



FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



**FISIOPATOLOGIA DE LA HIPERTENSION ARTERIAL Y LA INFLAMACION
RENAL Y VASCULAR PROVOCADA POR DIETAS CON SOBRECARGA DE
FRUCTOSA Y SAL. ALTERACIONES MOLECULARES DESENCADENADAS
POR LOS IONES CLORURO Y SODIO Y LA SOBRECARGA DE FRUCTOSA
EN LA DIETA**

DIRECTOR: Dra. María Inés Rosón / Dr. Nicolás Martín Kouyoumdzian

INVESTIGADORES COLABORADORES: Est. Gabriel Robbesaul, Dra. Paula Denise Prince, Est. Gabriel Kim, Dr. Belisario Fernández, Dra. Mónica Galleano, Dr. Marcelo R. Choi.

SEDE-LUGAR: Instituto Alberto C. Taquini de Investigaciones en Medicina Traslacional (IATIMET)

PERIODO: 2018-2020

CONTACTO DEL AUTOR: nicokouy214@gmail.com

Índice

- I. Resumen /Abstract
- II. Introducción:
 - a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización
 - b. Justificación y Relevancia
 - c. Objetivos: General y Especifico
 - d. Marco conceptual
- III. Metodología
 - a. Tipo de estudio
 - b. Muestra
 - c. Ámbito de estudio
 - d. Fuentes e instrumento de recolección de datos
 - e. Procesamiento y Análisis de la información
- IV. Resultados
- V. Discusión y Conclusión
- VI. Bibliografía
- VII. Anexos

I. Resumen /Abstract

Se desconoce el papel del anión cloruro en los efectos deletéreos del consumo excesivo de sal y si sus efectos son independientes de la presencia del sodio.

Objetivo: discernir los efectos propios de la sobrecarga de cloruro, y de sodio, en la dieta sobre: la presión arterial sistólica (PAS), la función renal y marcadores de estrés oxidativo a nivel renal: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), y enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

Materiales y Métodos: ratas Wistar macho (n=8/grupo) recibieron cuatro dietas durante tres semanas: estándar: **Control**; alta en cloruro de sodio: **NaCl** (8% P/P en la comida); hipersódica sin cloruro: **Na₃C₆H₅O₇** (Citrato de Sodio, 11,8%); hiperclórica sin sodio: **KCl/CaCl₂/MgCl₂** (3,8%; 3,06% y 1,30%, respectivamente). Se midió diuresis de 24 horas. En corteza renal, se evaluó la producción de TBARS y la actividad y expresión de SOD, CAT y GPx. Análisis estadístico: ANOVA, con test de Tukey a posteriori.

Resultados: en las tres dietas se observó un incremento significativo de la diuresis (mL/día/kg, **Control**: 10±2; **NaCl**: 78±14*; **Na₃C₆H₅O₇**: 92±15*; **KCl/CaCl₂/MgCl₂**: 51±21*, *p<0,05 vs C) mientras que la PAS aumentó significativamente sólo en los grupos que recibieron Cl⁻ (mmHg **Control**: 125±9; **NaCl**: 164±8*; **Na₃C₆H₅O₇**: 133±4; **KCl/CaCl₂/MgCl₂**: 152±7*). Se observó un incremento en la producción de TBARS en corteza renal (mol_{TBARS}/mg_{prot} × (10¹²): **Control**: 1,30±0,10; **NaCl**: 1,82±0,18*; **Na₃C₆H₅O₇**: 2,01±0,32*; **KCl/CaCl₂/MgCl₂**: 1,91±0,34*) sin cambios en la actividad ni expresión de SOD y CAT. La actividad de la GPx resultó superior en los grupos que recibieron Cl⁻ (μmol_{GSSG}/mg_{prot}/min, **Control**: 1,34±0,14; **NaCl**: 2,31±0,37*; **Na₃C₆H₅O₇**: 1,30±0,14; **KCl/CaCl₂/MgCl₂**: 2,77±0,52*).

Conclusión: Si bien el reemplazo de Cl⁻ por citrato provoca una disminución significativa de la PAS, se observan alteraciones en el estado oxidativo debido a la peroxidación lipídica a nivel de corteza renal. Estos hallazgos confirman el rol del anión Cl⁻ en el desarrollo de un mayor estado prooxidante a nivel renal respecto a la sobrecarga de sales de Na⁺.

II. Introducción:

a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización

El anión cloruro (Cl^-) tiene un papel importante en la hipertensión, que fue descrito ya en 1904 por Ambard y Beaujard y en 1908 por Higgins, quienes señalaron que la hipertensión se asocia íntimamente con "retención de cloro".^{1,2} 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^- .³⁻⁵ Un estudio clínico pionero demostró que el Cl^- fue el principal componente del aumento en la presión arterial, a partir de la observación de que el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) no tuvo el mismo efecto presor como el cloruro de sodio (NaCl) en personas hipertensas.⁶ Kurtz y col. demostraron que el aumento de la presión sanguínea en respuesta a una dieta alta en sodio (dieta con 240 mmol NaCl por día; 5,52 g Na^+) era suprimida a partir de la sustitución de una cantidad equimolar de Na^+ por citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$).³ Por su parte, Luft y col. en el año 1990, demostraron un efecto hipertensor del NaCl , pero no del NaHCO_3 , al igual que Shore y col. en el año 1988, quienes informaron que la ingesta de NaCl indujo un mayor aumento de la presión arterial que la ingesta de fosfato de sodio.^{4,5} Evidencias recientes sugieren que el componente Cl^- del NaCl puede tener un papel más específico en la hipertensión arterial "sal sensible", independiente del efecto hipertensógeno del sodio y que incluso puede potenciar el efecto del sodio en forma aditiva, como componente de la sal NaCl .⁷⁻¹²

b. Justificación y Relevancia

Si bien se conoce poco acerca de la participación del Cl^- en la génesis o desarrollo de la hipertensión, está descrito que los canales ClC-K a/b son reguladores esenciales del anión Cl^- a nivel renal.¹³ Estos canales constituyen un subgrupo de la superfamilia de canales de cloruro ClC voltaje-dependientes, los cuales se expresan de forma ubicua en casi todas las células eucariotas y funcionan como canal de aniones en la membrana plasmática de las células o como intercambiador Cl^-/H^+ en las vesículas intracelulares.¹⁴ Los ClC pueden funcionar como un componente clave de los canales reguladores del volumen, como un transportador de anión superóxido y/o interactuando con la NADPH oxidasa (NOX) y, finalmente, como un regulador de otros transportadores.¹⁵ De esta manera, el anión Cl^- a través de los canales ClC está implicado en la regulación de la actividad eléctrica, el volumen celular, la

proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis, el pH intracelular y el estado *redox* celular.¹⁶⁻²¹ El flujo de Cl⁻ a través de los ClC-K a/b expresados a nivel renal en vesículas intracelulares (y que colocalizan con las enzimas electrogénicas NOXs) evita la depolarización de la membrana al compensar las cargas del flujo de electrones generado por las NOXs. Esto conduce a un estado prooxidante y proinflamatorio, ya que las ROS generadas contribuyen a la activación de vías de señalización proinflamatorias sensibles al estado *redox*, entre ellas las del factor de transcripción NF-κB y de ERK a/b.^{15,22} El efecto de retroalimentación positiva entre la producción de ROS derivadas de las NOX y la activación de NF-κB ha sido ampliamente estudiado.²³⁻²⁷

