FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA

PARTICIPACIÓN DEL ANIÓN CLORURO EN EL DAÑO DE ÓRGANO BLANCO MEDIADO POR HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR UNA SOBRECARGA CRÓNICA DE SAL

DIRECTOR: Choi, Marcelo

CO DIRECTOR: (si hubiera)

INVESTIGADORES COLABORADORES: Dra Natalia Rukavina, Dr. Nicolás Kouyoumdzian

FILIACIÓN DE LOS INVESTIGADORES COLABORADORES: IATIMET (CONICET)

SEDE-LUGAR: Buenos Aires

FECHA: 21/05/2026

CONTACTO DEL DIRECTOR: marcelinkchoi@yahoo.com.ar

I. Índice

Resumen ……..4

Palabras claves ……5

Abstract ……..…….5

Palabras claves en inglés ……6

Introducción ……6

Metodología (materiales y métodos) ……..…….….11

Determinación de presión arterial y frecuencia cardíaca ……12

Evaluación de la función renal ……..12

Evaluación de la inflamación en tejido renal y aorta ……...13

Evaluación de la producción de especies oxidantes y del daño oxidativo en tejido renal y aorta ……....14

Determinación de la participación de los canales de cloruros ……..….15

Análisis estadístico general ……....15

Resultados ……15

Evolución temporal de la presión arterial sistólica ……15

Parámetros de funcionalidad renal excretora ……....16

Marcadores de estrés oxidativo e inflamación en corteza renal ……17

Características histológicas del parénquima renal ……..22

Conclusión y discusión ……22

Agradecimientos ……..23

Bibliografia ……...23

I. Resumen

La hipertensión arterial (HTA) continúa siendo el principal factor de riesgo de mortalidad a nivel mundial, siendo el consumo elevado de ClNa uno de los principales determinantes del incremento en los valores de presión arterial [1,2]. La reducción en el consumo de sal (ClNa) demostró asociarse a un descenso en los niveles de presión arterial tanto en pacientes con o sin HTA [3], siendo dicha reducción aún más notoria ante condiciones previas de exposición al alto consumo de ClNa, sugiriéndose que la sobrecarga salina fomenta aún más el efecto deletéreo de la HTA por sí misma. No obstante, se desconoce hasta el momento si el efecto deletéreo del consumo excesivo de sal es atribuido al sodio únicamente, o si el alto consumo de cloruros también es deletéreo y potencia los efectos del sodio. En la actualidad, las terapias no farmacológicas dirigidas a la restricción o reducción del consumo de sal como cloruro de sodio, no logra discernir si los beneficios asociados al bajo consumo se deben al descenso de ingesta de sodio o del aporte de Cl^-. En base a observaciones experimentales y evidencias clínicas provenientes de estudios a pequeña escala, en donde se demuestra un posible rol deletéreo de las dietas altas en Cl^- independientemente de la presencia de sodio, este proyecto tiene como objetivo evaluar los efectos de una sobrecarga de Cl^- sobre el daño de órgano blanco a nivel renal y vascular, y por otra parte, el posible impacto que tendría la reducción del consumo de sales, no solo bajas en sodio, sino también bajas en Cl^-. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo de este proyecto sugiere que la sobrecarga de cloruro y de sodio, y no solamente la de sodio, provocan un estado de inflamación y oxidación vascular y renal que incrementan la presión arterial y producen un daño estructural y funcional a nivel vascular y renal. De esta manera, el objetivo es discernir cuáles son los efectos propios de la sobrecarga de Cl^- y cuáles los de la sobrecarga de sodio y qué sobrecarga es más nociva para la salud. Asimismo, se estudiará si al suministrar crónicamente la sal NaCl, existe un efecto sinérgico proinflamatorio y pro-oxidativo entre los efectos propios de cada ion por separado, y si la reducción en el consumo de sodio o de Cl^- disminuye o revierte las alteraciones que los mismos ocasionan. Desde el punto de vista mecanístico, se estudiará la participación de los canales de cloruros ClC en la respuesta inflamatoria y oxidativa vascular y renal mediada por Cl^-, tratando así de dar respuesta a los fenómenos celulares y subcelulares implicados en el daño de órgano ocasionado por las sobrecargas de ambos iones.

II. Palabras claves: Hipertensión Arterial, Sodio, Cloruro, Riñón.

III. Abstract

Hypertension (HTN) still represent the main risk factor for mortality worldwide, being the high NaCl consumption one of the main determinants of the increase in blood pressure values. The reduction in the consumption of salt (NaCl) was shown to be associated with a decrease in blood pressure levels in both patients with and without HTN, and this reduction was even more noticeable in condition of previous exposure to high consumption of NaCl, suggesting that saline overload further promotes the deleterious effect of HTN on its own. However, it is still unknown if the deleterious effect of excessive salt consumption is attributed to sodium only, or if high chloride intake is also deleterious and potentiates the effects of sodium. At present, non-pharmacological therapies aimed at restricting or reducing the consumption of salt such as sodium chloride, cannot discern whether the benefits associated with low consumption are due to a decrease in sodium intake or by Cl-. Based on experimental observations and clinical evidence from small-scale studies, which demonstrate a possible deleterious role of diets high in Cl- regardless of the presence of sodium, this project aims to evaluate the effects of a Cl overload on target organ damage (kidney and vascular bed), and on the other hand, the possible impact that the reduction in NaCl consumption should have, not only by lowering sodium, but also lowering the Cl-. Therefore, our hypothesis suggests that chloride and sodium overload, and not only sodium, induces vascular and renal inflammation and oxidation that increase blood pressure and produce structural and functional damage in this target organs. In this way, the objective of this project will be to discern which are the effects induced by Cl- overload and which by the sodium overload and which overload is more harmful to health. Additionally, we will study whether chronic NaCl consumption exhibit a synergistic pro-inflammatory and pro-oxidative effect that represent the effects of each ion separately, and whether the reduction in sodium or Cl- consumption reduces or reverses the alterations that they cause. From a mechanistical point of view, the participation of the chloride channels ClC in the inflammatory and oxidative vascular and renal response mediated by Cl- will also be studied, thus allowing to know the cellular and subcellular phenomena involved in organ damage caused by both ions overload.

IV. Palabras clave en inglés: Arterial Hypertension, Sodium, Chloride, Kidney.

V. Introducción:

La HTA continúa siendo la principal causa de enfermedad cardiovascular, que afecta aproximadamente a mil millones de personas en todo el mundo [4]. Además de la HTA y sus enfermedades cardiovasculares relacionadas, una ingesta elevada de cloruro de sodio también afecta a los vasos sanguíneos, produciendo un estado de disfunción endotelial y mayor reactividad a agentes vasoconstrictores, y a los riñones, que son los principales órganos de excreción de los cationes sodio y los aniones cloruro. Una disminución progresiva de la función renal como consecuencia de un consumo elevado de ClNa puede conducirá la insuficiencia renal [5-7]. El uso de fármacos antihipertensivos como medida para controlar los niveles elevados de presión arterial no suele ser suficiente si no se acompaña de una medida dietética adecuada, especialmente la reducción de la ingesta de ClNa. Muchas evidencias científicas demuestran que la reducción del consumo de sal posee efectos beneficiosos que se traducen en un descenso de los valores de presión arterial, especialmente en pacientes con HTA y enfermedades cardiovasculares relacionadas, pero también extiende sus efectos beneficiosos a pacientes prehipertensos como a normotensos con o sin riesgo cardiovascular [3,8]. Esta fue la razón por la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una "recomendación fuerte" sobre la ingesta máxima de sodio que se estableció en 2,0 gr/d, lo que equivale a 5,0 gr/d de sal (NaCl) [6]. No obstante, gran parte de toda esta evidencia hace referencia al catión sodio como el principal responsable de los efectos del consumo de sal como cloruro de sodio, sin considerar los efectos del cloruro en esta ecuación. El papel importante que puede protagonizar el Cl^- fue descripto ya en 1904 por Ambard y Beaujard y en 1908 por Higgins quienes señalaron que la HTA se asocia íntimamente con "retención de cloro" [9,10]. Un número limitado de observaciones clínicas también sugieren que la presión arterial no se incrementa en los seres humanos por la dieta alta en Na^+ en ausencia de Cl^- [11-13]. Un estudio clínico en el año 1929 mostró que el Cl^- fue el principal componente del aumento de la presión arterial con la observación de que el bicarbonato de sodio no tuvo el mismo efecto presor como el ClNa en personas hipertensas [14]. Kurtz y col. demostraron que el aumento de la presión sanguínea en respuesta a una dieta alta en sodio (dieta con 240 mmol de ClNa por día; 5,52 g Na^+) era

