





# Participación de los canales de cloruro en la salud cardiovascular y renal. Efectos de dietas altas en cloro sobre la presión arterial en un modelo experimental de sobrecarga salina

## *Participation of Chloride Channels in Cardiovascular and Kidney Health. Effects of High Chloride Diets on Blood Pressure in an Experimental Model of Saline Overload*

MARÍA J. RUDI<sup>1</sup>; NICOLÁS M. KOUYOUMDZIAN<sup>1,2</sup> , MELANIE KIM<sup>1</sup>; NATALIA L. RUKAVINA MIKUSIC<sup>1,2</sup> , HYUN J. LEE<sup>1</sup>; MÓNICA GALLEANO<sup>3,4</sup> , BELISARIO FERNÁNDEZ<sup>5</sup>; ANA PUYÓ<sup>1</sup> , MARCELO R. CHOI<sup>1,2,5</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** El consumo excesivo de sal (cloruro de sodio, NaCl) en la dieta conduce al desarrollo de hipertensión arterial (HTA) y daño de órgano blanco. Se sabe que los canales ClC-K1 y ClC-5 son reguladores esenciales del anión cloruro (Cl<sup>-</sup>), pero la contribución de este anión a los efectos deletéreos de la sal es aún desconocida.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación del Cl<sup>-</sup> en la respuesta inflamatoria y oxidativa renal y en el desarrollo de HTA.

**Material y métodos:** Ratas Wistar macho se dividieron en cuatro grupos (n=8/grupo) y se alimentaron con diferentes dietas durante 3 semanas: control (grupo C); NaCl 8 % (grupo NaCl); dieta alta en Na<sup>+</sup>: citrato de sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) 11,8 % (grupo Na); dieta alta en Cl<sup>-</sup>: cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 3,80 %, cloruro de potasio (KCl) 3,06 % y cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 1,30 % (grupo Cl). Se determinó la presión arterial sistólica (PAS), función renal, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación en corteza renal, y la expresión renal de los canales de cloruro ClC-K1 y ClC-5.

**Resultados:** Se observó un aumento de la PAS, actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y expresión renal de factor nuclear kappa B (NFκB) y receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) en los grupos NaCl y Cl<sup>-</sup> (p<0,05). La producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentó en los grupos experimentales con respecto a C. La expresión de la proteína de Parkinson 7 (PARK7) disminuyó en el grupo Cl en comparación con C (p< 0,05). Los grupos NaCl y Cl<sup>-</sup> mostraron una mayor expresión de ClC-K1, mientras que ClC-5 se redujo en el grupo NaCl en comparación con C (p<0,05).

**Conclusión:** El Cl<sup>-</sup> sería corresponsable, junto con el Na<sup>+</sup>, de desencadenar daño oxidativo e inflamatorio renal y aumentar la presión arterial; por ello se deduce la importancia de reducir la ingesta de ambos iones como medida preventiva no farmacológica para la prevención y control de la HTA. El rol de los canales ClC-K1 y ClC-5 como mediadores de este proceso queda aún por confirmarse.

**Palabras clave:** Anión cloruro - Catión sodio - Cloruro de sodio - Hipertensión arterial - Canales de cloruro

### ABSTRACT

**Background:** Excessive consumption of salt (sodium chloride, NaCl) in the diet leads to the development of hypertension (HTN) and target organ damage. It is known that the ClC-K1 and ClC-5 channels are essential regulators of the chloride (Cl<sup>-</sup>) anion, but the contribution of this anion to salt-harmful effects remains unknown.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the participation of Cl<sup>-</sup> in the renal inflammatory and oxidative response and in the development of HTN.

REV ARGENT CARDIOL 2024;92:133-141. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v92.i2.20753>

Recibido: 05/12/2023 - Aceptado: 12/02/2024

Dirección para correspondencia: Julieta Rudi. E-mail: [mjuliatarudi94@gmail.com](mailto:mjuliatarudi94@gmail.com)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

©Revista Argentina de Cardiología

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires (UBA). Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB). Departamento de Ciencias Biológicas, Cátedra de Anatomía e Histología. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> CONICET-UBA, Instituto Alberto C. Taquini de Investigaciones en Medicina Traslacional (IATIMET). Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> CONICET-UBA, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL). Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> UBA. FFyB. Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Cátedra de Fisicoquímica. Buenos Aires, Argentina.

<sup>5</sup> Fundación H.A. Barceló, Instituto Universitario de Ciencias de Salud. CABA, Argentina.

**Methods:** Male Wistar rats were divided into four groups (n=8/group) and fed with different diets for 3 weeks: control (C group); NaCl 8% (NaCl group); high Na<sup>+</sup> diet: sodium citrate (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) 11.8% (Na group); high Cl<sup>-</sup> diet: calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) 3.80%, potassium chloride (KCl) 3.06% and magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) 1.30% (Cl group). Systolic blood pressure (SBP), renal function, oxidative stress and inflammation markers in the renal cortex, and renal expression of the chloride ClC-K1 and ClC-5 channels were assessed.

**Results:** An increase in SBP, glutathione peroxidase (GPx) activity, and renal expression of nuclear factor kappa B (NFκB) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) were observed in the NaCl and Cl groups (p<0.05). The production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increased in the experimental groups compared with C. The expression of Parkinson disease protein 7 (PARK7) decreased in the Cl group compared with C (p<0.05). The NaCl and Cl groups showed increased expression of ClC-K1, while ClC-5 was reduced in the NaCl group compared with C (p<0.05).

**Conclusion:** Cl<sup>-</sup> would be co-responsible together with Na<sup>+</sup> in triggering oxidative and inflammatory kidney damage and increasing blood pressure. This indicates the importance of reducing the intake of both ions as a non-pharmacological preventive measure for the prevention and control of HTN. The role of ClC-K1 and ClC-5 channels as mediators of this process remains to be confirmed.

