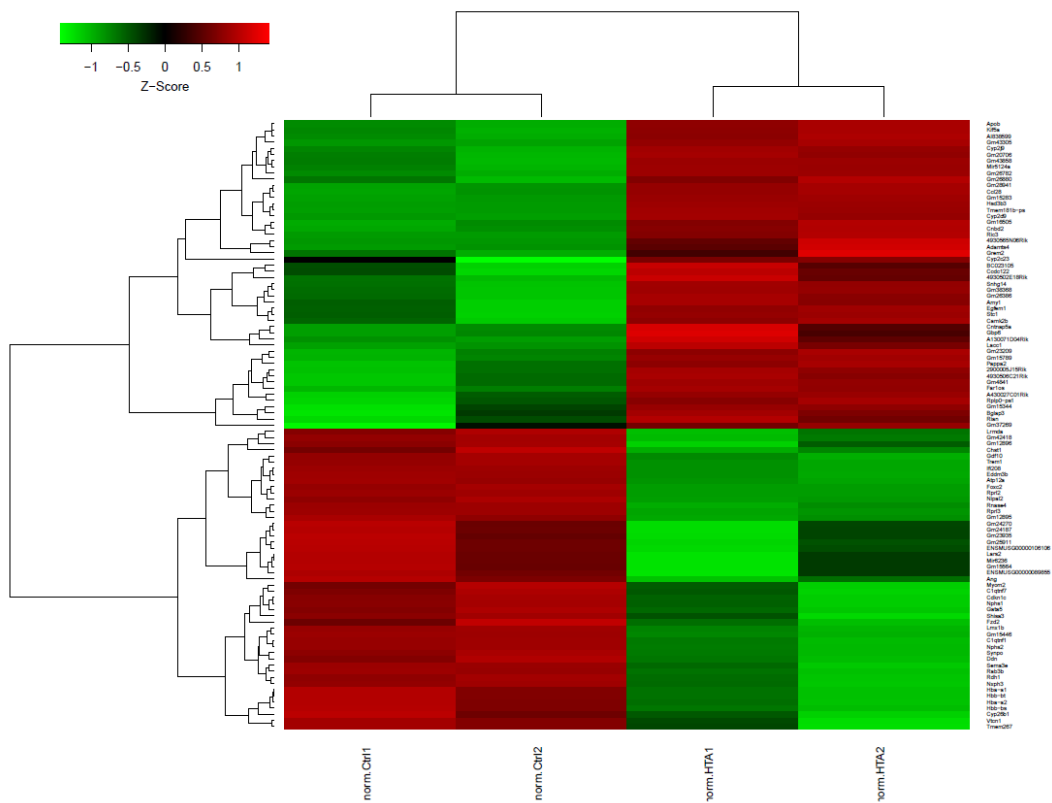


Figura 27. Heatmap de transcritos en DCs renales tratados con AngII o Vehículo. Veces de cambio del top50 de transcritos en DCs renales de animales tratados con AngII o vehículo. En verde transcritos que se reprimen y en rojo transcritos que se inducen. n= 3.

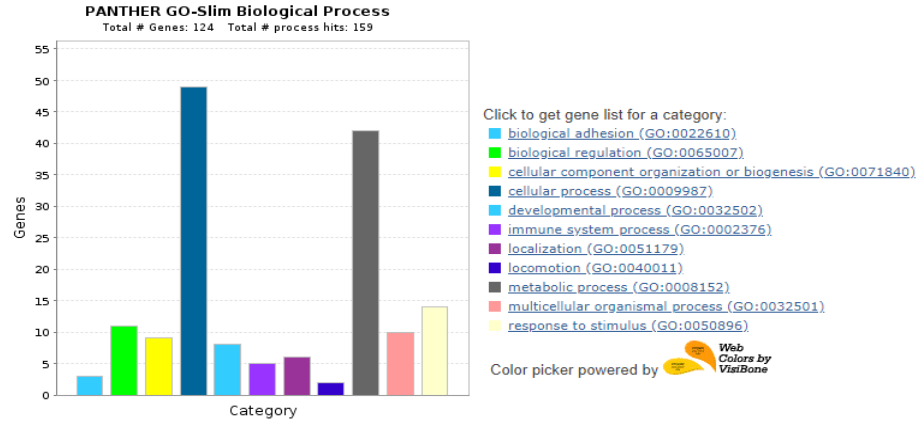
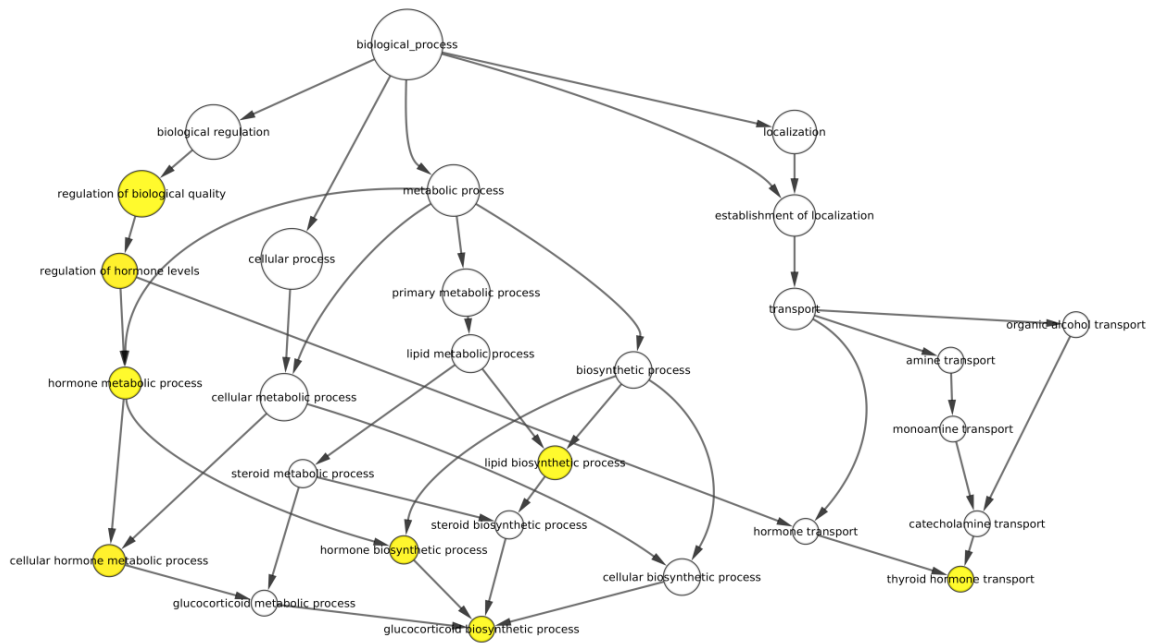
A**B**

Figura 28. Familias génicas y Ontología de transcritos en DCs renales de animales tratados con AngII o Vehículo que se inducen. A Análisis bioinformático PANTHERdb, que permite combinar la función de genes, ontología, vías de señalización y análisis estadístico de transcritos. **B** Análisis bioinformático BINGO para determinar que categorías están estadísticamente sobrerrepresentadas en un set de transcritos. Se observan los transcritos que se inducen (FC>2). Análisis estadístico mediante distribución hipergeométrica corregida (Bonferroni). $n = 3$; $P < 0.05$.