suprimida a partir de la sustitución de una cantidad equimolar por citrato de sodio [11]. Por su parte, Luft y col. mostraron un efecto hipertensor del NaCl pero no del NaHCO3 sobre la presión arterial al igual que Shore y col. quienes informaron que la ingesta de NaCl indujo un mayor aumento de la presión arterial que la ingesta de fosfato de sodio [12,13]. Existen evidencias recientes que el componente Cl^- del NaCl puede tener un papel más específico en la sensibilidad a la sal en la HTA, independiente del efecto hipertensógeno del sodio y que incluso, puede potenciar el efecto del sodio en forma aditiva, como componente de la sal NaCl [15]. Adicionalmente la sensibilidad a la sal se pone de manifiesta sólo ante una alta ingesta dietética tanto de sodio y cloruro, hecho demostrado experimentalmente en donde se observó que una alimentación selectiva de sodio sin cloruro o cloruro sin sodio no produce hipertensión o, en el caso de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) alimentados con una dieta alta en cloruros, retrasa su desarrollo [16]. Otra evidencia que sugiere el rol del anión cloruro en la regulación de la presión arterial proviene de las aguas de origen mineral. El código alimentario nacional clasifica a la mineralización de las aguas según su contenido de sodio como bajas en sodio, cuando la concentración es de hasta 20 mg/L, y sódicas, a aquellas que contienen una concentración mayor de 200 mg/L. Según la OMS no está demostrada la asociación entre el contenido de sodio en las aguas y la ocurrencia de HTA, esto es debido a que, por un lado, el aporte de sodio proveniente del agua es poco relevante dentro de una alimentación variada, y por otro lado, la mayor parte de este no es en forma de cloruro de sodio, sino que la acompaña otro anión, generalmente bicarbonato o sulfato. Esto último sugiere que el efecto que produce el sodio sobre la presión arterial depende de si el anión acompañante es el cloruro u otro anión como el bicarbonato, otorgando así importancia al anión cloruro, independientemente del sodio, en el desarrollo y mantenimiento de la HTA. El efecto del bicarbonato de sodio sobre la PA es diferente del provisto por cantidades equivalentes de cloruro de sodio, tal es así que el aporte de un agua mineral rica en bicarbonato de sodio no genera aumento de la presión arterial [17]. Las dietas bajas en cloruro de sodio representan una de las medidas no farmacológicas más conocidas para la prevención y el tratamiento de la HTA y también reducen el riesgo de accidente cerebrovascular, hipertrofia ventricular izquierda, osteoporosis, cálculos renales, asma, cataratas, patología gástrica e incluso la demencia senil [11,13,18-20]. Sin embargo, la restricción del sodio evoca respuestas metabólicas contrarreguladoras, como el aumento de la producción de renina y Ang II y una mayor actividad simpática, que son potencialmente

adversas para la salud vascular, y se ha sugerido que la restricción de sodio podría no ser del todo beneficiosa e incluso podría estar contraindicado en algunos sujetos “sal resistentes" [21-24] debido a que estos sujetos presentan un fuerte aumento de los niveles de renina y Ang II con la restricción de sodio, siendo esta respuesta atenuada en sujetos sensibles a la sal [25-27]. En este sentido existe evidencia de que el cloruro de sodio, más que el sodio en sí es responsable de los efectos adversos conocidos de la sal dietética [16]. Así, sales de sodio sin cloruro, como el citrato o bicarbonato de sodio, no elevan el volumen plasmático, la presión arterial, la pérdida de calcio urinario ni promueven el accidente cerebrovascular en ratas propensas a sufrir un accidente cerebrovascular (Stroke-prone rats) [20,28,29]. Asimismo, se ha demostrado que estos compuestos mitigan el impacto de la restricción de sodio sobre la renina, la Ang II y la actividad simpática en humanos [11-13,19,30]. En este sentido, se necesitan estudios clínicos adicionales para determinar si una dieta moderadamente restringida en el componente del cloruro (aún sin modificar el contenido de sodio) tiene el mismo o un mejor impacto sobre la HTA que la restricción de cloruro de sodio por sí sola. Cabe destacar que los efectos mencionados más arriba, ya sea por exceso o reducción de cloruro de sodio, se observan dentro del rango fisiológico plasmático de natremia y cloremia. Por otro lado, se sabe que el Cl^- es el anión predominante en el fluido extracelular y que su concentración intracelular es regulada dinámicamente [31]. El efecto directo del Cl^- en la HTA no está establecido actualmente y los mecanismos dependientes del Cl^- involucrados en la regulación de la presión arterial abarcan numerosas vías de señalización, destacando la necesidad de profundizar dichos estudios para dilucidar las bases mecanísticas de los mismos. En este sentido, se ha demostrado que la noradrenalina estimula el flujo de salida de Cl^- tanto en la aorta de rata como en la vena pulmonar del conejo, mientras que la endotelina es capaz de activarlas [32-35]. Los estudios que utilizan antagonistas no selectivos de los canales de Cl^- y otros estudios que sustituyen el componente aniónico, apoyan el concepto de que el flujo de Cl^- contribuye a la vasoconstricción [36-39]. Si bien es poco lo que se conoce sobre la participación del Cl^- en la génesis o desarrollo de la HTA, se ha descripto que los canales ClC son reguladores esenciales del anión Cl- a nivel de los vasos sanguíneos y a nivel renal [40, 41]. Se han descripto 9 miembros de la familia ClC: ClC-1 a ClC-7 y los ClC-Ka y ClC-Kb. Los canales ClC-K a/b son una superfamilia de canales de cloruro voltaje-dependientes que funciona como canal de aniones en la membrana plasmática de las células epiteliales tubulares renales y a diferencia de los otros canales ClC se co-expresan