A partir de todos estos antecedentes, planteamos la hipótesis que el anión Cl⁻ participaría, además del sodio, en la respuesta inflamatoria ante una sobrecarga aguda, y en el aumento en la producción de especies oxidantes a nivel renal en modelos experimentales de sobrecarga crónica de NaCl. Estas alteraciones deberían ser atenuadas/disminuidas tanto si se reemplaza el anión Cl⁻ por citrato (mediante la administración de citrato de sodio, Na₃C₆H₅O₇), como el catión Na⁺ por otros iones (mediante la administración de cloruro de potasio, KCl).

c. Objetivos: General y Especifico

Primera parte

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que una sobrecarga aguda de Cloruro de Sodio induce inflamación renal, pero se desconoce si el anión cloruro (Cl⁻) es partícipe necesario en dicho efecto.²⁸

Además, hemos reportamos que la sobrecarga de fructosa también induce inflamación renal, ignorándose si la misma está ligada al aumento de la tasa de reabsorción de Na⁺ y de Cl⁻.²⁹

A partir de estos antecedentes, planteamos nuestros objetivos:

- Demostrar *in vivo* la contribución del anión cloruro (Cl⁻) en el proceso de inflamación renal inducido por una sobrecarga aguda de NaCl.
- Evaluar la atenuación de los efectos agudos inflamatorios renales al reemplazar el anión Cl⁻ por el citrato.
- Evaluar la contribución de la fructosa como estimulante de los efectos deletéreos renales del NaCl en el modelo de sobrecarga aguda.

Segunda parte

Nuestros objetivos son:

- Evaluar la participación del anión Cl^- en la respuesta inflamatoria y en el desarrollo de estrés oxidativo en riñón utilizando el modelo experimental de sobrecarga crónica de NaCl o de sales con reemplazo del anión Cl^- o del catión Na^+ .
- Evaluar el daño y alteraciones en la función excretora renal inducidos por la sobrecarga crónica de NaCl, de sales con reemplazo del anión Cl^- o del catión Na^+ .

d. Marco conceptual

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado los efectos agudos y crónicos proinflamatorios y profibróticos que una sobrecarga de NaCl provoca a nivel renal.^{28,30-32} En este sentido, una dieta alta en sodio induce una respuesta proinflamatoria a nivel renal con mayor activación del gen del angiotensinógeno y aumento del estrés oxidativo que conducen al desarrollo de hipertensión arterial.³³⁻³⁵ Además, podría haber estimulación de canales de cloruro, en cuyo caso se podría potenciar el efecto proinflamatorio del NaCl.

Sin embargo, hasta el día de hoy no están descriptos ni se han estudiado los posibles efectos dañinos del anión Cl^- en el riñón.

III. Metodología

a. Tipo de estudio

Estudio experimental en animales de laboratorio (investigación básica)

b. Muestra

Se trabajó con el animal entero (ensayos *in vivo*) y muestras de plasma, orina, riñón hemiseccionado conservado en formaldehído para inmunohistoquímica y corteza renal conservada a -80°C para realización de Western Blot.

c. Ámbito de estudio

Primera parte

Ratas Wistar macho ($n=5/\text{grupo}$) fueron aleatoriamente distribuidos en diferentes grupos experimentales, que recibieron distintas soluciones a un flujo de $0,05 \text{ mL} / \text{min} / 2 \text{ horas}$. Se trabajó con 6 tratamientos:

a) Control: C

- b) Cloruro de Sodio (NaCl) 1M
- c) Citrato de Sodio (NaCit) 0,33M
- d) Fructosa (F) 0,5M
- e) NaCl+F
- f) NaCit+F.

Se midió presión arterial media (PAM), Volumen de filtrado glomerular estimado por el Clearance de Creatinina (ClCr), la Reabsorción Tubular de Sodio, la Reabsorción Tubular de Cloruro, y la Expresión tubular de Angiotensina II, Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFβ) y el Factor Nuclear kappa beta (NF-κB) por inmunohistoquímica. Los resultados de Densidad Óptica Integrada (DOI) de la inmunoexpresión de los marcadores inflamatorios están expresados en Unidades Arbitrarias (UA). Los resultados fueron expresados como promedio ± SEM.

Segunda parte

Para cumplir los objetivos planteados, trabajamos con ratas macho Wistar de 200-230 g de peso corporal, del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, alimentadas con dieta balanceada (0,4% de NaCl), dieta hipersódica-hiperclórica, hipersódica sin cloruro o bien, hiperclórica sin sodio, durante tres semanas. Los animales fueron divididos aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos experimentales (n=8 por grupo).

- a) C (control): dieta balanceada y agua corriente para beber.
- b) NaCl: sobrecarga de Cloruro de Sodio en la comida (8% P/P) y agua corriente para beber.
- c) Na₃C₆H₅O₇: sobrecarga de Citrato de Sodio (11,8% P/V) en la comida, de tal manera que los miliequivalentes de Na⁺ administrados sean iguales al del grupo de NaCl, y agua corriente para beber.
- d) KCl/CaCl₂/MgCl₂: sobrecarga de Cloruro de Potasio, Cloruro de Calcio y Cloruro de Magnesio (3,06%; 3,80% y 1,30% P/P, respectivamente) en la comida, de tal manera que los miliequivalentes de Cl⁻ administrados sean iguales al del grupo de NaCl, y agua corriente para beber.

d. Fuentes e instrumento de recolección de datos

Basalmente y cada siete días, se registrará la presión arterial indirecta por el método de la cola. Los animales serán entrenados al procedimiento de medición de PAS durante los cuatro días previos al día de la toma.

Para el estudio de la función renal, en la última semana de tratamiento se colocarán las ratas en jaulas metabólicas y se recolectarán muestras de orina durante períodos de 24 horas para la determinación del volumen urinario, osmolalidad urinaria, pH urinario, depuración de creatinina, carga filtrada, reabsorción tubular y excreción urinaria de anión cloruro y de catión sodio. Se extraerán muestras de sangre al final del período utilizando heparina como anticoagulante para la determinar la concentración plasmática de sodio, cloruro y creatinina, el pH plasmático y la osmolaridad.