**Key words:** Chloride Anion - Sodium Cation - Sodium Chloride - Arterial Hypertension - Chloride Channels

## INTRODUCCIÓN

El consumo excesivo de cloruro de sodio (NaCl) en la dieta es un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión arterial (HTA) y daño de órgano blanco. En el riñón, la sobrecarga salina induce estrés oxidativo e inflamación, independientemente del valor de la presión arterial. Los estudios clínicos sugieren que la presión arterial no se incrementa por una dieta alta en Na<sup>+</sup> en ausencia del anión cloruro (Cl<sup>-</sup>), (1-3) dado que el bicarbonato de sodio no tiene el mismo efecto presor que el NaCl en personas hipertensas. (2,4) Los estudios más recientes sugieren que el cloruro puede tener un rol más específico en la hipertensión arterial “sal sensible”, independiente del efecto hipertensógeno del sodio. (5-7)

Por otra parte, se sabe que los canales de cloruro regulan estrechamente las concentraciones de este anión tanto en el compartimento intracelular como en el extracelular, y se clasifican en cuatro grupos: familia de canales de cloruro (ClCs), canales de cloruro activados por calcio (CaCCs), canales transmembrana reguladores de la fibrosis quística (CFTR) y receptores del ácido γ-aminobutírico tipo A (GABAA). Los ClCs constituyen una gran familia de canales dependientes de voltaje y es la familia de canales de cloruro más involucrada en el desarrollo de la hipertensión arterial. (8-14) Incluyen nueve subtipos: ClC-1 a ClC-7, ClC-K1 y ClC-K2. (15) Se ha demostrado recientemente *in vitro* que altas concentraciones de NaCl disminuyen los niveles de expresión de ClC-5. (16) Por último, se sabe que altas concentraciones de NaCl se asocian a un incremento de la expresión renal del canal ClC-K1. (17) Pero se desconoce qué efectos tiene una dieta rica en cloruros sobre la expresión de estos canales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el anión Cl<sup>-</sup>, además del catión Na<sup>+</sup>, estaría involucrado en la respuesta inflamatoria y oxidativa renal y en el desarrollo de HTA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales y dietas

Se emplearon ratas Wistar macho de 7 semanas de edad y peso corporal (PC) promedio de 155-165 g al comienzo de la dieta. Se dividieron en un grupo control y tres grupos experimentales (n = 8/grupo), bebieron agua corriente *ad libitum* y consumieron diferentes dietas equimolares durante 3 semanas:

- 1) Control: dieta normosódica y normoclórica (Grupo C);
- 2) NaCl 8 % P/P: dieta hipersódica e hiperclórica (Grupo NaCl);
- 3) Alta en Na<sup>+</sup>: dieta hipersódica y normoclórica (citrate de sodio, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 11,8 % P/P) (Grupo Na);
- 4) Alta en Cl<sup>-</sup>: dieta hiperclórica y normosódica (cloruro de calcio, CaCl<sub>2</sub>, 3,80 %; cloruro de potasio, KCl, 3,06 % y cloruro de magnesio MgCl<sub>2</sub>, 1,30 % P/P) (Grupo Cl).

Las dietas fueron elaboradas por la Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

### Determinación de la presión arterial sistólica (PAS)

La PAS se determinó a tiempo 0 (basal), 1, 2 y 3 semanas mediante el método pletismográfico en la cola de la rata.

### Determinación de parámetros urinarios, plasmáticos y evaluación de la funcionalidad renal excretora

Al cabo de las 3 semanas de dieta, los animales se alojaron en jaulas metabólicas, durante dos días: uno de aclimatación y otro de recolección de orina de 24 horas para medir la diuresis, las concentraciones urinarias de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (mEq/L) y creatinina (mg/dL).

El día del sacrificio, bajo anestesia, se extrajo sangre del seno retroocular. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, creatinina, glucosa y urea, mediante un autoanalyzer. La osmolaridad plasmática (mOsm/kg) se estimó como: 2\*натremia (mEq/L) + 1/18\*glucemia (mg/dL) + 1/6\*uremia (mg/dL).

Se calculó la depuración (*clearance*) de creatinina (ClCr) según:

$$\text{ClCr} = (\text{creatininuria/creatininemia}) * \text{diuresis/tiempo/PC}.$$

La carga filtrada (CF) y los parámetros de funcionalidad renal excretora, excreción urinaria (EU) y fraccional (EF) de los diferentes iones, se calcularon a partir de las siguientes fórmulas estándar:

$CFNa = ClCr \cdot natremia$   
 $EUNa = diuresis \cdot natriuria$   
 $EFNa = (EUNa/CFNa) \cdot 100$   
 $CFCI = ClCr \cdot cloremia$   
 $EUCl = diuresis \cdot cloruria$   
 $EFCl = (EUCl/CFCI) \cdot 100$

La diuresis, ClCr, CF y EU se normalizaron por el PC de cada rata y se expresan en mL/día/kg, mL/min/kg o mEq/día/kg, mientras que la EF se expresa en porcentaje (%).

### Sacrificio, extracción de riñones y procesamiento de muestras

Bajo anestesia, se extrajeron ambos riñones. Se disecó la corteza renal, que se homogenizó en *buffer* fosfato salino (7,6 mM  $KH_2PO_4$ , 42,4 mM  $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, pH: 7,40) y se centrifugó a 600 g durante 20 minutos a 4 °C. En los sobrenadantes, se determinaron las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), y la actividad y expresión de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx). La expresión proteica se determinó mediante la técnica de Western Blot y el contenido proteico se midió por el método de Lowry. (18)

### Determinación de TBARS y actividad enzimática

El contenido de TBARS se determinó fluorométricamente en homogeneizados de corteza renal. (19) Los resultados se expresan en nmol de TBARS de equivalentes de malondialdehído (MDA)/mg proteína.