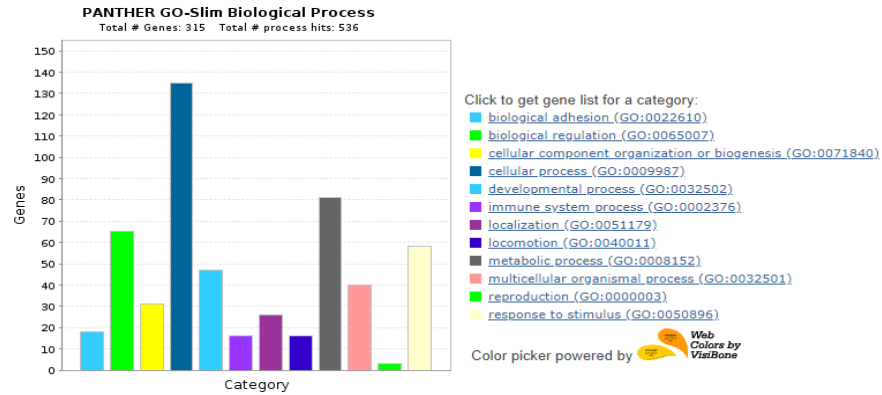
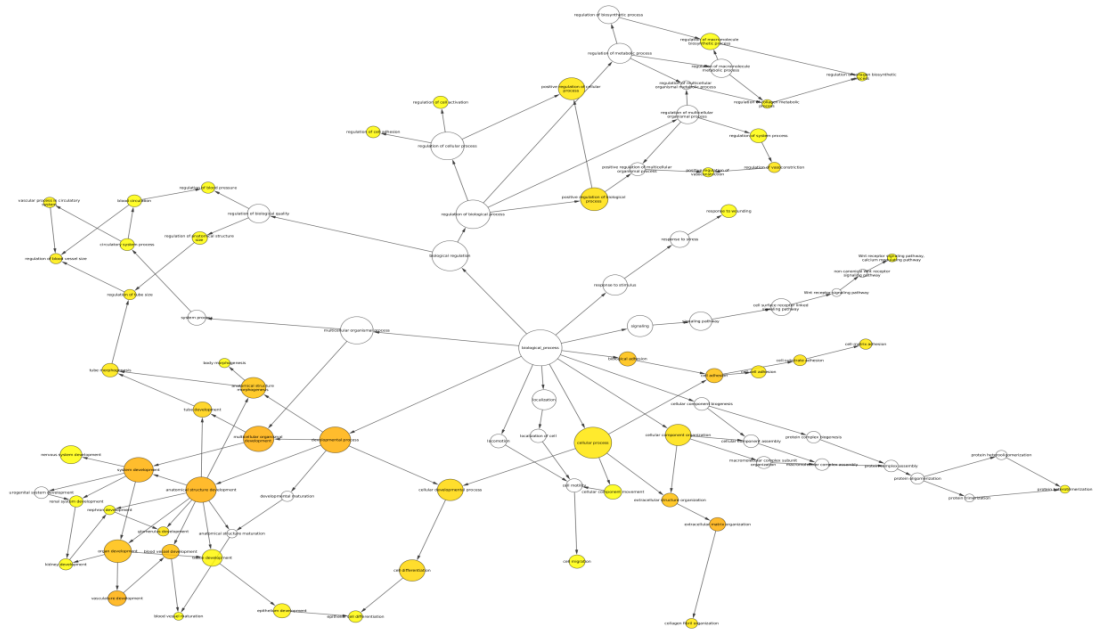
A**B**

Figura 29. Familias génicas y Ontología de transcritos en DCs renales de animales tratados con AngII o Vehículo que se reprimen. A Análisis bioinformático PANTHERdb, que permite combinar la función de genes, ontología, vías de señalización y análisis estadístico de transcritos. **B** Análisis bioinformático BINGO para determinar que categorías están estadísticamente sobrerrepresentadas en un set de transcritos. Se observan los transcritos que se reprimen ($FC < 0.5$). Análisis estadístico mediante distribución hipergeométrica corregida (Bonferroni). $n = 3$; $P < 0.05$.

Mecanismo celular del fenotipo prohipertensivo de las rDCs AngII

El tratamiento durante 14 días con AngII genera un fenotipo proinflamatorio e inductor de aumentos de PA en las rDCs. Para evaluar potenciales mecanismos celulares y moleculares activados en respuesta a la infusión de AngII, realizamos un *screening* de algunos genes de expresión en tejido renal y cuya inducción han sido asociada con aumentos PA en respuesta a AngII y que fueron observados en el estudio bioinformático del transcriptoma de las rDCs.

Para ello, purificamos RNA total a partir de las rDCs y realizamos RT y qPCR en tiempo real para evaluar la abundancia relativa de los mRNA de interés. En la tabla 3 podemos apreciar una lista de genes relacionados con estrés oxidativo, con el RAAS y otros relacionados con señales proinflamatorias. Observamos que AngII causó un aumento en la expresión de Nox2 en rDCs, en comparación con las rDCs vehículo ($P<0.05$). También se observó un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β ($P<0.001$), IL-6 ($P<0.001$), IL-23 ($P<0.01$) e IFN γ ($P<0.05$) en las rDCs provenientes de un animal AngII en comparación a las rDCs provenientes de un animal vehículo (Tabla 3). No se observaron efectos significativos en otros genes relacionados con el RAS, en rDCs tratadas con vehículo o AngII.

		Renal DCs	
		Vehicle	AngII
Nox	Nox2	1.00±0.15	1.96±0.48 *
	Nox3	1.00±0.31	0.97±0.10
	Nox4	1.00±0.28	0.99±0.32
RAS	ACE1	1.00±0.26	1.77±0.59
	AGT	1.00±0.15	0.62±0.26
	MR	1.00±0.35	1.15±0.32
	AT ₁ R	1.00±0.08	0.74±0.23
Cytokines	TGF β	1.00±0.18	1.18±0.36
	IL-1β	1.00±0.32	3,04±0.39***
	IL-6	1.00±0.85	9.11±1.47***
	IL-23	1.00±0.46	4.01±1.23**
	IFNγ	1.00±0.52	67.7±30.2*

Tabla 3. Expresión de genes en rDCs renales luego de 14 días de tratamiento con vehículo y AngII. Los valores representan promedio \pm DS, $n=4-6$, $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$.

Luego de observar que el tratamiento con AngII en rDCs genera un aumento en los niveles del mRNA de *Nox2*, quisimos evaluar la abundancia de la proteína *Nox2* en rDCs. Para esto, se extrajeron rDCs provenientes de animales tratados con vehículo o AngII durante 14 días, de igual manera como se mencionó anteriormente. Luego de la obtención de las rDCs se realizó la extracción de proteínas totales y se utilizaron para evaluar la abundancia de *Nox2* mediante *western blot*.

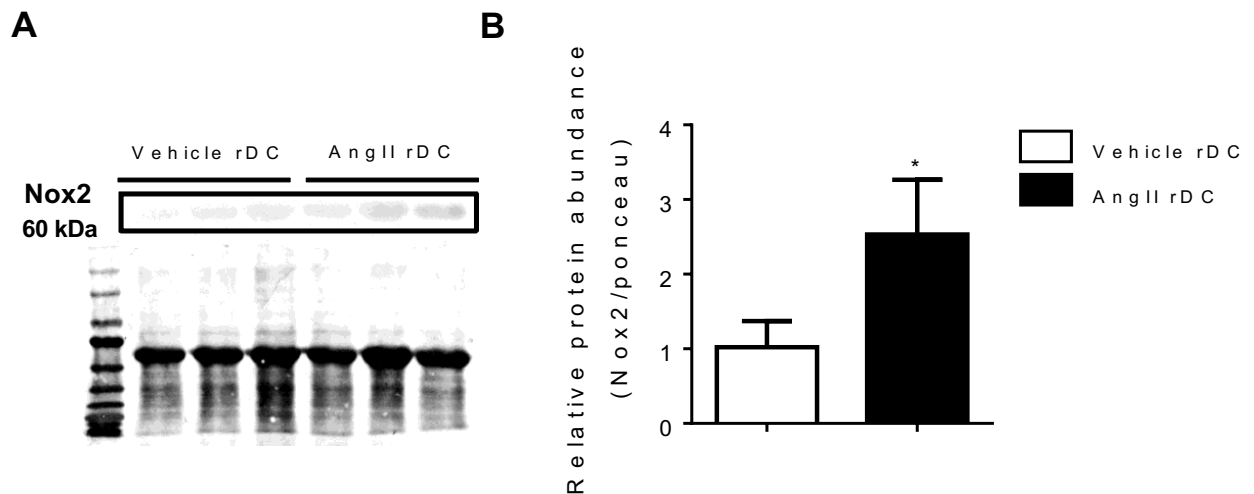


Figura 30. DCs renales hipertensas presentan una mayor abundancia de Nox2. (A) *Western blot* de *Nox2* para rDCs provenientes de animales tratados con vehículo y AngII. (B) cuantificación de imagen en A. Los valores representan el promedio \pm DS. $n=4-5$, $*P < 0.05$ vs vehículo.

Se puede apreciar en la Figura 30, que el tratamiento con AngII durante 14 días, generó un aumento en la abundancia de la proteína *Nox2* en rDCs, en comparación a las rDCs tratadas con vehículo ($p<0.05$.)