Finalizado el período experimental, los animales serán sacrificados y se les extraerán los riñones rápidamente, se decapsularán y cortarán longitudinalmente. Un riñón se dividirá en una porción que se fijará en formaldehído 10% (v/v) en *buffer* PBS (pH: 7,2) para determinaciones inmunohistoquímicas, otra se fijará en paraformaldehído 4% (v/v) en *buffer* PBS (pH: 7,4) para determinaciones de inmunofluorescencia y otra que se colocará en HClO₄ 1 M conteniendo EDTA 2 mM para la determinación de glutatión por HPLC. El otro riñón se separará en corteza y médula. Se realizará la toma de una muestra de 1 mm³ de corteza con bisturí y se colocará en tubo *ependorf* con glutaraldehído para microscopía electrónica y el resto de muestra se congelará en nitrógeno líquido para las determinaciones posteriores.

Las determinaciones en plasma y orina se realizarán en base a lo publicado anteriormente por nuestro grupo de trabajo.^{28-29,32,36} 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: $VU \text{ min} = VU/1440 \text{ min}$.

Las concentraciones urinarias (U) y plasmáticas (PL) de Na⁺, Cl⁻ y creatinina (Cr) se determinarán utilizando un autoanalizador. El volumen de filtrado glomerular (VFG) se estimará mediante la depuración (*clearance*) de creatinina (CC): $CC = (UCr/PLCr) \cdot VU \text{ min}$.

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:

$$CFNa = CC \cdot PLNa$$

$$EUNa = VU \cdot UNa$$

$$RTNa = CFNa - EUNa$$

$$EFNa = (EUNa/CFNa) \cdot 100$$

$$\text{CFCl} = \text{CC} \cdot \text{PLCl}$$

$$\text{EUCI} = \text{VU} \cdot \text{UCI}$$

$$\text{RTCl} = \text{CFCl} - \text{EUCI}$$

$$\text{EFCI} = (\text{EUCI} / \text{CFCl}) \cdot 100$$

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

Las expresiones de estas enzimas se determinarán por Western Blot, y sus actividades siguiendo espectrofotométricamente la autooxidación de la epinefrina para la SOD,³⁷ el consumo de peróxido de hidrógeno para la CAT³⁸ y la oxidación enzimática de NADPH para la GPx³⁹ en homogeneizados de corteza y de médula renal.

e. Procesamiento y Análisis de la información

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 PAS se expresarán como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para aquellos parámetros con distribución no Gaussiana como los datos histológicos, el análisis estadístico se realizará por medio del test Kruskal-Wallis (Nonparametric ANOVA) y el test de comparación múltiple de Dunn. Los datos se procesarán con el programa InfoStat, versión 2018. Los resultados con $p < 0,05$ se considerarán estadísticamente significativos.

IV. Resultados

Primera parte

Tabla 1: Presión Arterial Media y Parámetros de funcionalidad renal

	Control	NaCl	NaCit	F	NaCl+F	NaCit+F
PAM (mmHg)	77+2	77+3	61+5	80+8	110+5 *	66+3
ClCr (mL/min)	1,98+0,10	2,48+0,12 *	1,87+0,36	2,20+0,30	2,68+0,40 *	1,64+0,31
RTNa ($\mu\text{Eq}/\text{min}$)	211+58	356+31 *	311+56	224+25	389+64 *	197+48
RTCl ($\mu\text{Eq}/\text{min}$)	186+46	307+49 *	139+42	168+28	274+58 *	182+53

* $p < 0,05$ respecto al grupo C o F

Figura 2: Inmunoexpresión de Angiotensina II intrarrenal: imágenes representativas (400x) y cuantificación correspondiente

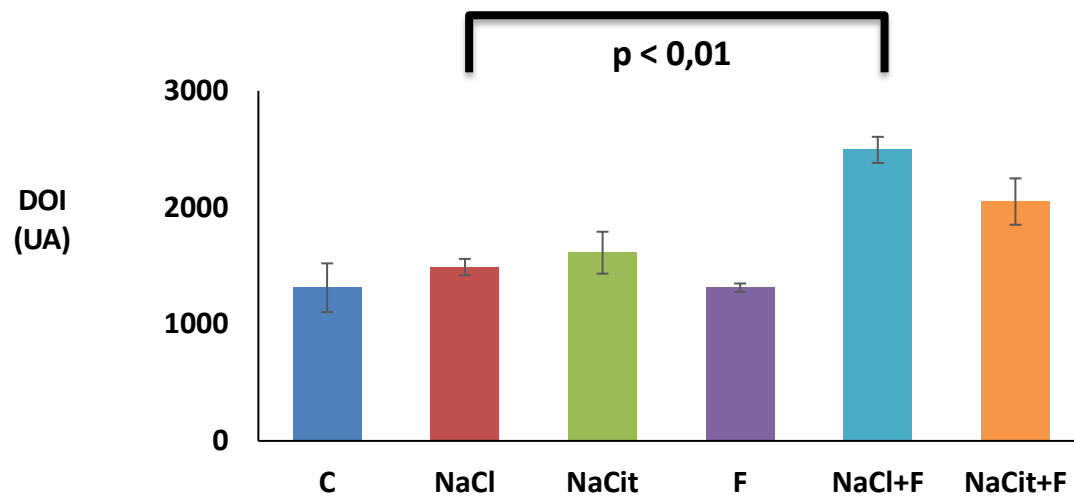
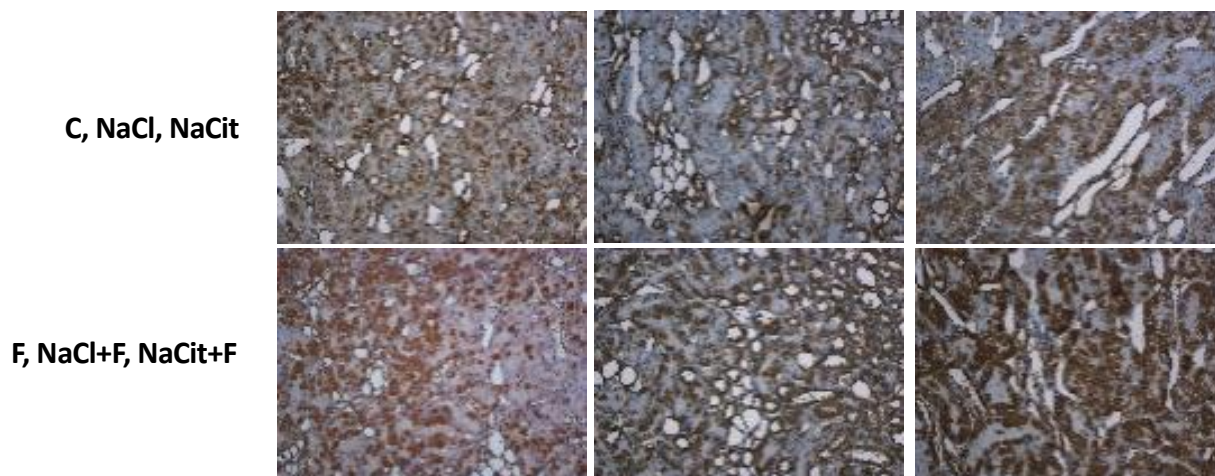