con la subunidad β bartina [42,43]. ClC-Ka y ClC-Kb (-K_1 y -K_2 en roedores) son dos canales estrechamente relacionados (aproximadamente un 90% idénticos), expresados casi en su totalidad en el nefrón y mutaciones de estos se asocian a trastornos del manejo transepitelial de sal [44-45]. También se ha descripto que el polimorfismo del canal ClC-Kb con ganancia de su función se asocia al desarrollo de HTA [46]. Por su parte, se ha demostrado en pacientes hipertensos, que la ingesta aumentada de ClNa, aumenta el sodio intracelular en las paredes vasculares, conduciendo a un aumento del contenido de calcio intracelular responsable de la estimulación de vías de señalización vasoconstrictoras. Recientemente se han implicado a los canales ClC-2 y ClC-6 en la regulación del tono vascular inducidas por sustancias vasoconstrictoras con implicancias directas en la génesis de la HTA a través del manejo de la disponibilidad del calcio intracelular [36,41,47,48]. El anión Cl- a través del canal ClC está implicado, entre otras funciones, en la regulación de la actividad eléctrica, el volumen celular, la proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis y el pH intracelular, poniendo en relieve su probable relevancia en la remodelación cardiaca y vascular durante la HTA [40]. En conjunto estas evidencias sugerirían que una mayor expresión y/o actividad de los canales ClC en estos órganos podrían conducir a un aumento en los niveles de presión arterial. No obstante, se desconoce al momento los efectos que puede tener una dieta alta o baja en cloruros sobre la función y/o expresión de los canales de Cl^- y su impacto sobre la respuesta cardiovascular y renal asociada al desarrollo de HTA. Así como se ha establecido una relación entre el consumo de sodio y elevación de la presión arterial, también se ha adjudicado que el consumo excesivo de sal se asocia a mayor riesgo de eventos cardiovasculares al favorecer el daño de órgano blanco [49]. De esta manera se ha demostrado que un exceso de consumo de sal (ClNa) se asocia a una mayor producción de EROs a nivel renal como también estimula la función de los monocitos-macrófagos con mayor producción de citoquinas inflamatorias (ILs, TNF-alfa, interferones) con predominio del fenotipo M1 sobre el M2, que conducen finalmente a la lesión renal inflamatoria [50-52]. No obstante, se desconoce si el estímulo responsable de este efecto es debido al exceso de sodio o de cloruros o de ambos. De manera similar, a nivel vascular, la ingesta elevada de ClNa en la dieta también conduce a estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial y de las células del musculo liso, conduciendo a su disfunción y remodelado estructural [53,54]. Los estudios realizados en células de músculo liso vascular demostraron que varias citoquinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral-α (TNF-□), la interleuquina 1β y la

Ang II, podrían activar la conductancia de Cl^-, y esta corriente de Cl^- dependería de la expresión de los canales ClC [55]. El flujo de salida de Cl^- a través de ClC disminuiría la concentración de Cl^- intracelular, provocando efectos proinflamatorios mediante la activación de la NADPH oxidasa y de la vía NF-kB [56]. Nuevamente estas evidencias señalan al catión sodio como único responsable de los efectos nocivos de una dieta excesiva crónica de sal como ClNa, no conociéndose aún a ciencia cierta la contribución real del anión Cl- al daño de órgano blanco renal y vascular. En términos de conocimiento que generará nuestro proyecto, podemos mencionar que desde el punto de vista de la salud pública, y teniendo en cuenta que el consumo diario de cloruro sodio en nuestro país (9,8 g en hombres y 12,7 g en las mujeres, datos del Ministerio de Salud de la Nación) supera ampliamente las recomendaciones nacionales e internacionales, el conocimiento sobre la contribución que poseen los aniones Cl^- en la fisiopatogenia de la HTA y del daño renal y vascular, tendría un impacto directo sobre uno de los factores de riesgo para el desarrollo de HTA como es el consumo excesivo de sal, a través de la implementación de medidas dietéticas adecuadas dirigidas al consumo del mismo en todas las etapas de prevención incluido la prevención primordial. Las medidas de restricción de consumo de ClNa (ya sea evitando el consumo de alimentos procesados ricos en ClNa o restringiendo su agregado en las comidas) suelen tener poca adherencia por parte del paciente por diferentes motivos, por lo que las sales sustitutas suelen representar una alternativa para mejorar el cumplimiento de esta medida. En general, estas sales sustitutas solo reemplazan uno o dos tercios del ClNa reemplazándola con el agregado de KCl, manteniendo de esta manera la cantidad de aniones Cl^- que pueden ser aportados. Si bien se ha descripto que el consumo de potasio se asocia a una reducción de la presión arterial, una revisión reciente del grupo Cochrane sobre más de 400 pacientes a partir de estudios clínicos controlados y randomizados, concluyó que la suplementación con sales de cloruro de potasio no modifica significativamente los valores de presión arterial, sumado además al hecho de que las sales a bases de potasio poseen efectos adversos relacionados a un sabor desagradable (amargo, ácido y metálico) que no favorece al adherencia al mismo [57]. En este sentido, los resultados del presente proyecto, podría sentar las bases futuras para implementar medidas correctivas con relación al consumo de sales que contengan Cl^-. Por lo tanto, la confirmación de nuestros objetivos permitirá no solo corroborar el rol del Cl^- en la fisiopatogenia del daño vascular y renal y en el desarrollo de la HTA, sino

también ampliar y/o modificar las recomendaciones actuales con relación al consumo de sales que contienen cloruros.

VI. Metodología (materiales y métodos)

Para evaluar los efectos de un exceso o reducción de sales de cloruros se emplearán ratas wistar de 200-250 grs. Se alimentarán a las ratas durante 3 semanas con:

1) **Control**: dieta normosódica y normoclórica (NaCl 0,4 %) y agua corriente para beber (n=8).
2) **NaCl**: dieta hipersódica e hiperclórica (NaCl 8 % P/P) y agua corriente para beber (n=8).
3) **CitrNa:** dieta hipersódica y normoclórica (citrato de sodio 12 % P/P) y agua corriente para beber (n=8).
4) **KCl + $CaCl_2$ + $MgCl_2$:** dieta hiperclórica y normosódica (KCl 3% + $CaCl_2$ 3,8% + $MgCl_2$ 1,30% P/P) y agua corriente para beber (n=8). El fundamento de utilizar una mezcla equimolar similar a la dieta NaCl pero compuesta de potasio, calcio y magnesio, reside en evitar el uso exclusivo de cloruro de potasio en reemplazo del ión sodio con la finalidad de independizarnos de los probables efectos beneficiosos de un exceso de ingesta de potasio (aunque este hecho todavía es discutido en la actualidad como se describió anteriormente). Por otra parte, si bien hay otros estudios que indican un probable efecto beneficioso de la ingesta de altas cantidades de magnesio y calcio, los mismos son modestos y requieren de una historia de consumo insuficiente y no son del todo consistentes.

Para confirmar los resultados que se obtengan a las 3 semanas de tratamiento y con el objeto de estudiar el efecto de prolongar los tratamientos dietarios, se continuarán los estudios mediante otro protocolo que incluye a los mismos grupos hasta la semana 6 de tratamiento con la finalidad de corroborar si los eventuales cambios observado a las 3 semanas se acentúan a 6 semanas.

DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL y FRECUENCIA CARDÍACA:

Para evaluar los efectos de las distintas dietas sobre los parámetros hemodinámicos, se determinará la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca antes de comenzar los tratamientos y la semana previa al sacrificio (semana 3 y 6) a través del método pletismográfico en la cola de la rata, usando un manguito inflable y un micrófono conectado a un amplificador Grass D.C. (modelo 7DAC, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA) acoplado a un polígrafo (modelo 79D, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA).

Finalizados los períodos experimentales, los animales se sacrificarán y se extraerá la aorta y los riñones. La aorta se dividirá en dos secciones, una se fijará en formaldehído 10% (v/v) en *buffer* PBS (pH: 7,2) para determinaciones histológicas convencionales (tinciones de hematoxilina y eosina, Picrosirius red y/o Masson) e inmunohistoquímicas, y el resto de muestra se congelará en nitrógeno líquido para las determinaciones posteriores. Los riñones se decapsularán y cortarán longitudinalmente. Un riñón se dividirá longitudinalmente en 2 mitades; una porción se fijará en formaldehído 10% (v/v) en *buffer* PBS (pH: 7,2) para determinaciones histológicas convencionales (tinciones de hematoxilina y eosina, Picrosirius red y/o Masson) e inmunohistoquímicas, y otra se colocará en $HClO_4$ 1 M conteniendo EDTA 2 mM para la determinación de glutatión por HPLC. El otro riñón se separará con bisturí en corteza y médula y se congelará en nitrógeno líquido para las determinaciones posteriores.