La actividad de la GPx se midió por espectrofotometría siguiendo la oxidación enzimática de NADPH a 340 nm en presencia de 1 mm de glutatión (GSH), 1 mm de azida de sodio ( $NaN_3$ ), 0,15 mm de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y 0,25 unidades (U)/mL de glutatión reductasa. Los resultados se expresan en  $\mu$ mol NADPH oxidado/mg proteína/min, que equivalen a  $\mu$ mol de glutatión oxidado (GSSG)/mg proteína/min). (20)

### Western Blot

Para determinar la expresión de las proteínas factor nuclear kappa B (NFkB), glutatión peroxidasa (GPx), receptores de la angiotensina II tipo 1 y 2 (AT1R, AT2R), proteína de Parkinson 7 (PARK7), ClC-5 y ClC-K1, se diluyeron 120  $\mu$ g de proteínas en *buffer* de muestra y se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturantes (SDS 10 %). Luego, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo descremada 3 % diluida en *buffer* tris salino (TBS)-Tween. Se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, los cuales se diluyeron 1:1000 en *buffer* fosfato salino (PBS). Después de 1 h de incubación con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rabanito (1:2000) y 1 h de incubación con Estreptavidina-Peroxidasa (1:2000), las proteínas se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia. Las bandas obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. Los resultados se normalizaron a los valores de  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

### Histología renal

Los riñones se fijaron en formaldehído al 10% para seguir posteriormente con la técnica histológica convencional, inclusión en parafina, cortes de secciones del tejido de 7  $\mu$ m de espesor con un micrótopo y coloración con hematoxilina-eosina (H-E). Luego, los preparados histológicos fueron analizados cualitativamente con un microscopio óptico de campo claro acoplado a una cámara digital (Nikon).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías y el test de Tukey, empleando el programa *InfoStat*. Las diferencias con un valor  $p < 0,05$  fueron consideradas estadísticamente significativas.

### Consideraciones éticas

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) bajo la resolución N°1881/2019. Los procedimientos fueron realizados siguiendo las indicaciones de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio". (21)

## RESULTADOS

### Evolución temporal de la presión arterial sistólica

Las ratas control se mantuvieron normotensas durante las 3 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 (Tabla 1).

El grupo NaCl alcanzó los valores más altos de PAS en la segunda y tercera 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, pero sin alcanzar diferencias significativas en relación con C.

### Parámetros plasmáticos y urinarios

Con respecto a los parámetros creatininemia, natriemia, cloremia y osmolaridad plasmática (estimada a partir de la natremia, la glucemia y la uremia), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. Respecto del grupo C, la creatininuria disminuyó en los otros tres grupos, y la natriuria se incrementó en los grupos con dieta alta en sodio (NaCl y Na) y se redujo en el grupo Cl. El índice natriuria/cloruria, que evalúa la equimolaridad urinaria entre los dos iones, aumentó significativamente en el grupo Na, y alcanzó valores muy cercanos a la equimolaridad en el grupo Cl (Tabla 2).

La diuresis aumentó en los tres grupos con respecto a C, mientras que el ClCr disminuyó en los grupos NaCl y Na. En los grupos NaCl y Na se incrementaron la EUNa, la EFNa, la EUCl y la EFCl respecto al grupo C (Tabla 2).

En comparación con el grupo NaCl, en el grupo Na se observó un incremento de la EUNa y disminución de la EUCl. Del mismo modo, en el grupo Na la EFCl fue menor que la EFNa.

El grupo Cl no mostró diferencias significativas con respecto al grupo C, pero sí en comparación con los otros dos grupos: respecto de los grupos NaCl y Na, presentó una menor excreción urinaria y fraccional de ambos iones (Tabla 1).

	Presión arterial sistólica (mm Hg)			
	Control	NaCl	Na	Cl
Semana 0	122 ± 3	127 ± 3	122 ± 3	114 ± 4
Semana 1	121 ± 5	142 ± 5	141 ± 8	146 ± 4
Semana 2	129 ± 5	168 ± 7* <sup>&amp;</sup> <sup>§</sup>	141 ± 9 <sup>§</sup> <sup>&amp;</sup>	151 ± 4* <sup>&amp;</sup>
Semana 3	125 ± 9	164 ± 8* <sup>&amp;</sup> <sup>§</sup>	133 ± 4 <sup>§</sup> <sup>&amp;</sup>	152 ± 7* <sup>&amp;</sup> <sup>Δ</sup>
Parámetros de funcionalidad renal excretora				
Diuresis (mL/día/kg)	10 ± 2	78 ± 14*	92 ± 15*	51 ± 21 <sup>Δ</sup>
ClCr (mL/min/kg)	3,55 ± 0,55	2,21 ± 0,29*	2,41 ± 0,19*	3,01 ± 0,53
EUNa (mEq/día/kg)	1,2 ± 0,3	22,9 ± 4,3*	34,4 ± 6,2* <sup>§</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
EFNa (%)	0,15 ± 0,04	5,24 ± 1,74*	6,82 ± 0,97*	0,15 ± 0,03 <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
EUCl (mEq/día/kg)	1,4 ± 0,3	26,5 ± 5,1*	7,8 ± 1,5* <sup>§</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
EFCl (%)	0,27 ± 0,07	8,39 ± 2,70*	2,23 ± 0,33* <sup>§</sup> <sup>@</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>

Cl: cloruro; ClCr: clearance de creatinina; EF: excreción fraccional; EU: excreción urinaria; Na: sodio; NaCl: cloruro de sodio  
\*p<0,05 vs control; <sup>§</sup>p<0,05 vs NaCl; <sup>@</sup>p<0,05 vs EFNa; <sup>Δ</sup>p<0,05 vs Na; <sup>§</sup>p<0,05 vs t = 0; <sup>§</sup>p < 0,05 vs 1era semana.