Figura 3: Inmunoexpresión de TGFβ intrarrenal: imágenes representativas (400x) y cuantificación correspondiente

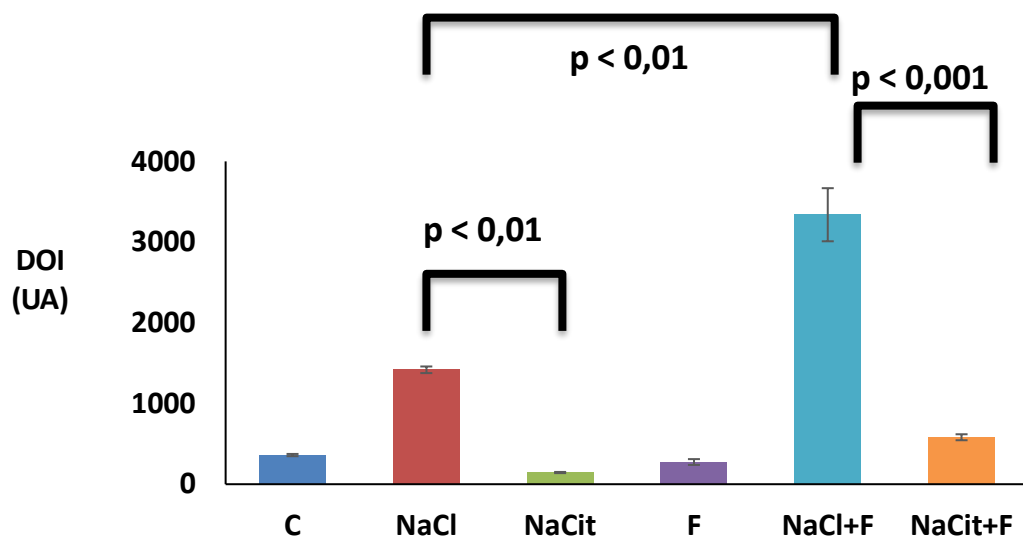
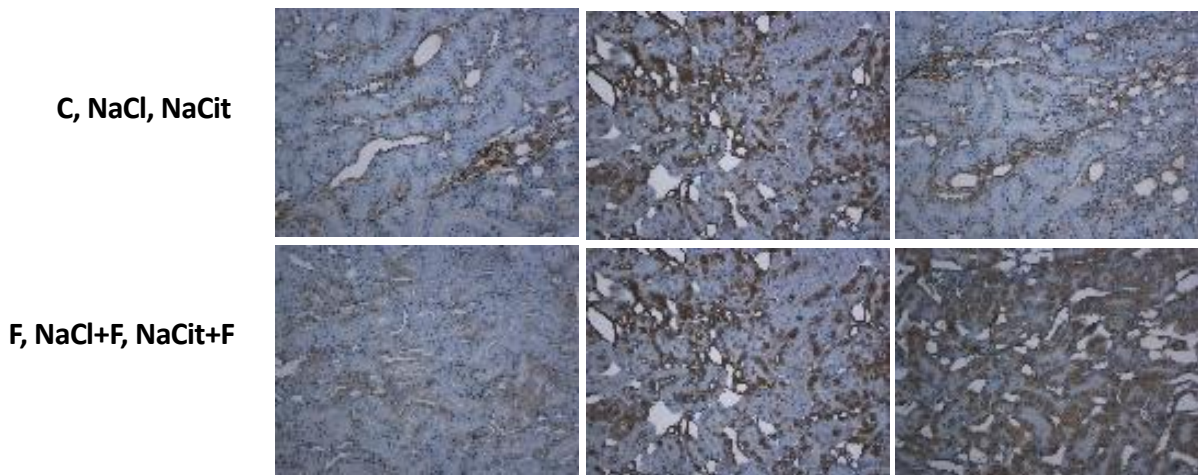
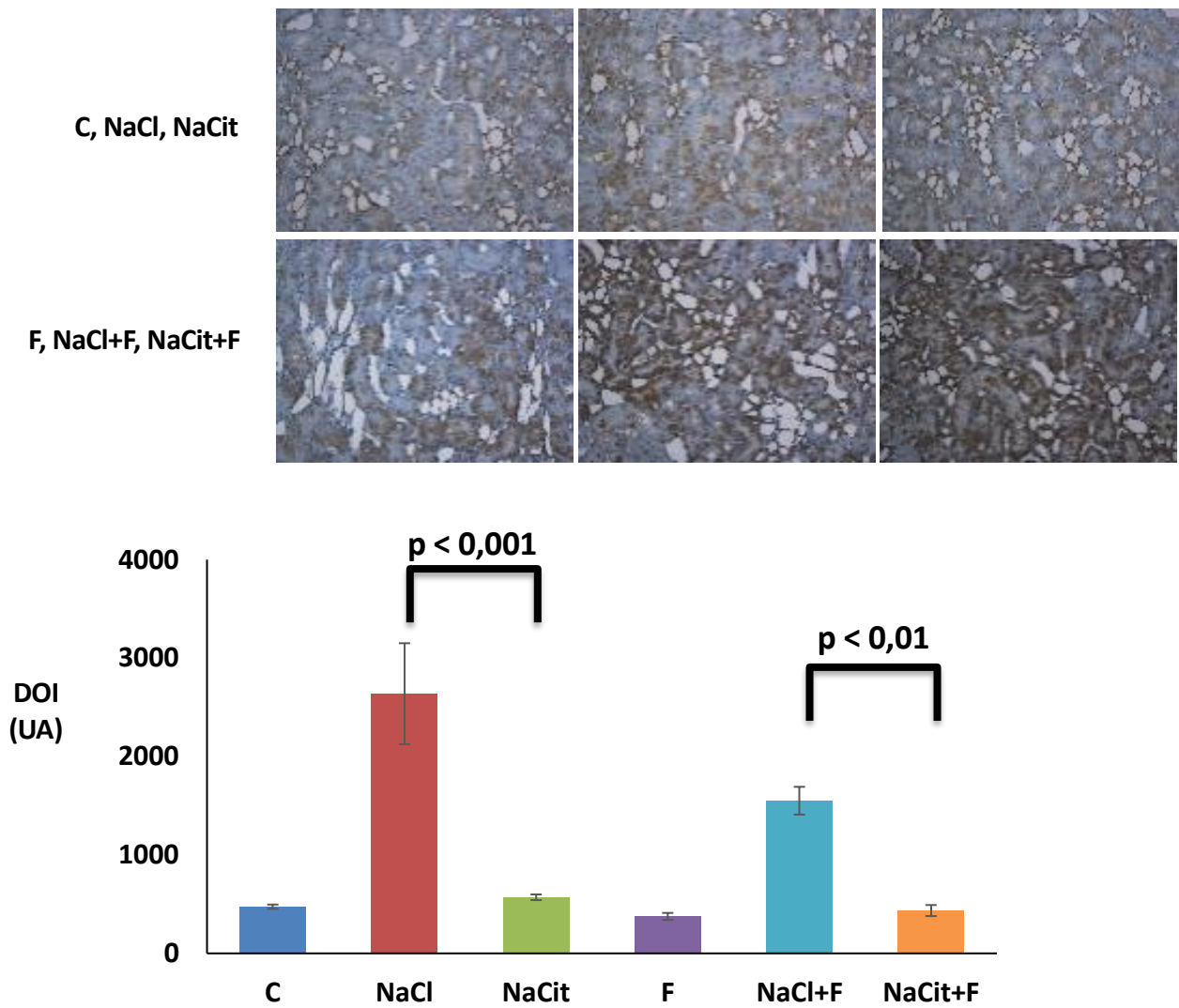