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL:

Para el estudio de la función renal, tres días previos al sacrificio se colocarán las ratas en jaulas metabólicas para su aclimatación y se recolectarán muestras de orina un día previo al sacrificio durante las 24 horas para la determinación del volumen urinario, osmolalidad urinaria, pH urinario, clearence de creatinina y se calculará la excreción urinaria de anión cloruro y de cationes sodio, potasio, magnesio y calcio. Se extraerán muestras de sangre venosa por vía retro-ocular (bajo anestesia con tiopental) al final del período utilizando heparina como anticoagulante para la determinar la concentración plasmática de sodio, cloruro, potasio, magnesio, calcio y creatinina, relación sodio/potasio, el pH plasmático y la osmolaridad.

Determinaciones en sangre y orina.

Se realizarán en base a lo publicado anteriormente por nuestro grupo de trabajo [58]. Para la determinación de la osmolaridad plasmática y urinaria se utilizará un microosmómetro (MosmetteTM Micro Osmometer). Se determinará por gravimetría el volumen urinario diario (VU) y, a partir de ese resultado, se calculará el VU por minuto: VU min = VU/1440 min.

Las concentraciones urinarias (U) y plasmáticas (PL) de Na^+, Cl^-, Mg^{2+}, K^+, Ca^{2+} y creatinina (Cr) se determinarán utilizando un autoanalizador. El volumen de filtrado glomerular (VFG) se estimará mediante la depuración (*clearance*) de creatinina (CC): CC = (UCr/PLCr).VU min.

Con el fin de estudiar la función tubular, se calcularán la carga filtrada (CF), la excreción urinaria (EU), la reabsorción tubular (RT) y la excreción fraccional (EF) de los diferentes iones, a partir de las siguientes fórmulas estándares (a modo de ejemplo se menciona al sodio):

$CFNa = CC.PLNa$ $\qquad$ $EUNa = VU.UNa$

$RTNa = CFNa - EUNa$ $\qquad$ $EFNa = (EUNa/CFNa).100$

Los parámetros VU, VFG, CF, RT y EU serán normalizados por el peso corporal de cada rata, expresado en kilogramos.

EVALUACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN TEJIDO RENAL Y AORTA:

a. *Determinaciones de la expresión e inmunolocalización de moléculas proinflamatorias iNOS, NF-kB, TNF-α e IL-6 y anti-inflamatorias PARK-7.*

Se determinarán mediante la técnica de Western Blot y por inmunohistoquímica como se describió en trabajos previos utilizando anticuerpos primarios específicos (Abcam) [60].

b. *Determinación de la expresión proteica de receptores AT1 y AT2 de Ang II.*

Se evaluará la expresión proteica mediante Western Blot utilizando anticuerpos primarios específicos.

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES OXIDANTES Y DEL DAÑO OXIDATIVO EN TEJIDO RENAL y AORTA:

Para estudiar la participación de la NOX (NADPH oxidasa) como partícipe de la respuesta inflamatoria renal, mediante la activación de la vía de señalización de NF-kB mediada por las ROS derivadas de su actividad, se evaluarán la producción de anión superóxido, de peróxido de hidrógeno, se evaluarán las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y el daño oxidativo a biomoléculas en este tejido.

a. Determinación de la producción de anión superóxido dependiente de NADPH.

Se determinará en homogenatos libres de mitocondrias (para eliminar la contribución mitocondrial en la producción de anión superóxido) mediante el método de quimioluminiscencia de la lucigenina. La especificidad del ensayo para anión superóxido se determinará realizando las reacciones en ausencia y en presencia de superóxido dismutasa (SOD) para cada muestra [63].

b. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.

Se determinará mediante el ensayo de Amplex Red/HRP [64].

c. Determinación de las expresiones y actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

Las expresiones de estas enzimas se determinarán por Western Blot, y sus actividades siguiendo espectrofotométricamente la autooxidación de la epinefrina para la SOD, el consumo de peróxido de hidrógeno para la CAT y la oxidación enzimática de NADPH para la GPx en homogenatos [65-67].

d. Determinación de los niveles de antioxidantes no enzimáticos.

Se determinará el contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y se calculará el índice GSH/GSSG como indicador del estado *redox*, utilizando un equipo de HPLC acoplado a un detector electroquímico.

e. Determinación del daño oxidativo a lípidos.

Se determinará midiendo el contenido de malondialdehído (MDA) previa derivatización con ácido tiobarbitúrico, utilizando un equipo de HPLC acoplado a un detector fluorométrico [68].

DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES CIC:

Determinación de los niveles proteicos y la inmunolocalización de CIC-5 y de ClC-K a (riñón). Se determinará la expresión proteica mediante Western Blot y su inmunolocalización mediante inmunohistoquímica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO GENERAL

La distribución Gaussiana se evaluará por el método Kolmogorov y Smirnov y para comparar entre los grupos, ANOVA seguido del test Newman-Keuls. Los resultados de las muestras de sangre, orina y de PAM se expresarán como la media ± ESM. El análisis estadístico se realizará por medio del test Kruskal-Wallis (Nonparametric ANOVA) y el test de comparación múltiple de Dunn, para aquellos parámetros con distribución no Gaussiana como los datos histológicos. La comparación de porcentajes se efectuará con tablas de contingencia. Para el análisis de concordancia se utilizará el índice Kappa de Cohen. Los datos se procesarán con el programa Infostat. Los resultados con $P \leq 0,05$ se considerarán estadísticamente significativos

VII. Resultados

A continuación, se detallan los resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo de trabajo en este proyecto:

EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Las ratas controles se mantuvieron normotensas durante las 3 y 6 semanas de tratamiento. La PAS aumentó en los tres grupos experimentales a partir de la segunda semana. Las

diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a los valores basales y del grupo control para las dietas NaCl y Cl.

El grupo NaCl alcanzó los valores más altos de PAS en la sexta semana, mientras que los incrementos de la PAS en los grupos Cl y Na fueron menores que los alcanzados en el grupo NaCl. Como se puede observar en la tabla 1, la PAS en el grupo Na mostró una elevación menor con respecto a los otros dos grupos experimentales.

Presión arterial sistólica				
	Control	**NaCl**	**Na**	**Cl**
Semana 3	125±9	164±8$^{*\&\S}$	133±4$^{\$\&}$	152±7$^{*\&\Delta}$
Semana 6	122±3	166±12$^{**\&\S}$	135±4$^{*\$\&}$	159±10$^{*\Delta\&\S}$
Parámetros de funcionalidad renal excretora				
Diuresis (mL/día/kg)	10±2	78±14*	92±15*	51±21$^{\Delta}$
EUNa (mEq/día/kg)	1,2±0,3	22,9±4,3*	34,4±6,2$^{*\$}$	1,1±0,3$^{\$\Delta}$
EUCl (mEq/día/kg)	1,4±0,3	26,5±5,1*	7,8±1,5$^{*\$}$	1,1±0,3$^{\$\Delta}$
Diuresis (mL/día/kg)	12±3	91±27**	60±12**$^{\$}$	26±7$^{\Delta}$
EUNa (mEq/día/kg)	2,5±0,65	41,46±13,04*	30,98±6,45**	2,61±0,44$^{\$\$\Delta\Delta}$
EUCl (mEq/día/kg)	3,09±1,02	45,90±14,10**	6,64±0,94*$^{\$}$	14,77±5,45

Tabla 1. Evolución temporal de la presión arterial sistólica y parámetros de funcionalidad renal excretora. EU: excreción urinaria; *p<0,05 vs Control; **p<0,01 vs Control; $^{\$}p$<0,05 vs NaCl; $^{\$\$}p$<0,01 vs NaCl; $^{\Delta}p$<0,05 vs Na; $^{\Delta\Delta}p$<0,01 vs Na; $^{\&}p$<0,05 vs t=0; $^{\S}p$<0,05 vs 1^{era} semana.