**Tabla 1.** Evolución temporal de la presión arterial sistólica y parámetros de funcionalidad renal excretora

	Parámetros plasmáticos y urinarios			
	Control	NaCl	Na	Cl
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
Uremia (mg/dL)	27 ± 1	38 ± 4*	49 ± 4* <sup>§</sup>	22 ± 2* <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
Osmolaridad plasmática (mOsm/kg)	319 ± 9	311 ± 4	321 ± 7	306 ± 5
Creatininuria (mg/dL)	316 ± 42	52 ± 17*	22 ± 4*	71 ± 24* <sup>Δ</sup>
Natriuria (mEq/L)	117 ± 31	293 ± 41*	360 ± 43*	26 ± 11* <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
Cloruria (mEq/L)	145 ± 37	345 ± 48*	83 ± 8* <sup>§</sup>	29 ± 12* <sup>§</sup> <sup>Δ</sup>
Índice urinario Na+/Cl-	0,77 ± 0,09	0,84 ± 0,05	4,30 ± 0,23* <sup>§</sup>	0,99 ± 0,26 <sup>Δ</sup>

Cl: cloruro; Na: sodio; NaCl: cloruro de sodio  
\*p<0,05 vs control; <sup>§</sup>p<0,05 vs NaCl; <sup>Δ</sup>p<0,05 vs Na

**Tabla 2.** Parámetros plasmáticos y urinarios

**Marcadores de estrés oxidativo e inflamación en corteza renal**

La producción de TBARS aumentó en la corteza renal en los grupos experimentales respecto al grupo C (Figura 1A). Por otro lado, 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 1B). 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 (Figuras 1C y D, respectivamente). La expresión de AT2R se redujo significativamente en los grupos NaCl y Cl (Figura 1E). La expresión de PARK7 disminuyó en el grupo Cl en comparación con el grupo C (Figura 1F). Por último, mientras que ClC-5 se redujo significativamente en el grupo NaCl en comparación con el grupo C (Figura 2A), los grupos NaCl y Cl mostraron una mayor expresión de ClC-K1 (Figura 2B)

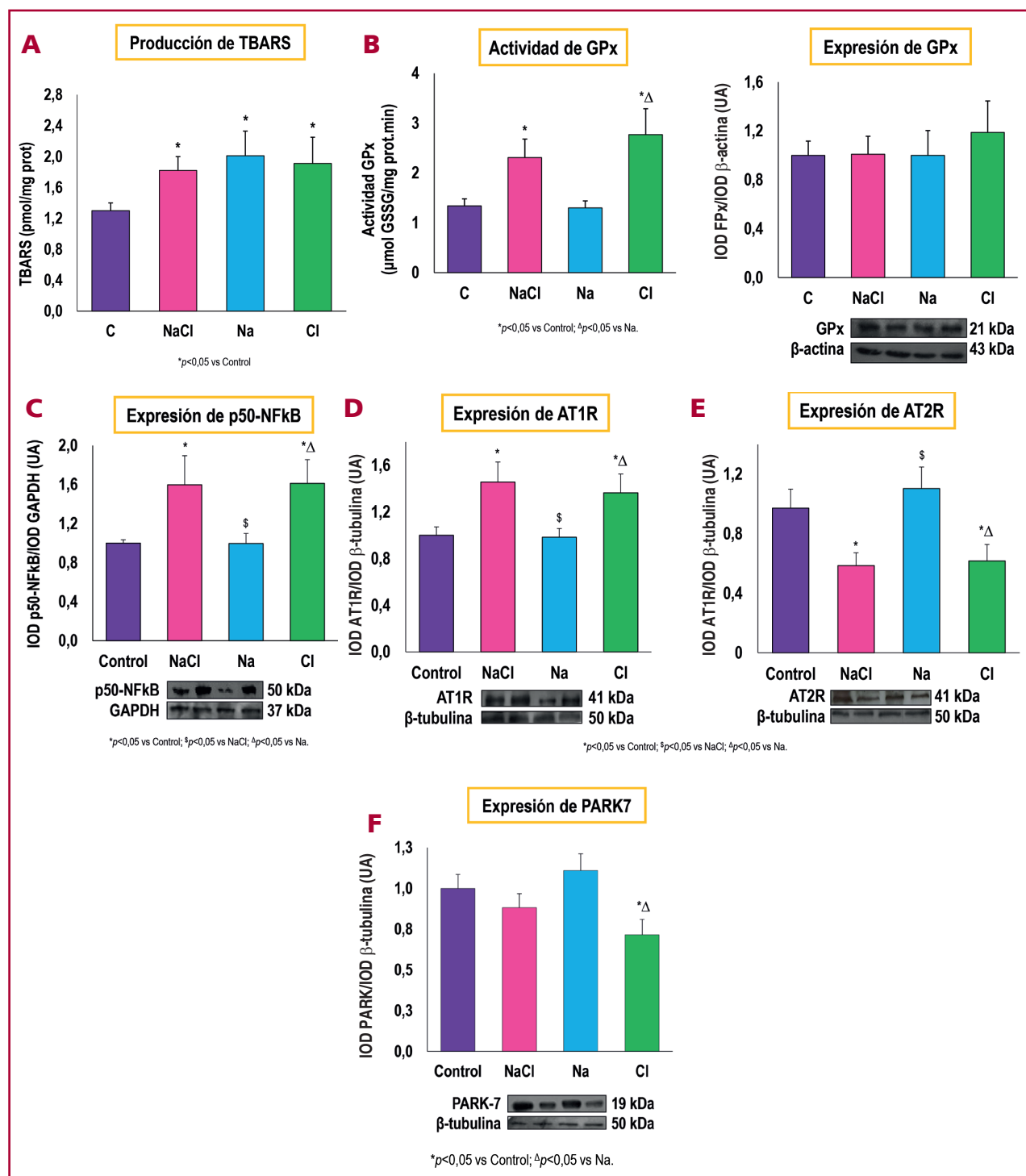
**Características histológicas del parénquima renal**

En la Figura 3, se muestran microfotografías representativas de las características histológicas del parénquima renal, con la técnica H-E, de los 4 grupos experimentales. En el análisis histológico cualitativo se destaca que los animales de los grupos NaCl y Cl mostraron modificaciones tubulointersticiales más pronunciadas caracterizadas por dilatación tubular en comparación con el grupo C. 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 modificaciones menos pronunciadas con respecto a los otros grupos experimentales.

