

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



IDENTIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS M1 Y M2 EN AORTA DE
RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) MEDIANTE
CITOMETRÍA DE FLUJO.

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Clínica
por:

CARLA MARGARITA GONZÁLEZ BRIONES

Directoras de tesis

Dra. Lorena García Nannig

Dra. María Paz Ocaranza

Santiago, CHILE

2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

CARLA MARGARITA GONZÁLEZ BRIONES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Clínica Aplicada, en el examen público rendido el día 19 de Octubre 2020.

Directoras de Tesis:

Lorena García Nannig, PhD

María Paz Ocaranza, PhD

Comisión Evaluadora de Tesis:

Daniela Seelenfreund, PhD (presidenta)

Sandra Ampuero Llanos, PhD

Javier Puente Piccardo, PhD

Agradecimientos

Estoy tan feliz de haber desarrollado esta tesis, porque durante este proceso conocí a personas maravillosas que no sólo me orientaron en lo académico sino que también me prepararon en lo emocional.

Primeramente agradecer al Dr. Abel Vásquez Veloso, Jefe Sección de Biotecnología del Departamento de Salud Ambiental (ISPCh) por su apoyo incondicional para comenzar este postgrado. A mis tutoras de tesis la Dra. Lorena García Nannig del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y la Dra. María Paz Ocaranza, División Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile, agradezco enormemente sus consejos y su guía en este proceso de aprendizaje, por entregarme su confianza y permitirme trabajar en este hermoso trabajo. También agradezco a la Directora del Magister en Bioquímica de la Universidad de Chile, la Dra. Daniela Seelenfreund, por estar presente y pendiente de mi desarrollo como profesional.

Es importante agradecer a Alex Cabrera Nuñez, Coordinador técnico, Unidad de Citometría de flujo, por sus enseñanzas y consejos, es un gran profesional y fue para mí un pilar importante para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco enormemente a Paulina Rosa Cerda Opazo y Nicole Nayira Bruneau Leyton por ser unas compañeras incondicionales, siendo un apoyo esencial, tanto en conocimientos como en lo afectivo, son verdaderamente maravillosas amigas. Gracias a Jackeline Trinidad Moya Lopez, Lab Manager del Laboratorio de Cardiología Molecular, División Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile, por tu alegría, amistad y conocimientos, contigo supe lo que es la paciencia, muchas gracias por tu apoyo.

Finalmente, quiero enfatizar este agradecimiento a mi compañero de vida Rodrigo Andrés Pérez Flores por su contención emocional y conocimientos, eres muy extraordinario para mí, haz valorado mi libertad y mis deseos de seguir desarrollándome como profesional, te amo.

FINANCIAMIENTO: Grant Bayer 4Targets (MPO) y FONDAP N°15130011 (LG, MPO)

LUGAR DE DESARROLLO DE LA TESIS: Laboratorio de Cardiología Molecular (División Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile) y Laboratorio de Inflamación y Estrés oxidativo Cardiovascular (Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Enfermedades cardiovasculares (ECV)	1
Hipertensión arterial (HTA)	1
Endotelio.....	2
Disfunción endotelial.....	4
Remodelado vascular en la HTA.....	5
Inflamación e HTA.....	7
Macrófagos	7
Macrófagos M1 y M2.....	8
Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) como modelo animal de hipertensión	11
Citometría de flujo y macrófagos	12
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. OBJETIVO GENERAL:	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Reactivos y materiales.....	15
4.2. Animales y validación del modelo experimental	15
4.3. Obtención y preparación de las muestras biológicas	16
4.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	17
4.5. Soluciones para la digestión enzimática en aorta de rata.....	17
4.6. Viabilidad celular	18
4.7. Criterio de selección de los anticuerpos utilizados para el reconocimiento de las proteínas marcadoras de los macrófagos.....	18

4.8. Citometría de flujo	19
4.9. Análisis estadístico.....	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Optimización del proceso de digestión enzimática en aorta de rata	20
5.2. Optimización de las diluciones de trabajo de los anticuerpos anti-CD para el reconocimiento de macrófagos y sus subpoblaciones M1 y M2.....	23
5.2.1. Titulación de los anticuerpos anti-CD45, anti-CD68, anti-CD86, anti-CD163	23
5.2.2. Anticuerpo anti-CD45 Pacific Blue	24
5.2.3. Anticuerpo anti-CD68 FITC	27
5.2.4. Anticuerpo anti-CD86 Alexa Fluor® 647.....	29
5.2.5. Anticuerpo anti-CD163 PE	31
5.3. Evaluación de la fluorescencia y selección de <i>gates</i> de los anticuerpos en células del lavado peritoneal	33
5.4. Condiciones experimentales finales de la nueva metodología para la identificación de macrófagos en aorta de rata.....	36
5.5. Control positivo para verificar la detección de M1 en aorta de ratas sometidas a un proceso inflamatorio agudo.....	41
5.6. Caracterización del modelo experimental: Parámetros morfométricos y hemodinámicos para ratas WKY y SHR.....	44
5.7. Identificación de macrófagos M1 y M2 en aortas de ratas WKY y SHR.....	46
6. DISCUSIÓN.....	51
6.1. Optimización de la digestión de aorta de ratas.....	52
6.2. Optimización de la concentración de anticuerpos para macrófagos en aorta de ratas	53
6.3. Verificación de la detección de M1 en aorta de ratas.....	56
6.4. Caracterización del modelo experimental	56
6.5. Identificación de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas	57
7. PROYECCIONES.....	60
8. CONCLUSIONES.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de los tipos de remodelado. Esquema modificado de Renna y Miatello (2013).....	6
Figura 2: Estrategia de <i>gating</i> para la identificación de leucocitos en sangre y aorta de rata.	22
Figura 3: Histograma de leucocitos CD45+ en aorta de rata disgregada a 30 o 60 minutos.	23
Figura 4: <i>Dot plot</i> , tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD45- Pacific Blue.	26
Figura 5: <i>Dot plots</i> , tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD68- FITC.	28
Figura 6: <i>Dot plots</i> , tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD86 Alexa Fluor [®]	30
Figura 7: <i>Dot plots</i> , tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD163- PE.	32
Figura 8: Construcción del panel multicolor para los leucocitos del lavado peritoneal.	35
Figura 9: <i>Dot plots</i> de la FMO para los anticuerpos CD86 y CD163 para las células del lavado peritoneal.	36
Figura 10: <i>Dot plots</i> de densidad para la evaluación de emisión de fluorescencia de los anticuerpos CD45, CD68, CD86 y CD163 en células de aorta de rata.	38
Figura 11: <i>Dot plots</i> de densidad para la evaluación de emisión de fluorescencia a partir del área CD86+ para la identificación celular en SSC-A/ FSC-A.	39
Figura 12: <i>Dot plots</i> de densidad a partir de gráfico FSC-H/FSC-A para la identificación de macrófagos M1 en el plot SSC-A/FSC-A.	40
Figura 13: <i>Dot plots</i> de densidad para la identificación optimizada de macrófagos M1 en aorta de rata.	41
Figura 14: <i>Dot plots</i> de densidad para la identificación optimizada de macrófagos M1 en aorta de rata.	43
Figura 15: Gráficos de los parámetros hemodinámicos y morfométricos de ratas WKY y SHR.	46
Figura 16: Viabilidad de células totales en aorta de ratas detectado por CF.	47

Figura 17: <i>Dot plots</i> para la identificación de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas.	49
Figura 18: Expresión de las proteínas CD86+ y CD163+ en macrófagos de aorta en ratas WKY y SHR.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores proteicos producidos y secretados por células endoteliales. (Modificado de la referencia Carvajal, 2017).....	4
Tabla 2. Células totales obtenidas en el proceso de digestión en aorta	21
Tabla 8. Parámetros hemodinámicos y morfométricos para ratas WKY y SHR	45
Tabla 9. Células totales, viabilidad celular y porcentaje de expresión de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas WKY y SHR.....	48

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpos monoclonales

Ang II: Angiotensina II

AO: Peso de la aorta completa

C: Peso total del corazón de ratas

CD número: *Cluster of differentiation* (número = 45, 68, 80, 86 o 163)

CF: Citometría de flujo

CSF-1: Factor de estimulación de colonias 1

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

DOCA: Deoxicorticosterona

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDHF: Factor hiperpolarizante del endotelio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ENS: Encuesta Nacional de Salud

ENTs: Enfermedades no transmisibles

ET: Endotelinas

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FMO: Fluorescencia menos uno

FSC-A: *Forward Scatter* Área

FSC-H: *Forward Scatter* Altura

GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos y macrófagos

HTA: Hipertensión arterial

HI: Histológicas

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IFN- γ : Interferón γ

IFN- α : Interferón α

IHC: Inmunohistoquímica

IL-(número): Interleuquina-(número = 1 β , 4, 6, 10, 12 o 13)

INE: Instituto Nacional de Estadística

IP: Ioduro de propidio

LPS: Lipopolisacárido

Ly6C: Marcador de monocitos/macrófagos en ratón

M1: Macrófago inflamatorio

M2: Macrófago antiinflamatorio

MCP-1: Factor quimioatrayente de monocitos 1

MHCII: Complejo de histocompatibilidad clase II

NK: *Natural Killer*

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NO: Óxido nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAd: Presión arterial diastólica

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1

PAMPs: Patrones microbianos asociados a patógenos

PAs: Presión arterial sistólica

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Amortiguador fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Ficoeritrina

PIH: Hipertensión inducida por el embarazo

PT: Peso total de rata

ROIs: Productos reactivos de oxígeno

SHR: Rata espontáneamente hipertensa

SBF: Suero bovino fetal

SEM: Error estándar de la media

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

SSC-A: *Side scatter area*

Th-1: Linfocitos T helper 1

Th-2: Linfocitos T helper 2

TLR-4: Receptor tipo Toll 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

VCAM-1: Proteína de adhesión celular vascular 1

WKY: Rata Wistar Kyoto

RESUMEN

Antecedentes. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y en nuestro país. El principal factor de riesgo es la hipertensión arterial (HTA). En Chile, el 26,9% de la población es hipertensa. La presión arterial está regulada por estímulos mecánicos y humorales y el desbalance de éstos, aumentan el flujo sanguíneo y la vasoconstricción provocando un proceso de remodelado (daño) en los vasos sanguíneos.

La inflamación es una respuesta defensiva natural frente a un daño. Sin embargo, en condiciones de inflamación crónica, tal como en la HTA, se ha descrito un aumento de citoquinas proinflamatorias y macrófagos en diferentes tejidos. Existen dos subpoblaciones de macrófagos, los M1 o proinflamatorios y los M2 o antiinflamatorios.

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) son un modelo animal apropiado ya que reproduce de buena forma la hipertensión esencial de humanos. A la fecha no se ha estudiado la participación de macrófagos M1 y M2 en este modelo.

En los últimos años la citometría de flujo (CF) ha surgido como una técnica específica, resolutive y rápida para la identificación de macrófagos y sus subpoblaciones. Sin embargo, no existen metodologías que permitan aislar e identificar macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas normo e hipertensas.

Hipótesis. En esta tesis se propuso la siguiente hipótesis:

"La citometría de flujo detecta y discrimina diferencias en los niveles de macrófagos M1 y M2 en aortas de ratas hipertensas respecto a ratas normotensas"

Objetivos específicos:

- 1.- Diseñar e implementar una nueva metodología que permita: a) aislar macrófagos de aorta de ratas y b) detectar y discriminar las subpoblaciones M1 y M2 en aorta por citometría de flujo.
2. Evaluar los niveles de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles normotensas (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), utilizando la nueva metodología implementada en el objetivo 1.

Metodología. Se utilizaron ratas normotensas WKY y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 4 a 5 meses, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), previa aprobación del Comité de Bioética Institucional. Para realizar el objetivo 1, se combinaron las metodologías de tres estudios previos de identificación de macrófagos, dos en aorta de ratón y uno de riñón de rata. Se ensayaron diferentes tiempos de digestión enzimática (30 y 60 minutos) de la aorta. Se evaluó la viabilidad celular por tinción con azul de Tripán y Ioduro de Propidio. Se seleccionaron los anticuerpos específicos marcados con el fluoróforo adecuado para la identificación específica de los macrófagos M1 y M2 y se estandarizaron las condiciones experimentales para su uso en CF. Una vez implementado el nuevo protocolo, se procedió a evaluar los niveles de macrófagos M1 y M2 en el grupo experimental normotenso (WKY, n = 9) y en el grupo hipertenso (SHR, n = 9).

Resultados. Se obtuvo una viabilidad celular de leucocitos mayor al 94%. El tiempo de digestión óptimo fue 30 minutos, manteniendo los niveles de expresión de los antígenos específicos de superficie. Se estandarizó el uso de todos los anticuerpos específicos para M1 y M2 en cuanto a su concentración de uso (anti-CD45 = $1,25 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, anti-CD68 = 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, anti-CD86 = $2,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y anti-CD163 = 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y especificidad de detección por CF. El grupo experimental de ratas hipertensas presentó niveles de macrófagos M1 significativamente elevados comparado con el grupo control normotenso y no se encontraron diferencias significativas en el nivel de macrófagos M2 entre ambos grupos.

Conclusiones. En este trabajo, por primera vez se logró diseñar e implementar una nueva metodología para evaluar macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas. Mediante esta metodología se estableció que los macrófagos proinflamatorios o M1 están significativamente elevados en condición de HTA ($14,6 \pm 1,2$)% respecto a una condición normotensa ($9,7 \pm 1,3$)%. Estos hallazgos apuntan a que en una condición de inflamación crónica como la HTA, los macrófagos podrían participar en la perpetuación del daño tisular en la aorta.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF M1 AND M2 MACROPHAGES IN AORTA OF SPONTANEOUS HYPERTENSIVE RATS (SHR) BY FLOW CYTOMETRY.

Background. Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide and particularly in our country. The main risk factor is arterial hypertension (HT). In Chile, 26.9% of the population is hypertensive. Blood pressure is regulated by mechanical and humoral stimuli and their imbalance increase blood flow and vasoconstriction, causing a remodeling process (damage) in the blood vessels.

Inflammation is a natural defensive response to injury. Under conditions of chronic inflammation, such as in HT, an increase of proinflammatory cytokines and macrophages in different tissues has been described. There are two subpopulations of macrophages, the M1 or pro-inflammatory type and the M2 or anti-inflammatory type.

Spontaneously hypertensive rats (SHR) are an excellent animal model since they reproduce essential hypertension caused in humans. To date, the participation of M1 and M2 macrophages has not been studied in this model.

Recently, flow cytometry (CF) has emerged as a specific, decisive and rapid technique for identification of macrophages and their subpopulations. However, there are no methodologies to isolate and identify M1 and M2 macrophages in aorta of normotensive and hypertensive rats.

Hypothesis. In this thesis the following hypothesis was proposed:

"Flow cytometry detects and discriminates differences in levels of M1 and M2 macrophages in aortas of hypertensive rats with respect to normotensive rats".

Specific objectives:

1. To design and implement a new methodology that allows: a) isolation of macrophages from rat aorta and b) to detect and discriminate the M1 and M2 subpopulations in aorta by flow cytometry.
2. To evaluate the levels of M1 and M2 macrophages in aorta of normotensive control rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR), using the new methodology implemented in objective 1.

Methodology. Normotensive WKY rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) (4-5 months of age) obtained from the Bioterium of the Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) were used with prior approval of the Institutional Bioethics Committee. To achieve objective 1, the methodologies of three previous macrophage identification studies were combined, two performed in mouse aorta and one performed in rat kidney. Different times of digestion (30 and 60 minutes) of the aorta were tested. Cell viability was evaluated by Trypan blue and Propidium Iodide staining. Specific antibodies labeled with the appropriate fluorophore were selected for identification of M1 and M2 macrophages and the experimental conditions for their use in FC were standardized. Once the new protocol was implemented, the levels of M1 and M2 macrophages were evaluated in the normotensive experimental group (WKY, n = 9) and in the hypertensive group (SHR, n = 9).

Results. Cell viability of leukocytes of over 94% was obtained. Optimal enzymatic digestion time was 30 minutes, maintaining expression levels of the specific surface antigens. All specific antibodies for M1 and M2 were standardized in terms of their concentration of use (anti-CD45 = 1.25×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, anti-CD68 = 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, anti-CD86 = 2.5×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and anti-CD163 = 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and detection specificity by CF. The experimental group of hypertensive rats showed significantly higher levels of M1 macrophages compared to the normotensive control group and no significant differences were found in M2 macrophages level between both groups.

Conclusions. In this work, for the first time a methodology to evaluate M1 and M2 macrophages in rat aorta was designed and implemented. Pro-inflammatory or M1 macrophages were found to be significantly increased in HTA condition ($14,6 \pm 1,2$) compared to a normotensive condition ($9,7 \pm 1,3$) using this methodology. These findings suggest that in a chronic inflammatory condition such as HTA, macrophages participate in the perpetuation of tissue damage in the aorta.

1. INTRODUCCIÓN

Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019), las ECV son la principal causa de muerte en el mundo, con 17,9 millones de defunciones cada año, equivalente al 31% del total de fallecidos por patologías. En Chile también representan la primera causa de muerte con un 27,5% de defunciones del total de patologías (INE, 2015). Las ECV afectan al corazón y/o los vasos sanguíneos y sus factores de riesgos pueden ser modificables o no modificables. Entre los factores de riesgos no modificables se encuentra la genética, la edad y el sexo. Por otro lado, la obesidad, el sedentarismo, el tabaquismo y la hipertensión arterial (HTA) son considerados factores modificables. En este contexto, se ha reportado que el 40,6% de la población mundial padece de ECV y presenta HTA, por lo que se estima como el principal factor de riesgo (Petermann, *et al.*, 2017; OMS, 2019).

Hipertensión arterial (HTA)

La HTA, según la Asociación Americana del Corazón, se define como la presión sistólica mayor o igual a 140 mm de Hg y una presión diastólica mayor o igual a 90 mm de Hg. Afecta en gran medida a las poblaciones de países de ingresos bajos y medianos, en los que el sistema de salud responde con pocos recursos. Esta patología rara vez produce síntomas en las primeras etapas y en muchos casos no se diagnostica, por lo que estos pacientes con diagnóstico positivo generalmente no tienen acceso al tratamiento y es posible que no la puedan controlar con éxito.

Según reportes de la OMS, la HTA afecta a mil millones de personas en el mundo (OMS, 2019). En Chile, según datos de la última Encuesta Nacional de Salud (ENS), el 27,9% de la población ha desarrollado HTA (SChH, 2018). A nivel mundial la prevalencia es similar (MINSAL, 2010) y aumenta con la edad, siendo el riesgo mayor a partir de los 65 años. Además, la ENS 2009-2010 mostró que sólo el 16,5% de los pacientes hipertensos controla su HTA y la última ENS (2016-2017) reveló una relación entre los años de estudio de los individuos y su desarrollo, siendo más frecuente la HTA en aquellas personas que presentan menos educación. Por lo tanto, la HTA no sólo tiene un componente fisiopatológico, sino también social (SChH, 2018).

Se ha reportado que no todos los pacientes con esta enfermedad tienen el mismo riesgo de desarrollar complicaciones, por lo tanto, la elección del fármaco antihipertensivo también debe centrarse en el tratamiento del daño cardiovascular (Marott, *et al.*, 2014). Los programas integrados en materia de enfermedades no transmisibles (ENTs) ejecutados a través de un enfoque de atención primaria, son asequibles, sostenibles y permiten un buen tratamiento de la HTA (Passalacqua & Tagle, 2015).

Existen dos tipos de HTA, la esencial o primaria y la secundaria. La HTA esencial se presenta en el 95% de los pacientes y se desconoce su causa, el 5% restante corresponde a la HTA secundaria en la que existe una causa particularmente curable luego de realizar los exámenes diagnósticos de rigor al paciente (Crombet, *et al.*, 2009).

La HTA se caracteriza generalmente por la existencia de disfunción endotelial con ruptura del equilibrio entre los factores relajantes del vaso sanguíneo (óxido nítrico -NO-, factor hiperpolarizante del endotelio -EDHF) y los factores vasoconstrictores (principalmente endotelinas) (Konukoglu & Uzun, 2016).

La HTA esencial es un trastorno poligenético multifactorial. Entre los estímulos más estudiados se encuentran los genéticos, neurogénicos, neurohumorales y mecánicos o de autorregulación. Está demostrado que uno de los estímulos neurohumorales como es el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) es preponderante en la aparición de la HTA (Mancilla, *et al.*, 2015). El SRAA, además de sus acciones propiamente vasculares, induce estrés oxidativo a nivel tisular, el que produce cambios estructurales y funcionales del endotelio (disfunción endotelial), configurando la patología hipertensiva (Wagner, 2010).

En la HTA, el daño de la estructura endotelial no es sólo provocado por cambios neurohumorales, sino que también pueden existir cambios mecánicos o de auto regulación (Carvajal, 2017). A nivel renal, la elevada permeabilidad celular al sodio y la hiperreactividad de los vasos sanguíneos renales contribuye a la sobrecarga del volumen y al deterioro progresivo del capilar glomerular, manteniendo la condición hipertensiva (Crombet, *et al.*, 2009).

Endotelio

El endotelio es una monocapa de células que separa los tejidos de la sangre. Tiempo atrás, se planteaba que el endotelio era sólo una barrera mecánica, pero en la actualidad, se sabe que

es un tejido que regula el tono vascular, el crecimiento celular y la interacción entre los leucocitos, los trombocitos y la pared vascular. Además, sintetiza factores de crecimiento, moléculas trombo-reguladoras y responde a señales físicas y químicas (Carvajal, 2017).

La pared de las arterias presenta tres capas: desde el exterior al interior comprenden la túnica adventicia, la túnica media y la túnica íntima. La capa de túnica adventicia contiene terminaciones nerviosas, tejido adiposo perivascular y elementos conectivos, como fibroblastos y proteínas del tipo colágeno, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo vascular y la remodelación. La segunda capa, el músculo liso vascular, regula la respuesta de contracción y dilatación de los vasos sanguíneos. Los estímulos mecánicos, como el esfuerzo y la presión de corte o los estímulos farmacológicos, activan la contracción de las células musculares lisas vasculares por aumento de la concentración intracelular de ion calcio. La túnica íntima, la capa más interna de la pared arterial vascular, consiste en células endoteliales y los tejidos conectivos se encuentran debajo de estas células. Las sustancias pueden pasar a través de la conexión entre el endotelio o son internalizadas por ellas. El tamaño de los vasos vasculares es de aproximadamente 60 a 80 nm de diámetro, por lo que el endotelio restringe las partículas más grandes y evita la interacción entre las células sanguíneas y la pared vascular (Vestweber, 2012; Konukoglu & Uzun, 2016).

El endotelio continuo se caracteriza porque sus células están fuertemente vinculadas unas a otras y rodeadas por una membrana basal continua. Las uniones intercelulares están formadas por complejos multiproteicos, conteniendo proteínas de transmembrana y citosólicas que conectan las proteínas de membrana con el citoesqueleto intracelular. El endotelio también se considera un órgano endocrino y además presenta varias funciones paracrinas, ya que produce y secreta factores vasoactivos, inflamatorios, vasculoprotectores, angiogénicos, trombóticos y antitrombóticos, entre otros. Al igual que los otros órganos endocrinos, el endotelio tiene receptores para hormonas y factores reguladores de su función (**Tabla 1**) (Chistiakov, *et al.*, 2015; Konukoglu & Uzun, 2016; Carvajal, 2017). Además, regula el reclutamiento y extravasación de leucocitos en respuesta al daño tisular a través de la expresión de proteínas de adhesión y citoquinas (Carvajal, 2017).

Tabla 1. Factores proteicos producidos y secretados por células endoteliales. (Modificado de la referencia Carvajal, 2017).