Figura 4: Inmunoexpresión de NFκB intrarrenal: imágenes representativas (400x) y cuantificación correspondiente



Segunda parte

Figura 1: Presión Arterial Sistólica de los cuatro grupos experimentales en función del tiempo

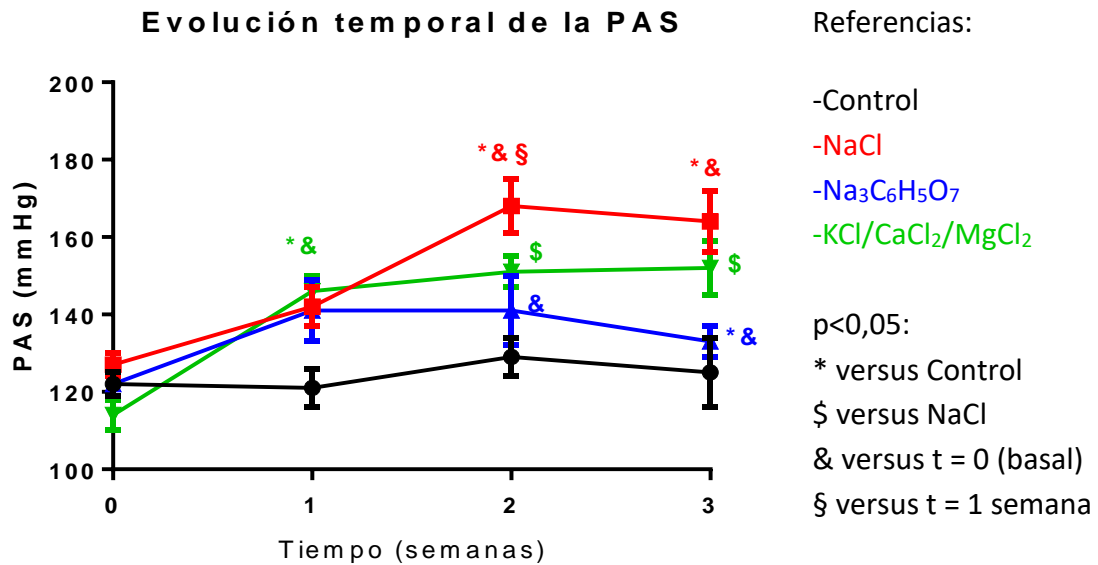


Tabla 1: peso corporal, ingesta de comida, de calorías y de bebida

	Control	NaCl	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	KCl/CaCl ₂ /MgCl ₂
Número de casos (n)	8	8	8	8
Peso Corporal inicial (g)	152±4	151±6	156±10	175±6
Peso Corporal final (g)	293±22	265±21	247±15	290±13
Diferencia de Peso Corporal (g)	141±7	114±9*	91±15*	115±3*
Ingesta de comida (g)	27±2	29±3	35±8	33±3
Ingesta calórica (kcal)	91±7	95±9	116±26	110±10
Ingesta de bebida (mL)	21±1	50±4*	61±9*	31±1*

Nivel justo de significación (valor p) < 0,05: * versus Control.

Tabla 2: Parámetros plasmáticos y urinarios

	Control	NaCl	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	KCl/CaCl ₂ /MgCl ₂
Creatininemia (mg/dL)	0,56±0,04	0,64±0,04	0,62±0,03	0,63±0,04
Natremia (mEq/L)	151±5	144±2	147±3	144±2
Cloremia (mEq/L)	102±2	100±1	101±3	99±1
Glucemia (mg/dL)	138±11	152±15	153±13	151±14
Uremia (mg/dL)	27±1	38±4 *	49±4 * \$	22±2 * \$ Δ
Osmolalidad pl. (mOsm/kg)	319±9	311±4	321±7	306±5
Creatininuria (mg/dL)	316±42	52±17 *	22±4 *	71±24 * Δ
Natriuria (mEq/L)	117±31	293±41 *	360±43 *	26±11 * \$ Δ
Cloruria (mEq/L)	145±37	345±48 *	83±8 * \$	29±12 * \$ Δ
Índice urinario Na ⁺ /Cl ⁻	0,77±0,09	0,84±0,05	4,30±0,23 * \$	0,99±0,26 Δ