**DISCUSIÓN**

**Evolución temporal de la presión arterial sistólica**

En este trabajo, los resultados que se presentan sugieren que la sobrecarga de NaCl se asocia a la HTA.

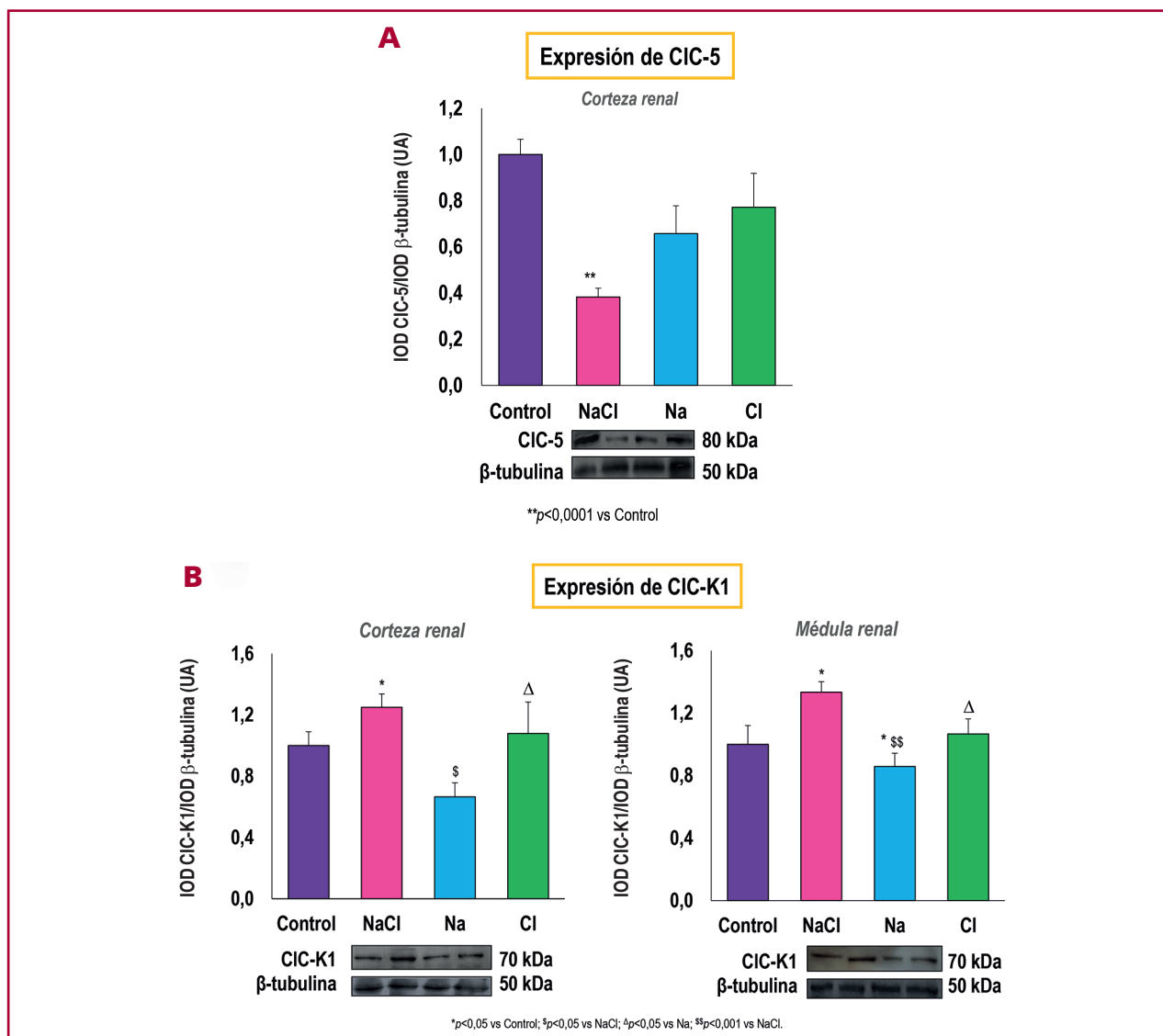


Cl: cloruro; Na: sodio; NaCl: cloruro de sodio; UA: Unidades arbitrarias

\*p<0,05 vs Control; \$p<0,05 vs NaCl; Δp<0,05 vs Na

**Fig. 1.** Marcadores de estrés oxidativo e inflamación en corteza renal. A) TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico. B) GPx: Glutación peroxidasa. C) p50-NFkB: Factor nuclear kappa B. GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. D) AT1R: Receptor de angiotensina II tipo 1. E) AT2R: Receptor de angiotensina II tipo 2 ( ). F) PARK7: Proteína de Parkinson 7





Cl: cloruro; Na: sodio; NaCl: cloruro de sodio

\*p<0,0001 vs Control; \*p<0,05 vs Control; \$p<0,05 vs NaCl; Δp<0,05 vs Na; \*p<0,001 vs NaCl.