Factores reguladores del tono vascular	Vasodilatadores	Óxido nítrico
		Prostaciclina
		Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
		Adenosina
	Vasoconstrictores	Endotelina-1
		Angiotensina II
Especies reactivas de oxígeno		
Factores que controlan procesos inflamatorios e inmunológicos vasculares.	Citoquinas	Interleuquina-1
		Interleuquina-6
		Interleuquina-8
		Proteína quimioatrayente de monocitos-1
	Proteínas de Adhesión	Factor de crecimiento transformante
		Factor de necrosis tumoral α
		Proteína de adhesión celular vascular-1
		Molécula de adhesión intercelular-1
		Selectinas

Disfunción endotelial

El término “disfunción endotelial” se usa generalmente para señalar el deterioro de la función endotelial en el cual se pierde el balance homeostático entre la función de los factores vasodilatadores y vasoconstrictores derivados del endotelio, con predominio de la función vasoconstrictora. El término también incluye las anomalías funcionales entre el endotelio y los leucocitos, los trombocitos y los factores reguladores, dando como resultado la activación del endotelio y una respuesta exacerbada de los leucocitos. Colectivamente, estos cambios endoteliales exhiben características prooxidantes, proliferativas, procoagulantes, de adhesión vascular y proinflamatorias (Konukoglu & Uzun, 2016; Carvajal, 2017). Los factores vasoconstrictores locales más potentes son las endotelinas (ET) las cuales son entre 10 a 100 veces más potentes que la angiotensina II (Ang II). No sólo el endotelio es fuente de la síntesis

de ET sino que también las células musculares lisas vasculares y los macrófagos, entre otras células (Wagner, 2010). Es importante señalar que la inflamación es otro mecanismo subyacente a la disfunción endotelial y se ha reportado que existe una retroalimentación positiva entre este proceso y el estrés oxidativo, ya que este último puede amplificar las vías de señalización vasculares inflamatorias y exacerbarla, y a su vez, incrementar el estrés oxidativo (Konukoglu & Uzun, 2016).

Remodelado vascular en la HTA

La pared vascular es un órgano dinámico, compuesto por elementos que interactúan para formar un complejo autocrino-paracrino que detecta cambios de su entorno, necesarios para establecer la comunicación intercelular. El remodelado vascular es un proceso activo de alteración estructural que involucra cambios en al menos cuatro procesos celulares: crecimiento, muerte, migración y producción-degradación de componentes de la matriz extracelular. Depende de una interacción dinámica entre factores de crecimiento locales, factores vasoactivos y estímulos hemodinámicos. Puede ser causado por enfermedades vasculares y trastornos circulatorios (Renna & Miatello, 2013). Gibbons ha propuesto una clasificación del remodelado basándose en la respuesta al incremento de la presión arterial en relación al lumen/media del vaso, cambiando la proporción del ancho de la pared por aumento de la masa muscular o la reorganización de elementos celulares o no celulares (Gibbons & Dzau, 1992). Esto provoca un incremento en la reactividad celular potenciando la resistencia periférica. Otra forma implica cambios en la luz del vaso, en la cual los elementos celulares o no celulares forman agregados en la luz vascular con cambios muy pequeños en el espesor de la pared. Un ejemplo clínico de este tipo de remodelado incluye la dilatación vascular asociada a un flujo constantemente alto de sangre. Por otro lado, una reducción de la masa vascular y del calibre, resulta en la disminución a largo plazo del flujo sanguíneo. La arquitectura de la pared vascular se encuentra también muy alterada en respuesta a la lesión vascular con el engrosamiento de la matriz extracelular e infiltración de células inflamatorias.

La modificación de la pared sin cambios en el diámetro del anillo se denomina “remodelado eutrófico”, cuando existe aumento en la túnica media de la pared se le denomina “remodelado hipertrófico” y por último, cuando los cambios que involucran la disminución en

la túnica media con el aumento del diámetro del lumen se clasifica como “remodelado hipotrófico” (**Figura 1**) (Renna & Miatello, 2013).

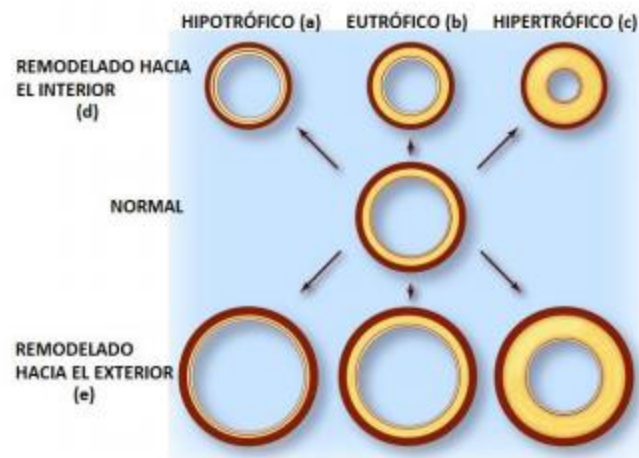


Figura 1: Representación esquemática de los tipos de remodelado. Esquema modificado de Renna y Miatello (2013).

Las arterias grandes se remodelan hacia afuera hipertróficamente aumentando la rigidez, por ejemplo, durante el envejecimiento y en pacientes con HTA, en los que puede haber una aceleración de este proceso que conduce a una mayor presión de pulso. Un diámetro aórtico reducido en sujetos hipertensos de mediana edad también puede desempeñar un papel en el aumento de la presión del pulso, lo que contradice el fenotipo aórtico hipertensivo clásico caracterizado por la degeneración y calcificación de la pared vascular y el aumento del diámetro aórtico. Sin embargo, en la HTA avanzada las láminas elásticas se duplican, se fragmentan y la deposición de colágeno aumenta, lo que contribuye a una mayor rigidez (Schiffrin, 2012).

Las evidencias indican que en un modelo animal de HTA conocido como SHR (ratas espontáneamente hipertensas) en donde el sistema renina-angiotensina se encuentra activado, y también en HTA esencial en humanos, el remodelado suele ser eutrófico. Por el contrario, en la hipertensión dependiente del consumo de sal, en diabetes mellitus y todas las condiciones en que se activan las ET, el remodelado suele ser hipertrófico (Rizzoni, *et.al.*, 1996).

Los mecanismos que conducen a un remodelado eutrófico interno son poco conocidos, pero podrían ser el resultado de un crecimiento interno combinado con apoptosis periférica. En algunos casos, se ha observado un aumento en la proporción de colágeno y fibronectina, el que podría ser inducido por ET, Ang II y/o aldosterona, las que actuarían de manera endocrina o

paracrina. Por otra parte, la inflamación de la pared arterial también participa en el remodelado, caracterizada por la infiltración de células inflamatorias, la regulación positiva de mediadores inflamatorios, como son las proteínas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), el factor nuclear kappa B (NF-kB), factor quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y aumento del estrés oxidativo (Schiffirin, 2012).

Inflamación e HTA

En los últimos años la inflamación ha emergido como un mediador importante en el inicio y mantenimiento de la HTA y del daño cardiovascular (Caillon & Schiffirin., 2016). El desarrollo de la inflamación se puede dar de forma persistente, como en el caso de la autoinmunidad o enfermedades crónicas o como inflamación aguda, cuando el agente nocivo es eliminado en el corto plazo. Esta última origina una reacción inmediata, en la cual los macrófagos, al encontrarse con un agente lesivo intentan destruirlo mediante la secreción de mediadores proteicos que actúan sobre las células endoteliales, provocando cambios en la permeabilidad vascular. De esta forma, se posibilita la migración de los leucocitos al foco inflamatorio para la fagocitosis, retornando a la normalidad cuando se restaura la lesión en un tiempo corto. En el caso de desarrollarse una inflamación crónica, persistente en el tiempo, se produce la infiltración de macrófagos, destrucción tisular e intentos de curación del tejido dañado, angiogénesis y fibrosis (Villalba, 2014).

Macrófagos

Los monocitos circulantes pueden infiltrar la mayoría de los tejidos transformándose en macrófagos, principalmente frente a estímulos inflamatorios (Duque & Rojas, 2007; Pollard, 2009). Ambos tipos celulares participan en la inmunidad innata y en la inmunidad adaptativa actuando como células fagocíticas y presentadoras de antígenos (Fattah, *et al.*, 2016). También cumplen un rol indispensable en el desarrollo de órganos, el recambio de los tejidos y la regeneración (Osborn & Olefsky, 2012). Debido a su función de vigilancia inmunológica, los macrófagos detectan un amplio espectro de estímulos, que abarcan desde antígenos víricos, microbianos como los lipopolisacáridos (LPS), parásitos, complejos inmunes, células apoptóticas o necróticas y diversos mediadores liberados por otras células (Forbes & Rosenthal, 2014). En respuesta al estímulo los macrófagos se activan, lo que les permite

ejercer una función inmunomoduladora y mantener la integridad del tejido (Novak & Koh, 2013).

Los macrófagos han sido considerados desde hace mucho tiempo como células inmunitarias diferenciadas terminalmente que se desarrollan a partir de monocitos y son incapaces de entrar en el ciclo celular (Chang, 2009; Duque & Rojas, 2007). Sin embargo, estudios recientes desafían este punto de vista y proponen que los macrófagos pueden ingresar al ciclo celular y renovarse por sí mismos (Martinez & Gordon, 2014; Zhou, *et al.*, 2014). Además, los macrófagos pueden desarrollarse a partir de precursores de leucocitos embrionarios sin la necesidad de un monocito intermedio, como se ha demostrado para algunos grupos de macrófagos residentes en los tejidos, como son las células de Kupffer, osteoclastos y microglía, entre otros (Zhou, *et al.*, 2014; Röszer, 2018). La piel, la mucosa intestinal y el peritoneo, por ejemplo, están colonizados principalmente por macrófagos derivados de monocitos y evidencia reciente muestra que hay renovación de macrófagos residentes del corazón y de la pared arterial, de los cuales se sabe muy poco sobre sus funciones específicas (Röszer, 2018).

Se ha descrito que los macrófagos derivados de monocitos se pueden diferenciar en el tejido de aorta de ratón y en riñones de ratas en los cuales se induce HTA (Palmer, *et al.*, 2014; Moore, *et al.*, 2013; Rubio, *et al.*, 2016). En la última década, se ha comenzado a describir con más detalles el complejo mecanismo de la activación de los macrófagos, el que involucra la polarización hacia dos estados opuestos conocidos como M1 y M2. El fenotipo M1 estaría asociado a la respuesta proinflamatoria y el M2 o antiinflamatorio estaría de preferencia involucrado en el proceso de cicatrización o reparación de daño (Mosser & Edwards, 2008; Sica & Mantovani, 2012; Solís, *et al.*, 2015).

Macrófagos M1 y M2

Las diversas funciones de los macrófagos en la homeostasis tisular parecen estar relacionadas con su estado de activación o fenotipo, el que puede cambiar rápidamente en respuesta a los estímulos ambientales locales (Spiller, *et al.*, 2016). En los últimos años, se han aplicado diversos términos asociados a la activación de macrófagos y a la polarización de ellos, donde estímulos como las citoquinas y agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) producen distintos patrones de expresión de genes y proteínas. Los macrófagos tienen la

capacidad de cambiar sus estados de activación en respuesta a CSF-1 y el GM-CSF, así como también por señales externas como citoquinas, productos microbianos, glucocorticoides y potencialmente cualquier otra entidad que pueda ser reconocida por ellos (Murray, *et al.*, 2014).

Los monocitos circulantes son reclutados rápidamente al reconocer los estímulos liberados por las células endoteliales activadas luego de un daño, como por ejemplo MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1 (Schiffrin, 2012; Humeres, *et al.*, 2016). Luego de adherirse al endotelio se genera la extravasación, proceso que implica el paso de monocitos desde la circulación al tejido subendotelial para diferenciarse o polarizarse a macrófagos M1 (Humeres, *et al.*, 2016).

Los macrófagos M1 proinflamatorios predominan durante la fase temprana de la disfunción cardíaca o endotelial en respuesta a la activación de TLR4, que reconoce patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y liberados después de la muerte de cardiomiocitos o células endoteliales (Carvajal, 2017; Röszer, 2018). El interferón gamma (IFN- γ) y GM-CSF que se liberan en el entorno local también promueven la diferenciación de monocitos hacia macrófagos M1, provocando que estos sintetizen y secreten citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α .

Los macrófagos M1 expresan altos niveles de complejo de histocompatibilidad clase II (MHC II), el marcador CD68 y las proteínas de membrana celular CD80 y CD86, siendo estas últimas proteínas utilizadas para su identificación (Spiller, *et al.*, 2016) y que son relevantes en esta investigación, dado que se utilizaron como marcadores de este tipo de macrófagos.

Como se mencionó anteriormente, los macrófagos M1 están implicados en la iniciación y la mantención de la respuesta inflamatoria y desde el punto de vista fisiopatológico, esta respuesta puede ser perjudicial si se exagera y se mantiene en el tiempo (Arnold, *et al.*, 2014). Sin embargo, en la respuesta inflamatoria normal, la disminución de los niveles de DAMPS/PAMPS cambia el entorno local a un perfil de citoquinas de tipo 2, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, las que son señales para inducir la polarización de los monocitos hacia macrófagos M2 antiinflamatorios. Este tipo de macrófagos suprime la inflamación y promueve la formación de tejido cicatricial a través de la secreción de IL10 e IL4 (Sica & Mantovani, 2012; Martinez & Gordon, 2014; Sánchez, *et al.*, 2017; Röszer, 2018). Se sabe además que los M2 pueden ser inducidos por células fúngicas, complejos inmunes, infección por helmintos y componentes del complemento. Esta activación conduce a la secreción de altas cantidades de

IL-10 y bajos niveles de IL-12. Fenotípicamente, se han caracterizado como IL-12^{low} IL-10^{high}, caspase-1^{low} y en su membrana expresan altos niveles de manosa y galactosa tipo E y C. La terminología M2 abarca distintos subtipos, los cuales son definidos en función de sus diferentes perfiles de expresión génica. Los activados por IL-4 con o sin IL-13, hongos y helmintos son llamados M2a; otros son activados por complejos inmunes o LPS llamados M2b y otros activados por IL10, glucocorticoides o el factor de crecimiento tumoral (TGF-β), llamados M2c. El cuarto tipo, M2d, es provocado por IL6 y adenosina, los cuales se ha comprobado que realizan funciones distintas en la angiogénesis y en la reparación de tejidos (Mantovani, *et al.*, 2004; Voге, *et al.*, 2014; Spiller, *et al.*, 2016).

Se ha visto que existe una mezcla de estos fenotipos en el tejido y su proporción depende de los estímulos del ambiente (Mosser & Edwards, 2008; Moore, *et al.*, 2013; Palmer, *et al.*, 2014; Marott, *et al.*, 2014; Caillon & Schiffrin., 2016). En la mayoría de los trastornos inflamatorios, la polarización de los macrófagos se debe principalmente a la influencia de los linfocitos que secretan más citoquinas en el lugar de la inflamación. Sin embargo, dado que las células inmunes y no inmunes coexisten en el tejido lesionado, es interesante especular sobre cómo las células del tejido también pueden influir en la polarización de los macrófagos. (Caillon & Schiffrin., 2016; Humeres, *et al.*, 2016; Palmer, *et al.*, 2014).

Los leucocitos circulantes son los marcadores de inflamación sistémica más estables y existen protocolos de separación y aislación bien estandarizados y de fácil implementación (Allen, *et al.*, 2017; Moore, *et al.*, 2013; Rubio, *et al.*, 2016). El papel predictivo del nivel de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la incidencia o prevalencia de la HTA ha sido bien documentado (Shankar, *et al.*, 2004). Sin embargo, hay poca información disponible sobre la contribución independiente de tipos específicos de PBMC (Tian, *et al.*, 2010).

El concepto de que el sistema inmunológico contribuye a la HTA no es nuevo. Los modelos murinos y de ratas han sido ampliamente utilizados para comprender el mecanismo molecular y celular involucrado en la lesión del tejido. Hace cincuenta años, White y Grollman describieron que la terapia inmunosupresora disminuía la presión arterial en ratas con infarto renal (White & Grollman, 1964). Otros estudios mostraron que la transferencia de células esplénicas aisladas de ganglios linfáticos o del bazo de animales hipertensos aumentó la presión arterial en ratas normotensas (Olsen, 1980). Además, la HTA inducida por Ang II se

asocia con un mayor número de monocitos circulantes (Mancilla, *et al.*, 2015) y su disminución conduce a una menor gravedad de la patología hipertensiva. Por otro lado, la timectomía de ratones tratados con desoxicorticosterona (DOCA) disminuye la HTA (Svendsen., 1976) (Zhang & Crowley, 2013). Así también, la aorta y las arterias coronarias de ratones macho C57BL/6J (8–19 semanas) tratados con Ang II durante 14 días mostraron un aumento significativo en el número de leucocitos y macrófagos de la pared aórtica, utilizando los anticuerpos CD45 y F4/80, respectivamente para su identificación (Moore, *et al.*, 2013). Recientemente, se evaluó la presencia de leucocitos (CD45) y macrófagos M1 (CD86) y ausencia de M2 (CD163) por citometría de flujo (CF) en riñones de ratas Wistar Kyoto (WKY, ratas normotensas), luego de inducir inflamación mediante la administración oral de aldosterona y sal durante tres semanas, comparado con el control (Rubio, *et al.*, 2016). Estos autores indujeron una inflamación en los tejidos, ya sea por Ang II o aldosterona, en cambio, en esta investigación se utilizó un modelo que espontáneamente es hipertenso. En este contexto, las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) surgen como el modelo de elección para estudiar la polarización de macrófagos en aorta en la patología hipertensiva.

Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) como modelo animal de hipertensión

Las SHR representan el modelo animal de elección utilizado para el estudio de la hipertensión esencial en humanos, ya que emula muy bien lo que sucede en humanos. Esta cepa de ratas fue desarrollada por el grupo de Okamoto mediante la selección y el cruce entre hermanos de ratas Wistar Kyoto (WKY) que presentaban elevada presión arterial (Okamoto & Aoki, 1963; Kurtz & Morris, 1987). La cepa WKY se estableció en 1971 como control normotenso ((US), (1976); Kurtz & Morris, 1987).

Estudios *in vivo* han demostrado que en las primeras fases de la hipertensión, las SHR presentan un incremento del gasto cardíaco sin cambios en la resistencia periférica. Cuando la hipertensión progresa a una situación de hipertensión establecida y constante el gasto cardíaco retorna a los valores normales, pero aumenta la resistencia periférica total (Hutchins & Smith, 1980) de forma muy similar a lo que sucede en humanos (Palatini & Julius., 1997; Gómez, *et al.*, 2008). En estas ratas, al igual que en humanos, la presión sanguínea tiende a elevarse con la edad y la HTA tendría un carácter poligénico. Además, los niveles plasmáticos de catecolaminas se elevan, sugiriendo que la hipertensión se pueda deber a alteraciones del eje

simpático y médula adrenal. Adicionalmente, en las SHR se han observado las mismas complicaciones producidas en humanos, como dilatación e insuficiencia cardiaca congestiva, hemorragia cerebral, nefrosclerosis con deterioro de la función renal, hipertrofia ventricular izquierda y remodelado de los vasos sanguíneos (Ribera, *et al.*, 2013) (Mancilla, *et al.*, 2015).

Por consiguiente, la utilización de modelos animales que emulen la HTA en humanos, tal como el modelo de las ratas espontáneamente hipertensas, resulta relevante para el desarrollo de nuevas metodologías que permitan aislar y detectar macrófagos M1 y M2 en aorta, ya que no hay antecedentes a la fecha.

Citometría de flujo y macrófagos

La CF emplea anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, los que son detectados y visualizados mediante un sistema informático apropiado y permite analizar un elevado número de células en suspensión en un corto período (5.000 células/s). Además, la sensibilidad general es superior a 1×10^{-4} , por lo que permite detectar, por ejemplo, una célula tumoral marcada entre 10.000 células normales.

Por otra parte, el análisis de viabilidad proporcionado por esta técnica entrega información sobre las células viables (vivas) y no viables (muertas). Las células no viables pueden unirse no específicamente a sus anticuerpos dando resultados falsos positivos y, en última instancia, resultados inexactos. La discriminación entre células vivas y muertas en el análisis por CF se puede evaluar utilizando diversos fluorocromos tales como, 7-amino actinomicina D (7-AAD), Ioduro de Propidio (PI) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), los cuales tienen fuerte afinidad por el ADN (Adan, *et al.*, 2017). Así también, ofrece información simultánea de varios parámetros celulares, identificando paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos por cuantificación de la intensidad antigénica por medio de canales de fluorescencia y empleando múltiples marcajes para detectar la coexpresión de antígenos en una sola muestra. Por lo tanto, esta técnica permite encontrar subtipos de células estrechamente relacionadas, por ejemplo, las subpoblaciones de macrófagos (Moore, *et al.*, 2013; Adan, *et al.*, 2017; Hays, *et al.*, 2018).

La detección fenotípica entre los macrófagos polarizados implica la expresión diferencial de los receptores de la superficie celular. Rubio y colaboradores identificaron subpoblaciones de macrófagos en riñón de ratas mediante CF (Rubio, *et al.*, 2016). Estas células fueron

detectadas utilizando anticuerpos anti-CD45 (proteína de membrana específica de leucocitos), anti-CD68 (proteína de membrana de lisosomas, pan macrófago), anti-CD86 (proteína de membrana específica para M1) y anti-CD163 (proteína de membrana específica para M2).

Actualmente, existe desconocimiento de la participación de las subpoblaciones M1 y M2 en el proceso de inflamación vascular provocada por distintos estímulos, como los asociados a HTA. Hay estudios en modelos de ratón donde se les induce hipertensión y se detectan macrófagos generales en aorta por CF (Allen, *et al.*, 2017; Moore, *et al.*, 2013). Por otra parte, se han realizado estudios en ratas a las cuales se les induce inflamación usando aldosterona como estímulo, en las que se ha detectado macrófagos en riñón por la misma técnica (Rubio, *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, el mejor modelo que se asemeja a la hipertensión en humanos es la que se produce en las SHR. Sin embargo, entre murinos y ratas existen diferencias entre las proteínas marcadoras y los anticuerpos utilizados para la detección de macrófagos por CF, lo que explicaría los escasos estudios en comparación con los ratones.

Esta investigación tiene como objetivo utilizar CF para proporcionar una nueva metodología que permita aislar, detectar y cuantificar macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles WKY y en ratas SHR. Luego, con esta metodología se propone evaluar la población de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles WKY y en ratas SHR.

Los antecedentes descritos permiten plantear la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

“La citometría de flujo detecta y discrimina diferencias en los niveles de macrófagos M1 y M2 en aortas de ratas hipertensas respecto a ratas normotensas”.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Implementar una nueva metodología que permita identificar macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas por citometría de flujo, para evaluar los niveles de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles normotensas (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Diseñar e implementar una nueva metodología que permita: a) aislar macrófagos de aorta de ratas y b) detectar y discriminar las subpoblaciones M1 y M2 en aorta por citometría de flujo.

2.- Evaluar los niveles de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles normotensas (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), utilizando la nueva metodología implementada en el objetivo 1.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos y materiales

El suero bovino fetal (SBF) fue obtenido de BioWest. La colagenasa de *Clostridium histolyticum* tipo I ≥ 125 CDU/mg (cat#: C0130-500 mg), colagenasa de *C. histolyticum* tipo IX ≥ 800 CDU/mg (cat#: C7657- 25 mg), hialuronidasa de bovino 400–1,000 units/mg (cat#: H3506), desoxirribonucleasa I de páncreas de bovino 400 units/mg (cat#: DN25), Ioduro de Propidio 1 mg/mL (cat#: P4864), solución azul de Tripán 0,4% (cat#: 93595), lipopolisacáridos de *Escherichia coli* O111:B4 (LPS) (cat#: L 2630) e histopaque[®]1077 de 100 ml (cat# 10771) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El PBS 10X fue obtenido de Corning. La ketamina 65 mg/kg era de Cheminova y la xilacina 10 mg/kg de Bayer. El kit BD Cytotfix/Cytoperm para la fijación y permeabilización (cat#: 554714) fue obtenido de BD Biosciences. Los anticuerpos monoclonales: CD45-Pacific Blue[™] anti-rat (#cat: 202225/25 μ g) clon OX-1 concentración 0.5 mg/mL y CD86-Alexa Fluor[®] 647 anti-rat (#cat: 200314/100 μ g) clon 24F concentración 0.5 mg/mL fueron adquiridos de Biolegend. Los anticuerpos policlonales: CD163-PE, inmunógeno: péptido sintético (cat#: orb124511) de concentración 0,5 mg/mL y CD68-FITC, inmunógeno: péptido sintético conjugado con KLH de ratón (cat#: orb318110) de concentración 0,5 mg/mL fueron obtenidos de Biorbyt. NaCl (cat#: S9888), CaCl₂ (cat#: C4901) y EDTA (cat#: E1644) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. La mariposa para extracción de sangre se obtuvo de BD Plastipak. El kit BD Cytotfix/Cytoperm (cat#554722) era de BD Biosciences.

4.2. Animales y validación del modelo experimental

Se utilizaron ratas WKY y SHR, ambas obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicados por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH Publicación 85-23, 1985) y aprobados por el Comité de Bioética Institucional de la PUC (N°170828003). El sacrificio y obtención de muestras de sangre y tejido fue realizada por un bioquímico certificado en supervisión y manipulación de ratas para el uso de investigación.