* p<0,05 vs Control; \$ p<0,05 vs NaCl; Δ p<0,05 vs Na₃C₆H₅O₇

Tabla 3: Parámetros de funcionalidad renal

	Control	NaCl	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	KCl/CaCl ₂ /MgCl ₂
Diuresis (mL/día/kg)	10±2	78±14 *	92±15 *	51±21 * Δ
ClCr (mL/min/kg)	3,55±0,55	2,21±0,29 *	2,41±0,19 *	3,01±0,53
CFNa (mEq/día/kg)	790±141	461±61 *	511±39 * \$	634±105 \$
EUNa (mEq/día/kg)	1,2±0,3	22,9±4,3 *	34,4±6,2 * \$	1,1±0,3 \$ Δ
EFNa (%)	0,15±0,04	5,24±1,74 *	6,82±0,97 *	0,15±0,03 \$ Δ
RTNa (mEq/día/kg)	789±141	440±64 *	477±38 * \$	633±105 \$
RFNa (%)	99,85±0,04	94,76±1,74 *	93,18±0,97 * \$	99,85±0,03 \$ Δ
CFCl (mEq/día/kg)	532±92	319±40 *	349±26 * \$	435±74 \$
EUCl (mEq/día/kg)	1,4±0,3	26,5±5,1 *	7,8±1,5 * \$	1,1±0,3 \$ Δ
EFCI (%)	0,27±0,07	8,39±2,70 *	2,23±0,33 * \$ @	0,24±0,04 \$ Δ
RTCl (mEq/día/kg)	531±92	295±44 *	341±26 * \$	434±74 \$
RFCI (%)	99,73±0,07	91,61±2,70 *	97,77±0,33 * \$ @	99,76±0,04 \$ Δ

Referencias: ClCr: clearance de creatinina, CF: carga filtrada, EU: excreción urinaria, EF: excreción fraccional, RT: reabsorción tubular, RF: reabsorción fraccional

* p<0,05 vs Control; \$ p<0,05 vs NaCl; @ p<0,05 vs RFNa o EFNa; Δ p<0,05 vs Na₃C₆H₅O₇

Tabla 4: Masa de órganos y tejidos

	Control	NaCl	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	KCl/CaCl ₂ /MgCl ₂
RD/PC (g/kg)	3,46±0,19	3,48±0,12	3,85±0,09	3,59±0,13
RI/PC (g/kg)	3,44±0,18	3,38±0,09	3,75±0,13	3,57±0,17
GP/PC (g/kg)	1,76±0,26	1,20±0,30	0,96±0,18 *	2,32±0,24 \$ Δ
Pc/PC (g/kg)	4,08±0,22	3,79±0,18	3,78±0,12	3,83±0,17
AD/Pc (%)	2,7±0,4	2,0±0,6	2,1±0,6	2,3±0,2
AI/Pc (%)	3,1±0,3	2,5±0,4	2,2±0,4	2,4±0,1
VD/Pc (%)	17,5±1,2	17,7±0,7	17,7±0,7	17,3±0,7
VI/Pc (%)	69,0±5,4	68,2±3,3	71,3±1,7	69,8±1,2

Referencias:

PC: peso corporal (kg)

RD: peso del riñón derecho (g)

RI: peso del riñón izquierdo (g)

GP: peso de grasa perirrenal (g)

Pc: peso del corazón (g)

AD: aurícula derecha

AI: aurícula izquierda

VD: ventrículo derecho

VI: ventrículo izquierdo

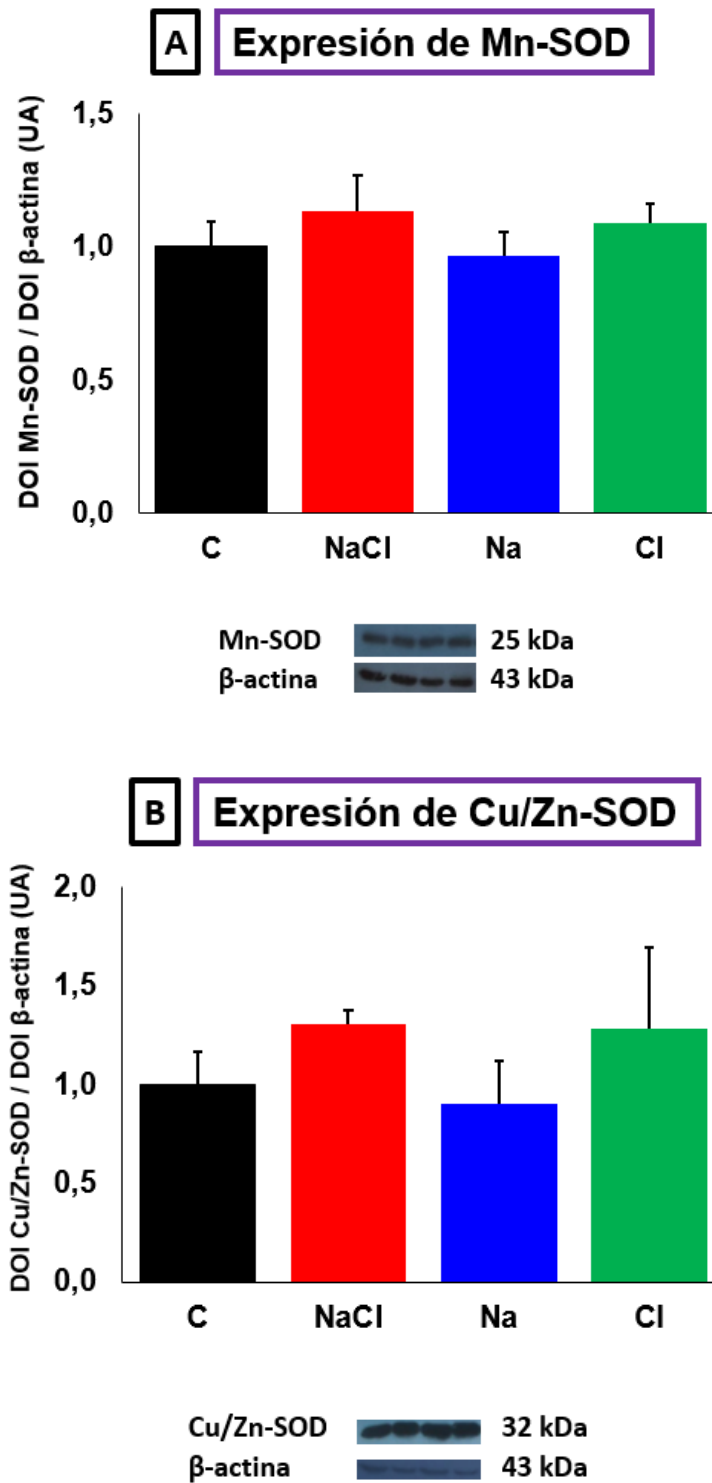
* p<0,05 vs Control; \$ p<0,05 vs NaCl; Δ p<0,05 vs Na₃C₆H₅O₇