PARÁMETROS DE FUNCIONALIDAD RENAL EXCRETORA

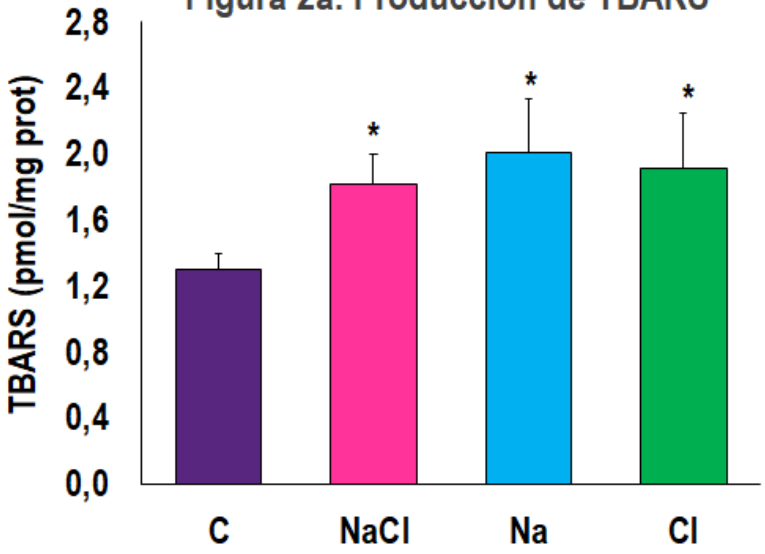
La diuresis aumentó en los tres grupos experimentales con respecto a C durante las 3 y 6 semanas de tratamiento. El clearance de creatinina (ClCr) no se vio afectado en ninguno de los grupos por fuera del rango fisiológico.

En los grupos NaCl y Na se incrementó la EUNa y EUCl respecto al grupo C. En relación al grupo NaCl, en las ratas Na se observó un incremento de la EUNa al cabo de la semana 3, mientras que a las 6 semanas se reduce en comparación con el grupo NaCl. La EUCl fue mayor en las semanas 3 y 6 en el grupo NaCl. El grupo Cl no mostró diferencias significativas con respecto al grupo C durante las 3 y 6 semanas de tratamiento, pero sí en comparación con los otros dos grupos: respecto a los grupos NaCl y Na, presentó una menor EUNa, mientras que la EUCl también fue menor en la semana 3 pero no se vio afectada durante la semana 6 (Tabla 1).

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN CORTEZA RENAL

Tanto para la semana 3 y 6, la producción de TBARS aumentó en la corteza renal en los grupos experimentales respecto al grupo C (Figura 2a, resultados correspondientes a semana 6). Por otro lado, no se modificaron la actividad y la expresión proteica de la isoforma mitocondrial (Figura 2b) y citosólica de la SOD (Figura 2c) y de la CAT (Figuras 2d). Por otra parte, mientras que la expresión proteica de la GPx no se modificó en ningún grupo, la actividad de esta enzima se incrementó en los grupos NaCl y Cl con respecto a los grupos C y Na (Figura 2e, resultados correspondientes a semana 6). Se observó un aumento de la expresión renal de p50-NFkB y AT1R en los grupos de NaCl y Cl en comparación con los otros grupos al cabo de las semanas 3 y 6 (Figura 3 y 4, resultados correspondientes a semana 6). La expresión de PARK7 disminuyó en el grupo Cl en comparación con el grupo C (Figura 5, resultados correspondientes a semana 6).