Para el objetivo 1, se utilizaron animales de desecho (ratas WKY de mayor edad al del estudio que iban a ser descartadas) y para el objetivo 2 se utilizaron ratas macho de 4 a 6

meses de edad. Los grupos experimentales fueron los siguientes: a) grupo 1: ratas espontáneamente hipertensas (SHR, n=11); b) control o grupo 2: ratas Wistar Kyoto normotensas (WKY, n=11). El número de animales a utilizar por grupo se calculó en base al grosor de la túnica media: Grosor de la túnica media N=8 por c/grupo; SHR 86 μm V/S Wistar 83 μm DS=2,3 y utilizando un poder estadístico del 90% y p=0,05 da un resultado de 11 muestras por cada grupo para este estudio.

La validación del modelo SHR se estableció por evaluación de la presión sanguínea. Esta se determinó de forma no invasiva en las ratas despiertas con el método *tail-cuff* (equipo CODA, Kents Scientific) una vez a la semana, con registro de presiones sistólicas y diastólicas en una habitación con luminosidad y ruido ambiental bajos y a temperatura ambiente (23–25 °C) sobre la plataforma del equipo CODA a la misma temperatura. Para la caracterización hemodinámica, se utilizó la presión tomada antes del sacrificio de la rata.

4.3. Obtención y preparación de las muestras biológicas

Previo a la obtención de las muestras, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina 65 mg/kg y xilacina 10 mg/kg por vía intraperitoneal.

- Muestras sanguíneas. La extracción de la sangre se realizó por punción en el corazón mediante una mariposa; un volumen de 2 mL fue depositado en tubos de heparina de sodio para su posterior uso. La sangre periférica se utilizó como control para la optimización de la obtención de PBMCs y titulación del anticuerpo anti-CD45.

- Extracción de leucocitos peritoneales. Para la extracción de leucocitos del lavado peritoneal se inyectó intraperitonealmente 20 mL de PBS 1X + 3% SBF mediante una jeringa con aguja de 5 mm, para luego obtener 10 mL del lavado peritoneal. El lavado peritoneal se utilizó como control positivo para la adquisición de macrófagos peritoneales y para la titulación de los anticuerpos anti-CD86, -CD163 y -CD68.

- Muestras de aorta. La extracción de la aorta completa se obtuvo cortando desde la zona próxima al punto de ramificación de la arteria subclavia izquierda hasta el punto en que el vaso se bifurca hacia la arteria renal. El tejido adiposo perivascular fue eliminado. Posteriormente, la aorta fue lavada a temperatura ambiente en solución salina al 1 % hasta que el lumen presentó un aspecto blanquecino. Luego, el tejido se pesó y se dividió en dos partes iguales para la posterior estandarización del protocolo de digestión enzimática.

4.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para la obtención de PBMCs se realizó fraccionamiento de la sangre por gradiente en Ficoll. En un tubo Falcon de 15 mL se colocó Histopaque[®]1077 y la muestra de sangre en proporción 1:1 (2 mL aproximados de la sangre). Los tubos fueron centrifugados a $400 \times g$ (Hettich Z320) durante 30 minutos a temperatura ambiente y sin freno. Transcurrido el tiempo, se recolectó cuidadosamente el volumen de la interfase turbia (1000 μ L aproximadamente) que se formó entre el medio acuoso y la capa de Ficoll, la que corresponde a la fracción de células mononucleares o capa linfocitaria. A esta fracción se le añadió de manera proporcional un volumen de solución de PBS 1X pH 7,3 y esta mezcla fue centrifugada a $850 \times g$ durante 5 minutos con freno. Con la finalidad de eliminar el Ficoll, el sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 2.000 μ L de PBS 1X pH 7,3.

4.5. Soluciones para la digestión enzimática en aorta de rata.

Luego de ensayar distintas combinaciones de soluciones, como resultado final se utilizaron las siguientes:

Soluciones stock: NaCl 1M en 100 mL; CaCl₂ 0,36 mM en 15 mL; 62,5 U/mL colagenasa tipo I (13,2 mg/mL); 125 U/mL colagenasa tipo XI (8,2 mg/mL); 60 U/ml hialuronidasa I (8,2 mg/mL); 60 U/mL DNAsa I (7 mg/mL); EDTA 25 mM en 100 mL; 500 mL de PBS 1X pH 7,3. Las enzimas fueron disueltas en amortiguador de enzimas que se detalla a continuación.

Amortiguador de enzimas: Se preparó con 1 mL de NaCl (0,75 M), 1mL CaCl₂ (0,36 mM) y 3 mL PBS 1X pH 7,3, obteniendo un volumen final de 5 mL.

Amortiguador de digestión: Se utilizó 1900 μ L del amortiguador de enzimas y se agregó 80 μ L de colagenasa I (0,5 mg/mL), 40 μ L colagenasa XI (0,15 mg/mL), 40 μ L hialuronidasa I (0,15 mg/mL) y 40 μ L DNAsa I (0,13 mg/mL), alcanzando un volumen final de 2100 μ L, del cual sólo se utilizó 2000 μ L para disgregar la mitad de la aorta de rata.

Amortiguador de lavado: Se preparó con 2 mL de EDTA 25 mM ([5 mM]_f), 100 μ L de SBF (1%) y 7,9 mL de PBS 1X pH 7,3.

4.6. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada por:

a) Conteo con azul de Tripán. En tubo Eppendorf de 0,6 mL se mezclaron 10 µL de muestra y 10 µL de azul de Tripán. Posteriormente, 10 µL de la mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular en un microscopio óptico con el objetivo a 10X de aumento. Se determinó el porcentaje de células vivas (birrefringentes o blancas) *versus* células muertas (azules). Para el cálculo de la concentración celular presente en la suspensión original, se contaron las células en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro y el número obtenido fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = \text{número de células vivas} \div 4 \times \text{factor de dilución} \times 10000$$

Para calcular la viabilidad celular (expresada como el porcentaje de células que están vivas) se realizó la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{\text{Número total de células vivas (blancas)}}{\text{Número total de células vivas y muertas (tanto blancas como azules)}} \times 100$$

b) Ioduro de Propidio. Esta técnica se utilizó para evaluar la viabilidad solamente para la suspensión celular después de realizada la digestión enzimática mediante el intercalante del ADN (Ioduro de Propidio), que fue incubado con la muestra 5 minutos antes de su detección en el citómetro de flujo.

4.7. Criterio de selección de los anticuerpos utilizados para el reconocimiento de las proteínas marcadoras de los macrófagos

La selección de los fluorocromos para los anticuerpos conjugados se basó en la expresión del antígeno sobre las células de interés y el índice de coloración del fluorocromo, estableciendo la sensibilidad de resolución. Los anticuerpos para cada proteína fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes aspectos: 1) Se seleccionaron los dos fluorocromos menos brillantes: Pacific Blue TM que utiliza láser azul (488-561 nm), su excitación máxima es a 405 nm y su emisión máxima es a 450 nm y Alexa Fluor 647, que usa el láser rojo (595-647 nm), su excitación máxima es a 650 nm y su emisión máxima es a 660 nm, para aquellos antígenos que permiten identificar la población general de leucocitos (CD45) y la subpoblación celular de macrófagos M1 (CD86); 2) Los fluorocromos con brillo intermedio como isotiocianato de fluoresceína (FITC) que utiliza el láser azul, su excitación

máxima es de 495 nm y su emisión máxima es a 519 nm y ficoeritrina (PE) que utiliza el láser azul, su excitación máxima es entre 496-564 nm y su emisión máxima es a 578 nm fueron utilizados para antígenos que caracterizan poblaciones celulares como los macrófagos (CD68) y la subpoblación celular de macrófagos M2 (CD163). El Ioduro de Propidio (IP) se utilizó para analizar la viabilidad celular después de la digestión enzimática, utiliza el láser azul, su excitación máxima es a 535 nm y su emisión máxima es a 617 nm.

4.8. Citometría de flujo

Las preparaciones de las muestras se incluyen en la sección de resultados, ya que es parte del objetivo 1 de esta investigación. Las lecturas fueron realizadas en el citómetro BD LSRFortessa™ X-20 que se puede configurar hasta con 5 láseres, lo que permite la detección de 20 parámetros simultáneamente. Las opciones de láser más comunes son el azul, rojo, violeta, amarillo-verde y UV. Además, cuenta con un programa de control de calidad automatizado que se realiza periódicamente. Para asegurar la validez y la reproducibilidad de la detección del panel utilizado, se aplicaron los mismos parámetros correspondientes a los voltajes de los fotomultiplicadores, según el boletín técnico del equipo. Luego, para cada lectura se hizo la compensación de las fluorescencias incluidas en el panel multicolor para corregir la posible superposición de los espectros de emisión de los fluorocromos. Una vez calibrado el equipo, se adquirió al menos 10.000 eventos para obtener un resultado representativo. Luego de seleccionar los anticuerpos y fluorocromos, se procedió a evaluar cada uno de manera progresiva con el fin de apreciar posibles interferencias entre los fluorocromos usados. Los datos obtenidos se analizaron usando el programa FlowJo versión 10.

4.9. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones se realizaron utilizando *t*-test, considerando una diferencia significativa de un valor de $p < 0,05$. Para determinar *outliers*, se utilizó el test de Grubbs (Urvoy and Autrusseau 2014). Los datos fueron analizados utilizando los programas IBM SPSS Statistics 21 y Graph Pad Prisma 6.0.

5. RESULTADOS

Objetivo 1: Diseñar e implementar una nueva metodología que permita: a) aislar macrófagos de aorta de ratas y b) detectar y discriminar las subpoblaciones M1 y M2 en aorta por citometría de flujo

Se procedió a diseñar un nuevo protocolo de digestión de aorta de rata que permita obtener macrófagos tisulares viables. Para este efecto, se trabajó combinando las metodologías de disgregación de tejidos descritas en los trabajos de Allen, *et al.*, 2017 (aorta de ratón), de Moore, *et al.*, 2013 (aorta de ratón) y Rubio, *et al.*, 2016 (riñón de rata). Se prepararon soluciones amortiguadoras teniendo en cuenta las características y actividad de las enzimas para disgregar aorta de rata. Además, se estudiaron dos tiempos distintos de digestión, 30 y 60 minutos, para buscar las condiciones óptimas de viabilidad y obtención de macrófagos.

5.1. Optimización del proceso de digestión enzimática en aorta de rata

Se evaluaron dos tiempos de disgregación, 30 y 60 minutos, como también las zonas de la aorta a digerir (abdominal y torácica). Luego de haber extraído la aorta, se pesó y se dividió en dos partes iguales para ensayar las distintas condiciones de trabajo. En un tubo Eppendorf de 2 mL se depositaron cada uno de los trozos, añadiendo 200 μ L del amortiguador de digestión (precalentado a 37 °C) y con una tijera quirúrgica se cortaron en fragmentos más pequeños durante 2 minutos aproximadamente. Luego, cada tubo se completó a 2 mL con el amortiguador de digestión y se incubó en un baño termostático en contacto con agua, agitación constante a 37 °C y mezclando el contenido por inversión cada 5 minutos. Transcurrido el tiempo (30 o 60 minutos) el tejido se lavó 1 vez con 1 mL de amortiguador de lavado y se centrifugó a 400 \times g durante 5 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió y se centrifugó como en el paso anterior. Posteriormente, el sobrenadante junto con el precipitado se filtró por un Cell Strainer de 70 μ m y se recolectó en un tubo Falcon de 50 mL. Luego, con 1 mL del amortiguador de lavado se resuspendió lo que quedó en el tubo Eppendorf (la punta de la pipeta se cortó para facilitar la suspensión) para ser filtrado. Este paso se repitió una vez más, obteniendo un volumen total de 3 mL por mitad de aorta. De esta suspensión celular, previamente mezclada mediante vórtex, se tomó 10 μ L y se tiñó con 10 μ L de azul de Tripán para su análisis y conteo mediante microscopio óptico.

Para determinar la eficacia del método de digestión y disgregación celular se usaron como parámetros el número total de células obtenidas, la viabilidad celular y la población de leucocitos por marcación con CD45+.

En la **Tabla 2** se muestra el número total de células obtenidas y la viabilidad celular de las secciones de aorta torácica y abdominal tratadas a 30 o 60 minutos con el tampón de digestión celular. Se observó que en las diferentes condiciones evaluadas se obtuvo una viabilidad celular mayor al 94%, sin diferencias significativas entre los tiempos de digestión, y sección de la aorta elegida para su disgregación. Sin embargo, se observan diferencias en el número de células obtenidas y la cantidad de tejido a disgregar; mientras más tejido se digiere, mayor es el número total de células obtenidas.

Tabla 2. Células totales obtenidas en el proceso de digestión en aorta

ID WKY	Peso de la rata (gr)	Tiempo (minutos)	Sección de aorta	Peso de la aorta (g)	Células (cél/mL)	Células (cél/gr)	Viabilidad (%)
R1	306	30	Torácica	0,104	1.420.000	4641	94%
R2	308	30	Torácica	0,112	5.660.000	18377	96%
R3	309	30	abdominal	0,072	1.860.000	6019	98%
R1	306	60	abdominal	0,060	500.000	1634	94%
R2	308	60	abdominal	0,111	2.280.000	7403	97%
R3	309	60	Torácica	0,074	3.200.000	10356	98%

Finalmente, la eficacia del método se definió evaluando el porcentaje de células CD45+, para lo cual se usó la aorta completa sometida a digestión durante 30 o 60 minutos. Como control negativo del ensayo se usó células sin marcar y como control positivo leucocitos en sangre del mismo animal. Se utilizó la dilución del anticuerpo CD45 recomendada por el proveedor ($2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$). La **Figura 2**, muestra el área seleccionada para la identificación de las células (**Figura 2A**) y la población de leucocitos en sangre y aorta (**Figura 2B**) con y sin marcar con anti-CD45. El control positivo de leucocitos en sangre marcados con anti-CD45 (**Figura 2B.2**) mostró un desplazamiento de la nube de puntos hacia la derecha correspondiente a 99,7 % de las células en comparación a las células sin marcar (**Figura 2B.1**).

En la aorta, las digestiones de 30 y 60 minutos permitieron obtener 64 y 68% de células CD45+, respectivamente (**Figura 2B.2**). Para ambos casos, las células sin marcar no mostraron señal inespecífica (**Figuras 2B.1**).

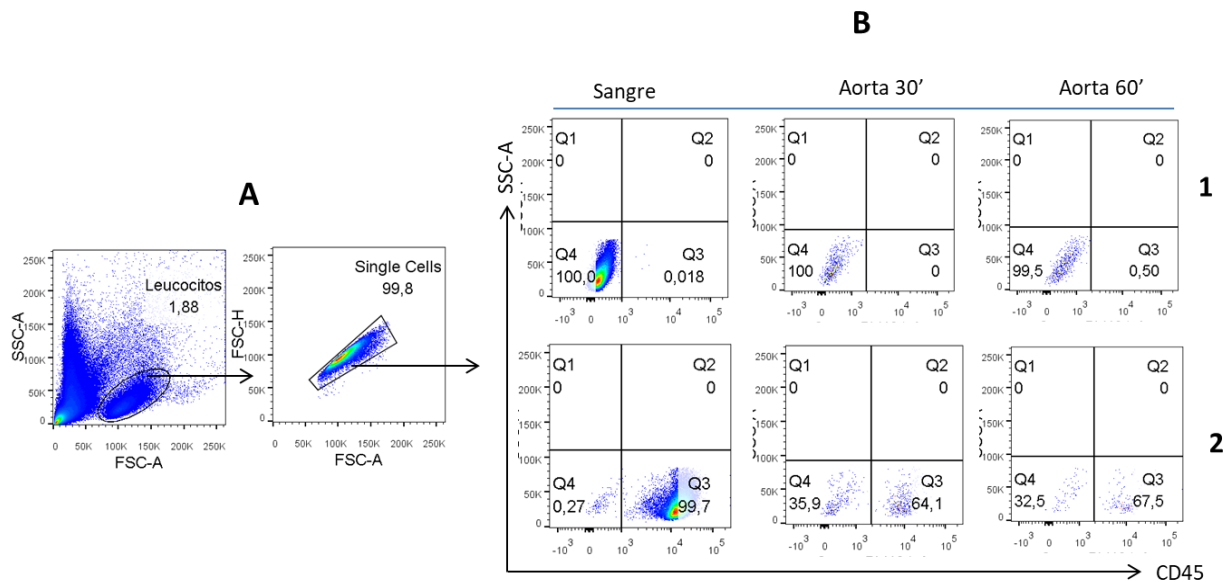


Figura 2: Estrategia de gating para la identificación de leucocitos en sangre y aorta de rata.

A) Diagrama de puntos (dot-plot) representativos de la identificación de células en sangre mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el singlet (FSC-H/FSC-A). Estas mismas áreas fueron utilizadas para seleccionar las células después de la digestión y disgregación de aorta. B) *Dot plot* de la población leucocitaria. B1) Leucocitos sin marcar en sangre y aorta después de la disgregación del tejido durante 30 minutos o 60 minutos. B2) Leucocitos de sangre y aorta después de la digestión y disgregación del tejido durante 30 o 60 minutos marcados con CD45.

El análisis de intensidad de fluorescencia de CD45+ en leucocitos de las aortas digeridas (30 o 60 minutos) reveló que a 30 minutos, el rendimiento de células CD45+ es mayor respecto a 60 minutos (**Figura 3**). El histograma muestra el contenido de células y la distribución a distintos tiempos de digestión de leucocitos sin marcar (gris), leucocitos CD45+ después de 30 minutos de la digestión (celestes) y leucocitos CD45+ después de 60 minutos de la digestión (morado).

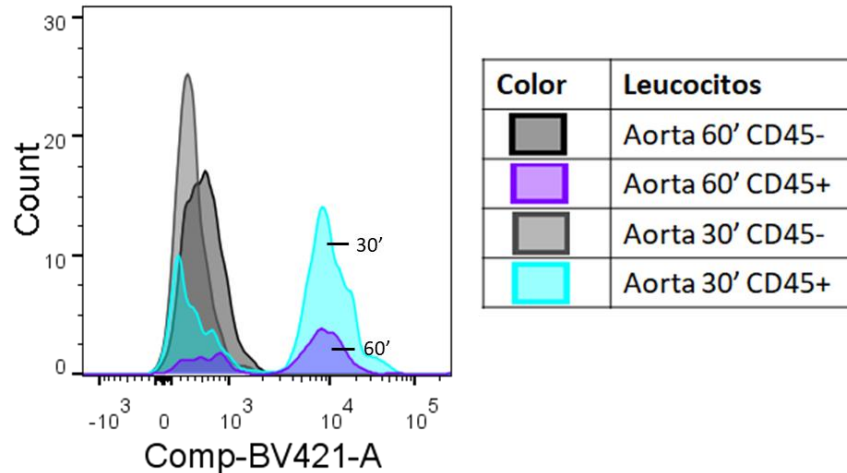


Figura 3: Histograma de leucocitos CD45+ en aorta de rata disgregada a 30 o 60 minutos.

Intensidad de fluorescencia de las células que unen CD45 ($2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) en aorta, a dos tiempos de digestión de 30 y 60 minutos.

5.2. Optimización de las diluciones de trabajo de los anticuerpos anti-CD para el reconocimiento de macrófagos y sus subpoblaciones M1 y M2

5.2.1. Titulación de los anticuerpos anti-CD45, anti-CD68, anti-CD86, anti-CD163

Para la titulación de los anticuerpos CD45-Pacific Blue, CD86-Alexa Fluor 647, se prepararon 4 diluciones seriadas 1:2 de cada conjugado, partiendo por la concentración recomendada por la casa comercial (Biolegend) en un volumen final de 100 μL . Para el anticuerpo CD68-FITC y CD163-PE se realizaron 3 y 4 diluciones seriadas respectivamente, partiendo de la concentración recomendada por el proveedor (Biorbyt) en un volumen final de 50 μL .

Posteriormente, se incubaron 1×10^5 células de aorta y 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica y lavado peritoneal con el anticuerpo CD45 en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente, utilizando las distintas concentraciones del anticuerpo conjugado. Por otro lado, se incubó 1×10^6 células del lavado peritoneal y 1×10^5 células de aorta para cada concentración de los anticuerpos CD86 y CD163, en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente y luego se fijaron con 250 μL BD Cytfix/Cytoperm durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para el anticuerpo intracelular (CD68) las células se permeabilizaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en BD *Perm/Wash*TMbuffer (proveniente

del sistema comercial BD Cytotfix/Cytoperm). Es importante considerar que durante la fijación y permeabilización las células fueron lavadas con *Perm/Wash™buffer*. Para disminuir la unión inespecífica entre las células y los conjugados, las células se lavaron con la solución tampón fosfato-alcalino para tinción de superficie (PBS 1X pH 7,3). Finalmente, las células fueron suspendidas en 150 μL de PBS 1X pH 7,3 para su análisis en CF.

Para cada concentración se obtuvo el índice de tinción, dado por el cociente entre la intensidad media de fluorescencia de la población positiva para la expresión del marcador y la intensidad media de fluorescencia de la población negativa (muestra sin marcaje). Por lo cual en cada uno de los casos se seleccionó el punto de saturación con base al mejor índice de tinción, que representa la mayor separación entre la población positiva y la negativa. Además, se seleccionó la concentración de conjugado que permite la mejor distribución de las poblaciones, con respecto a los ejes en las gráficas de puntos o dispersogramas.

5.2.2. Anticuerpo anti-CD45 Pacific Blue

La concentración óptima del anticuerpo CD45 para aorta de rata fue definida mediante la titulación de anticuerpos.

Como control negativo se utilizó células sin marcar y como control positivo leucocitos de sangre y de lavado peritoneal del mismo animal. En la **Figura 4** se observan los diagramas de puntos (*dot plot*) de leucocitos en sangre (**Figura 4A**), lavado peritoneal (**Figura 4B**) y aorta (**Figura 4C**). Se determinó el porcentaje de expresión y la distribución de las poblaciones *versus* la concentración del anticuerpo ($2,5 \times 10^{-3}$; $1,25 \times 10^{-3}$; $6,25 \times 10^{-4}$; $3,1 \times 10^{-4}$; $1,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), para marcar 100.000 células.

Utilizando la concentración sugerida por el proveedor ($2,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en leucocitos de sangre se observó un desplazamiento de la nube de puntos hacia la derecha, obteniendo una expresión del 94% de células unidas al anticuerpo CD45, en comparación con las células sin el marcador, tal como se observa en la **Figura 4A**. Por otro lado, este porcentaje se mantiene al disminuir la concentración a la mitad. Sin embargo, a medida que aumenta la dilución del anticuerpo desde $6,25 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ este porcentaje va disminuyendo y a su vez la nube de puntos se desplaza hacia la izquierda, alcanzando un 40,5% a la concentración de $1,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en comparación a su control negativo.

En la **Figura 4B** se observa el desplazamiento de la población de leucocitos de lavado peritoneal marcados con anti-CD45 a una concentración de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, correspondiendo a un 16,5% comparado con las células sin marcar. A medida que la dilución del anticuerpo aumenta, disminuye el porcentaje de células marcadas, alcanzando un 2,4% en la última dilución ($1,6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

En la **Figura 4C** se aprecia en leucocitos de aorta que, tanto la concentración $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ como $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, mantienen el porcentaje de células CD45+ correspondiendo a un 6,5%. Sin embargo, con una dilución de $6,25 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ se alcanza un 10,6% y en las siguientes diluciones ($3,1 \times 10^{-4}$ y $1,6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) disminuye a un 4,8 %.

Finalmente, para seleccionar el punto de saturación, se evaluó el índice de tinción y se comparó con el porcentaje de expresión de las células CD45+, tanto en los controles positivos (leucocitos de sangre y del lavado peritoneal) como en las células de aorta, tal como se muestra en las **Tablas y Gráficas 4D, 4E y 4F**, respectivamente.

El análisis del índice de tinción para los CD45+ en leucocitos de sangre y lavado peritoneal, reveló que la concentración de $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ del anticuerpo proporciona un índice de tinción sobre el 50% (**Tablas de la Figuras 4D y 4E**) o igual, como es el caso de la aorta (**Tabla de la Figura 4F**) en relación con el índice de tinción de la concentración $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$. También se observa que a medida que va aumentando la dilución, disminuye el índice de tinción tanto en leucocitos de sangre, como en lavado peritoneal y aorta (**Gráficas de las Figuras 4D, 4E y 4F**).