Discusión

Los principales resultados de esta tesis son: a) las DCs son necesarias para el desarrollo de HTA en respuesta a AngII, para la disminución de la natriuresis y el cambio en el patrón de expresión de transportadores tubulares de sodio, particularmente en la rama gruesa del Asa de Henle y en el nefrón distal b) la transferencia de rDCs de un animal hipertenso por la infusión de AngII (durante 14 días) a un animal WT causan un aumento transitorio de la PA, asociado a la disminución en la capacidad natriurética, c) que la acción pro-hipertensiva de las rDCs provenientes de animales tratados con AngII (durante 14 días) requiere de la presencia de linfocitos en el animal receptor y d), las rDCs provenientes de un animal hipertenso por la infusión de AngII presentan un cambio fenotípico acompañado de un cambio en su transcriptoma. La evidencia reciente demuestra la participación de células inmunes en el desarrollo y mantención de la HTA y daño en tejido blanco^{85, 90, 95-97}. Sin embargo, este es el primer estudio que muestra que las rDCs son las que específicamente median el aumento de PA, un efecto que depende de la presencia de linfocitos y se asocia a la modulación de la función renal.

Eliminación de DCs en modelo AngII

Los resultados de la presente tesis son consistentes con resultados de estudios recientes de nuestro grupo, en los que observamos que la eliminación de DCs previene el desarrollo de HTA, daño en órgano blanco e inflamación en ratones que recibieron infusión de AngII más dieta alta en NaCl⁹⁰. A diferencia del estudio previo, en este trabajo de tesis eliminamos el alto aporte de sal en la dieta como parte del protocolo inductor del aumento de la PA. Así, la prevención del desarrollo de aumentos de PA mediante la eliminación de DCs indica que la acción de AngII, independientemente del estímulo proinflamatorio adicional que representa una alta ingesta de sal, depende de la presencia de DCs. Nuestros estudios mostraron que, aunque se observa esta “resistencia” a la acción de AngII, no hay cambios en la abundancia de receptores del RAAS (AT₁R o AT₂R) renales, lo que sugiere que el papel de las DCs no dependería de la modulación de la abundancia de receptores a los componentes de este eje hormonal.

Además del efecto de la remoción de DCs, otros grupos han reportado que la depleción de células LysM⁺ (eliminación de un 98% de macrófagos y un 16% de células CD11c⁺)⁹⁸ previene el desarrollo de HTA inducido por AngII y la reconstitución con monocitos (CD11b⁺/Gr-1⁺), es suficiente para restaurar la respuesta a la infusión de AngII⁹⁹. Estos antecedentes indican que diversas poblaciones de células inmunes mieloides, presentadoras de antígeno, son requeridas para el aumento de PA inducida por AngII, sugiriendo que existe algún grado de redundancia funcional¹⁰⁰.

Eliminación de DCs y efecto vascular

Desde un punto de vista hemodinámico, el aumento de la PA puede ser el resultado de aumentos del GC y/o la RPT. Como comentamos, nuestros resultados muestran un importante papel de las DCs como moduladoras de la función renal, que no permite descartar que además la remoción de DCs puedan modificar la función vascular y la RPT. Por ello, realizamos estudios de contractilidad aórtica en los distintos grupos experimentales. Sorprendentemente, observamos que la eliminación de DCs, no mejoró la disfunción vascular generada por AngII, indicando que la disminución de la PA debería estar mediada por mecanismos extravasculares. No obstante, observamos una disminución en la capacidad contráctil frente a agonista alfa adrenérgico, en los animales tratados con AngII+DT (sin DCs). Estos resultados podrían explicar en parte, la disminución de la PA, sin embargo, se necesitan más estudios a nivel vascular y en arterias de resistencia, que permitan caracterizar si la eliminación por la infusión de AngII modifica la función de arterias de resistencia.

Eliminación de DCs y efecto sobre la natriuresis

De acuerdo con la hipótesis de Guyton⁷ y a los distintos trabajos en que se manipula genéticamente el transporte renal de sodio¹⁰¹, la HTA implica la disminución de la excreción urinaria de NaCl y agua. En el caso particular de la infusión de AngII, los estudios de Guyton mostraron que junto con el aumento de la RPT, se genera un desplazamiento de la curva presión vs. natriuresis hacia la derecha, observando que para obtener una natriuresis adecuada se requiere una

mayor PA media^{7, 102}. El test salino nos permitió evaluar la presión natriuresis en los diferentes grupos experimentales. Cuando realizamos la infusión de AngII la carga aguda de sodio demostró el efecto anti natriurético. Observamos que desde el día 4 post infusión de AngII existe una disminución en la natriuresis, que se acentúa al día 14 post infusión de AngII. Estos resultados son concordantes con los estudios de Kamat y cols, que interpreta los resultados del test salino como un indicador de la actividad de los transportadores de sodio en el túbulo renal¹⁰³. La eliminación de DCs previene la caída de la natriuresis y el desplazamiento a la derecha de la curva presión vs. natriuresis. Este efecto es de gran relevancia para el desarrollo de HTA, ya que como lo demostró Coffman, la HTA inducida por AngII es dependiente de la modulación de la función renal¹⁰⁴. Nuestros resultados demuestran que las DCs son necesarias para que se manifieste la acción anti-natriurética de AngII en el riñón, y más aún, para que aumente la PA. En este sentido, la ausencia de DCs confiere “resistencia” a las acciones anti-natriureticas de AngII. Considerando los resultados de los animales NAS⁹¹ del presente estudio, este efecto se extiende a la acción de aldosterona sobre la función renal. Estudios posteriores deberán caracterizar si la natriuresis en condiciones basales, sin activación inadecuada del RAAS, se ve modificada por la ausencia de DCs. En base a nuestros resultados, es esperable que animales carentes de DCs presenten mayor labilidad hemodinámica frente a la deprivación de NaCl dietario y/o las caídas del volumen circulatorio efectivo, que podrían ser secundarias a hemorragia o deshidratación. No obstante, ratones CD11c.DOG tratados con vehículo + DT durante 14 días, no presentaron cambios en la evolución de su PA, presentando valores de PA similares al vehículo sin DT ($P=ns$) siendo animales normotensos (datos no mostrados).

Efecto de la eliminación de DCs sobre los transportadores renales de sodio.

Un primer grupo de estudios fisiológicos fue utilizado para explorar las potenciales causas de la mantención de la natriuresis en los animales en que se eliminaron las DCs y recibieron AngII. Los estudios del test salino muestran que en el caso de ratones tratados con AngII existe una disminución de la capacidad natriurética. Este efecto es prevenido por la eliminación de las DCs. Los estudios

disponibles ^{103, 105} muestran que esta prueba funcional evalúa principalmente la función del túbulo proximal y del Asa de Henle, por lo que nuestros resultados sugieren que estos segmentos son los que están sujetos a modulación por las DCs. En primer lugar, es importante destacar que el túbulo proximal reabsorbe 2/3 de la carga filtrada de sodio, y el mayor transportador de sodio en este segmento es el NHE3, por lo que una disminución en su actividad (medido como la forma fosforilada del intercambiador) daría cuenta de un importante efecto natriurético como lo observado en los animales AngII+DT. Sería relevante confirmar este hallazgo mediante estudios de localización subcelular y comprender el mecanismo por el cual las DCs modifican la distribución del NHE3 en la célula tubular. En segundo lugar, la prueba de furosemida dio resultados indicativos de que la eliminación de DCs disminuye la actividad de NKCC2. A diferencia del test de sobrecarga aguda (test salino), el test de infusión de furosemida mide la actividad de NKCC2 en un animal en estado de equilibrio antes de la maniobra experimental. Tanto la evaluación a los 4 días, así como a los 14 días mostraron que un efecto de la eliminación de DCs es la disminución de la actividad NKCC2, a valores cercanos al 50% de la actividad basal. Por otra parte, en el caso del tratamiento con AngII sin eliminación de DCs se observa aumento de la actividad NKCC2 en comparación con la actividad basal. Finalmente, los estudios de abundancia de la proteína NKCC2 a los 14 días de tratamiento muestran que efectivamente la eliminación de DCs con DT disminuye NKCC2. Por lo tanto, considerando estos resultados concluimos que un efecto principal de la eliminación de las DCs es la disminución de abundancia y actividad de NKCC2, el aumento secundario de la natriuresis y la prevención de la expansión de la volemia que normalmente ocurre con el aumento de AngII circulante y el consecuente aumento de la actividad NKCC2. Considerando que en la rama gruesa del Asa de Henle normalmente se reabsorbe el 25% de la carga filtrada de NaCl, el efecto natriurético de la inhibición de la actividad NKCC2 es muy significativo, comparable a la acción de furosemida.