Tabla 5: Parámetros de estrés oxidativo en corteza renal

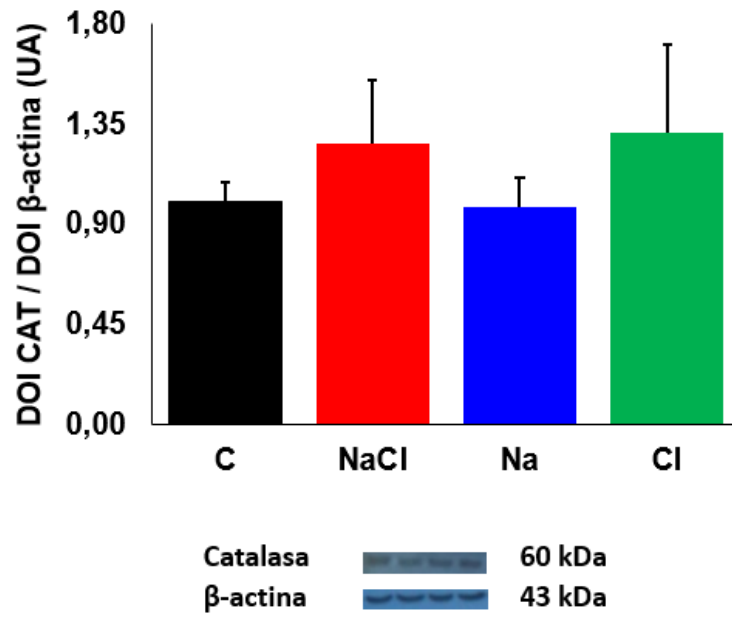
	Control	NaCl	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	KCl/CaCl ₂ /MgCl ₂
TBARS (mol/mg prot).(10 ¹²)	1,30±0,10	1,82±0,18 *	2,01±0,32 *	1,91±0,34 *
Act. SOD total (UA/mg)	7,3±1,0	7,9±1,0	7,0±1,1	9,0±0,9
Act. Mn-SOD (UA/mg)	2,0±0,5	1,7±0,3	2,1±0,6	2,3±0,1
Act. Cu/Zn-SOD (UA/mg)	5,3±0,8	6,2±1,0	4,9±0,8	6,7±1,0
Act. CAT (μmol H ₂ O ₂ /mg prot.min)	22,2±3,3	37,1±6,0	22,2±5,2	38,7±9,2
Act. GPx (μmol GSSG/mg prot.min)	1,34±0,14	2,31±0,37 *	1,30±0,14	2,77±0,52 *

TBARS: especies reactivas del Ácido Tiobarbitúrico; prot: proteína; Act: actividad; SOD: superóxido dismutasa; UA: unidades arbitrarias; Mn: manganeso-SOD (mitocondrial); Cu/Zn: cobre/zinc-SOD (citosólica); CAT: catalasa (CAT); H₂O₂: peróxido de hidrógeno; GPx: glutatión peroxidasa; GSSG: glutatión oxidado. * p<0,05 versus Control.

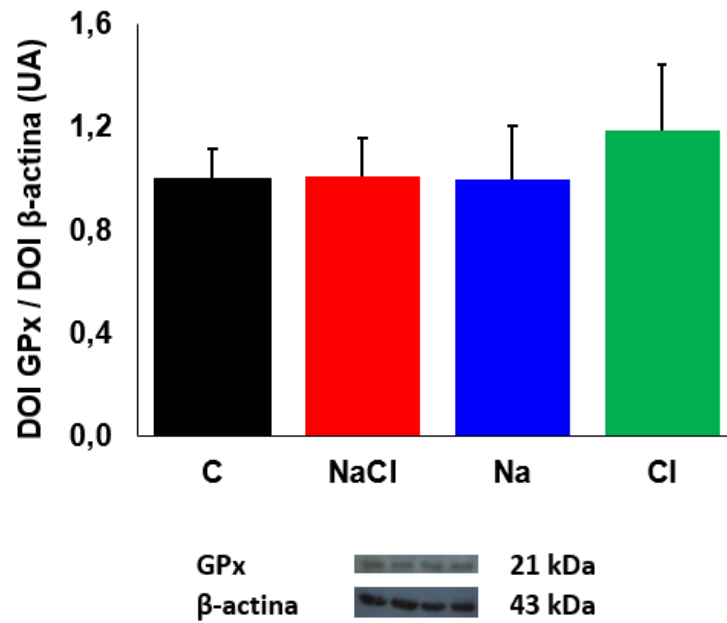
Figura 2: Expresión de enzimas antioxidantes con sus imágenes representativas



C Expresión de CAT



D Expresión de GPx



V. Discusión y Conclusión

Los resultados de la primera parte demuestran que el incremento en la reabsorción tubular de sodio y cloruro se asocia a una mayor expresión de marcadores de inflamación, siendo la inflamación renal debida a sobrecarga aguda de NaCl dependiente del anión Cl^- , pues en ausencia de éste, la sobrecarga de sodio no fue inflamatoria. El suministro agudo de fructosa aumenta el efecto inflamatorio del NaCl por un mecanismo independiente de la RT_{Na} y RT_{Cl} .

En cuanto a la sobrecarga crónica de NaCl en la dieta, se observa un incremento de la excreción urinaria de agua, sodio y cloruro, y disminución de la reabsorción de ambos iones, luego de tres semanas de tratamiento. La ingesta de citrato de sodio produjo cambios similares de los parámetros de funcionalidad renal excretora, respecto al grupo Control, de las ratas alimentadas con NaCl. Respecto al grupo control, las sales de cloruro provocaron un incremento de la diuresis pero no de otros parámetros de funcionalidad renal.

En cuanto a la masa de tejidos y órganos, solamente se observó una disminución significativa de la grasa perirrenal (normalizada por peso corporal de la rata) en el grupo $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ respecto al grupo Control, y un incremento significativo en este cociente en el grupo $\text{KCl}/\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ respecto a los grupos Control y NaCl. Si bien el reemplazo del anión cloruro por el citrato provoca una disminución significativa de la presión arterial, se observan alteraciones en el estado oxidativo debido a la peroxidación lipídica a nivel de corteza renal.

Estos hallazgos confirman en un primer momento el rol del anión cloruro en las dietas en el desarrollo de un mayor estado prooxidante a nivel renal respecto a la sobrecarga de sales de sodio, sugiriendo la importancia de tener en cuenta no solamente el contenido ingerido de sodio, sino también el de cloruros como medida de tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial inducida por una sobrecarga salina en la dieta.

Por otra parte, se necesita un mayor grado de evidencias sobre los mecanismos fisiopatológicos del manejo de cloruro para comprender los efectos deletéreos de este anión sobre la presión arterial y la función renal. Los incrementos en la PAS de los grupos tratados con sobrecarga de Cl^- indicarían un rol relevante del este anión en la patogénesis de la hipertensión arterial, independientemente del Na^+ . Si bien tanto la sobrecarga de NaCl como la de los dos iones por separado indujeron daño oxidativo a lípidos (aumento de TBARS), solo los grupos que recibieron Cl^- mostraron un aumento en la actividad de la GPx, lo que indicaría un mayor estado prooxidante a nivel renal.