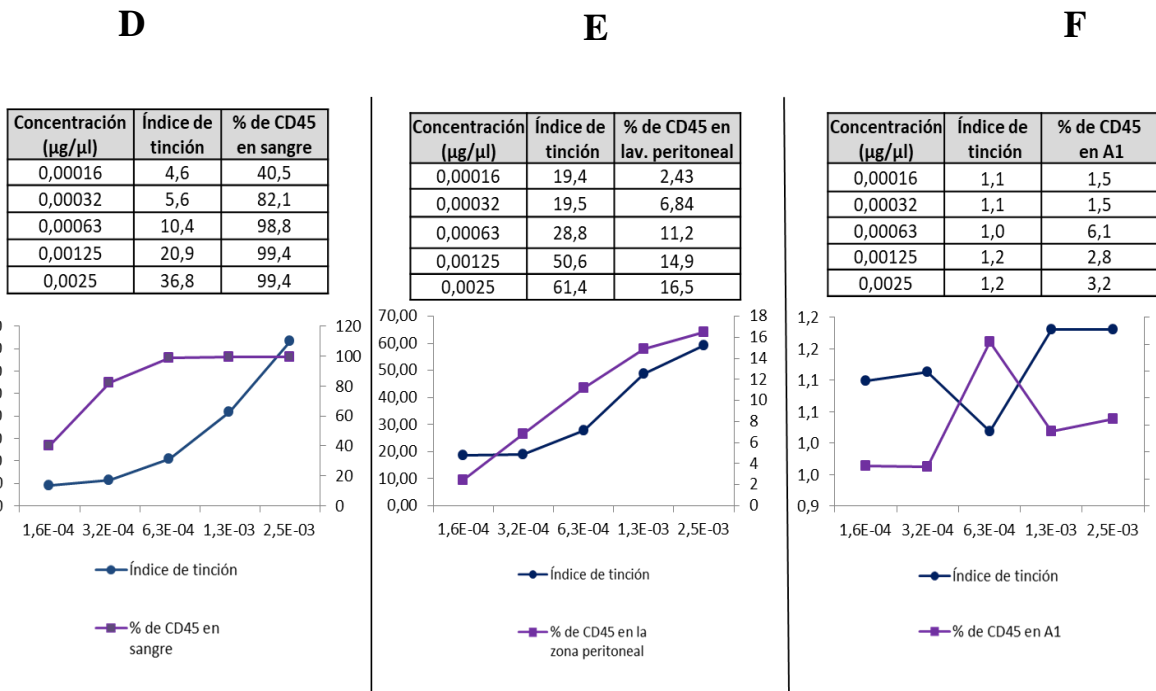
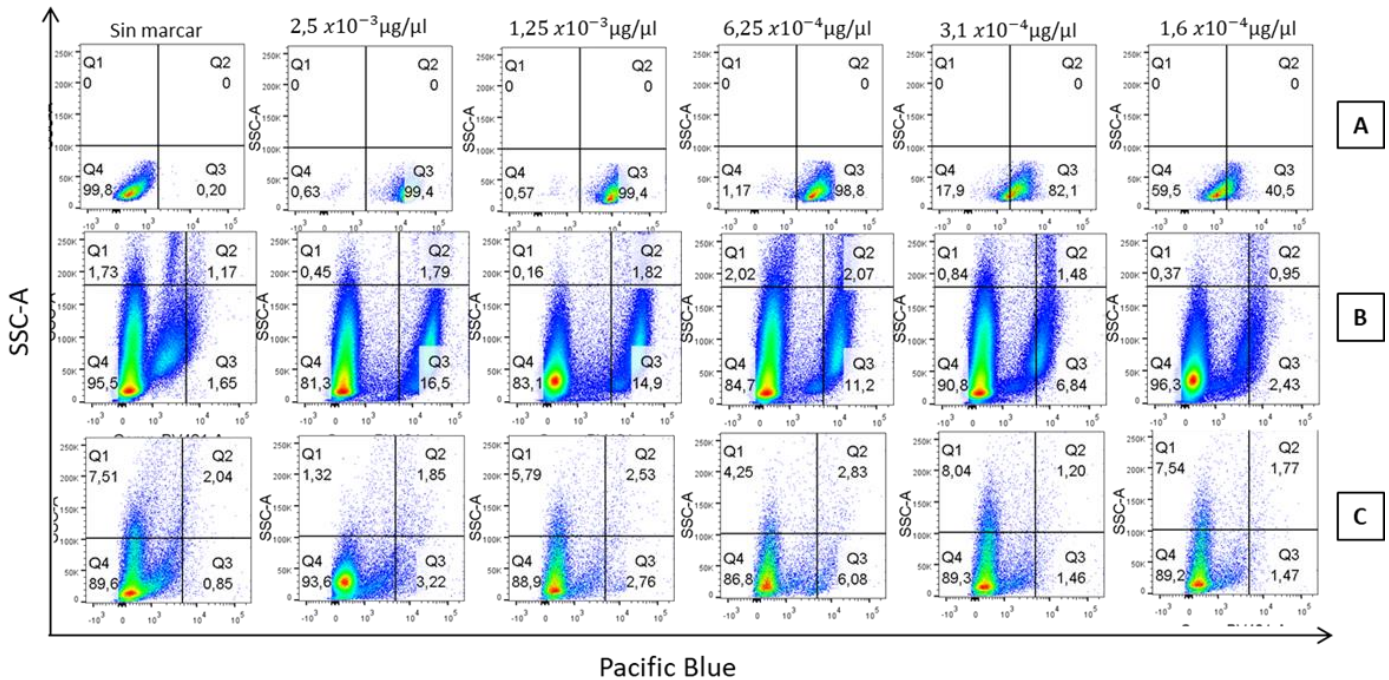


Figura 4: Dot plot, tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD45-Pacific Blue.

A) Leucocitos en sangre periférica. B) Leucocitos del lavado peritoneal. C) Leucocitos en aorta. Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes: $2,5 \times 10^{-3}$; $1,25 \times 10^{-3}$; $6,25 \times 10^{-4}$; $3,1 \times 10^{-4}$; $1,6 \times 10^{-4}$ µg/µL. Los controles negativos fueron células sin marcar como se indica en los dot plots. D) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD45 en sangre. E) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD45 en lavado peritoneal. F) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD45 en aorta.

Para concluir, la concentración del anticuerpo anti-CD45 que se utilizó para la detección de leucocitos en aorta es de $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, ya que se mantiene el rendimiento del porcentaje de expresión en un 88%, como sucede también en los controles (leucocitos de sangre y lavado peritoneal) y porque el índice de tinción (1,2) es igual al índice de la concentración a $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ sugerida por el proveedor.

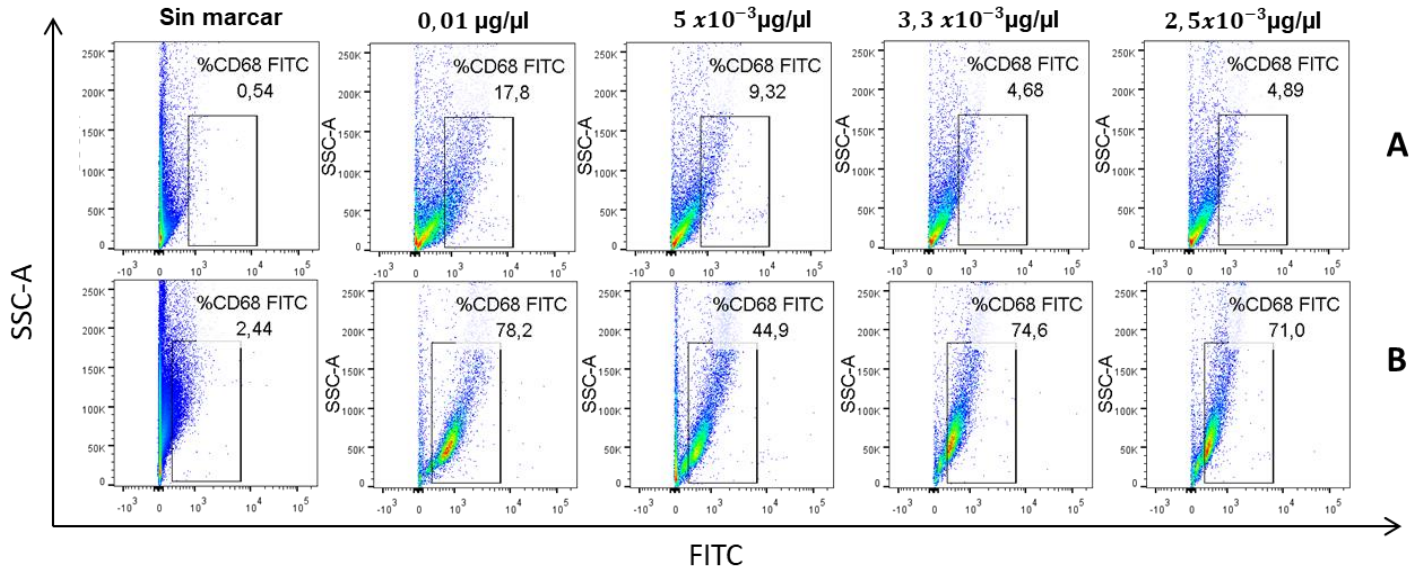
5.2.3. Anticuerpo anti-CD68 FITC

La concentración del anticuerpo CD68 en aorta de ratas se definió usando la titulación de anticuerpos a partir de la concentración sugerida por el proveedor (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Como control negativo y positivo, se usaron células sin marcar y macrófagos del lavado peritoneal, respectivamente. La **Figura 5** muestra los *dot plots* para macrófagos en aorta (**Figura 5A**) y lavado peritoneal (**Figura 5B**) para cada concentración del anticuerpo CD68 (0,01; 5×10^{-3} ; $3,3 \times 10^{-3}$ y $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

En la aorta se aprecia que a mayor concentración, mayor es el porcentaje de unión de CD68+ en las células en comparación con el control negativo. Para la concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se obtuvo un 17,8% de unión y para la dilución de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, el porcentaje de unión fue de 4,9% (**Figura 5A**).

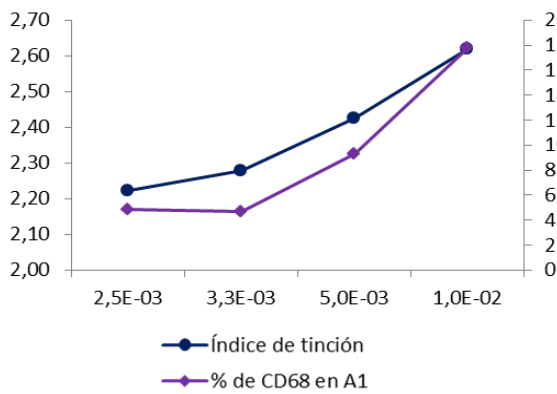
En macrófagos del lavado peritoneal se observa que a mayor concentración, mayor es el porcentaje de unión de CD68, respecto a las células sin marcar, siendo para la concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del anticuerpo un 78,2%. Mientras que, para la última dilución $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, el porcentaje de expresión corresponde a 71% (**Figura 5B**).

Para determinar la dilución del anticuerpo a seleccionar, se evaluó el índice de tinción de las células con anti-CD68 (**Tablas y Gráficas de la Figura 5**). El análisis del índice de tinción para los CD68+ en macrófagos de aorta, mostró que la concentración 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sugerida por el proveedor), obtiene el mayor índice de tinción correspondiendo a 2,6 (**Tabla de la Figura 5C**) y representa el punto más alto de la **Gráfica de la Figura 5C**. Los macrófagos del lavado peritoneal (**Tabla de la Figura 5D**) presentan un índice de tinción del 1,9 y el porcentaje de unión del anticuerpo fue un 78,2%, siendo ambos los puntos más altos de la **Gráfica de la Figura 5D**. Por lo tanto, la concentración 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del anticuerpo CD68 es la indicada para determinar macrófagos en aorta y con la cual se procedió a trabajar en los próximos ensayos.



C

Concentración (µg/µl)	Índice de tinción	% de CD68 en A1
0,0025	2,2	4,89
0,0033	2,3	4,68
0,005	2,4	9,32
0,01	2,6	17,8



D

Concentración (µg/µl)	Índice de tinción	% de CD68 en lavado peritoneal
0,0025	1,1	71
0,0033	1,1	74,6
0,005	1,5	44,9
0,01	1,9	78,2

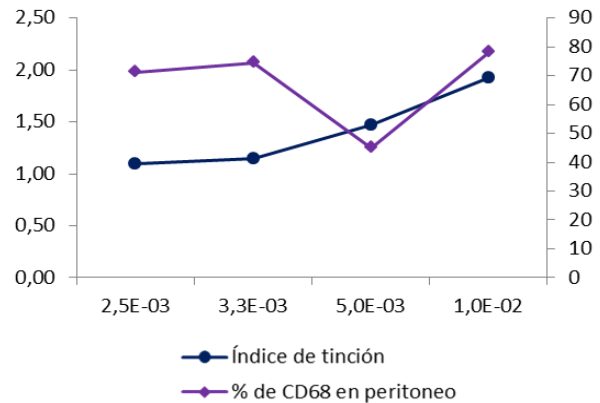


Figura 5: Dot plots, tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD68-FITC.

A) Macrófagos CD68+ en aorta. B) Macrófagos CD68+ en lavado peritoneal (control positivo). Como control negativo, son células sin el anticuerpo (sin marcar). Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes: 0,01; 5×10^{-3} ; $3,3 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$ µg/µL, para marcar 100.000 células. C) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de unión del anticuerpo CD68 en aorta. D) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de unión del anticuerpo CD68 en lavado peritoneal.

5.2.4. Anticuerpo anti-CD86 Alexa Fluor® 647

Para la obtención de la concentración del anticuerpo CD86 (este marcador se utiliza para identificar macrófagos M1), se aplicaron los criterios anteriormente utilizados en CD45. Igualmente, como control negativo se utilizaron células sin marcar y como control positivo leucocitos del lavado peritoneal del mismo animal. La **Figura 6** muestra los *dot plots* en aorta (**Figura 6A**) y lavado peritoneal (**Figura 6B**), para cada concentración del anticuerpo CD86 ($2,5 \times 10^{-3}$; $1,25 \times 10^{-3}$; $6,25 \times 10^{-4}$; $3,1 \times 10^{-4}$; $1,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

En la aorta (**Figura 6A**), se aprecia que tanto las concentraciones $2,5 \times 10^{-3}$ y $1,25 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ unen células CD86+ del orden de 4,5%. A mayores diluciones del anticuerpo, el porcentaje de células marcadas va disminuyendo la unión, siendo para la concentración más baja ($1,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) una expresión del 0,46%.

El lavado peritoneal marcado con anti CD86 a una concentración de $2,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se observa el desplazamiento de la nube de puntos hacia la derecha, correspondiendo a un 7,3% y va disminuyendo a medida que la dilución del anticuerpo aumenta, llegando a 0,8% en la concentración de $1,6 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (**Figura 6B**).

Se usó el índice de tinción y el porcentaje de expresión del anticuerpo para definir la concentración de CD86 (**Tablas y Gráficas de la Figura 6**). Como control positivo se utilizaron los leucocitos de lavado peritoneal (**Tabla y Gráfica de la Figura 6D**).

En los leucocitos del lavado peritoneal el índice de tinción va disminuyendo a medida que van aumentando las diluciones del anticuerpo, a excepción de la concentración $6,25 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, donde el índice aumenta a 3,9, correspondiente a un porcentaje de unión de 0,05% (**Gráfica de la Figura 6D**). Por otro lado, a la concentración $1,25 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tanto el índice de tinción (1,5) como el porcentaje de expresión (4,9%) mantienen el rendimiento sobre el 50% en comparación al índice y el porcentaje de unión de la concentración $2,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sugerida por el proveedor (**Tabla de la Figura 6D**).

El análisis del índice de tinción para los CD86+ en macrófagos de aorta, mostró que la concentración de $1,25 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da cuenta de un índice de tinción de 1,5, parecido a la concentración de $2,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1,4), manteniendo el rendimiento de la expresión del anticuerpo en 4,5% como se muestra en la **Tabla de la Figura 6C**. En conclusión, la

concentración del anticuerpo anti CD86 que se utilizó para la identificación de macrófagos M1 en aorta fue de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

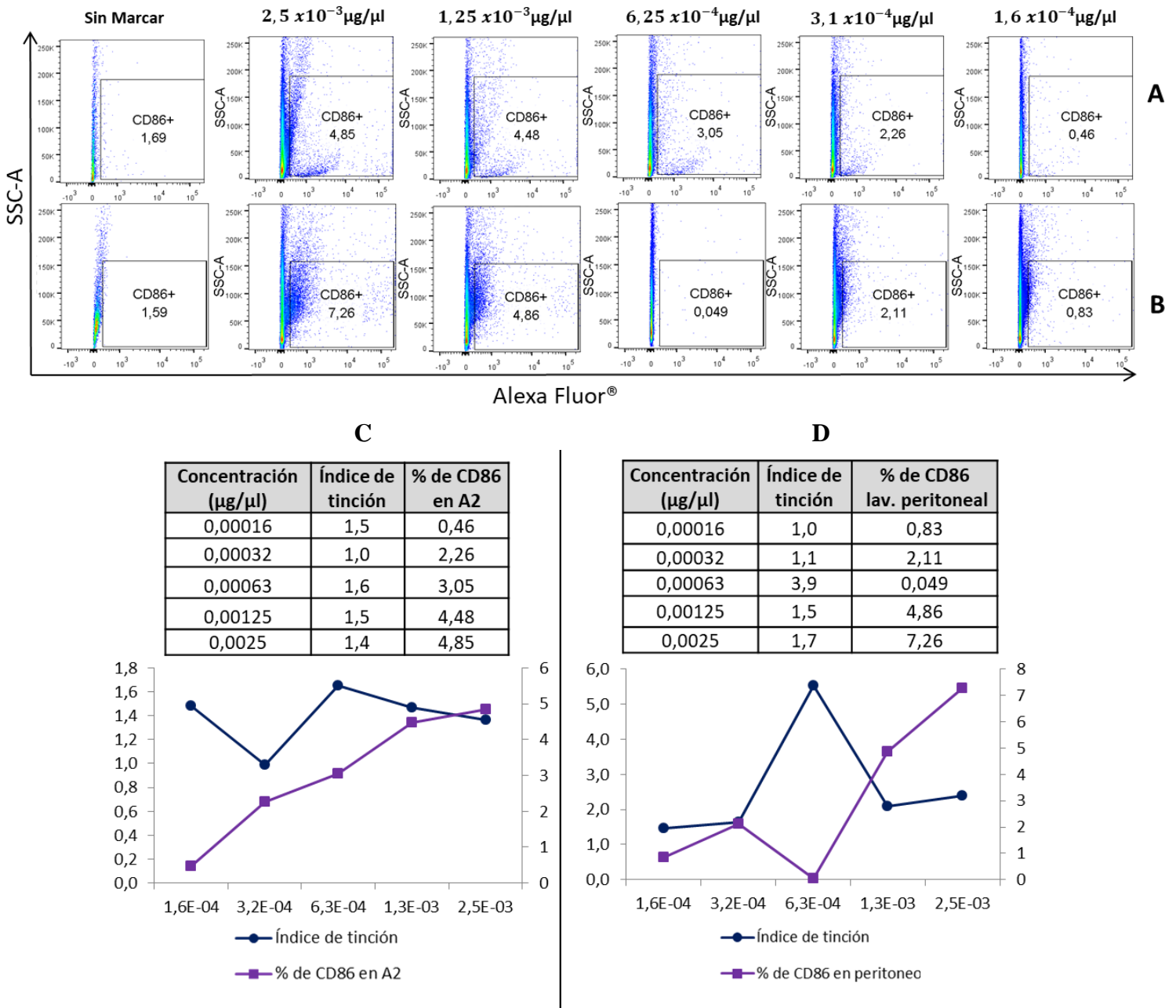


Figura 6: Dot plots, tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD86 Alexa Fluor®.

A) Macrófagos CD86+ en aorta. B) Macrófagos CD86+ del lavado peritoneal (control positivo). Como control negativo, son las células sin el anticuerpo (sin marcar). Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes: $2,5 \times 10^{-3}$; $1,25 \times 10^{-3}$; $6,25 \times 10^{-4}$; $3,1 \times 10^{-4}$; $1,6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$. C) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD86 en aorta. D) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD86 en lavado peritoneal.

5.2.5. Anticuerpo anti-CD163 PE

Este anticuerpo permite reconocer macrófagos M2 y para su titulación se usó el mismo criterio que en CD68. Como control negativo se utilizó células sin marcar y como control positivo leucocitos del lavado peritoneal del mismo animal. La **Figura 7** muestra los *dot plots* para células en aorta (**Figura 7A**) y lavado peritoneal (**Figura 7B**) para las concentraciones del anticuerpo CD163 entre $0,02 - 2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En la aorta, a mayor concentración del anticuerpo, mayor es el porcentaje de unión del CD163. Para la concentración de $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ se unió un 4,9% de las células y para la dilución de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, el porcentaje de unión disminuyó a 1,9% (**Figura 7A**).

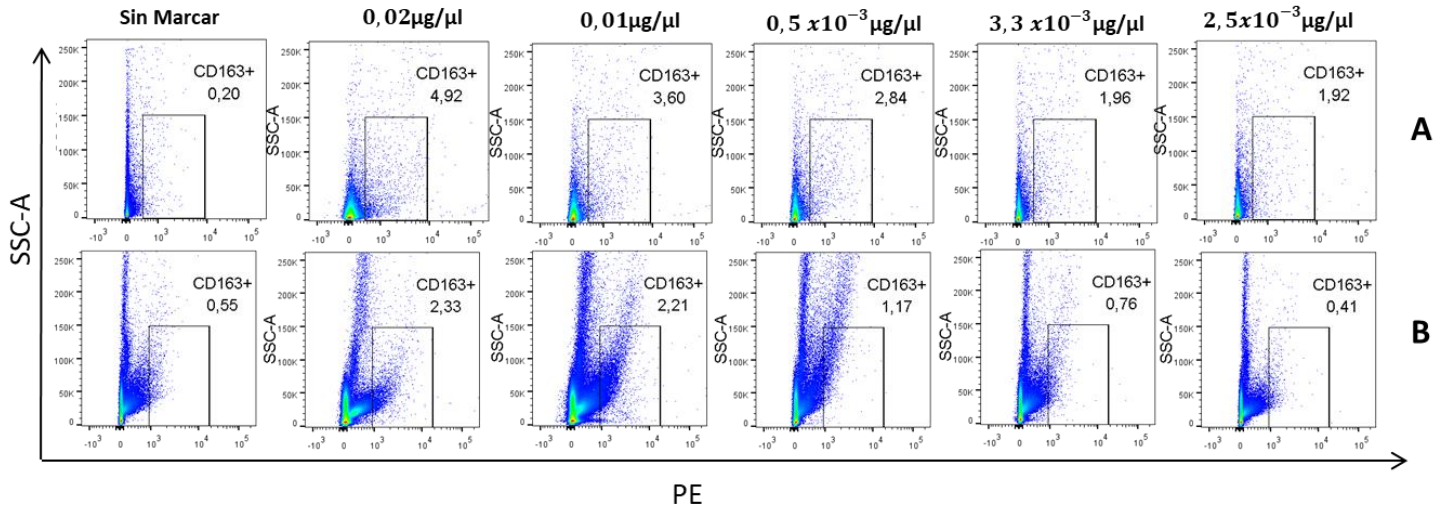
En el lavado peritoneal, el comportamiento es similar y con $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de anticuerpo se logra un 2,3% de unión. Mientras que con $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, el porcentaje de unión es de 0,4% (**Figura 7B**).

La dilución del anticuerpo a usar en aorta se definió por el índice de tinción y el porcentaje de células que unen CD163 (**Tabla y Gráfica de la Figura 7C**). Como control positivo se usaron leucocitos del lavado peritoneal, tal como se muestran en la **Tabla y Gráfica de la Figura 7D**.

El análisis del índice de tinción para las células CD163+ en aorta, mostró que con la concentración de $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sugerida por el proveedor), se logra un índice de tinción del 1,3 con un porcentaje de expresión igual a 3,6%, representando el segundo punto más alto, tal como se observa en la **Gráfica de la Figura 7C**. Este rendimiento se mantiene sobre el 50% en la dilución siguiente $0,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1,3 y 2,8%), como se observa en la **Tabla de la Figura 7C**.