A la fecha existe evidencia de diversos mecanismos moduladores de la actividad y abundancia de NKCC2. Entre los reguladores hormonales positivos se encuentran vasopresina (ADH), AngII, agonistas β -adrenérgicos, paratohormona

(PTH) y glucagón ¹⁰⁶. Los reguladores negativos son el óxido nítrico (NO), Péptido natriurético atrial y endotelina-1¹⁰⁶. A nivel celular, segundos mensajeros como cAMP y cGMP han sido caracterizados como los reguladores de la actividad NKCC2 ¹⁰⁷ El punto de convergencia de las vías de señalización son los niveles de cAMP intracelular, que es incrementado por los reguladores positivos; los reguladores negativos aumentan la actividad de fosfodiesterasa tipo 2 (PDE2), disminuyendo la concentración intracelular de cAMP ¹⁰⁶. También se conoce que diversas citoquinas tales como IL-1 e γ INF, secretadas por macrófagos, así como también por DCs, pueden modular de manera directa al NKCC2, aumentando la biodisponibilidad de NO ^{108,109}. Adicionalmente se sabe que existen al menos seis isoformas diferentes de NKCC2 generadas por *splicing* y codificadas en el exón 4 del gen *Slc12a1*, de las cuales las más abundantes en el riñón son las isoformas A, B y F ¹¹⁰, quienes difieren en la afinidad que presenta por los iones, las características en el transporte de los iones y en su localización a lo largo del Asa de Henle ^{111,112,113}, También se conoce que, frente a cambios en las concentraciones de sodio o cloruro, las células tubulares pueden adaptarse y provocar un cambio en la abundancia de las distintas isoformas del NKCC2, proceso que también puede ser modulado por AngII ¹¹⁴. Estudios moleculares son necesarios para identificar como es la interacción entre las DCs y alguna de las isoformas particulares del NKCC2 a lo largo del Asa. Por otro lado, se ha observado que dentro de los mecanismos que controlan la presión natriuresis, estaría la actividad de la iNOS en tejido renal, la cual podía ser modulada y afectar los niveles tisulares de NO¹¹⁵ ¹¹⁶. Como demostramos en esta tesis, aparentemente las DCs modulan los mecanismos de presión natriuresis, sugiriendo evaluar en el futuro la biodisponibilidad de NO, o parte de sus vías de señalización en los animales con/sin DCs tratados con AngII, y poder relacionarlo con los cambios en la actividad del NKCC2. Sería interesante saber si las rDCs pueden modular la actividad del NKCC2.

Cambios adicionales en el patrón de expresión de los transportadores de sodio fueron la inducción de los transportadores NCC-t y NCC-p al igual que α ENaC en respuesta a AngII. Diversos reportes, han indicado que los modelos de HTA inducidos por AngII, generan un aumento de la abundancia y actividad de los

transportadores de sodio a nivel distal y colector, debido en parte, a una disminución del NHE3 a nivel proximal, y de manera compensatoria, aumentaría la disponibilidad de sodio a nivel distal, generando una mayor reabsorción de sodio²⁸. Sin embargo, estos antecedentes han sido reportados, en homogenados totales de proteína y en animales tratados a dosis menores de AngII; mientras que, en este trabajo, los resultados encontrados han sido en proteínas de fracciones de membrana, y con dosis alta de AngII. Nuestros resultados demostraron que, en ratones tratados con AngII, la ausencia de DCs previene la inducción de los transportadores NCC-t y NCC-p al igual que α ENaC. La disminución de la actividad de estos sistemas es un factor adicional que explica la resistencia a la acción de AngII de ratones sin DCs, e implicaría que, aunque la oferta de NaCl hacia el distal de la mácula densa ha aumentado, esta carga adicional parcialmente continúa en el lumen del nefrón distal, aumentando así la natriuresis.

Finalmente, observamos la inducción de Pendrina y NDBCE en los ratones AngII+DT. Este resultado indicaría un efecto derivado de la ausencia de las DCs, sobre las células intercaladas del túbulo colector. Es probable que la regulación positiva de estos transportadores permita la reabsorción de sodio y cloruro desde el lumen del túbulo colector, alcalinizando el pH urinario por el aumento de la excreción urinaria de bicarbonato. Este mecanismo podría representar una acción compensatoria de los efectos de la eliminación de DCs en regiones río arriba del túbulo. Son necesarios estudios adicionales para evaluar su relevancia en el manejo renal de sodio. Adicionalmente, estudios futuros deberán analizar si la ausencia de efecto renal de AngII en los ratones sin DCs, se debe a cambios en los niveles plasmáticos de aldosterona y/o cambios de otros factores moduladores de la natriuresis.

Como discutimos más adelante, nuestros estudios de transferencia adoptiva de rDCs son sugerentes de modulación de la función tubular por rDCs a nivel local. Una posible explicación a estos resultados es que las DCs controlen la actividad de mecanismos compensatorios a la activación de RAAS y sus acciones sobre el nefrón. Entre los potenciales candidatos a nivel renal se encuentran cambios de la expresión/actividad de los ATRs y las cininas. Este último es un sistema de

hormonas peptídicas generadas localmente. Las cininas, particularmente la bradicinina en el riñón, son generadas por serino-proteasas como la kalicreína, a partir del péptido precursor cininógeno. Las acciones de bradicinina (BK) son mediadas por 2 receptores acoplados a proteína G, B₁R y B₂R. El B₂R se expresa en forma constitutiva en las células epiteliales del túbulo proximal, la rama gruesa ascendente del Asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector^{117,118}. La infusión de BK estimula la natriuresis, efecto que se ha atribuido a la inhibición de NCC y ENaC, vía B₂R^{119,120}. Además, la actividad de ACE no solo cataliza la generación de AngII a partir de AngI, sino que inactiva a BK. Es interesante comentar que la K_m de ACE por BK es 30 veces mayor que la K_m por AngI, además de tener una k_{cat}/K_m por BK 10 veces mayor que por AngI¹²¹. Es por ello que pequeñas variaciones de actividad ACE afectan drásticamente los niveles de BK, en forma cuantitativamente mayor que el efecto sobre AngII¹²¹. Por ende, se debe evaluar si la presencia de DCs afecta los niveles de BK y los componentes del sistema de cininas renales, modulando la natriuresis en respuesta a la infusión de AngII y/o aldosterona.

Efecto agudo de la transferencia de rDCs sobre la PA y la capacidad natriurética

Nuestros resultados mostraron que la transferencia de rDCs provenientes de animales tratados con AngII, provoca una disminución en la capacidad natriurética a las 24 horas post-transferencia (como respuesta a la carga aguda de sodio). Este resultado muestra que las rDCs pueden rápidamente modular la función tubular, en forma independiente de la actividad del RAAS. Además, sugiere que, aunque en el riñón de los animales receptores deben ser ocupado por rDCs normotensas el “nicho renal”, las rDCs hipertensas son capaces de causar una modificación significativa de la natriuresis, que afecta la PA.

En cuanto al mecanismo celular que explique los cambios de capacidad natriurética de los animales receptores de rDCs hipertensas, encontramos un aumento de la actividad del NHE3 (medido como una disminución en la fosforilación inhibitoria) lo cual daría cuenta de los cambios agudos en la PA. Se ha descrito, que la respuesta al test salino sería un reflejo de la actividad del transporte de sodio en el

túbulo proximal¹⁰³, que podrían implicar un cambio en la porción de transportador activo en la microvellosidad del epitelio tubular, sin cambios considerables en la abundancia de la proteína ^{122, 28} indicando mayoritariamente que existen cambios en la actividad más que en la abundancia de la proteína, es necesario entonces, poder evaluar la localización subcelular de este transportador, para identificar si existe un cambio en la actividad tras la transferencia de rDCs hipertensas. Por otro lado, la localización del pNCC mediante IF mostró mayor abundancia en la zona apical de la membrana plasmática del nefrón distal, en comparación a los ratones trasferidos con rDC vehículo. Es necesario completar estos estudios de localización subcelular de los transportadores, con estudios moleculares sobre las vías de transducción de señales que activan al NCC (WNK-SPAK-OSR1). De manera adicional, sería recomendable determinar los niveles plasmáticos de AngII y Aldosterona, luego de la transferencia de rDCs ¹²³.