**Fig. 2.** Expresión renal de canales de cloruro CIC-5 y CIC-K1

El aumento de la PAS está también relacionado con la sobrecarga de cloruros, dado que el grupo Cl<sup>-</sup> alcanzó valores tensionales mayores a 140 mmHg, superiores a los del grupo Na. El anión Cl<sup>-</sup> es un componente del NaCl que podría tener un rol más específico en la sal-sensibilidad y que podría ser, incluso, más determinante que el Na<sup>+</sup>.<sup>(14)</sup> Otros estudios efectuados en ratas *Dahl* “sal-sensibles” demostraron que, a lo largo de varias semanas, la hipertensión se desarrolló en los animales consumidores de NaCl, pero no en los alimentados con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) u otras sales de Na<sup>+</sup>.<sup>(22-24)</sup>

Por otra parte, la sobreingesta de sales de cloruro “no sódicas”, que es acompañada por una excreción urinaria de Cl<sup>-</sup> menor que la producida en presencia de Na<sup>+</sup>, podría estar relacionada con una acumulación

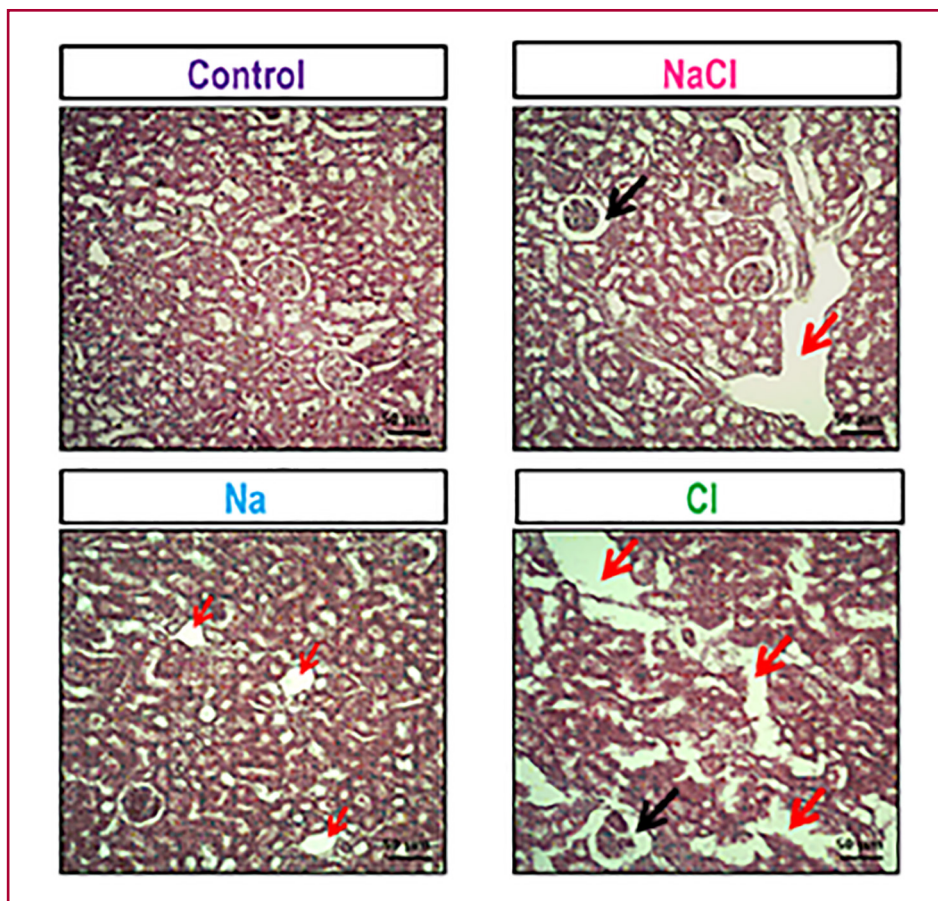
selectiva de Cl<sup>-</sup> en el organismo, lo que conllevaría al desarrollo de HTA “sal-sensible”.<sup>(25-27)</sup>

### Parámetros plasmáticos y urinarios

La ausencia de modificaciones en las concentraciones plasmáticas de sodio y cloruro y la osmolaridad son evidencias de la eficiencia biológica de los mecanismos fisiológicos para compensar una posible hipernatremia y/o hipercloremia y para conservar la osmolaridad plasmática.

En el grupo NaCl aumentaron la natriuria y la cloruria con respecto al grupo control; el índice urinario Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> fue similar en ambos grupos. En el grupo Na es posible que aumente la secreción y la excreción de bicarbonato, resultado consistente con el incremento del índice urinario Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> con respecto a los demás

**Fig. 3.** Imágenes histológicas representativas del parénquima renal teñidos con H-E. Barra de escala =50  $\mu$ m. Aumento total 100X. Las flechas en color rojo indican las modificaciones tubulointersticiales y las flechas en color negro la dilatación del espacio urinario.



Cl: cloruro; Na: sodio; NaCl: cloruro de sodio

grupos que se observaron; lo que sugiere que el  $\text{Cl}^-$  no es el principal contraión del  $\text{Na}^+$  excretado. La secreción de  $\text{HCO}_3^-$  tiene por objetivo compensar una alcalosis metabólica en los animales que recibieron citrato de  $\text{Na}^+$  y, como consecuencia de ello, la reabsorción de  $\text{Cl}^-$  estaría incrementada y su excreción, disminuida, ya que el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , independiente del catión  $\text{Na}^+$ , presentaría una mayor expresión en las membranas apicales de las células de los túbulos contorneado distal, colector cortical y conector. (14) Con respecto al grupo Cl, es llamativa la baja cloruria con respecto a las ratas control, lo que sugiere que, para su excreción, es necesario que se elimine también el  $\text{Na}^+$  como contraión.