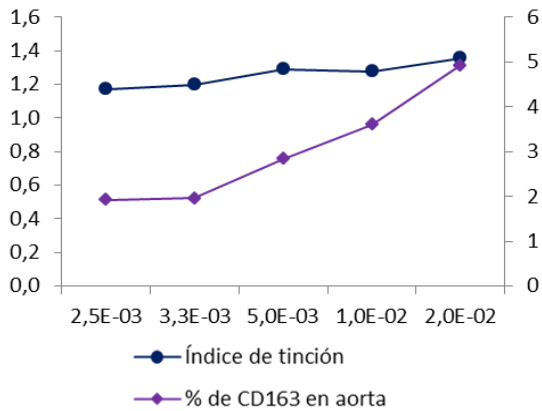
En las células del lavado peritoneal (**Tabla 7D**) para la concentración $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, el índice de tinción es 1,9 al igual que la concentración $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y el porcentaje de expresión se mantiene en 2,2%. Ambas concentraciones representan los puntos más altos (**Gráfica de la Figura 7D**).

En conclusión, se utilizó la concentración $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ del anticuerpo anti-CD163 PE para evaluar macrófagos M2 en aorta de rata.



C

Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Índice de tinción	% de CD163 en aorta
0,0025	1,2	1,92
0,0033	1,2	1,96
0,005	1,3	2,84
0,01	1,3	3,6
0,02	1,4	4,92



D

Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Índice de tinción	% de CD163 en lav. peritoneal
0,0025	1,6	0,4
0,0033	1,6	0,8
0,005	1,7	1,2
0,01	1,9	2,2
0,02	1,9	2,3

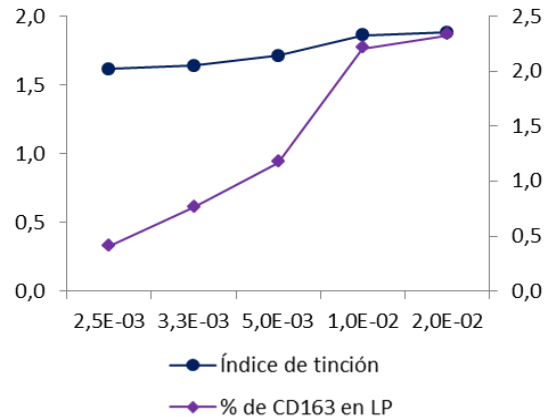


Figura 7: Dot plots, tablas y gráficas representativas de la curva de titulación para el conjugado CD163-PE.

A) Macrófagos CD163+ en aorta. B) Macrófagos CD163+ en lavado peritoneal (control positivo). Como control negativo, se utilizó células sin el anticuerpo (sin marcar). Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes: 0,02; 0,01; $0,5 \times 10^{-3}$; $3,3 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, para marcar 100.000 células. C) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD163 en aorta. D) Tabla y gráfica del índice de tinción *versus* el porcentaje de expresión del anticuerpo CD163 en lavado peritoneal.

5.3. Evaluación de la fluorescencia y selección de *gates* de los anticuerpos en células del lavado peritoneal

Luego de seleccionar los anticuerpos y fluorocromos, se procedió a evaluar cada uno de manera progresiva con el fin de apreciar posibles interferencias entre los fluorocromos usados. Para ello, 1×10^6 células extraídas del lavado peritoneal de ratas WKY se incubaron en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente con los conjugados de superficie previamente titulados. Transcurrido el tiempo, se lavaron con la solución tampón para tinción. Cada anticuerpo conjugado se evaluó en tubos separados dado el siguiente orden: anti-CD45, -CD68, -CD86, -CD163. Además, se utilizó un control negativo (células sin marcar) y un control de viabilidad con Ioduro de Propidio (IP). También se evaluó un tubo con la muestra más todos los anticuerpos en conjunto (CD45 + CD68 + CD86 + CD163). La interferencia de los conjugados se evaluó con base en que el análisis por separado de cada uno de los anticuerpos conjugados pudiese modificar la señal de los conjugados de manera conjunta.

El panel también fue evaluado por el control de fluorescencia menos uno (Fluorescence Minus One, FMO), el cual nos permite observar la interferencia de fluorescencia de un anticuerpo en el canal de detección del conjugado no adicionado. En este ensayo las células fueron marcadas con todos los conjugados menos el conjugado de interés, evaluando sólo CD86 y CD163. Por ejemplo, la FMO de CD86, es la muestra de interés, con todos los anticuerpos menos CD86. En este caso, la muestra es incubada sólo con CD45 + CD68 + CD163. Para este ensayo, 1×10^6 células del lavado peritoneal se marcaron en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos de superficie. Pasado el tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a $1200 \times g$ durante 5 minutos. Luego, se realizó una agitación con vórtex a las células e inmediatamente se les agregó 250 μL del amortiguador de fijación/permeabilización y se dejó incubando durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se realizó un lavado con 500 μL de *Wash Buffer* y se centrifugaron a $1200 \times g$ durante 5 minutos. Luego, se incubó con el anticuerpo CD68 durante 1 h a temperatura ambiente y oscuridad. Terminado el tiempo de incubación, se realizó un lavado con 500 μL de *Wash Buffer* y se centrifugó a $1200 \times g$ durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió en 150 μL de PBS 1X pH 7 para su análisis por CF.

La **Figura 8** muestra la construcción progresiva del panel multicolor, seleccionando las áreas representativas para la identificación de las células extraídas del lavado peritoneal (**Figura 8A**), granularidad *versus* tamaño (**Figura 8A.1**) y *singlet* (**Figura 8A.2**), para luego seguir la identificación de las células marcadas con el anticuerpo unido al fluorocromo de manera progresiva. En la **Figura 8B.1** se observan células sin marcar y en los demás paneles las células marcadas con los respectivos anticuerpos: CD45 (**Figura 8B.2**); CD45 + CD68 (**Figura 8B.3**); CD45 + CD68 + CD86 (**Figura 8B.4**) y CD45 + CD68 + CD86 + CD163 (**Figura 8B.5**). El *dot plot* CD86 *versus* CD163 se obtiene a partir del *plot* CD45 *versus* CD68 seleccionando el cuadrante Q2 (CD45+ CD68+) como se muestra en la **Figura 8B.1; B.4; B.5** respectivamente. Para determinar la división de los cuadrantes en el *dot plot*, se utilizó como límite la población de las células sin los anticuerpos (**Figura 8B.1**).

Se observa que la sensibilidad de fluorescencia de las poblaciones para cada marcador se mantuvo a medida que los conjugados se agregaban sucesivamente. Por otro lado, la selección de los *gates* para la identificación de los macrófagos fue definida por el área de las células sin el anticuerpo del *plot* CD45 *versus* CD68 (**Figura 8B.1**).

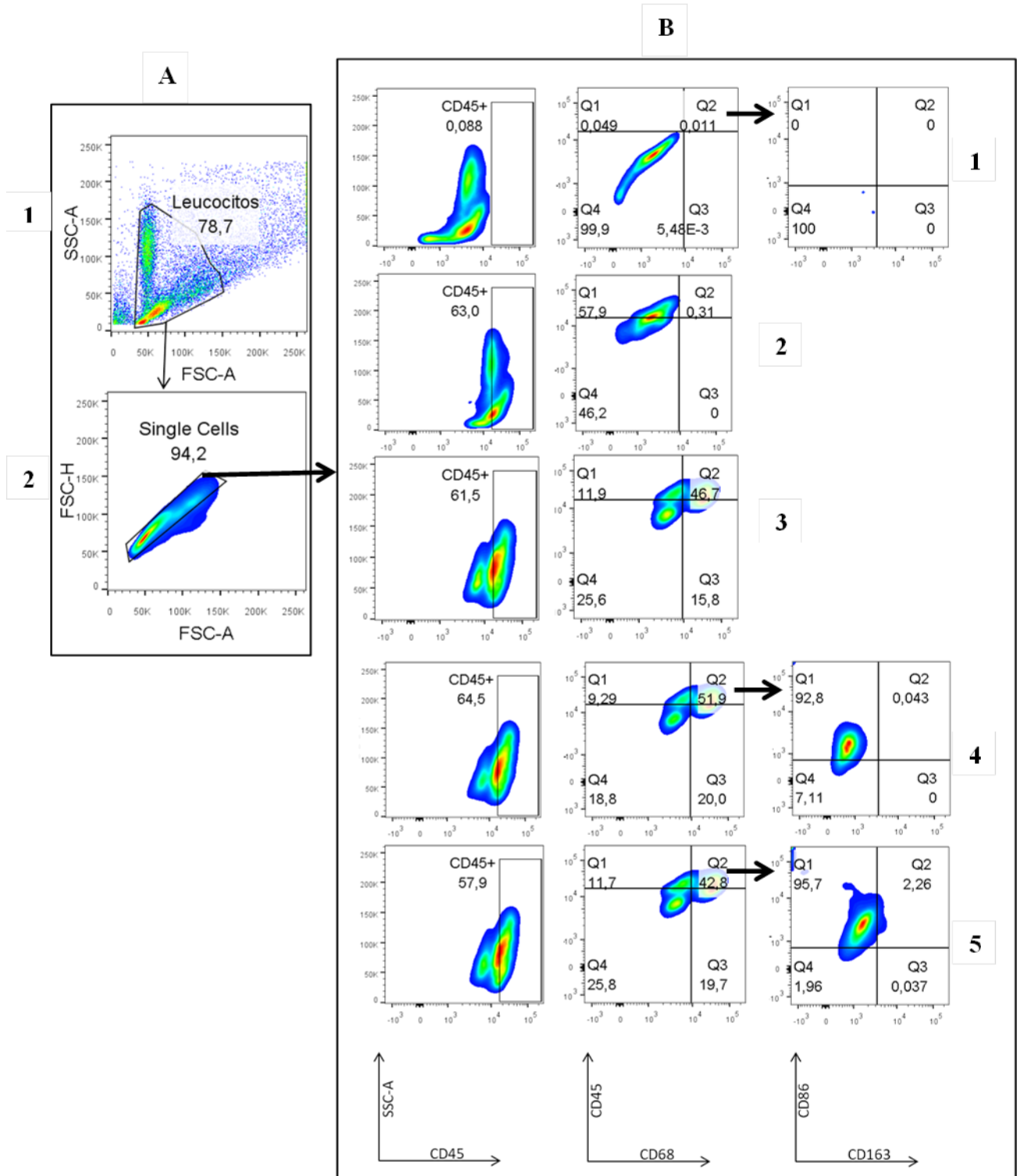


Figura 8: Construcción del panel multicolor para los leucocitos del lavado peritoneal.

A) *Dot-plots* representativos de la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el *singlet* (FSC-H/FSC-A). B) Identificación de las células marcadas con el anticuerpo unido al fluorocromo de manera progresiva: B1) Células sin marcar. B2) CD45. B3) CD45 + CD68. B4) CD45 + CD68 + CD86. B5) CD45 + CD68 + CD86 + CD163.

Se realizó la fluorescencia menos uno para determinar los *gates* de la expresión de los anticuerpos CD86 y CD163, como se observa en la **Figura 9A y B**, respectivamente. Los macrófagos CD45+ CD68+ se seleccionaron en cada uno de los casos, tal como se muestra en la **Figura 8**. En la **Figura 9A** se observa la población de células que sólo tienen los marcadores CD45 + CD68 + CD163, siendo la línea horizontal del *dot plot* el límite de células sin el anticuerpo CD86. Por otro lado, en la **Figura 9B** se obtienen sólo las células marcadas con los anticuerpos CD45+ CD68+ CD86+, siendo la línea vertical el límite de las células sin el marcador CD163. Se puede observar que sólo hay señal de fluorescencia para los anticuerpos que se adicionaron. En conclusión, éstos fueron los *gates* seleccionados para la identificación de macrófagos M1 y M2 en células del lavado peritoneal.

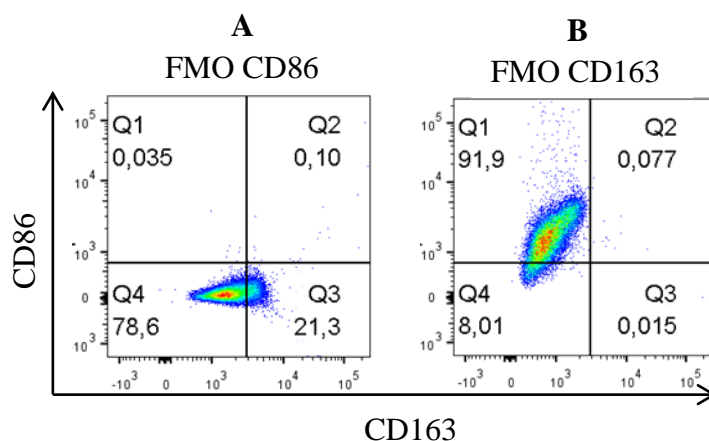


Figura 9: Dot plots de la FMO para los anticuerpos CD86 y CD163 para las células del lavado peritoneal. A) FMO del anticuerpo CD86. B) FMO del anticuerpo CD163. Los macrófagos CD86+ y CD163+ se seleccionaron en cada uno de los caso, como se muestra en la Figura 8.

5.4. Condiciones experimentales finales de la nueva metodología para la identificación de macrófagos en aorta de rata

Dado que la obtención de leucocitos en aorta es mucho menos eficiente en comparación al lavado peritoneal, el estudio de la identificación de la población de macrófagos en aorta de ratas SHR se determinó después de la digestión enzimática de este tejido, mediante el protocolo optimizado de identificación de leucocitos en aorta, descrito a continuación.

Previo a la marcación de las células, se prepararon dos mezclas de anticuerpos a temperatura ambiente. La primera de ellas contenía los anticuerpos de superficie CD45-Pacific Blue ($1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$), CD86- Alexa Fluor[®] 647 ($2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y CD163-PE (0,01

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un volumen final de 100 μL en PBS 1X pH 7,3. La segunda mezcla, contenía el anticuerpo intracelular CD68- FITC (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un volumen final de 50 μL de *Wash Buffer* (adquirido del proveedor).

Luego de obtener las células de aorta mediante la digestión enzimática, del 100%, el 30% fue dividido en dos tubos de citometría, uno para evaluar la viabilidad (tubo a 4 °C) y como control negativo (células sin el marcaje de los anticuerpos). El 70% del volumen restante fue depositado en un tubo de citometría para ser centrifugado a $1200 \times g$ durante 5 minutos. El sedimento obtenido se incubó con la mezcla de anticuerpos de superficie, realizando una agitación suave con vórtex, y conservándola en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavó con 250 μL de PBS 1X pH 7,3 a $1200 \times g$ durante 5 minutos. El sedimento obtenido del tubo sin marcar y el marcado con los anticuerpos de superficie, se les incorporó 250 μL del amortiguador de fijación/permeabilización en el instante que se realiza la agitación. Luego, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y pasado el tiempo se lavó con 500 μL de *Wash Buffer* a $1200 \times g$ durante 5 minutos. El sedimento recolectado en la muestra marcada se le agregó el anticuerpo CD68-FITC, aplicando un vórtex suave y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Mientras tanto, el tubo sin marcar se resuspendió en 150 μL de PBS 1X pH 7,3 y se mantuvo a 4 °C hasta su lectura en el citómetro. Transcurrida la hora de incubación, la muestra se lavó con 500 μL *Wash Buffer*, para extraer el exceso de anticuerpo, se centrifugó a $1200 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido se resuspendió en 150 μL de PBS 1X pH 7,3 para su lectura en el citómetro de flujo.

Para la cuantificación de la emisión de fluorescencia de los anticuerpos en aorta de ratas (**Figura 10**), se mantuvo la estrategia de *gates* de granularidad *versus* tamaño (SSC-A *versus* FSC-A) y *singlet* realizada para la identificación de macrófagos en lavado peritoneal (**Figura 10A**). Luego, se analizó la granularidad *versus* cada fluorocromo en aorta, tal como se observa en la **Figura 10B**. Como control negativo se utilizó las mismas células de aorta sin marcar (**Figura 10B.1**).

En aorta se observa que se obtiene claramente un desplazamiento del núcleo más denso en el eje X (flecha) donde se grafica CD45, CD68 y CD86, pero no es tan claro en CD163 (**Figura 10B.2**), en comparación al control.

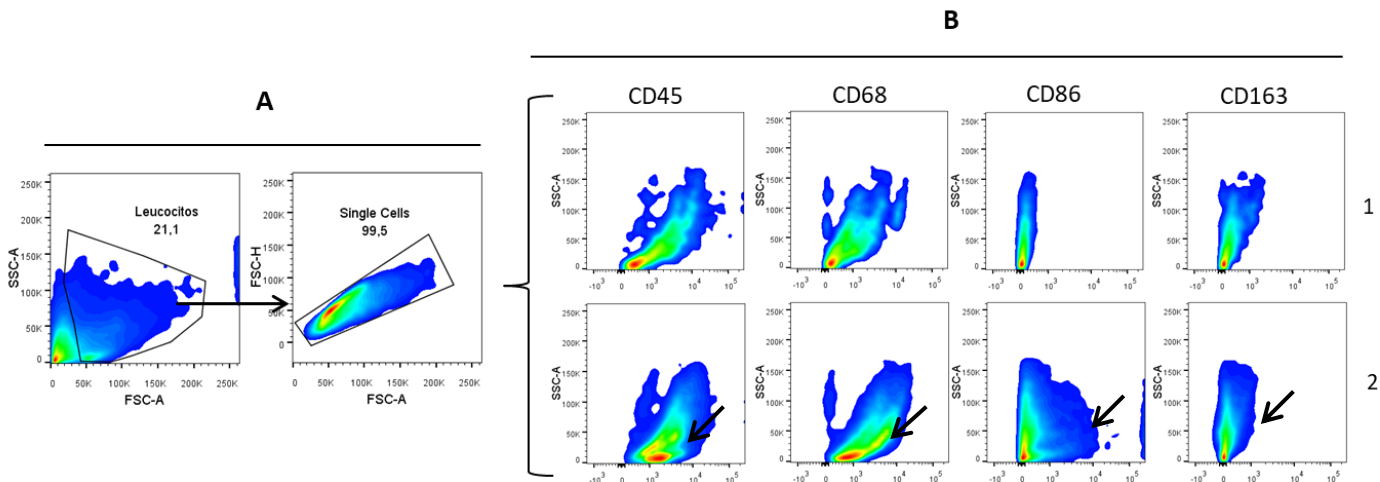


Figura 10: Dot plots de densidad para la evaluación de emisión de fluorescencia de los anticuerpos CD45, CD68, CD86 y CD163 en células de aorta de rata.

A) *Dot plots* representativos de la estrategia de gates para la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el *single* (FSC-H/FSC-A). B) *Dot plots* para la identificación de células mediante la separación de granularidad *versus* anticuerpo (SSC-A *versus* CD45; SSC-A *versus* CD68; SSC-A *versus* CD86; SSC-A *versus* CD163). B.1) Como control negativo, se usó células sin marcar. B.2) Células marcadas con los anticuerpos para la identificación de macrófagos. La flecha indica el movimiento de la nube de fluorescencia hacia la derecha en relación a las células sin los anticuerpos (10 B fila 1).

Se aprecia que la imagen con más especificidad para el anticuerpo, respecto a su control, es la de CD86, ya que es en éste donde se observó un mayor desplazamiento. Por lo tanto, se realizó un análisis “de atrás para adelante”, identificando la población CD86+ (**Figura 11A.2**). Como control negativo, se utilizó las células sin el marcador (**Figura 11A.1**). Por lo tanto, se identificó primero la población CD86+ y luego se continuó sucesivamente hasta el *plot* de separación de granularidad *versus* tamaño (SSC-A *versus* FCS-A), tal como se muestra en la **Figura 11B**.

Cuando se hizo el análisis de esta forma, se observó que la población celular CD45+ y CD68+ está mucho más definida y que en el *plot* FSC-H/FSC-A se aprecian dos densidades de población en la parte superior (**Figura 11B.1** flecha y asterisco) en comparación con el *plot* realizado anteriormente en la Figura 10 B.2 lo que se evidencia en la **Figura 11B.2**. Por consiguiente, se dispuso a disminuir el área del *plot* “*Single Cells*” (**Figura 12A**) para abarcar la parte superior de la imagen y así obtener una población celular más definida, en el *plot* de separación de granularidad *versus* tamaño, tal como se observa en la **Figura 12B**.

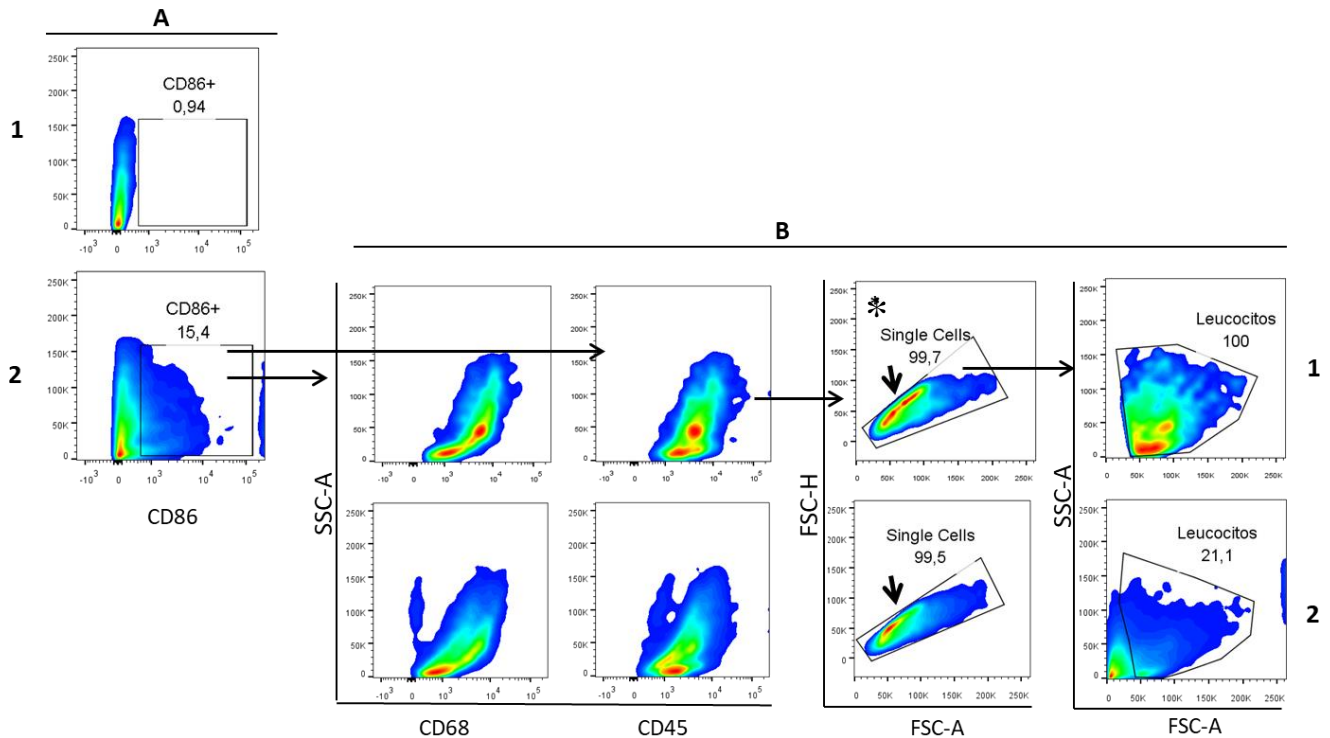


Figura 11: Dot plots de densidad para la evaluación de emisión de fluorescencia a partir del área CD86+ para la identificación celular en SSC-A/ FSC-A.