Transferencia de HTA por las rDCs

Las DCs, son parte del Sistema monocito-macrofágico, y se encuentran en el riñón^{77, 100}, en zonas peritubulares. Se ha observado que las DCs, participan en procesos inflamatorios de diversas enfermedades renales^{77, 81, 94, 124}. En esta tesis descubrimos que la transferencia de rDCs provenientes de animales hipertensos a animales WT sanos, causa un aumento de la PA. Este efecto fue específico de rDCs, y no se observó al realizar la transferencia de DCs esplénicas provenientes de animales tratados con AngII. Sin embargo, en 1980, Olsen demostró que la transferencia de células esplénicas desde animales hipertensos inducidos por DOCA-Sal provoca un aumento en la PA, en los animales receptores de estas células⁵⁴. Sin embargo, el diseño experimental desarrollado por Olsen, fue diferente al nuestro; en primer lugar se obtuvo células esplénicas desde ratas donantes a las que se les indujo HTA durante 3 meses y con un modelo diferente de HTA; en segundo lugar, Olsen transfirió 180 millones de células esplénicas, número muy por sobre lo actualmente descrito en transferencias adoptivas de células inmunes, y por sobre al número de células que nosotros transferimos (1 millón); finalmente, Olsen transfirió células esplénicas, donde mayoritariamente existen LT y LB, y en menor % células presentadoras de antígeno como las DCs, por lo cual se podía interpretar que

el efecto observado no corresponde a un tipo de célula en específicos. Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia que muestren que las DCs, en particular DCs renales transfieren la HTA. Más aun, sugieren que la residencia en tejido renal podría ser clave en la adquisición del fenotipo pro-hipertensivo y/o en la activación a nivel renal de los mecanismos pro-hipertensivos. Otros grupos han demostrado que la transferencia de DCs esplénicas de ratones hipertensos por AngII no aumentan la PA *per se*, pero sí aumenta la sensibilidad de respuesta frente a la infusión de AngII, generando HTA con dosis menores ⁸⁵. En concordancia con nuestros resultados, la transferencia de bDCs de ratones hipertensos por AngII no aumentó la PA en los animales receptores⁸⁵. Por otro lado, recientemente nuestro grupo ha demostrado que en animales sin DCs, la transferencia de bDCs (bDCs vehículo, no expuestas previamente a AngII) en conjunto con la infusión de AngII restablece la sensibilidad a AngII⁹⁰. Estos resultados sugieren que bDCs pueden reemplazar a las DCs nativas, ausentes en ratones CD11c.DOG por acción de AngII. Nuestros resultados demostraron que una fracción importante de rDCs transferidas se alojaron en el riñón del animal receptor, y que las rDCs de animales hipertensos presentan aumento de la expresión de receptores que median el *homing* renal (figura 24). Considerando que las rDCs son capaces de aumentar la PA, especulamos que las rDCs sufren un proceso de diferenciación por acción de AngII. Este consistiría en la adquisición de un fenotipo pro-hipertensivo. En base a los resultados, este fenotipo se adquiere en el riñón.

Observamos que las rDCs de un animal control (vehículo), también llegan al riñón, indicando que independiente del tratamiento, pareciera, que las rDCs tienen un marcador *homing* hacia su lugar de origen. Observamos que las rDCs presentan el marcador de *homing* renal, CX₃CR₁, un receptor de quimioquina (fraktalkina), que es secretada por el epitelio renal¹²⁵, y que se encuentra de manera abundante en rDCs y macrófagos, en situaciones de inflamación renal^{77, 83, 94}. Sin embargo, este marcador se encuentra en mayor abundancia en las rDCs provenientes de animales AngII. Este resultado nos indica, que si bien, las rDCs hipertensas presentan un mayor marcador de *homing* renal, estas no migran en mayor proporción al riñón, cuando se comparan con las rDCs control. Concluimos que las rDCs deben

presentar un fenotipo adquirido en forma dependiente de la infusión de AngII, que es distinto del *homing* renal pero que sí podría requerir de la residencia en el tejido renal. De forma adicional, estudios recientes indicarían que CX₃CR₁, no es un marcador específico de DCs, y que sería compartido por otras células mieloides como los macrófagos, por lo cual, es posible que parte del aumento de CX₃CR₁ en los animales tratados con AngII sea por una población de macrófagos que comparte marcadores con DCs como MHC-II y CD11c⁸¹.

¿Cuál es la naturaleza del cambio fenotípico que sufren las rDCs de animales tratados con AngII? *A priori*, podría estar asociado al desarrollo de un fenotipo pro-inflamatorio, e implicar la producción de mediadores que modulen la función tubular (citoquinas, quimioquinas, ROS etc). Los transportadores renales de sodio pueden ser modulados de manera directa por citoquinas^{103, 105, 108} otras señales paracrinas^{38, 126}. En los últimos años, se ha demostrado que un aumento en la actividad del iRAS, podría generar un aumento en la actividad de los transportadores renales de sodio a nivel del túbulo proximal, distal y colector^{37, 48, 50, 127, 128}. Se observó que la transferencia de rDCs provenientes de animales tratados con AngII, provocó un aumento en la abundancia de AGT en el riñón de los animales transferidos. Se ha demostrado que AGT también es sintetizado en el túbulo proximal^{129, 130} y como se mencionó anteriormente, un aumento de AGT intrarenal, correlaciona con aumento de HTA^{49, 131}. También se sabe que existe una estrecha relación entre citoquinas como IL-6 o IFN γ y el aumento de AGT en el túbulo proximal^{41, 132, 133-135}, indicándonos que células inmunes podrían aumentar los niveles de AGT de manera indirecta, tras secretar citoquinas como IL-6 o IFN γ . Estos resultados indicarían que la transferencia de rDCs hipertensas, provocan un aumento en el AGT (probablemente por secreción de citoquinas como IL-6 o IFN γ), y esto provocaría, por un lado, un aumento local de AngII, y por otro una mayor activación del NHE3 en el túbulo proximal, generando este aumento de PA transitoria. Sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta hipótesis.

Según el reporte de Guzik et al, la HTA inducida por AngII depende de la presencia de los LT⁵⁸ y requeriría el desarrollo de respuesta inmune. Sin embargo,

nuestros resultados muestran que los cambios en la PA luego de la transferencia de las rDCs son rápidos, lo que nos sugirió que la participación de los LT en un mecanismo inmune de presentación antigénica y respuesta de memoria sería improbable como mediador inicial del efecto inductor de aumentos de la PA de las rDCs hipertensas. Para evaluar si los linfocitos eran necesarios para que las rDCs de animales AngII causen aumentos de la PA, se realizó la transferencia de rDCs hipertensas y controles hacia animales carentes de LT y LB, (RAG1^{-/-} sin encontrar cambios en los niveles de PA a las 24h ni cambios en la función renal. Kirabo y cols. realizaron la transferencia de DCs esplénicas, hipertensas a ratones RAG1^{-/-}, sin encontrar cambios en la PA, resultado que nosotros replicamos (datos no mostrados). Estos resultados, nos indican que independiente de la cinética del aumento de la PA posterior a la transferencia de las rDCs, las rDCs ya diferenciadas hacia un fenotipo pro-hipertensivo necesitan de los linfocitos para generar un aumento de la PA. Experimentalmente, esta nueva hipótesis se puede probar mediante la transferencia de linfocitos renales provenientes de animales hipertensos por AngII o control a un receptor sano. Junto con permitir la ulterior caracterización del tipo específico de linfocitos implicados en este efecto, permitiendo avanzar en el entendimiento del mecanismo de acción de AngII en el riñón y su relación con la HTA.

Por otra parte, el resultado que obtuvimos en los animales RAG1^{-/-}, aunque aparentemente congruente con el resultado de Guzik y cols.,⁵⁸ es difícil de interpretar. Nuestros experimentos de transferencia de rDCs ocurren en un contexto en que presumiblemente las rDCs residentes (normotensas) se encuentran en el tejido renal del animal receptor. Si bien las rDCs de un ratón infundido con AngII aumentan la PA, este efecto es menor que la infusión de AngII en forma directa, lo que podría resultar de la suma de la acción de rDCs con fenotipo normotenso sumadas a las de efecto pro-hipertensivo transferidas. En la misma línea, la ausencia de aumento de la PA en los ratones RAG1^{-/-} podría resultar de la incapacidad de las rDCs transferidas de llegar al tejido renal. Por ende, estudios de marcaje y estudio de la destinación de las rDCs transferidas son necesarios para evaluar esta hipótesis. Adicionalmente, la caracterización de la abundancia de DCs en tejido renal de

animales RAG1^{-/-} puede ayudarnos a aclarar si la presencia de linfocitos modifica el *homing* de DCs hacia el riñón.