VI. Bibliografia

- [1] Ambard L & Beaujard E. Causes de l'hypertension artérielle. *Arch Gen Med* **1**, 520–533 (1904).
- [2] Higgins, H. Observations on blood pressure, chloride retention and dechlorination, hyperacidity, and variations in the starch ration. *The Lancet* **171**, 1136–1142 (1908).
- [3] Kurtz, T. W., Al-Bander, H. A. & Morris, R. C. 'Salt-sensitive' essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important? *N. Engl. J. Med.* **317**, 1043–1048 (1987).
- [4] Luft, F. C., Zemel, M. B., Sowers, J. A., Fineberg, N. S. & Weinberger, M. H. Sodium bicarbonate and sodium chloride: effects on blood pressure and electrolyte homeostasis in normal and hypertensive man. *J. Hypertens.* **8**, 663–670 (1990).
- [5] Shore, A. C., Markandu, N. D. & MacGregor, G. A. A randomized crossover study to compare the blood pressure response to sodium loading with and without chloride in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.* **6**, 613–617 (1988).
- [6] Berghoff RS & Geraci AS. The influence of sodium chloride on blood pressure. *BMJ* **56**, 395–397 (1929).
- [7] van der Leeuw J, et al. Separating the effects of 24-hour urinary chloride and sodium excretion on blood pressure and risk of hypertension: Results from PREVEND. *PLoS One.* **15**, e0228490 (2020).
- [8] Zanfirescu A, et al. A review of the alleged health hazards of monosodium glutamate. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **18**, 1111-1134 (2019).
- [9] Iqbal S, Klammer N, Ekmekcioglu C. The Effect of Electrolytes on Blood Pressure: A Brief Summary of Meta-Analyses. *Nutrients.* **11**, 1362 (2019).
- [10] Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB. The Influence of Dietary Salt Beyond Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep.* **21**, 42 (2019).
- [11] McCallum, L., Lip, S. & Padmanabhan, S. The hidden hand of chloride in hypertension. *Pflugers Arch.* **467**, 595–603 (2015).
- [12] Jacques, T. et al. Overexpression of pendrin in intercalated cells produces chloride-sensitive hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 1104–1113 (2013).
- [13] Estévez, R. et al. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* **414**, 558–561 (2001).
- [14] Jentsch, T. J., Neagoe, I. & Scheel, O. CLC chloride channels and transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 319–325 (2005).
- [15] Miller, F. J. et al. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and ClC-3. *Circ. Res.* **101**, 663–671 (2007).
- [16] Mao, J. et al. Suppression of ClC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1706–1716 (2008).
- [17] Duan, D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J. Physiol.* **587**, 2163–2177 (2009).
- [18] Hoffmann, E. K., Lambert, I. H. & Pedersen, S. F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* **89**, 193–277 (2009).
- [19] Yin, Z., Tong, Y., Zhu, H. & Watsky, M. A. ClC-3 is required for LPA-activated Cl⁻ current activity and fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C535-542 (2008).
- [20] Guan, Y.-Y., Wang, G.-L. & Zhou, J.-G. The ClC-3 Cl⁻ channel in cell volume regulation, proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 290–296 (2006).
- [21] Hawkins, B. J., Madesh, M., Kirkpatrick, C. J. & Fisher, A. B. Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2002–2012 (2007).

- [22] Rozentsvit, A. et al. Ellagic Acid Reduces High Glucose-Induced Vascular Oxidative Stress Through ERK α /b/NOX4 Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **44**, 1174–1187 (2017).
- [23] Cremonini, E. et al. (-)-Epicatechin protects the intestinal barrier from high fat diet-induced permeabilization: Implications for steatosis and insulin resistance. *Redox Biol.* **14**, 588–599 (2018).
- [24] Tsai, K.-H. et al. NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF- κ B in cardiomyocytes exposed to high glucose. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1347–1357 (2012).
- [25] Bagul, P. K., Deepthi, N., Sultana, R. & Banerjee, S. K. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NF κ B-p65 and histone 3. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 1298–1307 (2015).
- [26] Prince, P. D. et al. Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. *Free Radic. Biol. Med.* **90**, 35–46 (2016).
- [27] Prince, P. D. et al. Fructose increases corticosterone production in association with NADPH metabolism alterations in rat epididymal white adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* **46**, 109–116 (2017).
- [28] Rosón, M. I. et al. Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. *Kidney Int.* **70**, 1439–1446 (2006).
- [29] Rukavina Mikusic, N. L. et al. Losartan prevents the imbalance between renal dopaminergic and renin angiotensin systems induced by fructose overload. L-Dopa/dopamine index as new potential biomarker of renal dysfunction. *Metabolism* **85**, 271–285 (2018).
- [30] Della Penna, S. L. et al. Role of angiotensin II and oxidative stress on renal aquaporins expression in hypernatremic rats. *J. Physiol. Biochem.* **70**, 465–478 (2014).
- [31] Rosón, M. I. et al. Sodium load combined with low doses of exogenous angiotensin II upregulate intrarenal angiotensin II. *Kidney Blood Press. Res.* **32**, 334–341 (2009).
- [32] Rosón, M. I. et al. High-sodium diet promotes a profibrogenic reaction in normal rat kidneys: effects of Tempol administration. *J. Nephrol.* **24**, 119–127 (2011).
- [33] Rosón, M. I. et al. Angiotensin II increases intrarenal transforming growth factor- β 1 in rats submitted to sodium overload independently of blood pressure. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **31**, 707–715 (2008).
- [34] Kobori, H. & Nishiyama, A. Effects of tempol on renal angiotensinogen production in Dahl salt-sensitive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 746–750 (2004).
- [35] Della Penna, S. L., Rosón, M. I., Toblli, J. E. & Fernández, B. E. Role of angiotensin II and oxidative stress in renal inflammation by hypernatremia: benefits of atrial natriuretic peptide, losartan, and tempol. *Free Radic. Res.* **49**, 383–396 (2015).
- [36] Kouyoumdzian, N. M. et al. Atrial Natriuretic Peptide Stimulates Dopamine Tubular Transport by Organic Cation Transporters: A Novel Mechanism to Enhance Renal Sodium Excretion. *PLoS One* **11**, e0157487 (2016).
- [37] Boveris, A., Fraga, C. G., Varsavsky, A. I. & Koch, O. R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **227**, 534–541 (1983).
- [38] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).
- [39] Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114–121 (1984).

VII. Anexos

-