A) Dot plot de la identificación de CD86+ (SSC-A/CD86). A.1): células sin marcar. A.2) células incubadas con los anticuerpos CD45, CD68, CD86, CD163. B) Gráficos para la identificación de células mediante la separación de granularidad *versus* anticuerpo (SSC-A *versus* CD68; SSC-A *versus* CD45) para luego identificar la población en FSC-H *versus* FSC-A y SSC-A *versus* FSC-A. B.1) Análisis de atrás hacia adelante de células incubadas con los anticuerpos. B.2) Análisis desde la separación de células a partir de granularidad *versus* tamaño de la figura anterior para identificar diferencias en las poblaciones. La flecha indica la presencia de dos núcleos de fluorescencia en comparación al análisis single cells de la fila 2

Para obtener la población específica de macrófagos M1 en el *plot* de identificación por granularidad *versus* tamaño, se realizó tres disminuciones del área *Single Cells* (**Figura 11B.1 y 12** con asterisco). Primero, se seleccionaron las dos poblaciones con más densidad de fluorescencia (**Figura 12A.1**), apreciando que ésta disminuye en el *gate* SSC-A/FSC-A, tal como se observa en la **Figura 12B.1**. Posteriormente, se eligió la población más densa inferior (**Figura 12A.2**), asegurando que abarcaba una fluorescencia más cercana al origen de los ejes “X” e “Y” en el *gate* SSC-A/FSC-A, como se muestra en la **Figura 12B.2**. Finalmente, se evaluó la densidad superior del *singlet* (**Figura 12A.3**) destacándose la población más alejada de los ejes del *gate* SSC-A/FSC-A (**Figura 12B.3**) y que, además, presentaba menor autofluorescencia respecto a las células sin los anticuerpos (**Figura 12A.4**). Con estos resultados, se evaluó los anticuerpos CD45/CD68 en esta población, observando que el núcleo

más denso pertenece a la población CD45+ CD68+ (**Figura 12C.3**; flecha morada) y a partir de ese cuadrante se obtuvo el *gate* CD86/CD163, notando la presencia del 89,2% de CD86+ y otra población con un 10,8% de CD86+ CD163+ (**Figura 12D.3**). Por otro lado, se observa autofluorescencia en todos los *gates* de la muestra sin los anticuerpos (**Figura 12A.4, B.4, C.4, D.4**).

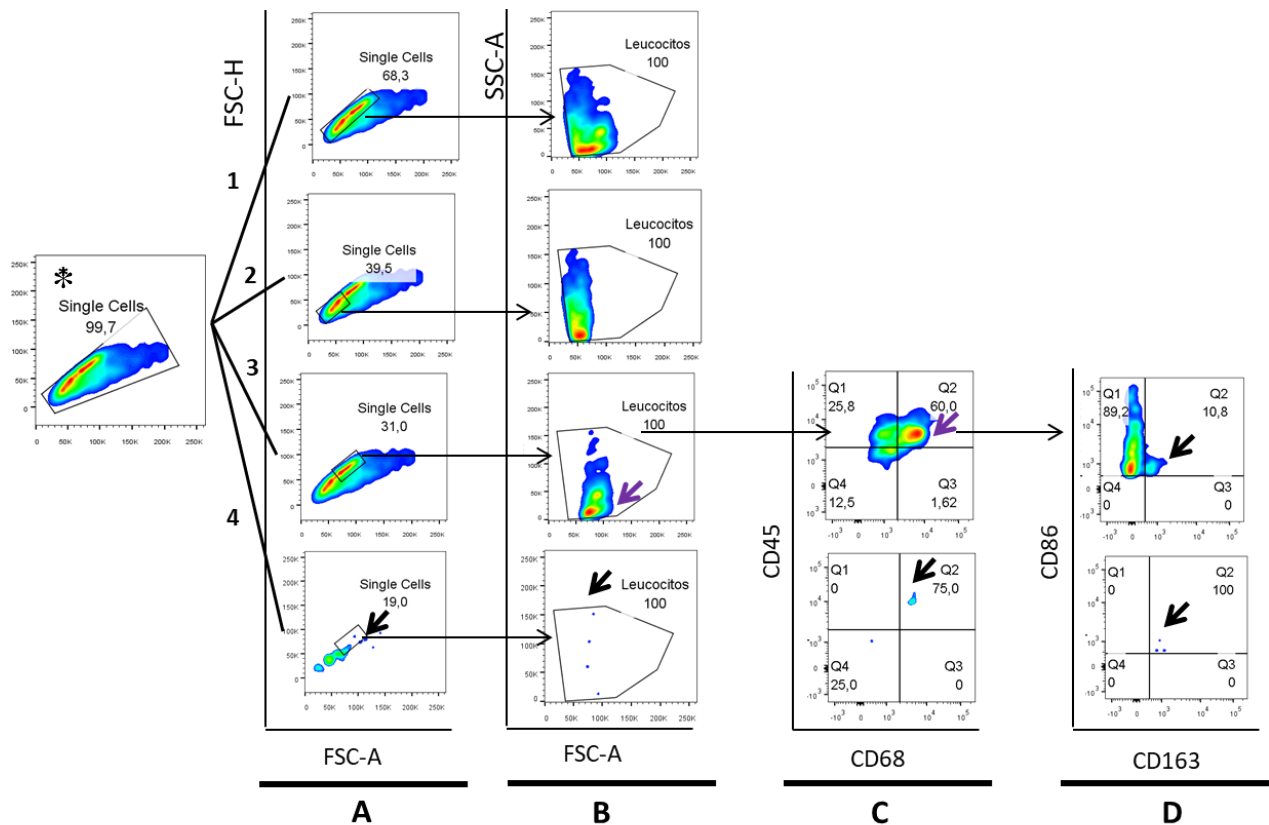


Figura 12: *Dot plots* de densidad a partir de gráfico FSC-H/FSC-A para la identificación de macrófagos M1 en el plot SSC-A/FSC-A.

(A.1) Disminución del área de identificación que abarca la zona superior en FSC-H/FSC-A. (B.1) Gráfico resultante (SSC-A/FSC-A) del área seleccionada en FSC-H/FSC-A. (A.2) Disminución del área de identificación que sólo abarca el núcleo inferior de fluorescencia en FSC-H/FSC-A. (B.2) Gráfico resultante (SSC-A/FSC-A) del área seleccionada en FSC-H/FSC-A. (A.3 y 4) Disminución del área de identificación que sólo abarca el núcleo superior de fluorescencia en FSC-H/FSC-A. (B.3 y 4) Gráfico resultante (SSC-A/FSC-A) del área seleccionada en FSC-H/FSC-A. (C.3 y 4) Gráfica CD45/CD68. (D.3 y 4) Gráfica CD86/CD163. La fila de gráficos N°1, 2 y 3 son células marcadas con los anticuerpos CD45, CD68, CD86 y CD163. La fila de gráficos N°4 son las células sin el marcaje de anticuerpos. La flecha morada indica el desplazamiento del núcleo de fluorescencia hacia la derecha y las flechas de color negro indican autofluorescencia.

Por lo tanto, para la identificación de macrófagos en aorta de ratas en los análisis siguientes (**Figura 13**) se seleccionó el área del núcleo de fluorescencia en la parte inferior del eje de la

ordenada y más alejado del origen en el eje X del *plot* SSC-A/FSC-A (**Figura 13A.1**). De esa área se creó el *plot* “Single Cells” (**Figura 13A.1**), del cual se obtuvo el *plot* de identificación de leucocitos y macrófagos totales (CD45+ CD68+), para luego diferenciar de esa población los macrófagos M1 y M2 (CD45+ CD68+ CD86+ y CD45+ CD68+ CD163+), tal como se observa en la **Figura 13B.1**. Como control negativo de fluorescencia y para las limitaciones de los cuadrantes de los gráficos, se utilizó las mismas células sin los anticuerpos.

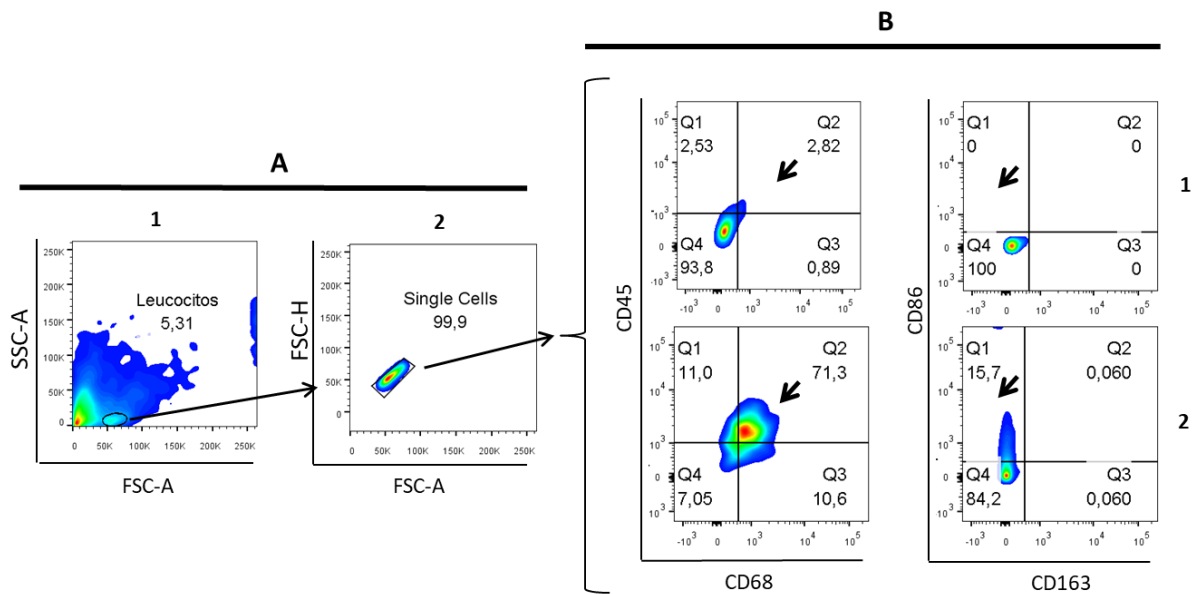


Figura 13: Dot plots de densidad para la identificación optimizada de macrófagos M1 en aorta de rata.

A) *Dot plots* representativos de la estrategia de *gates* para la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el *single* (FSC-H/FSC-A). B) *Dot plots* para la identificación de células mediante la separación por anticuerpos (CD45 *versus* CD68; CD86 *versus* CD163. B.1) Como control negativo, se utilizó células sin marcar. B.2) Células marcadas con los anticuerpos para la identificación de macrófagos. La flecha indica el desplazamiento del núcleo de fluorescencia con respecto al control (células sin la incubación con los anticuerpos).

5.5. Control positivo para verificar la detección de M1 en aorta de ratas sometidas a un proceso inflamatorio agudo

Para determinar la eficacia del método de identificación de macrófagos en aorta de SHR mediante CF, se evaluó el porcentaje de células CD86+, utilizando aortas de ratas Wistar y SHR. Como control negativo del ensayo, se utilizó células sin marcar de los mismos animales y como control positivo, aortas de ratas Wistar a las cuales se les indujo la activación de la respuesta inflamatoria mediante la administración de LPS intraperitoneal, como se menciona en el punto 5.11.

La **Figura 14** muestra el área seleccionada para la identificación de las células (**Figura 14A.1 y A2**), para luego identificar la población de macrófagos en aorta sin marcar (**Figura 14B**) en WKY (**Figura 14B.1**), SHR (**Figura 14B.2**) y WKY + LPS (**Figura 14B.3**) y con anti CD45 + CD68 + CD86 + CD163 (**Figura 14C**) en WKY (**Figura 14C.1**), SHR (**Figura 14C.2**) y WKY + LPS (**Figura 14C.3**).

Se observa en la **Figura 14C** que existe un desplazamiento de la nube de puntos hacia el cuadrante superior derecho, correspondiendo a la identificación de macrófagos totales (CD45 + CD68) en aorta de WKY, SHR y WKY + LPS, correspondiendo a 32%, 71% y 83,7%, respectivamente en comparación a las células sin marcar. En aorta de rata WKY no se identificaron macrófagos M1 (CD86+) (**Figura 14C.1**). Por el contrario, en SHR y WKY + LPS se identificaron M1 con un 8,9% y 8,5%, respectivamente (**Figura 14C.2 y 3**) en comparación con las células sin marcar (**Figura 14B.2 y 3**).

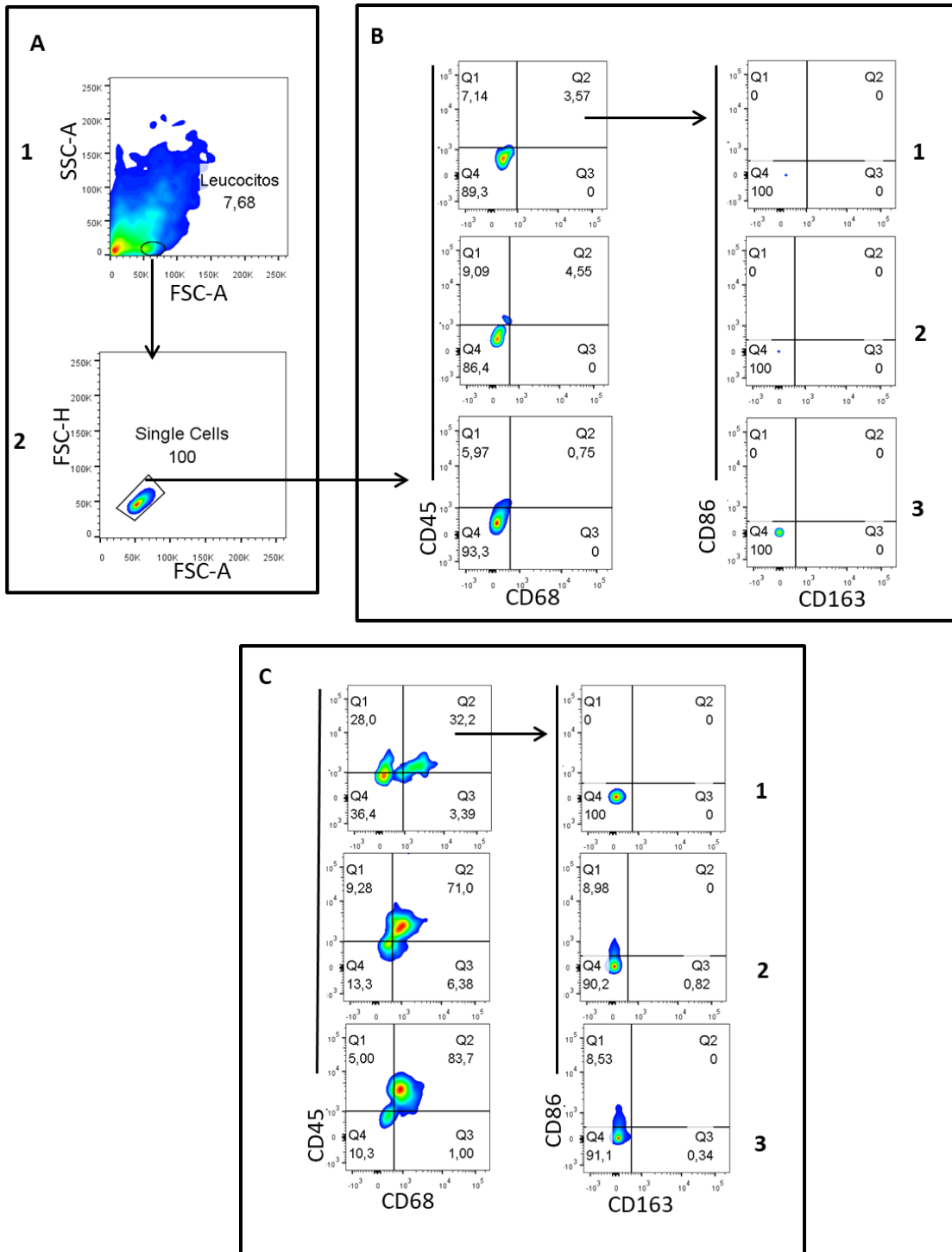


Figura 14: Dot plots de densidad para la identificación optimizada de macrófagos M1 en aorta de rata.
 A) Dot plots representativos de la estrategia de *gates* para la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el *singlet* (FSC-H/FSC-A). B) Dot plots para la identificación de células sin marcar, mediante la identificación por anticuerpos (CD45 *versus* CD68, CD86 *versus* CD163). B.1) Células de aorta de ratas WKY. B.2) Células de aorta de SHR. B.3) Células de aorta de WKY + LPS. C) Dot plots para la identificación de células de aorta incubadas con los anticuerpos (CD45 *versus* CD68; CD86 *versus* CD163). C.1) Células de aorta de ratas WKY. C.2) Células de aorta de SHR. C.3) Células de aorta de WKY + LPS.

Objetivo 2: Evaluar los niveles de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas controles normotensas (WKY) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), utilizando la nueva metodología implementada en el objetivo 1

5.6. Caracterización del modelo experimental: Parámetros morfométricos y hemodinámicos para ratas WKY y SHR

Luego de la identificación de la población de macrófagos en aorta de ratas, se prosiguió a determinar la población de M1 y M2 en las ratas control (WKY) y en SHR. Para esto, se caracterizó el modelo experimental evaluando a nueve ratas por grupo, la edad, la presión, el peso total del animal, el peso de la aorta completa, corazón y pulmón, como se aprecia en la **Tabla 8**.

La edad promedio fue de 5,4 meses, mostrando características hemodinámicas diferentes entre los dos grupos (**Tabla 8**). Las ratas WKY presentan una presión arterial diastólica (PAd) promedio de $69,6 \pm 6,3$ mmHg *versus* $100,8 \pm 7,4$ mmHg en SHR con un $p < 0,01$. Por otro lado, la presión arterial sistólica (PAs) en ratas WKY es de $116,8 \pm 3,6$ mmHg *versus* $159,0 \pm 5,7$ mmHg en las SHR con un $p < 0,0001$, tal como se observa en la **Figura 15A**.

Desde el punto de vista morfométrico, ambos modelos (WKY y SHR) se comportan de manera similar (**Tabla 8**), los cuales presentan un peso total entre $324,2 \pm 6,2$ g y $327,9 \pm 35,3$ g; el peso de la aorta total es de $0,13 \pm 0,01$ g y $0,14 \pm 0,01$ g; el peso del corazón es de $1,22 \pm 0,12$ g y $1,21 \pm 0,11$ g; el peso promedio del pulmón es de $1,9 \pm 0,2$ g y $1,9 \pm 0,1$ g, como se observa en la **Figura 15B**.

Tabla 8. Parámetros hemodinámicos y morfométricos para ratas WKY y SHR

Ratas	N	Edad (meses)	Presión Diastólica (mmHg)	Presión Sistólica (mmHg)	Peso (g)	Aorta (g)	Corazón (g)	Pulmón (g)
WKY	1	7	32	125	329	0,1598	1,0175	3,7909
	2	6	89	121	341	0,1811	1,13	2,066
	3	6	56	92	344	0,1074	1,1421	1,5279
	4	6	87	120	319	0,1233	0,9313	1,682
	5	5	69	126	333	0,1634	1,8174	2,0353
	6	5	56	121	284	0,0831	0,8744	1,5449
	7	5	83	123	311	0,0942	0,9138	1,9673
	8	5	85	115	320	0,124	1,6601	1,4124
	9	5	69	108	337	0,107	1,4618	1,7896
SHR	1	6	61	143	393	0,2022	1,2682	2,2925
	2	6	86	183	363	0,1553	2,0216	2,0064
	3	5	119	157	274	0,1318	1,0188	1,8224
	4	5	111	155	346	0,1415	1,1553	1,5747
	5	5	140	184	310	0,123	1,0149	1,6878
	6	5	106	142	305	0,1879	1,0145	1,6395
	7	5	98	160	310	0,0562	1,0985	2,462
	8	5	92	169	331	0,1434	1,1968	1,8809
	9	5	94	138	319	0,1349	1,1398	2,5863

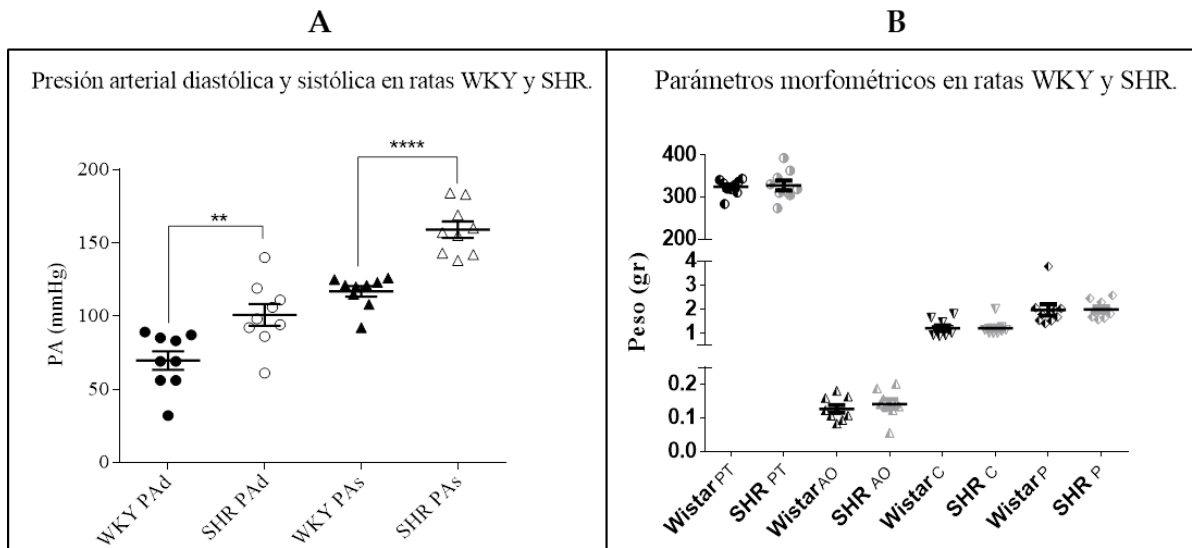


Figura 15: Gráficos de los parámetros hemodinámicos y morfométricos de ratas WKY y SHR.

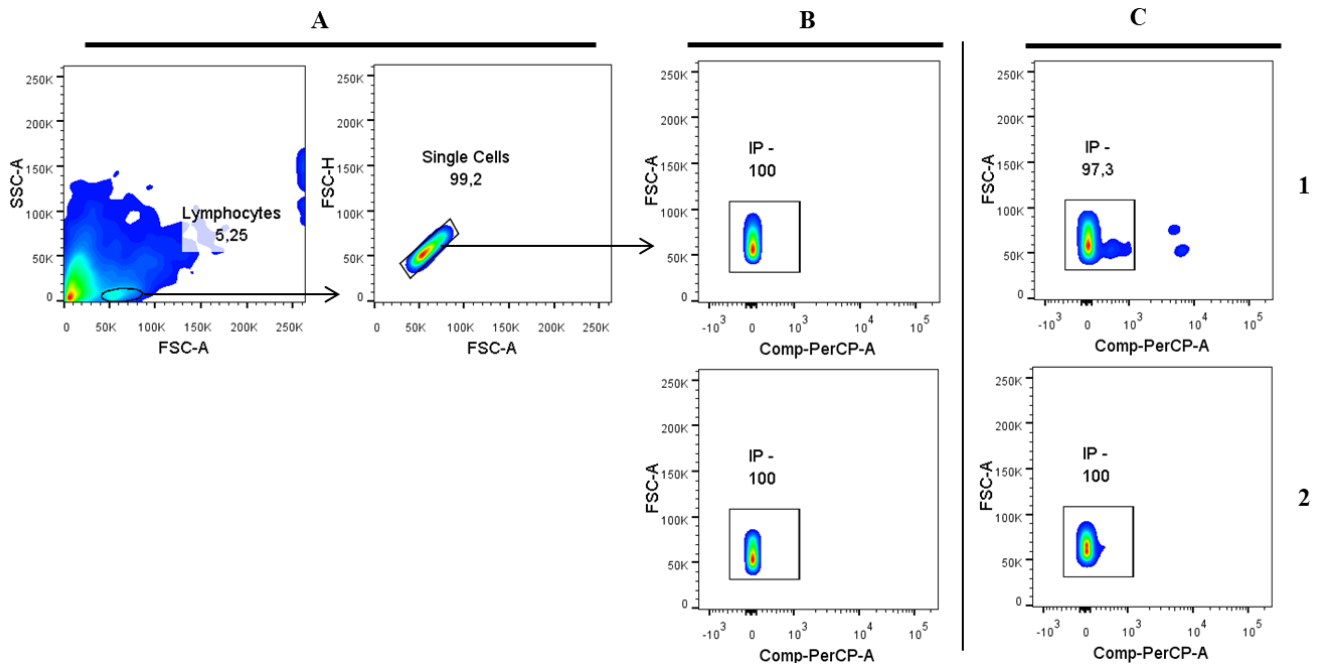
A) Gráfico de dispersión que detalla la presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial sistólica (PAs) en ratas WKY y SHR. Presión arterial normal = 80/120 mmHg. HTA \geq 90/140 mmHg. B) Gráfico de dispersión que muestra los parámetros morfométricos en ratas WKY y SHR. PT: Peso total del animal, AO: Peso de la aorta completa. C) Peso del corazón, P: Peso del pulmón. Los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$). ** $p < 0.01$; **** $p < 0,0001$.