En base a nuestros resultados, surgen otras interrogantes, ¿Serán LT clásicos los que regulan este efecto? En los últimos años, se ha observado la participación de diversos tipos de células inmunes tipo innatas, las cuales pueden responder rápidamente frente a patógenos sin requerir presentación antigénica¹³⁶ Dentro de estas células tipo innatas, encontramos LT del tipo *Natural killer* (activados por antígenos lipídicos), los cuales se ha descrito que no participarían en la HTA inducida por AngII⁸⁵. También se han descrito los LT $\gamma\delta$ (subunidades del receptor de los linfocitos T, TCR)¹³⁷, los cuales participan en el desarrollo de HTA inducida por AngII^{136, 138}. Estos linfocitos T $\gamma\delta$ podrían actuar de manera rápida e independiente de presentación antigénica, quizás, por señales entre una DC y dichos linfocitos o por interacción entre ellos sin presentación de antígeno¹³⁹. Dados los resultados obtenidos en esta tesis, sugiere observar en un futuro, si existe alguna comunicación entre las DCs y los LT $\gamma\delta$, y en particular las rDCs.

El aparente cambio fenotípico de las rDCs, posterior al tratamiento con AngII, fue analizado mediante citometría de flujo, evaluando marcadores clásicos de maduración de DCs. Encontramos que las rDCs hipertensas, presentan una inducción del perfil de marcadores de superficie proinflamatorio, en comparación a las rDCs vehículo. Lo cual ha sido reportado por otros grupos y el nuestro^{58, 84, 85, 90}, indicando que la HTA, genera un cambio fenotípico en las DCs, hacia un perfil, proinflamatorio, y que presentarían eventualmente capacidad de presentar un neoantígeno originado en la HTA⁸⁵. Este cambio fenotípico en las rDCs hipertensas, implica cambios en el patrón de expresión génica. Para evaluar estos potenciales cambios, preliminarmente analizamos la abundancia del mRNA de diversos genes que se han asociado al desarrollo de HTA por infusión de AngII en el tejido renal, y que podrían verse modificados en las rDCs de animales HTA. Luego de 14 días de tratamiento con AngII, se observó un incremento en la abundancia del mRNA de la Nox2, que codifica para la proteína NADPH oxidasa, que genera ROS al interior de la rDC. Este antecedente, se relaciona a la evidencia reportada por Kirabo et al,

indicando que, al interior de las DCs, se forman neoantígenos derivados de la acción de ROS sobre las proteínas^{85, 86}. estudios futuros deberán evaluar si es necesaria la inducción de Nox2 para la diferenciación pro-hipertensiva, y si este cambio modula la función de los linfocitos residentes en el riñón y/o la función de las células tubulares. Adicionalmente se observó un incremento en la abundancia del mRNA de diversas citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, INF γ , IL-23) en las rDCs hipertensas, que indicarían una eventual acción sobre LT, o directamente sobre los túbulos renales, para mantener la HTA. Diversos estudios han demostrado la importancia de estas citoquinas, en el manejo renal de sodio^{70, 95, 103} y es posible que estén mediando los efectos encontrados tras la transferencia de las rDCs provenientes de animales hipertensos.

El cambio fenotípico de las rDCs sugiere que existe un cambio en el transcriptoma causado por la infusión de AngII. En los estudios de transcriptoma y bioinformática de rDCs observamos que la infusión de AngII, genera un cambio en familias génicas relacionados con procesos de biosíntesis de lípidos y hormonas y glucocorticoides, que se encuentran aumentados (FC>2). Además, en el estudio inicial buscamos transcritos que hayan sido descritos previamente en la regulación de la PA o patologías renales, así como también, en la activación de LT, o citoquinas relacionadas con el manejo renal de sodio. Entre ellos encontramos varios transcritos relacionados con activación de linfocitos T (CCL28, CXCL10¹⁴⁰, IL-6^{102, 141, 142, 143, 62, 144}, PD-L1, STAT2, IL15Ra, ITSN2) canales y transportadores de iones involucrados en la activación de NADPH oxidasa (NCX1, NCC, NOX4)¹⁴⁵ entre otros. Por otro lado, dentro de los transcritos que disminuyen su abundancia (FC<0.5), y que podrían regular la función inmune o bien se han visto involucrados en enfermedades renales o en el control de la PA, encontramos SGK1^{146,147}, S1PR3^{148, 149}, TLR11, CD4, CD209a¹⁵⁰, CD11b. Estos resultados preliminares, nos indicarían que AngII provoca un cambio fenotípico en las rDCs, que se explica en parte por efectos genómicos. Estamos realizando nuevos análisis, intentando identificar vías de señalización y factores que puedan determinar los cambios encontrados.

En conclusión, los resultados de esta tesis entregan evidencia novedosa sobre la participación de las DCs en la HTA, y particularmente las rDC, quienes serían capaces de adquirir un fenotipo pro-hipertensivo, mediante mecanismos que involucran el manejo renal de sodio. En base a estos resultados, proponemos que *el tratamiento prolongado con AngII (14 días) provoca un cambio fenotípico de las rDCs, que incluye la secreción citoquinas antinatriuréticas como IL-6 y/o un aumento en la actividad del iRAS, lo cual causa modulación en la actividad de transportadores de sodio de las células tubulares, aumenta la reabsorción renal de sodio y la PA.* Creemos que el descubrimiento del papel de las células dendríticas como parte de los mecanismos que generan la HTA, abre nuevas perspectivas y hace necesario estudiar si en la HTA en pacientes sal-sensibles e hipertensos esenciales puede tener algún papel. De ser así, nuestro estudio sería un paso inicial que permitirá el desarrollo de nuevas terapias biológicas o farmacológicas para los pacientes que sufran de HTA.

Referencias

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK and He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365: 217-23.
2. Ibrahim MM and Damasceno A. Hypertension in developing countries. *Lancet*. 2012; 380: 611-9.
3. Guyton AC. The surprising kidney-fluid mechanism for pressure control--its infinite gain! *Hypertension*. 1990, p. 725-30.
4. Hall JE, Granger JP, do Carmo JM, et al. Hypertension: physiology and pathophysiology. *Compr Physiol*. 2012; 2: 2393-442.
5. Singh M, Mensah GA and Bakris G. Pathogenesis and Clinical Physiology of Hypertension. *cardiology Clinics*. 2010, p. 545-59.
6. Guyton AC. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1990; 591: 107-13.
7. Guyton AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991; 252: 1813-6.
8. Hall JE, Mizelle HL, Hildebrandt DA and Brands MW. Abnormal pressure natriuresis. A cause or a consequence of hypertension? *Hypertension*. 1990; 15: 547-59.
9. Kimura G and Brenner BM. A method for distinguishing salt-sensitive from non-salt-sensitive forms of human and experimental hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993; 2: 341-9.
10. Kobori H, Nangaku M, Navar LG and Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007; 59: 251-87.
11. Fyhrquist F and Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008; 264: 224-36.
12. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007; 13: 9-20.
13. Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens*. 2006; 24: 983-91.
14. Ferrari R. RAAS inhibition and mortality in hypertension: from pharmacology to clinical evidence. *Kardiol Pol*. 2013; 71: 1-7.
15. Carey RM and Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003; 24: 261-71.
16. Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1092-9.
17. Dahl LK and Heine M. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res*. 1975; 36: 692-6.
18. Graf C, Maser-Gluth C, de Muinck Keizer W and Rettig R. Sodium retention and hypertension after kidney transplantation in rats. *Hypertension*. 1993; 21: 724-30.
19. Kopf D, Waldherr R and Rettig R. Source of kidney determines blood pressure in young renal transplanted rats. *Am J Physiol*. 1993; 265: F104-11.

20. Rettig R, Folberth CG, Stauss H, et al. Hypertension in rats induced by renal grafts from renovascular hypertensive donors. *Hypertension*. 1990; 15: 429-35.
21. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 17985-90.
22. Denton KM, Fennessy PA, Alcorn D and Anderson WP. Morphometric analysis of the actions of angiotensin II on renal arterioles and glomeruli. *Am J Physiol*. 1992; 262: F367-72.
23. Ramkumar N and Kohan DE. Proximal tubule angiotensinogen modulation of arterial pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013; 22: 32-6.
24. Verouti SN, Boscardin E, Hummler E and Frateschi S. Regulation of blood pressure and renal function by NCC and ENaC: lessons from genetically engineered mice. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 21: 60-72.
25. Quadri S and Siragy HM. (Pro)renin receptor contributes to regulation of renal epithelial sodium channel. *J Hypertens*. 2016; 34: 486-94; discussion 94.
26. Peng K, Lu X, Wang F, et al. Collecting duct (pro)renin receptor targets ENaC to mediate angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017; 312: F245-F53.
27. van der Lubbe N, Zietse R and Hoorn EJ. Effects of angiotensin II on kinase-mediated sodium and potassium transport in the distal nephron. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013; 22: 120-6.
28. Nguyen MT, Lee DH, Delpire E and McDonough AA. Differential regulation of Na⁺ transporters along nephron during ANG II-dependent hypertension: distal stimulation counteracted by proximal inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305: F510-9.
29. Castaneda-Bueno M, Cervantes-Perez LG, Vazquez N, et al. Activation of the renal Na⁺:Cl⁻ cotransporter by angiotensin II is a WNK4-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 7929-34.
30. San-Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, et al. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 4384-9.
31. Rojas-Vega L and Gamba G. Mini-review: regulation of the renal NaCl cotransporter by hormones. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310: F10-4.
32. Brooks HL, Allred AJ, Beutler KT, Coffman TM and Knepper MA. Targeted proteomic profiling of renal Na(+) transporter and channel abundances in angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *Hypertension*. 2002; 39: 470-3.
33. Stegbauer J, Gurley SB, Sparks MA, et al. AT1 receptors in the collecting duct directly modulate the concentration of urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 2237-46.
34. Zaika O, Mamenko M, Staruschenko A and Pochynyuk O. Direct activation of ENaC by angiotensin II: recent advances and new insights. *Curr Hypertens Rep*. 2013; 15: 17-24.
35. Pech V, Kim YH, Weinstein AM, Everett LA, Pham TD and Wall SM. Angiotensin II increases chloride absorption in the cortical collecting duct in mice through a pendrin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F914-20.
36. Yang T and Xu C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28: 1040-9.