Figura 2a. Producción de TBARS



Referencias: *p<0,05 versus Control

Figura 2b

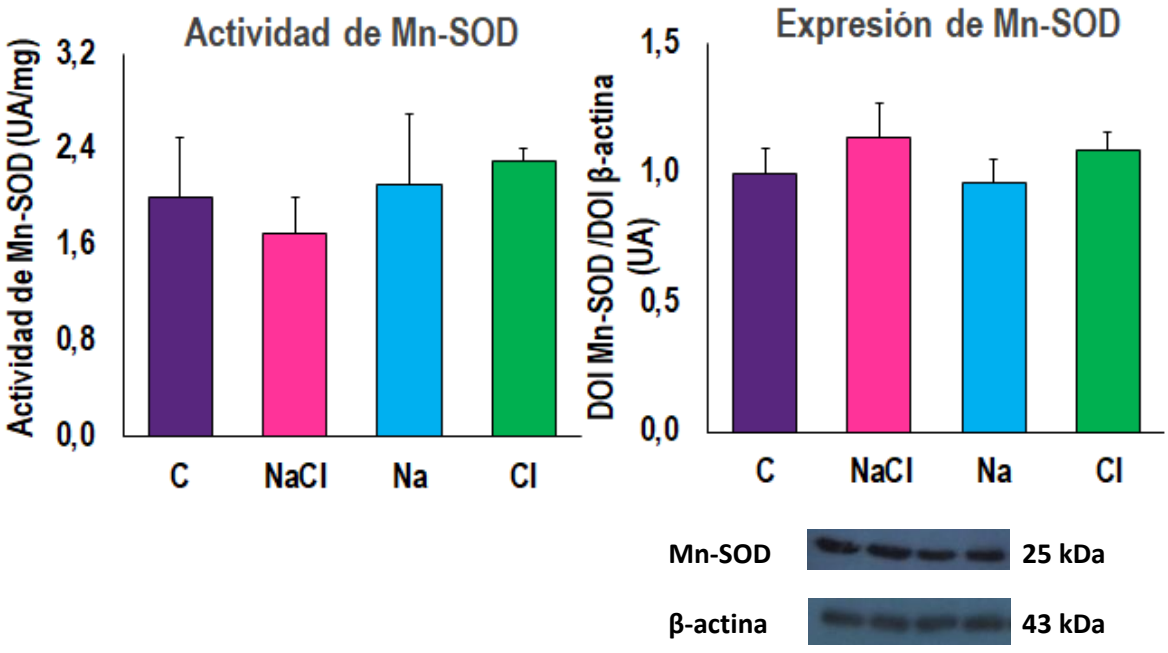


Figura 2c

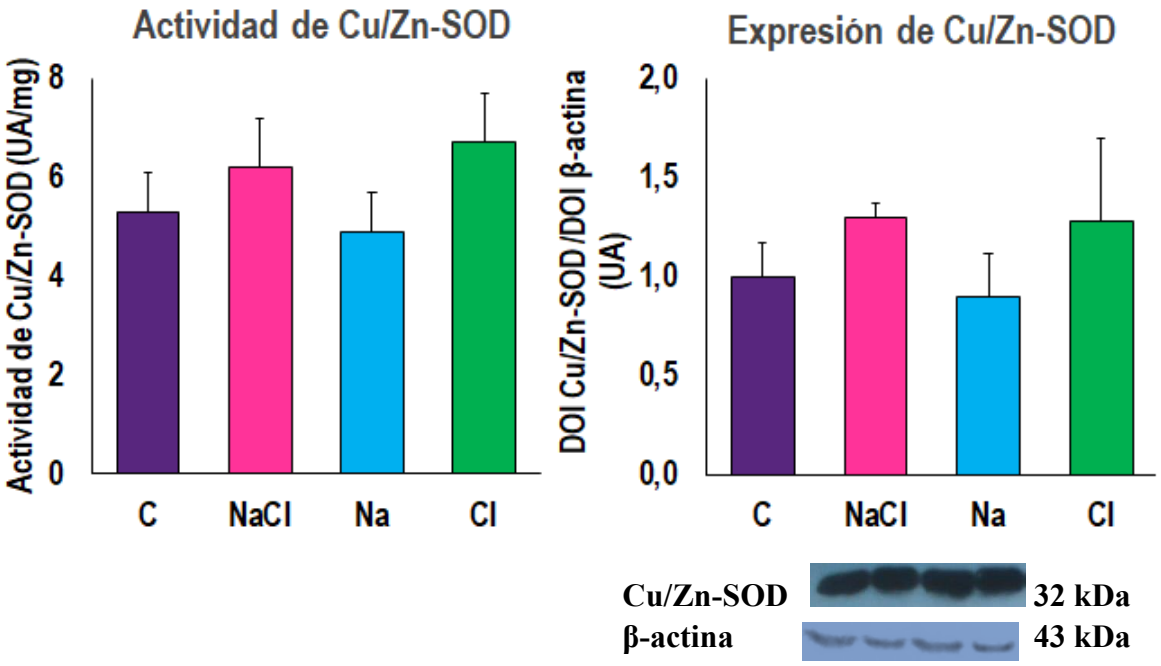


Figura 2d

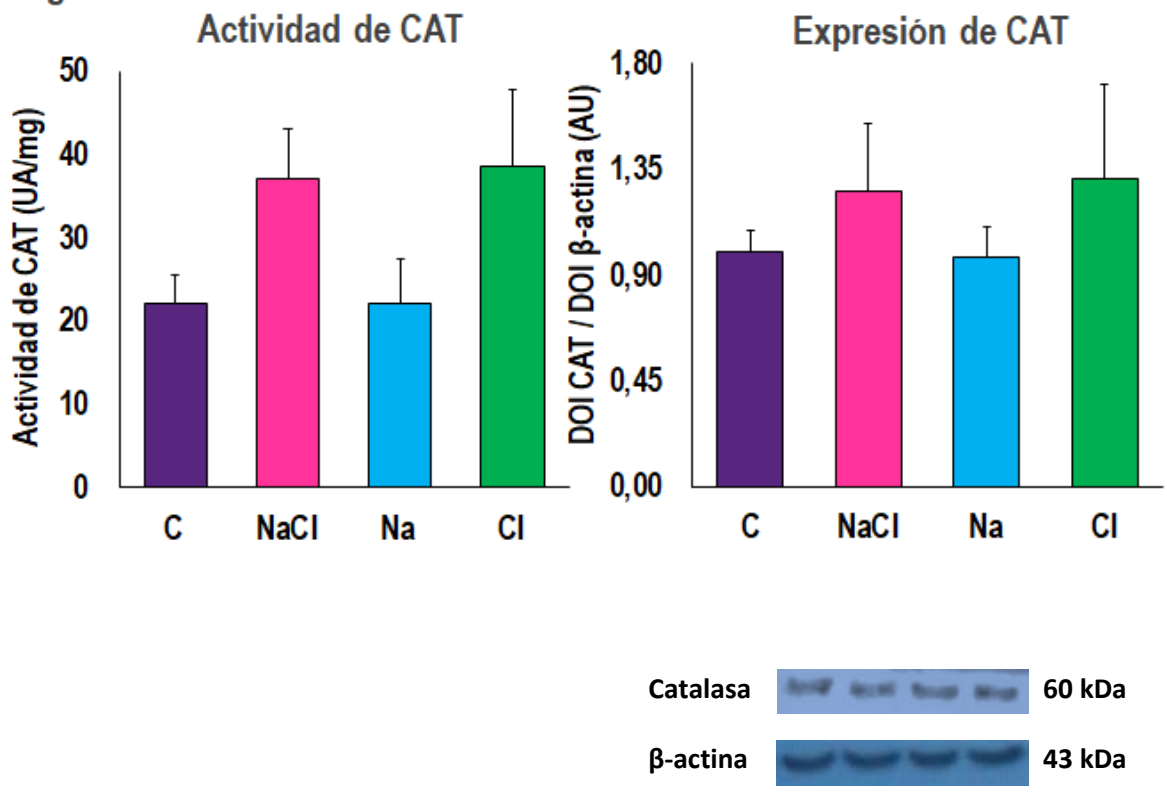
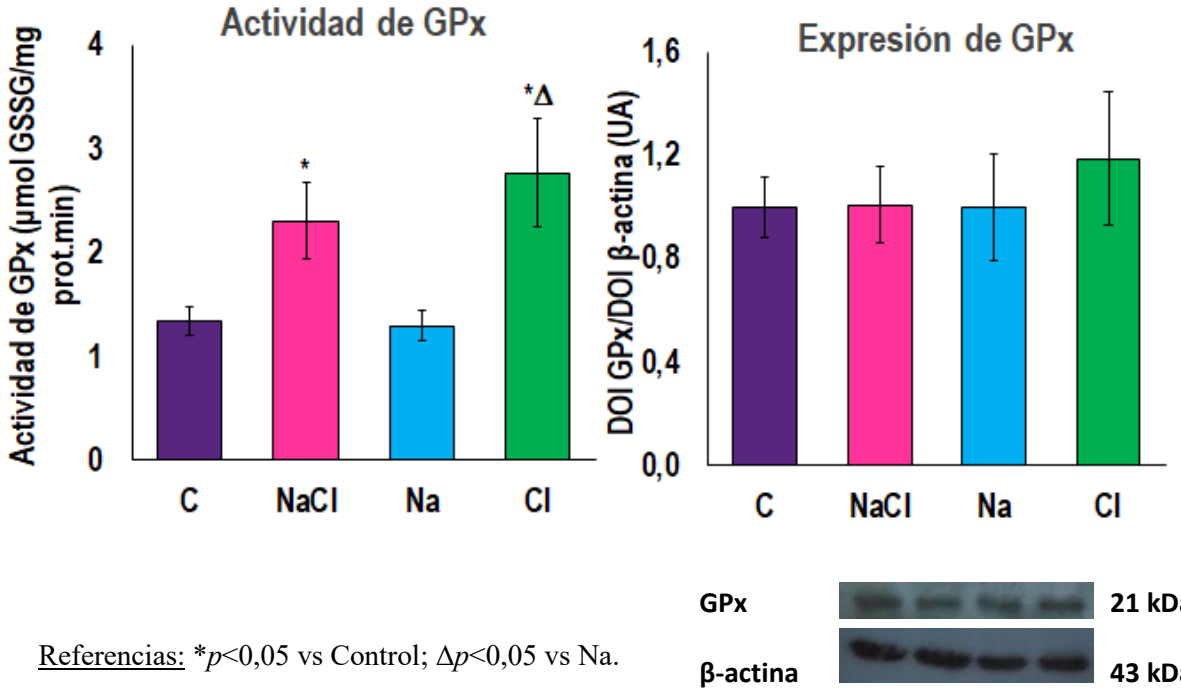


Figura 2e



Referencias: *p<0,05 vs Control; Δp<0,05 vs Na.