Estos resultados aluden a que el anión  $\text{Cl}^-$  se estaría acumulando en algún compartimento, como la piel, ya que en el plasma sus niveles continúan siendo normales. (26,27)

### Marcadores de estrés oxidativo e inflamación en el riñón

La sobrecarga de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  o ambos iones en la dieta, se asoció con un incremento en la peroxidación lipídica en la corteza renal, representado por el aumento en la producción de TBARS. El estado prooxidante en

estas células se caracteriza por un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de que la expresión proteica de GPx no se vio afectada, se registró un aumento de su actividad. La regulación de la misma está relacionada con modificaciones postraduccionales que ocurren en el sitio activo de la enzima e independientemente de que varíe o no su expresión. (28)

La expresión de  $\text{ClC-K1}$  aumenta en los grupos NaCl y Cl, por lo que esto estaría incrementando la reabsorción tubular del anión. Se ha demostrado que el Cl puede convertirse en ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO). (29) Las reacciones de daño oxidativo de las biomoléculas se asocian predominantemente con especies reactivas de nitrógeno (RNS) secundarias, como peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y  $\text{HOCl}$ . También se sabe que la formación de  $\text{HOCl}$  se asocia con daño tisular. (30,31) Por otro lado, se sabe que las ROS contribuyen a la activación de vías de señalización proinflamatorias tales como NF- $\kappa$ B. (32) Para estudiar la participación del anión  $\text{Cl}^-$  en la respuesta inflamatoria renal, se evaluó la expresión de los marcadores de inflamación tales como p50-NF $\kappa$ B y AT1R. (33-35) En el presente estudio, se demostró

que los niveles de expresión de p50-NFκB y AT1R se incrementan significativamente en los grupos NaCl y Cl, lo que nos sugiere también un estado proinflamatorio a nivel renal en comparación con el exceso de sodio.

Por otro lado, se sabe que la PARK7, también llamada DJ-1 tiene actividad antioxidante eliminando  $H_2O_2$  y regulando la expresión de varias enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD). (36,37) Era de esperar que los niveles de PARK7 se vieran incrementados. Sin embargo, hemos observado que su expresión disminuye en el grupo Cl en comparación con el grupo C. Se ha demostrado que AT1R interacciona con PARK7, lo que podría respaldar la hipótesis de que AT1R lo esté regulando negativamente. (38) No obstante, quedan hallazgos aún por dilucidar.

### Canales de cloruro ClC-5 y ClC-K1

El canal de cloruro ClC-5 participa en la acidificación de los endosomas en tejidos de riñón, intestino e hígado. El ClC-5 se expresa principalmente en vesículas intracelulares tubulares proximales y desempeña un papel clave en la endocitosis. (10) La acidificación endosomal se logra principalmente mediante el transporte activo de  $H^+$  por una ATPasa  $H^+$  de tipo vacuolar. Debido a que el transporte activo de  $H^+$  es electrogénico, se requiere el movimiento concurrente de aniones cloruro hacia los compartimentos endosómicos. (39) Se ha demostrado recientemente *in vitro* que altas concentraciones de NaCl disminuye sus niveles de expresión. (16) Sin embargo, actualmente se desconoce qué mecanismos específicos están involucrados. Nuestros resultados confirman que ClC-5 reduce su expresión en la corteza renal ante un exceso de NaCl en comparación con el grupo C, pero no así en los grupos Cl ni Na, sugiriendo un papel importante en la reabsorción de ambos iones en el túbulo proximal renal. (40) Se desconoce hasta el momento el mecanismo por el cual Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>, en forma conjunta, reducen la expresión de ClC-5 en la corteza renal.

El canal ClC-K1 participa en el transporte epitelial de cloruro en riñón y en los mecanismos de concentración urinaria. (12) Se sabe que altas concentraciones de NaCl se asocian a un incremento de la expresión en el asa ascendente delgada de Henle de ClC-K1, (17) pero se desconoce qué efectos tiene una dieta rica en cloruros sobre la expresión de este canal. Nuestros resultados demuestran que los grupos NaCl y Cl<sup>-</sup> presentan una mayor expresión renal de ClC-K1. Estos hallazgos sugieren que ClC-K1 tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del anión cloruro y el agua al promover su excreción.

### CONCLUSIÓN

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que el anión Cl<sup>-</sup> sería corresponsable, junto con el catión Na<sup>+</sup>, de desencadenar daño oxidativo renal y aumentar la presión arterial; por lo que, se necesitan más estudios para comprobar la importancia de reducir la ingesta de ambos iones como medida preventiva no

farmacológica para la prevención y control de la HTA. Nuestros resultados ponen en evidencia la participación de los canales ClC-K1 y ClC-5 como mediadores de este proceso.

### Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la Web).

### Financiamiento

Parte del estudio fue financiado por fondos provenientes de los siguientes subsidios: PICT 2021-I-A-00607 y PIP CONICET 2022-2024.