37. Navar LG, Kobori H, Prieto MC and Gonzalez-Villalobos RA. Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension*. 2011; 57: 355-62.
38. Giani JF, Eriguchi M, Bernstein EA, et al. Renal tubular angiotensin converting enzyme is responsible for nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-induced salt sensitivity. *Kidney Int*. 2017; 91: 856-67.
39. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A and Valentijn AJ. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension*. 1991; 18: 763-73.
40. Gonzalez-Villalobos RA, Satou R, Seth DM, et al. Angiotensin-converting enzyme-derived angiotensin II formation during angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2009; 53: 351-5.
41. Kobori H, Ozawa Y, Satou R, et al. Kidney-specific enhancement of ANG II stimulates endogenous intrarenal angiotensinogen in gene-targeted mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293: F938-45.
42. Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, et al. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 1181-9.
43. Rosivall L and Navar LG. Effects on renal hemodynamics of intra-arterial infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol*. 1983; 245: F181-7.
44. Komlosi P, Fuson AL, Fintha A, et al. Angiotensin I conversion to angiotensin II stimulates cortical collecting duct sodium transport. *Hypertension*. 2003; 42: 195-9.
45. Rosivall L. Intrarenal renin-angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 302: 185-92.
46. Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y and Li XC. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4: 166.
47. Navar LG. Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23: 38-45.
48. Giani JF, Shah KH, Khan Z, et al. The intrarenal generation of angiotensin II is required for experimental hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 21: 73-81.
49. Kobori H, Harrison-Bernard LM and Navar LG. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 431-9.
50. Gonzalez-Villalobos RA, Seth DM, Satou R, et al. Intrarenal angiotensin II and angiotensinogen augmentation in chronic angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: F772-9.
51. Wu H, Liang Y, Zheng Y, et al. Up-regulation of intrarenal renin-angiotensin system contributes to renal damage in high-salt induced hypertension rats. *Kidney Blood Press Res*. 2014; 39: 526-35.
52. White FN and Grollman A. Autoimmune Factors Associated with Infarction of the Kidney. *Nephron*. 1964; 1: 93-102.
53. Olsen F. Type and course of the inflammatory cellular reaction in acute angiotensin-hypertensive vascular disease in rats. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1970; 78: 143-50.
54. Olsen F. Transfer of arterial hypertension by splenic cells from DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats to normotensive recipients. *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1980; 88: 1-5.

55. Ba D, Takeichi N, Kodama T and Kobayashi H. Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J Immunol.* 1982; 128: 1211-6.
56. Okuda T and Grollman A. Passive transfer of autoimmune induced hypertension in the rat by lymph node cells. *Tex Rep Biol Med.* 1967; 25: 257-64.
57. Harrison DG, Marvar PJ and Titze JM. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol.* 2012; 3: 128.
58. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* 2007; 204: 2449-60.
59. Marvar PJ, Thabet SR, Guzik TJ, et al. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res.* 2010; 107: 263-70.
60. Harrison DG, Vinh A, Lob H and Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10: 203-7.
61. Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126: 267-74.
62. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, et al. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290: H935-40.
63. Brands MW, Banes-Berceli AK, Inscho EW, Al-Azawi H, Allen AJ and Labazi H. Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation. *Hypertension.* 2010; 56: 879-84.
64. Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010; 19: 181-6.
65. Schiffrin EL. The immune system: role in hypertension. *Can J Cardiol.* 2013; 29: 543-8.
66. Barnes MJ and Powrie F. Hybrid Treg cells: steel frames and plastic exteriors. *Nat Immunol.* 2009; 10: 563-4.
67. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM and Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int.* 2010; 77: 1070-5.
68. Turner JE, Krebs C, Tittel AP, et al. IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 1486-95.
69. Pietrowski E, Bender B, Huppert J, White R, Luhmann HJ and Kuhlmann CR. Pro-inflammatory effects of interleukin-17A on vascular smooth muscle cells involve NAD(P)H- oxidase derived reactive oxygen species. *J Vasc Res.* 2011; 48: 52-8.
70. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2010; 55: 500-7.
71. Platten M, Youssef S, Hur EM, et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 14948-53.
72. Viel EC, Lemarie CA, Benkirane K, Paradis P and Schiffrin EL. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 298: H938-44.
73. Amador CA, Barrientos V, Pena J, et al. Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. *Hypertension.* 2014; 63: 797-803.

74. Kasal DA, Barhoumi T, Li MW, et al. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 2012; 59: 324-30.
75. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, et al. CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int*. 2006; 70: 591-6.
76. Woltman AM, de Fijter JW, Zuidwijk K, et al. Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney Int*. 2007; 71: 1001-8.
77. Hochheiser K, Tittel A and Kurts C. Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease. *Int J Exp Pathol*. 2011; 92: 193-201.
78. Teteris SA, Engel DR and Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int*. 2011; 80: 139-45.
79. Lindenmeyer M, Noessner E, Nelson PJ and Segerer S. Dendritic cells in experimental renal inflammation--Part I. *Nephron Exp Nephrol*. 2011; 119: e83-90.
80. John R and Nelson PJ. Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2628-35.
81. Brahler S, Zinselmeyer BH, Raju S, et al. Opposing Roles of Dendritic Cell Subsets in Experimental GN. *J Am Soc Nephrol*. 2018; 29: 138-54.
82. Kitching AR. Dendritic cells in progressive renal disease: some answers, many questions. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29: 2185-93.
83. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, et al. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J Clin Invest*. 2013; 123: 4242-54.
84. Vinh A, Chen W, Blinder Y, et al. Inhibition and genetic ablation of the B7/CD28 T-cell costimulation axis prevents experimental hypertension. *Circulation*. 2010; 122: 2529-37.
85. Kirabo A, Fontana V, de Faria AP, et al. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *J Clin Invest*. 2014; 124: 4642-56.
86. Dixon KB, Davies SS and Kirabo A. Dendritic cells and isolevuglandins in immunity, inflammation, and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 312: H368-H74.
87. Ozaki KS, Kimura S, Nalesnik MA, et al. The loss of renal dendritic cells and activation of host adaptive immunity are long-term effects of ischemia/reperfusion injury following syngeneic kidney transplantation. *Kidney Int*. 2012; 81: 1015-25.
88. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, et al. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol*. 2010; 184: 191-202.
89. Hochweller K, Striegler J, Hammerling GJ and Garbi N. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 2776-83.
90. Hevia D, Araos P, Prado C, et al. Myeloid CD11c(+) Antigen-Presenting Cells Ablation Prevents Hypertension in Response to Angiotensin II Plus High-Salt Diet. *Hypertension*. 2018; 71: 709-18.
91. Araos P, Prado C, Lozano M, et al. Dendritic cells are crucial for cardiovascular remodeling and modulate neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression upon mineralocorticoid receptor activation. *J Hypertens*. 2019; 37: 1482-92.
92. Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, et al. The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *J Clin Invest*. 2013; 123: 2011-23.