Figura 3. Corteza renal

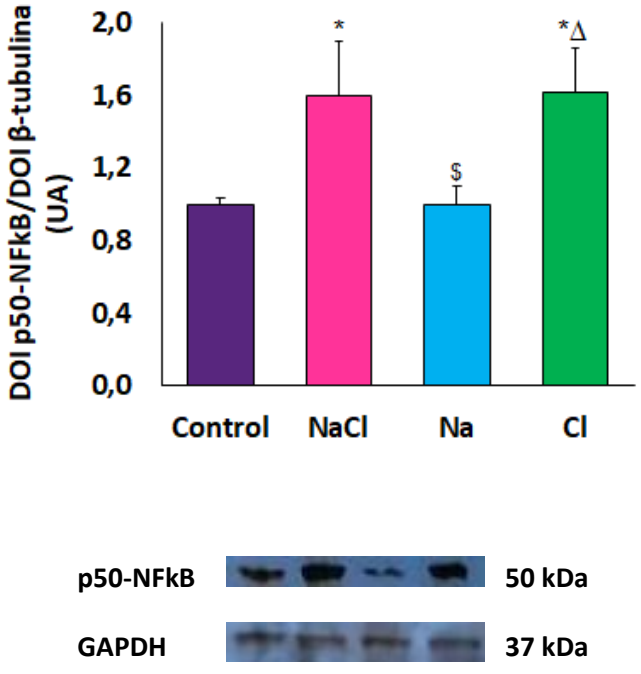
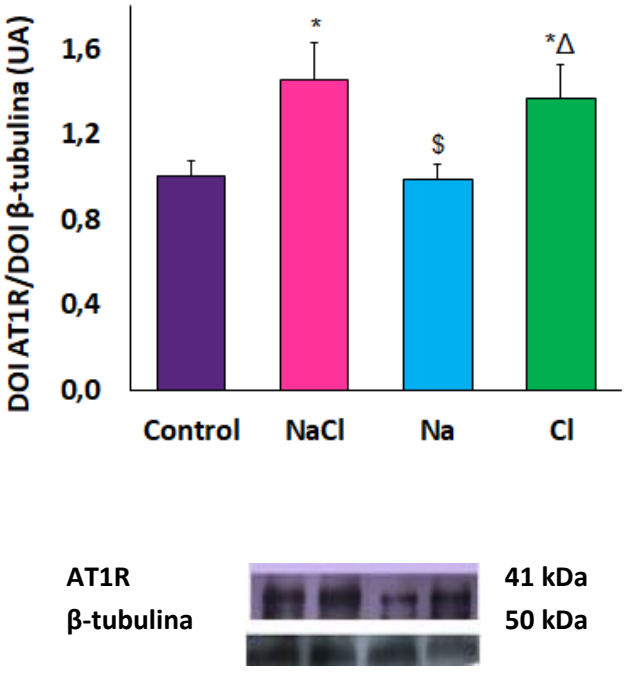
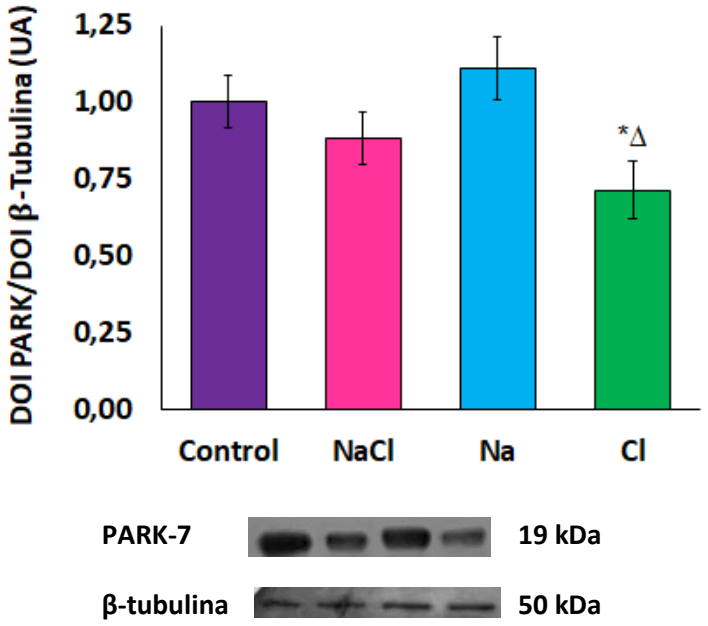


Figura 4. Corteza renal



Referencias: *p<0,05 vs Control; $^{\$}p$<0,05 vs NaCl; $^{\Delta}p$<0,05 vs Na.

Figura 5. Corteza renal



Por último, los grupos NaCl y Cl mostraron una mayor expresión de ClC-K1, mientras que ClC-5 se redujo significativamente en el grupo NaCl en comparación con el grupo C (Figura 6).

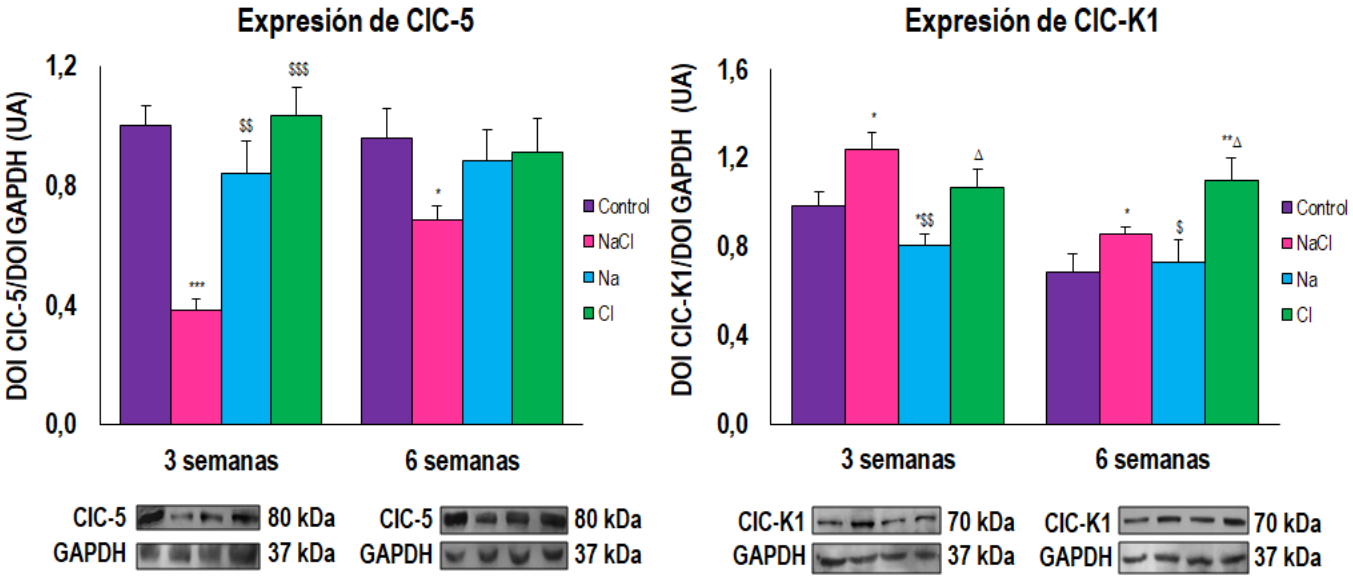


Figura 6. Expresion renal de canales de cloruro ClC-5 y ClC-K1. *p<0,05 vs Control; **p<0,01 vs Control; ***p<0,0001 vs Control; $^{\$}p$<0,05 vs NaCl; $^{\$\$}p$<0,01 vs NaCl; $^{\$\$\$}p$<0,0001 vs NaCl; $^{\Delta}p$<0,05 vs Na.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL PARÉNQUIMA RENAL

En el análisis histológico cualitativo se destaca que los animales de los grupos NaCl y Cl mostraron lesiones tubulointersticiales más pronunciadas caracterizadas por dilatación tubular en comparación al grupo C durante las semanas 3 y 6 de tratamiento. Además, en ambos grupos, también se observó dilatación del espacio urinario respecto al grupo C. Por último, en el grupo Na se apreció la presencia de lesiones menos pronunciadas respecto a los otros grupos experimentales.

VIII. Conclusión y discusión

En base a los experimentos realizados, se comprobó que:

- ✓ La sobrecarga de NaCl y una dieta rica en cloruros se asocian a la hipertensión arterial;
- ✓ No solo una dieta alta en sodio sino también en cloruro se asocian con un estrés oxidativo elevado en la corteza renal, tal como se demostró en el incremento de la peroxidación lipídica, representado por el aumento en la producción de TBARS;
- ✓ La sobrecarga de cloruro se asocia a una mayor actividad de la enzima glutatión peroxidasa, lo que sugiere un estado prooxidante importante a nivel renal en comparación con el exceso de sodio;
- ✓ La expresión de PARK7 disminuyó en el grupo Cl en comparación con el grupo control.
- ✓ Los grupos NaCl y Cl mostraron una mayor expresión de NF-kB, AT1R y ClC-K1, mientras que ClC-5 se redujo en el grupo NaCl en comparación con el grupo control.