### BIBLIOGRAFIA

1. Kurtz, T. W., Al-Bander, H. A., & Morris Jr, R. C. (1987). Salt-sensitive essential hypertension in men. *New England Journal of Medicine*, 317(17), 1043-1048.
2. Luft FC, Zemmel MB, Sowers JA, Fineberg NS, Weinberger MH. Sodium bicarbonate and sodium chloride: effects on blood pressure and electrolyte homeostasis in normal and hypertensive man. *J Hypertens*. 1990;8:663-70. <https://doi.org/10.1097/00004872-199007000-00010>
3. Shore, A. C., Markandu, N. D., & MacGregor, G. A. (1988). A randomized crossover study to compare the blood pressure response to sodium loading with and without chloride in patients with essential hypertension. *Journal of hypertension*, 6(8), 613-617.
4. Berghoff, R. S., & Geraci, A. S. The influence of sodium chloride on blood pressure. *IMJ*. 1929;56:395-7.
5. Iqbal, S., Klammer, N., & Ekmekcioglu, C. (2019). The effect of electrolytes on blood pressure: a brief summary of meta-analyses. *Nutrients*, 11(6), 1362.
6. van der Leeuw J, de Borst MH, Kieneker LM, Bakker SJL, Gansevoort RT, Rookmaaker MB. Separating the effects of 24-hour urinary chloride and sodium excretion on blood pressure and risk of hypertension: Results from PREVEND. *PLoS One*. 2020;15:e0228490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228490>
7. Zanfrescu, A., Ungurianu, A., Tsatsakis, A. M., Niulescu, G. M., Kouretas, D., Veskoukis, A., & Margină, D. (2019). A review of the alleged health hazards of monosodium glutamate. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(4), 1111-1134.
8. Barlassina C, Dal Fiume C, Lanzani C, Manunta P, Guffanti G, Ruello A, et al. Common genetic variants and haplotypes in renal CLCNKA gene are associated to salt-sensitive hypertension. *Hum Mol Genet*. 2007;16:1630-8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm112>
9. Berend K, van Hulsteijn LH, Gans RO. Chloride: the queen of electrolytes? *Eur J Intern Med*. 2012;23:203-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.11.013>
10. Devuyst O, Guggino WB. Chloride channels in the kidney: lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F1176-91. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00184.2002>
11. Duan DD. The ClC-3 chloride channels in cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32:675-84. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.30>
12. Gerbino A, De Zio R, Russo D, Milella L, Milano S, Procino G, et al. Role of PKC in the Regulation of the Human Kidney Chloride Channel ClC-Ka. *Sci Rep*. 2020;10:10268. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67219-8>
13. Kouyoumdzian, N. M., Kim, G., Rudi, M. J., Rukavina Mikusic, N. L., Fernández, B. E., & Choi, M. R. (2022). Clues and new evidences in arterial hypertension: unmasking the role of the chloride anion. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 474(1), 155-176.
14. McCallum L, Lip S, Padmanabhan S. The hidden hand of chloride in hypertension. *Pflugers Arch*. 2015;467:595-603. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1690-8>



15. Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebek, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological reviews*, 82(2), 503-568.
16. Mo S, Cui Y, Sun K, Wang H, Peng X, Ou L, et al. High sodium chloride affects BMP-7 and  $\alpha$ -hydroxylase levels through NCC and CLC-5 in NRK-52E cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;225:112762. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112762>
17. Bergler T, Stoelcker B, Jeblick R, Reinhold SW, Wolf K, Riegger GA, et al. High osmolality induces the kidney-specific chloride channel CLC-K1 by a serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 MAPK pathway. *Kidney Int*. 2008;74:1170-7. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.312>
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
19. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Halogenated compounds as inducers of lipid peroxidation in tissue slices. *Free Radic Biol Med*. 1987;3:119-23. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(87\)80006-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(87)80006-0)
20. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1)
21. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
22. Abboud HE, Luke RG, Galla JH, Kotchen TA. Stimulation of renin by acute selective chloride depletion in the rat. *Circ Res*. 1979;44:815-21. <https://doi.org/10.1161/01.res.44.6.815>
23. Kotchen TA, Galla JH, Luke RG. Failure of NaHCO<sub>3</sub> and KHCO<sub>3</sub> to inhibit renin in the rat. *Am J Physiol*. 1976;231:1050-6. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.231.4.1050>
24. Kotchen TA, Luke RG, Ott CE, Galla JH, Whitescarver S. Effect of chloride on renin and blood pressure responses to sodium chloride. *Ann Intern Med*. 1983;98:817-22. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-98-5-817>
25. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med*. 2009;15:545-52. <https://doi.org/10.1038/nm.1960>
26. Machnik A, Dahlmann A, Kopp C, Goss J, Wagner H, van Rooijen N, et al. Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension*. 2010;55:755-61. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143339>
27. Matsuda JJ, Filali MS, Moreland JG, Miller FJ, Lamb FS. Activation of swelling-activated chloride current by tumor necrosis factor- $\alpha$  requires ClC-3-dependent endosomal reactive oxygen production. *J Biol Chem*. 2010;285:22864-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099838>
28. Cao C, Leng Y, Huang W, Liu X, Kufe D. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 2003;278:39609-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305770200>
29. Kato, Y. (2016). Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 58(2), 99-104.
30. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 13:757-772. doi: 10.2147/CIA.S158513
31. Weidinger A, Kozlov AV (2015) Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5:472-484. doi: 10.3390/biom5020472
32. Miller Jr, F. J., Filali, M., Huss, G. J., Stanic, B., Chamseddine, A., Barna, T. J., & Lamb, F. S. (2007). Cytokine activation of nuclear factor  $\kappa$ B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and ClC-3. *Circulation research*, 101(7), 663-671.
33. Manrique C, Lastra G, Gardner M, Sowers JR. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Med Clin North Am*. 2009;93:569-82. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2009.02.014>
34. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF- $\kappa$ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1254-62. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010020218>
35. Zhang H, Sun SC. NF- $\kappa$ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*. 2015;5:63. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0056-4>
36. Cuevas S, Zhang Y, Yang Y, Escano C, Asico L, Jones JE, et al. Role of renal DJ-1 in the pathogenesis of hypertension associated with increased reactive oxygen species production. *Hypertension*. 2012;59:446-52. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185744>
37. Cuevas S, Villar VA, Jose PA, Armando I. Renal dopamine receptors, oxidative stress, and hypertension. *Int J Mol Sci*. 2013;14:17553-72. <https://doi.org/10.3390/ijms140917553>
38. Lu Y, Zhang J, Han B, Yu Y, Zhao W, Wu T, et al. Extracellular vesicles DJ-1 derived from hypoxia-conditioned hMSCs alleviate cardiac hypertrophy by suppressing mitochondria dysfunction and preventing ATRAP degradation. *Pharmacol Res*. 2023;187:106607. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106607>
39. George AL Jr. Chloride channels and endocytosis: ClC-5 makes a dent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7843-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7843>
40. Briet M, Vargas-Poussou R, Lourdel S, Houillier P, Blanchard A. How Bartter's and Gitelman's syndromes, and Dent's disease have provided important insights into the function of three renal chloride channels: ClC-Ka/b and ClC-5. *Nephron Physiol*. 2006;103:p7-13. <https://doi.org/10.1159/000090218>