93. Giani JF, Bernstein KE, Janjulia T, et al. Salt Sensitivity in Response to Renal Injury Requires Renal Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertension*. 2015; 66: 534-42.
94. Engel DR, Krause TA, Snelgrove SL, et al. CX3CR1 reduces kidney fibrosis by inhibiting local proliferation of profibrotic macrophages. *J Immunol*. 2015; 194: 1628-38.
95. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS and Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*. 2015; 116: 1022-33.
96. Itani HA, McMaster WG, Jr., Saleh MA, et al. Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans. *Hypertension*. 2016; 68: 123-32.
97. Wenzel U, Turner JE, Krebs C, Kurts C, Harrison DG and Ehmke H. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27: 677-86.
98. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R and Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. 1999; 8: 265-77.
99. Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, et al. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*. 2011; 124: 1370-81.
100. Weisheit CK, Engel DR and Kurts C. Dendritic Cells and Macrophages: Sentinels in the Kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10: 1841-51.
101. Rossier BC, Staub O and Hummler E. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Lett*. 2013; 587: 1929-41.
102. Evans RG and Bie P. Role of the kidney in the pathogenesis of hypertension: time for a neo-Guytonian paradigm or a paradigm shift? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016, p. R217-R29.
103. Kamat NV, Thabet SR, Xiao L, et al. Renal transporter activation during angiotensin-II hypertension is blunted in interferon-gamma-/- and interleukin-17A-/- mice. *Hypertension*. 2015; 65: 569-76.
104. Coffman TM. The inextricable role of the kidney in hypertension. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2341-7.
105. Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, et al. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension*. 2016; 68: 167-74.
106. Mount DB. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014; 9: 1974-86.
107. Ares GR, Caceres PS and Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301: F1143-59.
108. Zhang J, Rudemiller NP, Patel MB, et al. Interleukin-1 Receptor Activation Potentiates Salt Reabsorption in Angiotensin II-Induced Hypertension via the NKCC2 Co-transporter in the Nephron. *Cell Metab*. 2016; 23: 360-8.
109. Norlander AE and Madhur MS. Inflammatory cytokines regulate renal sodium transporters: how, where, and why? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017; 313: F141-F4.
110. Schiessl IM and Castrop H. Regulation of NKCC2 splicing and phosphorylation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015; 24: 457-62.

111. Gagnon E, Bergeron MJ, Daigle ND, Lefoll MH and Isenring P. Molecular mechanisms of cation transport by the renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter: structural insight into the operating characteristics of the ion transport sites. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32555-63.
112. Gimenez I, Isenring P and Forbush B. Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions. *J Biol Chem.* 2002; 277: 8767-70.
113. Plata C, Meade P, Vazquez N, Hebert SC and Gamba G. Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11004-12.
114. Schiessl IM, Rosenauer A, Kattler V, Minuth WW, Oppermann M and Castrop H. Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 305: F1139-48.
115. Franco M, Tapia E, Bautista R, et al. Impaired pressure natriuresis resulting in salt-sensitive hypertension is caused by tubulointerstitial immune cell infiltration in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 304: F982-90.
116. Wen Y and Crowley SD. Renal effects of cytokines in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018; 27: 70-6.
117. Rodriguez JA, Vio CP, Pedraza PL, McGiff JC and Ferreri NR. Bradykinin regulates cyclooxygenase-2 in rat renal thick ascending limb cells. *Hypertension.* 2004; 44: 230-5.
118. Vio CP, Velarde V and Muller-Esterl W. Cellular distribution and fate of the bradykinin antagonist HOE 140 in the rat kidney. Colocalization with the bradykinin B2 receptor. *Immunopharmacology.* 1996; 33: 146-50.
119. Mamenko M, Zaika O and Pochynyuk O. Direct regulation of ENaC by bradykinin in the distal nephron. Implications for renal sodium handling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014; 23: 122-9.
120. Zhang DD, Gao ZX, Vio CP, et al. Bradykinin Stimulates Renal Na(+) and K(+) Excretion by Inhibiting the K(+) Channel (Kir4.1) in the Distal Convolute Tubule. *Hypertension.* 2018; 72: 361-9.
121. Tomita H, Sanford RB, Smithies O and Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 81: 733-44.
122. McDonough AA. ISN Forefronts Symposium 2015: Maintaining Balance Under Pressure-Hypertension and the Proximal Tubule. *Kidney Int Rep.* 2016; 1: 166-76.
123. Palmer LG and Schnermann J. Integrated Control of Na Transport along the Nephron. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2015, p. 676-87.
124. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, et al. Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 527-37.
125. Chakravorty SJ, Cockwell P, Girdlestone J, Brooks CJ and Savage CO. Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129: 150-9.
126. Giani JF, Janjulia T, Kamat N, et al. Renal angiotensin-converting enzyme is essential for the hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 2752-63.
127. Satou R, Shao W and Navar LG. Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015; 9: 181-90.

128. Shao W, Seth DM, Prieto MC, Kobori H and Navar LG. Activation of the renin-angiotensin system by a low-salt diet does not augment intratubular angiotensinogen and angiotensin II in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 304: F505-14.
129. Braam B, Mitchell KD, Fox J and Navar LG. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol*. 1993; 264: F891-8.
130. Navar LG, Imig JD, Zou L and Wang CT. Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol*. 1997; 17: 412-22.
131. Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y and Nishiyama A. Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2073-80.
132. Jain S, Shah M, Li Y, Vinukonda G, Sehgal PB and Kumar A. Upregulation of human angiotensinogen (AGT) gene transcription by interferon-gamma: involvement of the STAT1-binding motif in the AGT promoter. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1759: 340-7.
133. O'Leary R, Penrose H, Miyata K and Satou R. Macrophage-derived IL-6 contributes to ANG II-mediated angiotensinogen stimulation in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310: F1000-7.
134. Satou R, Miyata K, Gonzalez-Villalobos RA, Ingelfinger JR, Navar LG and Kobori H. Interferon-gamma biphasically regulates angiotensinogen expression via a JAK-STAT pathway and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in renal proximal tubular cells. *FASEB J*. 2012; 26: 1821-30.
135. Satou R, Gonzalez-Villalobos RA, Miyata K, et al. Costimulation with angiotensin II and interleukin 6 augments angiotensinogen expression in cultured human renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: F283-9.
136. Caillon A, Mian MOR, Fraulob-Aquino JC, et al. gammadelta T Cells Mediate Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Injury. *Circulation*. 2017; 135: 2155-62.
137. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J and Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol*. 2015; 16: 1114-23.
138. Li Y, Wu Y, Zhang C, et al. gammadeltaT Cell-derived interleukin-17A via an interleukin-1beta-dependent mechanism mediates cardiac injury and fibrosis in hypertension. *Hypertension*. 2014; 64: 305-14.
139. Higaki A, Caillon A, Paradis P and Schiffrin EL. Innate and Innate-Like Immune System in Hypertension and Vascular Injury. *Curr Hypertens Rep*. 2019; 21: 4.
140. Lehmann JM, Claus K, Jansen C, et al. Circulating CXCL10 in cirrhotic portal hypertension might reflect systemic inflammation and predict ACLF and mortality. *Liver Int*. 2018; 38: 875-84.
141. Hashmat S, Rudemiller N, Lund H, Abais-Battad JM, Van Why S and Mattson DL. Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 311: F555-61.
142. Vazquez-Oliva G, Fernandez-Real JM, Zamora A, Vilaseca M and Badimon L. Lowering of blood pressure leads to decreased circulating interleukin-6 in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*. 2005; 19: 457-62.
143. Luther JM, Gainer JV, Murphey LJ, et al. Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism. *Hypertension*. 2006; 48: 1050-7.

144. Li K, Guo D, Zhu H, et al. Interleukin-6 stimulates epithelial sodium channels in mouse cortical collecting duct cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 299: R590-5.
145. Barbaro NR, Foss JD, Kryshtal DO, et al. Dendritic Cell Amiloride-Sensitive Channels Mediate Sodium-Induced Inflammation and Hypertension. *Cell Rep*. 2017; 21: 1009-20.
146. Norlander AE, Saleh MA, Pandey AK, et al. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. *JCI Insight*. 2017; 2.
147. Zhang D, Gu D, He J, et al. Associations of the Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Genes With BP Changes and Hypertension Incidence: The Gensalt Study. *Am J Hypertens*. 2017; 30: 95-101.
148. Bajwa A, Huang L, Ye H, et al. Dendritic cell sphingosine 1-phosphate receptor-3 regulates Th1-Th2 polarity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*. 2012; 189: 2584-96.
149. Bajwa A, Huang L, Kurmaeva E, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3-Deficient Dendritic Cells Modulate Splenic Responses to Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27: 1076-90.
150. Ponichtera HE, Shainheit MG, Liu BC, et al. CD209a expression on dendritic cells is critical for the development of pathogenic Th17 cell responses in murine schistosomiasis. *J Immunol*. 2014; 192: 4655-65.