En conclusión, estos resultados respaldan la hipótesis de que la sobrecarga crónica de Cl^- sería corresponsable, junto con el Na^+, de desencadenar daño oxidativo e inflamatorio renal y aumentar la presión arterial. Los canales ClC-K1 y ClC-5 estarían involucrados en los

efectos deletéreos ante el consumo crónico excesivo de este anión. Estos hallazgos refuerzan la importancia de reducir ambos iones como medida no farmacológica para la prevención y control de la HTA.

IX. Agradecimientos

Agradecemos a los apoyos institucionales y financieros recibidos para poder llevar a cabo el desarrollo del presente estudio: Fundación Barceló Convocatoria 2023, PICT 2021, CONICET-PIP 2022.

X. Bibliografía

[1] GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Lancet 2018;392:1923-94

[2] PURE investigators. NEJM 2014; 371:601-11

[3] He FJ, Mac Gregro GA. J Hum Hypertens 2002;16(11):761-70

[4] Israili ZH, Hernandez-Hernandez R, Valasco M. Am J Ther. 2007; 14: 121–34

[5] Haddy FJ, Pamnani MB. J Am Coll Nutr. 1995 Oct;14(5):428-38.

[6] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. 2012a.

[7] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. 2012b.

[8] Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, et al. NEJM 2001 Jan 4;344(1):3-10)

[9] Ambard L, Beaujard E (1904) Arch Gen Med 1:520–533.

[10] Higgins H (1908) Lancet 171:1136–1142.

[11] Kurtz TW, Al-Bander HA, Morris RC Jr (1987) N Engl J Med 317(17):1043–1048.

[12] Luft FC, Zemel MB, Sowers JA, Fineberg NS, Weinberger MH (1990). J Hypertens 8(7):663–670.

[13] Shore AC, Markandu ND, MacGregor GA (1988). J Hypertens 6(8):613–617.

[14] Berghoff RS, Geraci AS (1929) BMJ 56:395–397.

[15] McCallum L, Lip S, Padmanabhan S. Pflugers Arch. 2015 Mar;467(3):595-603.

[16] McCarty MF. Medical Hypotheses (2004) 63, 138–148.

[17] Toma de posición sobre ingesta de sodio como componente de las aguas naturales. Implicancia sobre la presión arterial. Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial. 2014.

[18] Sato Y, Ogata E, Fujita T. Hypertension 1991;18:622–9.

[19] Sharma AM, Schattenfroh S, Thiede HM, et al. Hypertension 1992;19:541–8.

[20] Kotchen TA, Kotchen JM. Am J Clin Nutr 1997;65:708S–11S.

[21] Brunner HR, Laragh JH, Baer L, et al. N Engl J Med 1972;286:441–9.

[22] Graudal NA, Galloe AM, Garred P. JAMA 1998;279:1383–91.

[23] Watson RD, Esler MD, Leonard P, et al. Clin Exp Pharmacol Physiol 1984;11:163–70.

[24] Lilavivathana U, Campbell RG. Arch Intern Med 1980;140:1485–9

[25] He FJ, Markandu ND, MacGregor GA. Hypertension 2001;38:321–5

[26] MacGregor GA. Br J Clin Pharmacol 1987;23(Suppl 1):21S–6S.

[27] He FJ, Markandu ND, Sagnella GA, et al. Hypertension 1998;32:820–4.

[28] Barzel US, Massey LK. J Nutr 1998;128:1051–3.

[29] Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. Clin Exp Pharmacol Physiol 1991;18:393–6

[30] Sharma AM, Schorr U, Oelkers W, et al. Am J Hypertens 1993;6:780–5.

[31] Yang H, Huang LY, Zeng DY, Huang EW, Liang SJ, Zhou JG. Hypertension. 2012; 60(5):1287-93.

[32] Smith JM, Jones AW (1985). Circ Res 56(4):507–516

[33] Casteels R, Kitamura K, Kuriyama H, Suzuki H. J Physiol. 1977;271(1):41-61

[34] Klöckner U, Isenberg G. Pflugers Arch. 1991; 418(1-2):168-75

[35] Van RC, Lazdunski M (1993). Pflugers Arch 425(1–2):156–163

[36] Takenaka T, Epstein M, Forster H, et al. (1992). Am J Physiol 262(5 Pt 2):F799–F806

[37] Nelson MT, Conway MA, Knot HJ, Brayden JE (1997). J Physiol 502(Pt 2):259–264

[38] Lamb FS, Barna TJ (1998). Am J Physiol 275(1 Pt 2):H151–H160

[39] Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Cell. 2001 Feb 23;104(4):545-56

[40] Duan DD. Acta Pharmacol Sin. 2011;32(6):675-8

[41] Kitamura K et al. Jpn J Pharmacol 85:351-7; 2001

[42] Stölting G et al. Front Physiol 5(378): 1-18, 2014

[43] Estévez R, Boettger T, Stein V, et al. Nature. 2001 Nov 29;414(6863):558-61.

[44] Kieferle S, Fong P, Bens M, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1994 Jul 19;91(15):6943-7.

[45] Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, et al. Nat Genet. 1997 Oct;17(2):171-8

[46] Jeck N et al. Hypertension 43: 1175-81, 2004

[47] Lu J, Xu F, Zhang Y, et al. J. Cell Mol Biol Lett. 2018 Jun 27;23:29

[48] Klemens CA et al. Hypertension 2021 Feb;77(2):582-593

[49] Nista F, Gatto F, Albertelli M, et al. Int J Environ Res Public Health. 2020 Apr 19;17(8):2811.

[50] Wenzel U, Ehmke H, Bode M. Cell Tissue Res. 2021. doi: 10.1007/s00441-020-03409-0.

[51] Lu X, Crowley SD. Curr Hypertens Rep. 2018 Oct 30;20(12):103

[52] Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, et al. J Clin Invest. 2015;125:4223– 4238.

[53] Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Compr Physiol. 2015 Dec 15;6(1):215-54

[54] Patik JC, Lennon SL, Farquhar WB, Edwards DG. Nutrients. 2021 Jan 19;13(1):270

[55] Matsuda JJ, Filali MS, Moreland JG, Miller FJ, Lamb FS. J Biol Chem. 2010, 23;285(30):22864-73.

[56] Miller FJ Jr, Filali M, Huss GJ, et al. Circ Res. 2007; 101:663–671.

[57] Dickinson HO, Nicolson DJ, et al. J. Cochrane Database Syst Rev. 2006;(3):CD004641

[58] Rukavina Mikusic, N. L. et al. *J. Nutr. Biochem*. 51, 47–55 (2018).

[59] Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Cao G, et al. Biotechnic & Histochemistry 2016;91(8):510-521

[60] Rosón, M. I. et al. Hypertens. Res. 31, 707–715 (2008)

[61] Barboza TC, Sotto MN, Kanashiro-Galo L, et al. Mycopathologia 2020; 185 (3): 477-483

[62] Li JM, Wheatcroft S, Fan LM, et al. *Circulation* 109, 1307–1313 (2004).

[63] Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 534–541 (1983).

[64] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126 (1984).

[65] Flohé L, Günzler WA. *Methods Enzymol.* 105, 114–121 (1984).

[66] Rodriguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 656, 311–318 (1994).

[67] Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 155– 161 (1988).

[68] Toblli JE, Cao G, Olivieri L, et al. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 3631–3640 (2010).