5.7. Identificación de macrófagos M1 y M2 en aortas de ratas WKY y SHR

Luego de obtener los resultados de la caracterización del modelo de las ratas, se determinó la presencia de M1 y M2 en aorta de ambos modelos (presiones normales e hipertensas). Se comenzó por la digestión de las aortas y la obtención de células totales y viables, siguiendo con la identificación mediante anticuerpos específicos para macrófagos totales y las subpoblaciones M1 y M2 mediante CF, como se observa en la **Tabla 9**.

El promedio de células totales obtenidas para WKY fue de $5,4 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$ y en SHR $6,6 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^6$ (**Tabla 9**). Posteriormente, como se muestra en la **Figura 16**, se evaluó la viabilidad de estas células mediante la tinción con IP por CF para ambos modelos. La **Figura 16A.1** muestra la estrategia de *gate* del área seleccionada para la identificación de las células mediante granularidad *versus* tamaño, seguido del *Single Cells*. Posteriormente, como control negativo, se identificó la población celular sin IP de ratas WKY (**Figura 16B.1**) y de SHR (**Figura 16B.2**). Como se observa en la **Tabla 9**, luego de la digestión enzimática, se obtuvo una alta viabilidad celular entre 97,3% y 100 para las ratas WKY (**Figura 16C.1**) y las SHR (**Figura 16C.2**), respectivamente. Además, se aprecia que no hay diferencias significativas

entre SHR ($98,8 \pm 0,6$) respecto al control WKY ($97,8 \pm 0,6$), como se observa en la **Figura 16D**.



D Viabilidad celular en aorta de ratas.

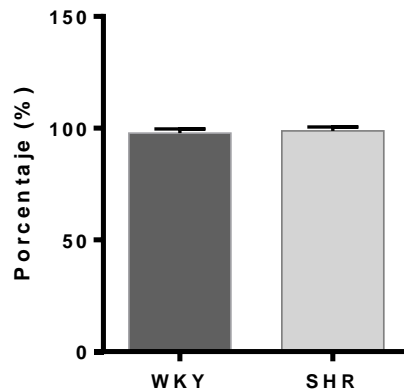


Figura 16: Viabilidad de células totales en aorta de ratas detectado por CF.

A) *Dot plots* representativos de la estrategia de *gates* para la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), para luego seleccionar el *single*t (FSC-H/FSC-A). B) *Dot plots* para la identificación de células sin marcar, mediante la identificación de tamaño *versus* la fluorescencia en PerCP (FSC-A *versus* IP). B1: WKY. B2: SHR. C) *Dot plots* para la identificación de células marcadas con IP, mediante FSC-A *versus* IP. C1: WKY. C2: SHR. D): Gráfico de barras, viabilidad de células totales luego de la digestión enzimática de aorta de ratas WKY y SHR. No existen diferencias significativas, los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$) * $p < 0,05$; N= 9.

Tabla 9. Células totales, viabilidad celular y porcentaje de expresión de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas WKY y SHR

Ratas	N	Células totales (células/mL)	Viabilidad celular (%)	M1 (%)	M2 (%)
WKY	1	4960000	97,1	17,1	0,11
	2	5440000	97,3	29,1	0,04
	3	1280000	100	12,3	2,47
	4	1080000	97,3	7,1	0,19
	5	3720000	94,2	9,9	0,33
	6	1800000	97,3	8,3	0,11
	7	2280000	100	7,2	1,25
	8	25080000	100	6,3	0,03
	9	2880000	96,9	9,7	0,15
\bar{X}	-	5391111	97,8	11,9	0,5
Mediana	-	3300000	97,3	9,8	0,17
SHR	1	4640000	99,2	11,2	0
	2	3680000	97,7	16,3	0,22
	3	640000	100	16,9	0,19
	4	4560000	100	16,8	0,16
	5	3960000	98,8	10,2	0,13
	6	11160000	99,2	21,6	0,11
	7	2760000	100	11,6	0
	8	23280000	100	12,4	0,07
	9	4368000	94,5	14,8	0
\bar{X}	-	6560889	98,8	14,6	0,10
Mediana	-	4464000	99,2	14,7	0,10

Posteriormente, se evaluó la presencia de macrófagos M1 y M2 en ambos modelos de rata por CF (**Figura 17**). La **Figura 17A** muestra la estrategia de *gates*, identificando la población celular mediante granularidad *versus* tamaño (SSC-A *versus* FSC-A) seguido del *Single Cells* (FSC-H *versus* FSC-A). Posteriormente, de esta área se seleccionó los macrófagos totales mediante los anticuerpos CD45 *versus* CD68 y desde el cuadrante Q2 se obtuvo el *dot plot* con la identificación de los macrófagos M1 y M2 (CD86 v/CD163). La **Figura 17B.1** y **17B.2** corresponde a las células sin los anticuerpos en aorta de ratas WKY y SHR, respectivamente.

La **Figura 17C.1** y **17C.2** corresponden a las mismas células de aorta de ratas WKY y SHR, incubadas con los anticuerpos CD45+ CD68+ CD86+ CD163+, respectivamente.

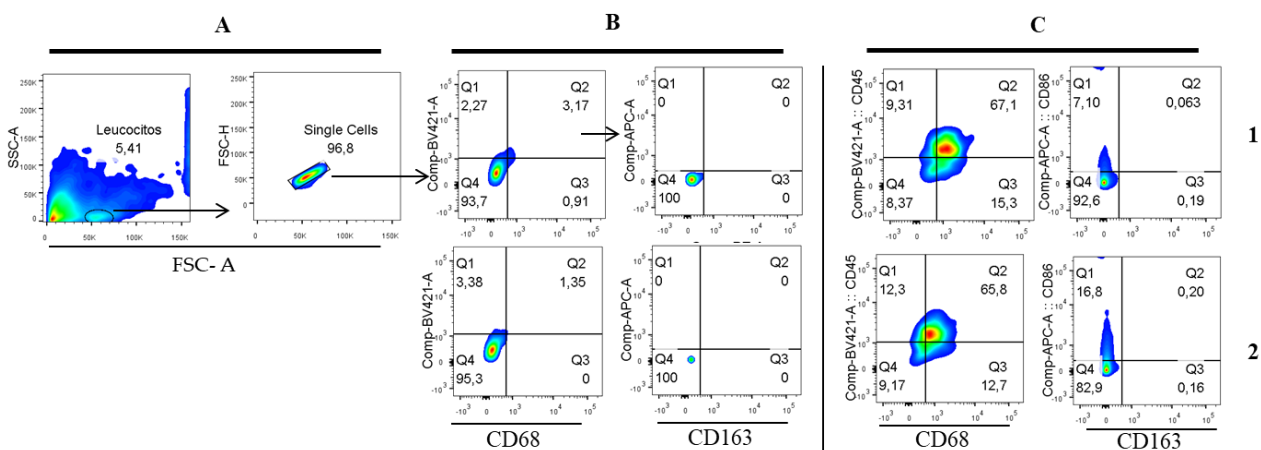


Figura 17: Dot plots para la identificación de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas.

A) Dot plot representativos de la estrategia de *gates* para la identificación de células mediante la separación por granularidad *versus* tamaño (SSC-A/FSC-A), el *singlet* (FSC-H/FSC-A). B) Dot plots de las células sin los anticuerpos para la identificación de macrófagos totales (CD45 *versus* CD68) y la identificación de macrófagos M1 y M2 (CD86 y CD163). B1: WKY. B2: SHR. C) Dot plots para la identificación de macrófagos totales y la subpoblación M1 y M2 marcados con CD45+ CD68+ CD86+ CD163+. C1: WKY. C2: SHR.

En la **Tabla 9**, se muestran los resultados obtenidos en la identificación de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas WKY y SHR mediante CF. Para este ensayo se aplicó la prueba de Grubb para detectar *outliers*, con el criterio de un $\alpha = 0,05$. En la **Figura 18** se observa que M1 está significativamente aumentado en comparación a M2, tanto en las cepa control WKY (M1: $9,7 \pm 1,5$; N= 8; M2: $0,14 \pm 0,04$; N= 7; $p < 0,0001$) como también para SHR (M1: $14,6 \pm 1,2$; N= 9; M2: $0,09 \pm 0,03$; N= 9; $p < 0,0001$). Sin embargo, se puede apreciar que existen diferencias significativas entre las poblaciones de macrófagos M1 de SHR ($14,6 \pm 1,2$; N= 9) con respecto a los M1 de las ratas WKY ($9,7 \pm 1,2$; N= 8). Por otra parte, no existen diferencias significativas entre las subpoblaciones M2 entre WKY ($0,14 \pm 0,04$; N= 7) y SHR ($0,09 \pm 0,03$; N= 9).

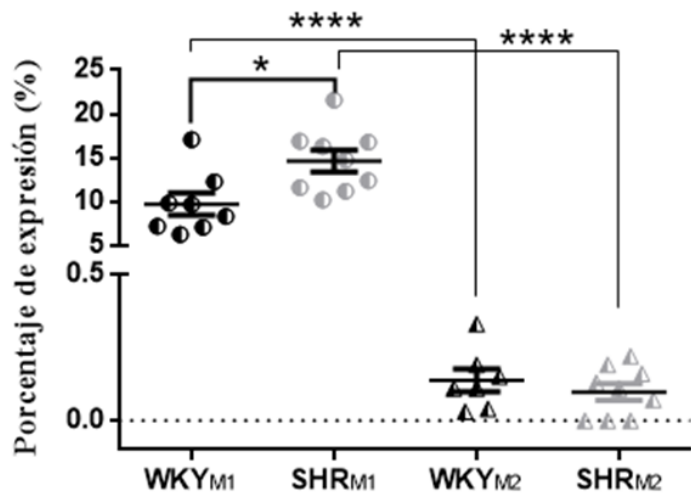


Figura 18: Expresión de las proteínas CD86+ y CD163+ en macrófagos de aorta en ratas WKY y SHR. Gráfico de dispersión de la cuantificación del porcentaje de expresión de CD86+ y CD163+ en aorta de ratas WKY y SHR (n= 9 por grupo, ensayos independientes). * $p < 0,05$ respecto al control (WKY); **** $p < 0,0001$ respecto a M1. Los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar de la media ($\bar{X} \pm SEM$).

6. DISCUSIÓN

Los macrófagos son células heterogéneas que juegan un papel importante en diferentes enfermedades inflamatorias, incluyendo el daño vascular en pacientes con hipertensión arterial (HTA), por lo que existe un interés creciente en la caracterización de cada uno de sus diferentes subtipos, ya que cada subpoblación contribuye de manera distinta al desarrollo de la remodelación vascular, renal y cardiovascular (Schiffrin, 2012; Rubio, *et al.*, 2016; Humeres, *et al.*, 2016).

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) desarrollan hipertensión crónica a medida que envejecen siendo un modelo de estudio adecuado y similar a la hipertensión esencial en humanos (Balaszczuk & Fellet, 2011).

Las SHR a las 3 semanas de edad aún no son hipertensas, pero sus riñones presentan niveles más altos de linfocitos y macrófagos infiltrantes que las ratas control normotensas Wistar Kyoto (WKY). Estos cambios inflamatorios en los riñones continúan aumentando, junto con la presión arterial y la edad en SHR (Subha, *et al.*, 1974; Ribera, *et al.*, 2013).

Hasta el año 2013, la mayoría de los estudios de macrófagos, en la enfermedad vascular, se basaron en técnicas inmunohistoquímicas (IHC) e histológicas (HI), tanto en modelos murinos como en ratas, las cuales proporcionaron información sobre la proximidad de los macrófagos a otros tipos de células y su ubicación dentro de la pared vascular. La pequeña cantidad de cortes de tejido delgado que se utilizan en estas técnicas representa una limitante, ya que disminuye la representatividad de la muestra. También tienen limitaciones para discernir entre subtipos de células estrechamente relacionadas, como es en el caso de los macrófagos. Por lo tanto, es importante estudiar las subpoblaciones de estas células, ya que podría generar nuevas estrategias terapéuticas para minimizar las acciones perjudiciales (proinflamatorias y regeneración exagerada) de los macrófagos sin comprometer sus efectos beneficiosos (inmunológicos) en la pared celular (Moore, *et al.*, 2013).

En contraste a las técnicas IHC e HI, el Citómetro de Flujo (CF) permite un rápido muestreo de las poblaciones celulares en cantidades relativamente grandes en diferentes tipos de muestras (riñón, aorta, lavado peritoneal). Además, la mayoría de estos equipos tienen la capacidad de medir más de 5 señales fluorescentes de una misma muestra diferenciando a través de marcadores específicos, de superficie o intracelulares, tipos celulares y sus

subpoblaciones, como es el caso de los leucocitos (Moore, *et al.*, 2013; Rubio, *et al.*, 2016; Rou, *et al.*, 2018). La identificación de PBMC por CF a través de anticuerpos específicos está bien estandarizada (Shankar, *et al.*, 2004). Sin embargo, una de las restricciones en la utilización e identificación de macrófagos mediante CF en ratas es la falta de marcadores específicos de macrófagos y subpoblaciones, no así en ratones, lo que limita la extrapolación de los hallazgos entre estas especies. Por lo tanto, esto ha sido una limitante relevante en los escasos estudios que se han reportado sobre la heterogeneidad de leucocitos en ratas (Rubio, *et al.*, 2016; Rou, *et al.*, 2018).

6.1. Optimización de la digestión de aorta de ratas

En la actualidad se dispone de una gran variedad de anticuerpos que se emplean para el diagnóstico inmunofenotípico de neoplasias hematopoyéticas humanas (Roa-Higuera, *et al.*, 2010). Sin embargo, hace muy poco tiempo destacan los anticuerpos CD45+ para la detección de leucocitos, CD68+ para la identificación de macrófagos (pan-macrófago), CD86+ para reconocer macrófagos de inflamación (M1) y CD163+ para la identificación de macrófagos antiinflamatorios o de reparación (M2) (Li, *et al.*, 2018; Rubio, *et al.*, 2016). Dado lo descrito anteriormente, en este estudio se utilizaron estos marcadores de leucocitos en ratas (WKY Y SHR), para extrapolar nuestros resultados en humanos.

En consideración a lo anterior, en este trabajo se combinaron las metodologías de digestión de tejidos de los trabajos de Allen, *et al.*, 2017, Moore, *et al.*, 2016 (aorta de ratón), y Rubio, *et al.*, 2016 (riñón de rata) y se generó un nuevo protocolo de digestión para aorta de rata descrito en el punto 5.1 y 5.2. Se estudiaron dos tiempos distintos de digestión, 30 minutos (Rubio, *et al.*, 2016) y 60 minutos (Allen, *et al.*, 2017; Moore, *et al.*, 2013) para buscar las condiciones óptimas de obtención de células tisulares viables, totalmente dissociadas y que conserven la mayoría (sino todas) las características, tales como los antígenos de superficie, los cuales son específicos y distinguen una célula de otra, siendo un factor importantes antes de emplear la CF para cuantificar de manera confiable, diferentes células en el tejido (Butcher, *et al.*, 2011; Allen, *et al.*, 2017). Sin embargo, tejidos como la aorta, con alto contenido de colágeno y elastina necesitan de una combinación de procesos, tanto de interrupción manual como de digestión enzimática, siendo esta última un punto crítico en la optimización de protocolos, ya que el aumento del tiempo en la incubación puede traer consigo una

disminución de la viabilidad celular, como también la escisión de antígenos de superficie celular (Moore, *et al.*, 2013; Rubio, *et al.*, 2016; Allen, *et al.*, 2017; Rou, *et al.*, 2018; Aysun, *et al.*, 2017; Butcher, *et al.*, 2011). Los dos tiempos de digestión estudiados (30 y 60 minutos) dieron como resultado una alta viabilidad de células totales, como se observa en la **Tabla 2**. No obstante, para definir la eficacia del método, a los dos tiempos de digestión, se evaluó el porcentaje de expresión de CD45+ (leucocitos) en las aortas digeridas, utilizando como control positivo sangre periférica del mismo animal, dado que está bien estandarizado y se puede obtener una gran suspensión de leucocitos viables con requisitos mínimos (Shankar, *et al.*, 2004). Como resultado se obtuvo que a 30 minutos de digestión enzimática exista una mayor cantidad de antígenos de superficie en comparación a 60 minutos, como se observa en la **Figura 3**. Por lo tanto, es importante determinar la viabilidad y la integridad de los antígenos de superficie después de una digestión enzimática para la identificación de macrófagos por CF. En consecuencia, a un tiempo de digestión de 30 minutos en aorta de ratas, es posible obtener leucocitos viables y con integridad de los antígenos, siendo la mitad del tiempo de digestión en aorta de ratón. Es probable que este resultado fue posible por el uso de colagenasa tipo I en este nuevo protocolo, el cual se implementó en la digestión de riñón de rata en el estudio de Rubio, *et al.*, 2016.

6.2. Optimización de la concentración de anticuerpos para macrófagos en aorta de ratas

Los anticuerpos tienen un espectro de excitación y uno de emisión de fluorescencia, la cual es detectada mediante filtros. Esta señal positiva puede ser comparada con una señal negativa, por ejemplo, la misma muestra sin la incubación de los anticuerpos, lo cual hace que la técnica sea altamente sensible. Además, los clones de los anticuerpos no probados deben ser validados por el investigador antes de ser utilizados en ensayos por CF (Butcher, *et al.*, 2011; Aysun, *et al.*, 2017). Dado lo anterior, se prosiguió con la titulación de cada anticuerpo de este estudio para obtener una detección de manera confiable y la concentración óptima en la suspensión celular de aorta. Por consiguiente, se tituló el anticuerpo CD45-Pacific Blue (leucocitos, **Figura 4**), CD68-FITC (macrófagos totales, **Figura 5**), CD86-Alexa Fluor 647 (macrófagos proinflamatorios, M1, **Figura 6**) y CD163-PE (macrófagos antiinflamatorios o de reparación, M2, **Figura 7**). Por otra parte, las mismas concentraciones de los anticuerpos se estudiaron en

controles positivos como son los leucocitos de sangre periférica (**Figura 4A**) y macrófagos del lavado peritoneal (**Figura 4B, 5B, 6B, 7B**) para comparar la detección y la concentración.

Para CD45 se decidió utilizar la mitad de la concentración sugerida por el proveedor ($1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$), ya que se mantuvo el rendimiento del porcentaje de expresión en un 88%, al igual que en los controles positivos (leucocitos de sangre y lavado peritoneal). Además, el índice de tinción (1,2) es igual al índice de tinción de la concentración $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$ sugerida por el proveedor, demostrando que la concentración $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ del anticuerpo CD45 es la adecuada para la máxima detección de leucocitos en aorta de ratas. Por otro lado, se obtuvo la máxima detección de fluorescencia de los anticuerpos CD163 ($0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), CD86 ($2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y CD68 ($0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a la concentración sugerida por el proveedor, en la suspensión celular de aorta en comparación a los resultados obtenidos en el control positivo (macrófagos del lavado peritoneal). Estos resultados no son comparables con otros estudios de rata, ya que los fluorocromos de los anticuerpos son distintos, como así también, los clones de éstos (Rubio, *et al.*, 2016; Rou, *et al.*, 2018) y existen otros tipos de anticuerpos para la detección de macrófago en ratón como por ejemplo, para la detección de M1 se utiliza el anticuerpo F4/80 (Layoun, *et al.*, 2015; Allen, *et al.*, 2017).

El anticuerpo unido al fluorocromo debe evitar las uniones inespecíficas y posibles reacciones con reactivos, obteniendo la máxima resolución por CF (Butcher, *et al.*, 2011; Aysun, *et al.*, 2017). Primero, se probaron los anticuerpos en la identificación de macrófagos en la muestra control (leucocitos del lavado peritoneal) (Ray & Dittel, 2010; Rubio, *et al.*, 2016; Rou, *et al.*, 2018; Mateus, *et al.*, 2013; Layoun, *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que no había uniones inespecíficas ni reacciones con los reactivos, como se muestra en la **Figura 8** y **Figura 9**. Debido a que es una muestra fácil de obtener (células del lavado peritoneal), no necesita de tratamientos previos con reactivos y se puede incubar con los anticuerpos inmediatamente después de haber sido extraída.

Dado que la obtención de leucocitos en aorta es mucho menor, en comparación al lavado peritoneal, el análisis de la identificación de macrófagos en aorta de SHR se determinó después de la digestión enzimática, manteniendo la estrategia de *gate* del control positivo (**Figura 8A.1**). Como resultado se obtuvo un desplazamiento hacia la derecha, pero que no es claro, mostrando una señal inespecífica para los anticuerpos CD45, CD68 y CD163, no así para CD86 (**Figura 10B.2**). La señal inespecífica puede deberse al alto contenido de células

estromales (es decir, músculo liso, fibroblastos, adipocitos) presentes en la digestión del tejido aórtico, las cuales son altamente autofluorescentes, especialmente cuando se excitan a longitudes de onda en la región violeta o azul del espectro de luz; alternativamente la señal puede deberse a la emisión de fluorescencia de proteínas estructurales como el colágeno, que emite a baja frecuencia (Moore, *et al.*, 2013). Por lo tanto, se analizó la población de macrófagos a partir de la señal del anticuerpo CD86 “de atrás para adelante”, para obtener el área en el *dot plot* del *Single Cell* (FSC-H *versus* FSC-A) y en el *dot plot* de granularidad vs tamaño (SSC-A *versus* FSC-A), destacando que la expresión del anticuerpo CD86+ de la población total, sin la presencia de los otros anticuerpos (CD45+ CD68+CD163), da una expresión del **15,4%** (**Figura 11A.2**). Se prosiguió con la identificación de la población mediante *Single Cell* (**Figura 12**) que entrega información sobre la altura y el área de las células, permitiendo discriminar el tamaño celular reflejado en el gráfico de puntos (línea recta a medida que las células van aumentando el área y su altura). También se analizó el *dot plot* de granularidad *versus* tamaño el cual permite la diferenciación de los distintos tipos celulares en una población celular heterogénea (Aysun, *et al.*, 2017).

Los análisis mostraron autofluorescencia (**Figuras 12B.1, B.2 y B.4**), por lo que se disminuyó el área del *plot* “*Single Cells*” (**Figura 12A.3**), para abarcar la parte superior de la imagen y así obtener la población celular. Se identificó una pequeña región en la parte inferior derecha con la presencia de macrófagos CD86+ (**Figura 13A.1**). Utilizando esta nueva área seleccionada en el *plot* de separación de granularidad *versus* tamaño, se prosiguió con la identificación de los macrófagos en aorta de ratas SHR, dando como resultado 15,7% de expresión del anticuerpo CD86+ (M1) (**Figura 13B.2**), similar a lo obtenido cuando se utilizó el área del control positivo, pero esta vez sin la emisión de fluorescencia inespecífica para los demás anticuerpos (CD45+, CD68+, CD163+), como se puede observar en las **Figuras 13B.1**. Por lo cual, la identificación exitosa de la población de macrófagos en el tejido de aorta de ratas se obtuvo utilizando la máxima resolución mediante CF.

Dado que esta es la primera investigación que estudia la inflamación de aorta en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en la que se detectan subpoblaciones de macrófagos M1 y M2 en el tejido por CF, no existen reportes de otros investigadores para comparar el porcentaje de expresión de estos macrófagos en este tejido. Se ha descrito que existe un aumento significativo ($P < 0,05$) en el número de macrófagos inflamatorios en la pared aórtica

de ratones, a los cuales se les induce hipertensión con Ang II tratados por 14 días, en comparación a su control normotenso y que fueron analizados por CF (Moore, *et al.*, 2013).

Se enfatiza que mediante el uso de estrategias de control e identificación de *gates* en CF generado en este estudio, se evita en gran medida el impacto de autofluorescencia en la detección de leucocitos positivos para antígenos. La CF se destaca como una herramienta poderosa para futuros estudios destinados a investigar la patogenia de la enfermedad vascular.

6.3. Verificación de la detección de M1 en aorta de ratas

Para determinar la eficacia de la identificación de macrófagos en aorta de ratas SHR, se realizó un ensayo para inducir inflamación en aorta de ratas control normotensas (WKY). Existe evidencia que los macrófagos proinflamatorios se activan en presencia de bacterias gram negativas por medio del lipopolisacárido (LPS) o $INF\gamma$, causando la secreción de moléculas proinflamatorias como $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF\alpha$, entre otras, generando así una inflamación tisular aumentada (Wright & Binger, 2017; Röszer, 2018). También se ha visto que el LPS es un ligando clásico de receptores tipo Toll (TLR) presente en monocitos/macrófagos que estimula la presencia de proteínas como CD86 (Li, *et al.*, 2018). Por este motivo se generó la polarización de macrófagos M1 en aorta de ratas WKY mediante la administración intraperitoneal de LPS (WKY+LPS). Los resultados de este estudio mostraron que efectivamente la aorta de ratas WKY no presenta macrófagos inflamatorios M1 (CD86+), como se muestra en la **Figura 14C.1**. Sin embargo, macrófagos inflamatorios M1 sí estaban presentes en aorta de SHR representando un 8,98% (**Figura 14C.2**). Por otro lado, cuando se indujo inflamación a las ratas WKY mediante la administración de LPS, se observó la presencia de M1 (8,53%) en el tejido aórtico, mediante la nueva estrategia de identificación de macrófagos por CF, como se muestra en la **Figura 14C.3**. En consecuencia, el nuevo método de identificación de macrófagos en aorta de ratas es eficiente y demuestra que en aorta de ratas durante las primeras etapas de la hipertensión existe la presencia de macrófagos M1, los cuales pueden promover un proceso inflamatorio.

6.4. Caracterización del modelo experimental

Se evaluó la presión arterial, el peso total del animal, el peso de la aorta completa, corazón y pulmón en nueve ratas por grupo, como se aprecia en la **Tabla 8**. No se encontraron

diferencias significativas entre los dos grupos de ratas utilizando estos parámetros morfométricos (**Figura 15B**). Sin embargo, se presentó un cambio significativo en la presión arterial con un promedio aproximado de 70/117 mmHg en WKY y 101/ 159 mm Hg en SHR (**Figura 15A**). Estos resultados eran esperados, ya que se ha demostrado en estudios previos un incremento de la presión arterial en el curso natural de las SHR y la utilización de su control normotenso, las ratas WKY (Subha, et al., 1974; Rodríguez, et al., 2004; Ribera, et al., 2013; Harwani, 2017; Hays, et al., 2018; Kurtz & Morris, 1987). Con estos resultados se corroboró la hipertensión en ratas SHR en comparación a su control normotenso WKY y que los parámetros morfométricos en ambos modelos son muy parecidos.

6.5. Identificación de macrófagos M1 y M2 en aorta de ratas

Luego de haber analizado los parámetros morfométricos, se determinó la presencia de M1 y M2 en aorta de WKY y SHR. Se aplicó el nuevo protocolo de digestión enzimática para aorta de ratas y se obtuvieron entre $5.4 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$ y $6,6 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^6$ de células totales en WKY y SHR, respectivamente (**Tabla 9**). En esta suspensión celular se midió la viabilidad por CF mediante tinción con Ioduro de Propidio (IP) (**Figura 16**), dando como resultado una alta viabilidad (> 97%) en WKY y SHR, como se ilustra en la **Gráfica 16D**. El IP se ha utilizado ampliamente para la evaluación de la apoptosis en diferentes modelos experimentales, basándose principalmente en la unión de este fluorocromo al DNA, permitiendo una evaluación rápida por CF (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Por último, se determinó la presencia de macrófagos M1 y M2 en aorta de SHR evaluando la presencia de CD86+ (M1) y CD163+ (M2) por CF, respecto al control normotenso WKY. Se observa que en ambos modelos de ratas (WKY y SHR) existe una mayor expresión de CD86+ (M1) comparado con CD163+ (M2) (**Figura 18**). En estudios previos indican que el fenotipo de los macrófagos está influenciado por la complejidad de estímulos del ambiente, por ejemplo la presencia de IL6 o IL10 (Duque & Rojas, 2007). Además, los macrófagos M1 son caracterizados como centinelas del sistema inmune, por su papel proinflamatorio y anti patógeno en la inmunidad (Kloth, *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha visto que, en la enfermedad renal crónica, los macrófagos M1 y M2 coexisten simultáneamente, aunque M1 puede ser predominante, aumentando y perpetuando el daño renal inflamatorio (Rubio, *et al.*,

2016). Por lo tanto, estos resultados demuestran que ambos fenotipos coexisten simultáneamente en aorta de ambos modelos.

Se obtuvo un incremento significativo de la expresión de CD86+ (M1) en aorta de SHR en comparación a los M1 en aorta de WKY, indicando un predominio de inflamación vascular en SHR (**Figura 18**). Estos resultados corroboran estudios realizados anteriormente en donde se ha evidenciado que en las primeras etapas de los pacientes hipertensos existe un aumento de marcadores inflamatorios (citoquinas y proteínas de fase aguda), los cuales aumentan entre dos o tres veces con respecto a los niveles plasmáticos en sujetos normotensos, por lo cual, estas citoquinas pueden contribuir a predecir la HTA (Bautista, *et al.*, 2005; Pauletto & Rattazzi., 2006). Estos marcadores están directamente relacionadas con el cambio de polarización de los macrófagos M1 (Harwani, 2017). Este hallazgo es mucho más específico comparado con otros obtenidos previamente y que se han realizado en riñón de ratas WKY, en el cual se induce inflamación mediante la administración de aldosterona en las primeras etapas de la lesión renal aguda, observando un predominio de los macrófagos M1 sin cambios significativos para M2, promoviendo la necrosis tubular e inflamación (Rubio, *et al.*, 2016). En otros estudios, luego de una inducción de inflamación *in vitro* a esplenocitos de SHR prehipertensos jóvenes (de 3 a 5 semanas de edad) con sus controles WKY emparejados por edad en ausencia (medio solo) o en presencia de nicotina (10 μ M) durante 48 h, se reporta que este compuesto es capaz de inducir un aumento significativo en la población de macrófagos M1 CD161a+ / CD68+, en comparación con las WKY (Harwani, 2017). Por consiguiente, los resultados obtenidos en esta investigación indican que sí existe un predominio de inflamación vascular en SHR, dominando en el curso temprano de la enfermedad vascular.

Se observó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de expresión de CD163+ (M2) en ambos modelos de ratas (**Figura 18**). Estos resultados corroboran su presencia en el tejido vascular y que en SHR los macrófagos M2 se encuentran en una cantidad basal en comparación con las ratas WKY. Además, se demuestra que en las primeras etapas de la hipertensión en SHR aún no existe una diferenciación o cambio en la polarización de los macrófagos M1 a M2, ya que se ha sugerido que los macrófagos no existen como fenotipos M1 o M2 distintos, sino más bien como un continuo de estados funcionales superpuestos. La transición entre el fenotipo M1 y M2 es un proceso dinámico que dependen de las citoquinas y proteínas del ambiente (Rou, *et al.*, 2018; Li, *et al.*, 2018). Se ha sugerido

que M2 puede dominar en las últimas etapas de un proceso de enfermedad crónica como la hipertensión (Rou, *et al.*, 2018) Si bien los macrófagos juegan un papel clave en la remodelación cardíaca, la desregulación de la polarización de los macrófagos entre los fenotipos proinflamatorio M1 y antiinflamatorio M2 puede promover una inflamación excesiva y daño cardíaco (Mouton, *et al.*, 2020). Por lo tanto, las nuevas estrategias terapéuticas que aprovechan el poder de la polarización de los macrófagos para revertir, controlar o prevenir la hipertensión esencial y sus devastadoras consecuencias cardiovasculares son muy prometedoras, pero a su vez, dependerán del tiempo de administración (Harwani, 2017).

Será interesante evaluar en SHR de edad avanzada si la presencia de M2 está aumentada en el tejido vascular, en comparación a los resultados de este estudio, ya que este tipo de macrófagos está relacionado con la remodelación del tejido. Es de interés evaluar una eventual relación con la remodelación vascular y la hipertensión.

En SHR se han utilizado fármacos antihipertensivos de uso humano (reserpina, hidralazina, clorotiazida), los cuales han sido útiles para el control de la presión sanguínea en estas ratas (Ribera, *et al.*, 2013). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren continuar con estudios relacionados con fármacos que disminuyan la polarización de los macrófagos a M1 en aorta. En situaciones de inflamación crónica, excesiva o no resuelta, se reclutan grandes cantidades de leucocitos en el tejido, liberando citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α y especies reactivas de oxígeno que causan daño (Wang, *et al.*, 2015). Esto representa un tema muy interesante para trabajos futuros.

Finalmente, la CF es una excelente herramienta para determinar en un mínimo de tiempo, de manera cuantitativa y específica, la subpoblación de macrófagos y por lo que se podrá utilizar en futuros estudios destinados a investigar la fisiopatología de la enfermedad vascular y la hipertensión arterial esencial.

7. PROYECCIONES

El protocolo descrito en esta investigación es fácil de aplicar, reproducible y útil para discriminar subpoblaciones de macrófagos de aorta de ratas. Los anticuerpos pueden ser usados en distintos tipos de tejidos como, por ejemplo, el riñón del mismo modelo para determinar la inflamación en etapas tempranas y evaluar si existe alguna similitud a lo que sucede en aorta.

Para verificar si efectivamente la polarización es debido a estímulos del ambiente, sería necesario medir interleuquinas o proteínas proinflamatorias mediante ELISA, IH y CF. Por otra parte, se podrían evaluar las subpoblaciones de macrófagos en el mismo modelo a mayor edad y observar si existe un aumento de macrófagos del tipo M2 en comparación a este estudio, dado que se ha visto que estos macrófagos están relacionados con la reparación del daño y quizás tendrían una relación con la remodelación vascular y la hipertensión.

Es importante evaluar fármacos que disminuyan la inflamación en aorta de SHR, ya que estos resultados pueden ser extrapolados a la hipertensión esencial en humanos y a su vez validar mediante citometría de flujo la presencia de M2 en este proceso antiinflamatorio. También se podrían evaluar otros tipos de células del sistema inmune en conjunto con los macrófagos, como por ejemplo identificar linfocitos en sangre, lavado peritoneal y aorta de SHR, y compararlos con el control WKY. Se sabe que en sangre no se encuentran macrófagos, pero se ha descrito en la literatura que los linfocitos también pueden estimular la polarización de macrófagos y viceversa. La citometría sería muy útil para identificar no sólo las subpoblaciones de macrófagos, sino también las subpoblaciones de linfocitos, en una sola muestra de manera específica. Sería muy importante si se encuentra alguna relación, dado que las muestras de sangre en clínica son menos invasivas, de bajo costo, y mediante el análisis de CF se obtendrían resultados rápidos y específicos.

Entender las bases moleculares que regulan o inducen los distintos fenotipos de macrófagos y que determinan el momento en que estas células deben ejercer su rol, es un desafío, abriendo nuevas posibilidades en la comprensión de la patogénesis de la hipertensión arterial. Además, despliega una gran cantidad de posibilidades en la modulación de las alteraciones y en la regulación de la respuesta inflamatoria.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha descrito un nuevo protocolo de digestión robusto y reproducible de poblaciones de leucocitos en la pared aórtica de ratas, en un modelo relevante de hipertensión.

Se demostró que la digestión enzimática de homogeneizado aórtico durante 30 minutos produce una suspensión de células individuales, que contiene un alto porcentaje de células viables. Este protocolo de digestión tiene un impacto mínimo en los niveles de expresión de antígenos específicos en la superficie de los leucocitos dentro de la suspensión.

Al aplicar CF y herramientas de clasificación FACS en una dimensión innovadora, se caracterizaron los macrófagos residentes en tejidos, reguladores clave de la inflamación en la hipertensión, identificando en profundidad la dinámica de la población de macrófagos en aorta de ratas de manera eficiente, proporcionando una visión fundamental de los mecanismos biológicos que regulan la heterogeneidad de los macrófagos en la salud y la enfermedad.

Con el nuevo protocolo descrito, se demostró que existe un aumento de macrófagos proinflamatorios (M1) en SHR comparado a su control (WKY) debido sólo a la hipertensión.

Se detectó exitosamente la presencia de M1 y M2 basal en aorta de ratas WKY. Por lo tanto, estos resultados son muy importantes, ya que evidencian un aumento significativo de macrófagos proinflamatorios (M1) en el tejido vascular y que éstos están directamente relacionados con la hipertensión en SHR, un modelo adecuado que emula la hipertensión esencial en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176.

Arnold, C. E., Whyte, C. S., Gordon, P., Barker, R. N., Rees, A. J., & Wilson, H. M. (2014). A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M 1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology*, 141(1), 96-110.

Allen, J. N., Dey, A., Nissly, R., Fraser, J., Yu, S., Balandaram, G., ... & Hankey-Giblin, P. A. (2017). Isolation, characterization, and purification of macrophages from tissues affected by obesity-related inflammation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (122), e55445.

Aysun Adan, Günel Alizada, Yağmur Kiraz, Yusuf Baran, Ayten Nalbant (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*;37(2):163-176.

Bautista, L. E., Vera, L. M., Arenas, I. A., & Gamarra, G. (2005). Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 19(2), 149.

Butcher, M. J., Herre, M., Ley, K., & Galkina, E. (2011). Flow cytometry analysis of immune cells within murine aortas. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (53), e2848.

Blackbeard, J., O'Dea, K. P., Wallace, V. C. J., Segerdahl, A., Pheby, T., Takata, M., ... & Rice, A. S. C. (2007). Quantification of the rat spinal microglial response to peripheral nerve injury as revealed by immunohistochemical image analysis and flow cytometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(2), 207-217.

Caillon, A., & Schiffrin, E. L. (2016). Role of inflammation and immunity in hypertension: recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. *Current Hypertension Reports*, 18(3), 21.

Carabetti, M., & Aníbal, J. (2012). Endotelio, inflamación e hipertensión arterial. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 27(3), 413-417.

Carvajal Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100.

Correa, M. D., & López, M. R. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2), 73-86.

Cristian Mancilla y cols. (2015). Eficacia del péptido vasoactivo angiotensina-(1-9) en el tratamiento del daño cardiaco en la hipertensión esencial experimental. *Revista Chilena de Cardiología*, 34;16.

Chang, Z. L. (2009). Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biology of the Cell*, 101(12), 709-721.

Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Frontiers in Physiology*, 6, 365.

De Hematología, S. A. (2017). Hematología: Volumen 21-Extraordinario XXIII Congreso Argentino (Vol. 5). Sociedad Argentina de Hematología.

De la Paz Sánchez-Martínez, M., Blanco-Favela, F., Mora-Ruiz, M. D., Chávez-Rueda, A. K., Bernabe-García, M., & Chávez-Sánchez, L. (2017). IL-17-differentiated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 196.

Fattah, C., Nather, K., McCarroll, C. S., Hortigon-Vinagre, M. P., Zamora, V., Flores-Munoz, M., & Smith, G. L. (2016). Gene therapy with angiotensin-(1-9) preserves left ventricular systolic function after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 68(24), 2652-2666.

Forbes, S. J., & Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature Medicine*, 20(8), 857.

Galeano, P., Gómez Llambí, H., Ottaviano, G., Paglia, N., Milei, J., Arnaiz, L., & Del Rosario, M. (2008). Rasgos conductuales y presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). In XV Jornadas de Investigación y Cuarto Encuentro de Investigadores en Psicología del Mercosur. Facultad de Psicología-Universidad de Buenos Aires.

Guerrero-Godínez, M. A., Franco-Bourland, R. E., Guízar-Sahagún, C. G., & Vázquez, G. C. (2005). Estandarización de la técnica para la obtención de células mesenquimatosas de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de lesiones medulares. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación*, 17(3), 84-90.

Harwani, S. C. (2018). Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Translational Research*, 191, 45-63.

Hays, T. T., Ma, B., Zhou, N., Stoll, S., Pearce, W. J., & Qiu, H. (2018). Vascular smooth muscle cells direct extracellular dysregulation in aortic stiffening of hypertensive rats. *Aging Cell*, 17(3), e12748.

Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., Bolivar, S., Anfossi, R., & Díaz-Araya, G. (2016). Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101, 69-80.

INE. (2015). Anuario de Estadísticas. Instituto Nacional de Estadísticas, 1-16. [Obtenido de:<https://www.ine.cl/docs/default-source/publicaciones/2017/s%C3%ADntesis-de-estad%C3%ADsticas-vitales-2015.pdf?sfvrsn=7>]

Intengan, H. D., & Schiffrin, E. L. (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 36(3), 312-318.

Konukoglu, D., & Uzun, H. (2016). Endothelial dysfunction and hypertension. In *Hypertension: from basic research to clinical practice* (pp. 511-540). Springer, Cham.

Kunstmann, S. (2005). Epidemiología de la hipertensión arterial en Chile. *Rev. Med. Clin. Condes*, 16(2), 44-47.

- Kurtz, T. W., & Morris Jr, R. C. (1987). Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 10(1), 127-131.
- Kloth, C., Gruben, N., Ochs, M., Knudsen, L., Lopez-Rodriguez E. (2019). Flow cytometric analysis of the leukocyte landscape during bleomycin-induced lung injury and fibrosis in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1;317(1):L109-L126
- Layoun, A., Samba, M., & Santos, M. M. (2015). Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (98), e52749.
- Li, Y., Xie, Z., Wang, Y., Hu, H. (2018). Macrophage M1/M2 polarization in patients with pregnancy-induced hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.*, 96(9):922-928.
- Liu, R. H., Wen, Y., Sun, H. Y., Liu, C. Y., Zhang, Y. F., Yang, Y., & Tang, L. J. (2018). Abdominal paracentesis drainage ameliorates severe acute pancreatitis in rats by regulating the polarization of peritoneal macrophages. *World Journal of Gastroenterology*, 24(45), 5131.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686.
- Marott, S. C., Nielsen, S. F., Benn, M., & Nordestgaard, B. G. (2014). Antihypertensive treatment and risk of atrial fibrillation: a nationwide study. *European Heart Journal*, 35, 1205-1214.
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Prime Reports*, 6.
- Mateus, J., Lasso, P., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2013). Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. *Biomédica*, 33(4), 660-672.
- McLennan, I. S. (1993). Resident macrophages (ED2-and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell and Tissue Research*, 272(1), 193-196.
- Ministerio de Salud. (2010). Guía clínica hipertensión arterial primaria o esencial en personas de 15 años y más.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958.
- Moore, J. P., Sakkal, S., Bullen, M. L., Kemp-Harper, B. K., Ricardo, S. D., Sobey, C. G., & Drummond, G. R. (2013). A flow cytometric method for the analysis of macrophages in the vascular wall. *Journal of Immunological Methods*, 396(1-2), 33-43.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., & Locati, M. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20.

Mouton, A. J., Li, X, Hall, M. E., Hall, J. E. (2020). Obesity, Hypertension, and Cardiac Dysfunction: Novel Roles of Immunometabolism in Macrophage Activation and Inflammation. *Circ Res.* 13;126(6):789-806

Novak, M. L., & Koh, T. J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), 875-881.

Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27(3), 282-293.

Olsen, F. (1980). Transfer of arterial hypertension by splenic cells from DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats to normotensive recipients. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section C Immunology*, 88(1-6), 1-6.

OMS. (2019). Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares. Obtenido de: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/

Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3), 363.

Palatini, P., & Julius, S. (1997). Heart rate and the cardiovascular risk. *Journal of Hypertension*, 15(1), 3-17.

Palmer, J. A., Abberton, K. M., Mitchell, G. M., & Morrison, W. A. (2014). Macrophage phenotype in response to implanted synthetic scaffolds: an immunohistochemical study in the rat. *Cells Tissues Organs*, 199(2-3), 169-183.

Passalacqua, W. (2005). Boletín Oficial Sociedad Chilena DE Hipertensión. *Hipertension*, 14(1).

Pauletto, P., & Rattazzi, M. (2006). Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(4), 850-853.

Petermann, F., Durán, E., Labraña, A. M., Martínez, M. A., Leiva, A. M., Garrido-Méndez, A., & Celis-Morales, C. (2017). Factores de riesgo asociados al desarrollo de hipertensión arterial en Chile. *Revista Médica de Chile*, 145(8), 996-1004.

Pollard, J. W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 259.

Ramos, V. C., Sanz-Rosa, D., de las Heras Jiménez, N., Gil, E. C., Ortega, M. M., & Juliá, V. L. (2004). Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial. *Hipertension y Riesgo Vascular*, 21(7), 347-354.

Ray, A., & Dittel, B. N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (35), e1488.

Renna, N & Miatello, R. (2013). Fisiopatología del remodelado vascular en la hipertensión arterial. Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial. Obtenido de: <http://www.saha.org.ar/pdf/libro/Cap.060.pdf>.

- Rivera, C., Hernández, R., & Marin, H. (2013). Manejo reproductivo de las colonia de Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR) y su control Normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 14(11B), 1-22.
- Rizzoni, D., Porteri, E., Castellano, M., Bettoni, G., Muiesan, M. L., Muiesan, P., ... & Agabiti-Rosei, E. (1996). Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*, 28(5), 785-790.
- Rodríguez-Iturbe, B., Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Parra, G., & Vaziri, N. D. (2004). Evolution of renal interstitial inflammation and NF- κ B activation in spontaneously hypertensive rats. *American journal of nephrology*, 24(6), 587-594.
- Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015.
- Rubio-Navarro, A., Guerrero-Hue, M., Martín-Fernandez, B., Cortegano, I., Olivares-Alvaro, E., de las Heras, N., & Moreno, J. A. (2016). Phenotypic characterization of macrophages from rat kidney by flow cytometry. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (116), e54599.
- Sellén Crombet, J., Sellén Sanchén, E., Barroso Pacheco, L., & Sellén Sánchez, S. (2009). Evaluación y diagnóstico de la Hipertensión Arterial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 28(1), 0-0.
- Sen, S., Tarazi, R. C., Khairallah, P. A., & Bumpus, F. M. (1974). Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*, 35(5), 775-781.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787-795.
- SChH. (2018). Hipertensión arterial: Una de las protagonistas de la última Encuesta Nacional de Salud. Obtenido de: <http://hipertension.cl/2018/03/06/hipertension-arterial-una-de-las-protagonistas-de-la-ultima-encuesta-nacional-de-salud/>
- Schiffrin, E. L. (2012). Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension*, 59(2), 367-374.
- Shankar, A., Klein, B. E., & Klein, R. (2004). Relationship between white blood cell count and incident hypertension. *American journal of Hypertension*, 17(3), 233-239.
- Smith, T. L., & Hutchins, P. M. (1980). Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 238(4), H539-H544.
- Solís-Martínez, R., Hernández-Flores, G., Ochoa-Carrillo, F. J., Ortiz-Lazareno, P., & Bravo-Cuellar, A. (2015). Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(2), 97-102.

Spiller, K. L., Wrona, E. A., Romero-Torres, S., Pallotta, I., Graney, P. L., Witherel, C. E., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Experimental Cell Research*, 347(1), 1-13.

Stöger, J. L., Gijbels, M. J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C. M., Biessen, E. A., & de Winther, M. P. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225(2), 461-468.

Svendsen, U. G. (1976). Evidence for an initial, thymus independent and a chronic, thymus dependent phase of DOCA and salt hypertension in mice. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*, 84(6), 523-528.

Tian, N., Penman, A. D., Manning Jr, R. D., Flessner, M. F., & Mawson, A. R. (2012). Association between circulating specific leukocyte types and incident chronic kidney disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Journal of the American Society of Hypertension*, 6(2), 100-108.

Urvoy, Matthieu, and Florent Autrusseau. 2014. "Application of Grubbs' Test for Outliers to the Detection of Watermarks." *IH and MMSec 2014 - Proceedings of the 2014 ACM Information Hiding and Multimedia Security Workshop* (June 2014): 49–60.

Vestweber, D. (2012). Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257(1), 184-192.

Villalba, E. (2014). Inflamación I. *Rev. Act. Clin. Med.* 2014, vol.43, pp. 2261-2265. ISSN 2304-3768. Obtenido de:http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S230437682014000400004&lng=es&nrm=iso.

Vogel, D. Y., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., & Beelen, R. H. (2014). Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9), 695-703.

Wagner-Grau, P. (2010, December). Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Facultad de Medicina* (Vol. 71, No. 4, pp. 225-229).

Wang, W. E. I., Li, X., Zheng, D., Zhang, D., Peng, X., Zhang, X., ... & Li, G. (2015). Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2397-2406.

White, F. N., & Grollman, A. (1964). Autoimmune factors associated with infarction of the kidney. *Nephron*, 1(2), 93-102.

Wright, M. D., & Binger, K. J. (2017). Macrophage heterogeneity and renin-angiotensin system disorders. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(3-4), 445-454.

Zhang, J., & Crowley, S. D. (2013). The role of type 1 angiotensin receptors on T lymphocytes in cardiovascular and renal diseases. *Current Hypertension Reports*, 15(1), 39-46.

Zhou, D., Huang, C., Lin, Z., Zhan, S., Kong, L., Fang, C., & Li, J. (2014). Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular Signalling*, 26(2), 192-197.