

ARTÍCULO ORIGINAL

DIFERENCIAS DE GÉNERO EN PRESIÓN ARTERIAL, FUNCIÓN RENAL Y RESPUESTA A LA DIETA HIPERSÓDICA EN RATAS WISTAR

GENDER DIFFERENCES IN BLOOD PRESSURE, RENAL FUNCTION AND RESPONSE TO HIGH-SODIUM DIET IN WISTAR RATS

Luis A. Di Ciano¹, Pablo J. Azurmendi¹, Sandra G. Vlachovsky¹, Alejandro F. Celía¹, Elisabet M. Oddo¹, Elvira E. Arrizurieta^{1,2}, Claudia M. Silberstein³, Fernando R. Ibarra^{1,3}

1) Laboratorio de Riñón Experimental y Bioquímica Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

3) Departamento de Ciencias Fisiológicas, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO Houssay-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Rev Nefrol Dial Traspl. 2018; 38 (1): 15-27

RESUMEN

Introducción: Es conocido que el sexo es un condicionante de la regulación renal de sodio y de la presión arterial. **Material y métodos:** Se estudiaron ratas Wistar machos y hembras a los 150 días de vida, con dieta normo o hipersódica (NaCl 1% v.o.) en los últimos cinco. Se determinaron presión arterial media (PAM), natriuresis, filtrado glomerular (VFG), flujo plasmático renal (FPR) y aldosterona plasmática. Se estudió la expresión Na⁺,K⁺-ATPasa total (t-NKA) y defosforilada (d-NKA), citocromo P4504A (CYP4A), cotransportadores Na⁺,K⁺,2Cl⁻ tipo 2 (NKCC2) y Na⁺/Cl⁻ (NCC) y por PCR el ARNm de la cadena $\alpha 1$ de NKA (*Atp1a1*) en corteza y médula renal. **Resultados:** La PAM fue mayor y la natriuresis menor en los machos bajo ambas dietas. Con ingesta hipersódica la aldosterona bajó en ambos sexos, el VFG fue menor en hembras y el FPR aumentó en machos (4,09 \pm 0,17 vs 2,81 \pm 0,12 ml/min/gR; p<0,01 vs dieta normosódica). La t-NKA, d-NKA y *Atp1a1* en médula fue mayor en machos con ambas dietas. Con ingesta hipersódica, t-NKA en médula

y d-NKA en corteza y médula disminuyeron en hembras y solamente d-NKA disminuyó en médula de machos. Asimismo, aumentó CYP4A y disminuyó NKCC2 y NCC en hembras, mientras que aumentó NKCC2, sin cambios en NCC, en machos. **Conclusión:** El sexo condiciona la presión arterial y el balance de sodio, disminuyendo su reabsorción en hembras y aumentando el FPR en machos. Esto sugiere posibilidades de estudio diferenciales según sexo en trastornos del metabolismo del sodio.

PALABRAS CLAVE: sexo; diferencias de género; balance de sodio; presión arterial; transportadores de sodio; sodio; ratas Wistar; enfermedades metabólicas

ABSTRACT

Introduction: It is known that sex is a determinant of renal sodium regulation and blood pressure. **Methods:** Male and female Wistar rats, which were 150 days old and a diet with normal or high levels of sodium (NaCl 1% v.o.), were studied for the last five days. Mean blood

pressure (MBP), natriuresis, glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) and plasma aldosterone level were established. The following were studied: expressions of total $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ (t-NKA); dephosphorylated NKA (d-NKA); cytochrome P4504A (CYP4A); $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-2Cl}^-$ (NKCC2) and Na^+/Cl^- (NCC) cotransporters. The mRNA expression of the NKA $\alpha 1$ (*Atp1a1*) chain was examined through PCR analysis in the renal cortex and marrow.

Results: Male rats having both types of diet showed higher MBP and lower natriuresis. High sodium intake triggered lower aldosterone levels in both sexes; GFR was lower in females and RPF was higher in males (4.09 ± 0.17 vs. 2.81 ± 0.12 ml/min/gr; $p < 0.01$ vs. diet with a normal sodium level). Marrow t-NKA, d-NKA and *Atp1a1* were higher in males on both diets. High sodium intake caused lower marrow t-NKA as well as lower cortex and marrow d-NKA in females. In the case of males, only marrow d-NKA decreased. Furthermore, females showed a higher level of CYP4A and lower levels of NKCC2 and NCC, whereas males showed higher levels of NKCC2 and no variations in NCC. **Conclusion:** Sex conditions blood pressure and sodium balance, reducing resorption in females and increasing RPF in males. This suggests the possibility of studying sodium metabolism disorders differently according to sex.

KEYWORDS: sex; gender differences; sodium balance; blood pressure; sodium transporters; sodium; Wistar rats; metabolic diseases

INTRODUCCIÓN

Investigaciones hechas en humanos y en animales de experimentación muestran que el sexo está asociado a una regulación de la presión arterial (PA) diferente entre machos y hembras.

⁽¹⁾ La PA definida como normal es más alta en machos que en hembras.⁽²⁾ Esta característica podría deberse a diferencias en los niveles de Aldosterona plasmática o volumen del líquido extracelular, siendo ambos más altos en machos.

⁽³⁻⁴⁾ Se ha adjudicado un rol a las distintas hormonas sexuales que podrían estar comprometidas en los mecanismos regulatorios de la PA. En los machos, los andrógenos tienen mecanismos de acción que se vinculan a una elevación de la PA.⁽⁵⁻⁶⁾ Las hembras, parecen propender a mantener niveles más bajos de PA, sobre todo debido al efecto descrito para los estrógenos.⁽⁶⁾ Los animales hembra jóvenes y las mujeres premenopáusicas muestran una protección en la funcionalidad renal y cardiovascular que los machos no poseen. Esta divergencia se puede atribuir a un manejo diferencial del sodio en un mecanismo hormonodependiente de los reguladores de la función y hemodinamia renal, así como de la PA.⁽⁷⁻⁸⁾

En este trabajo se investiga la expresión y modificaciones transcripcionales y postraduccionales de transportadores o reguladores del balance de sodio que se ubican en diferentes partes a lo largo del nefrón. La $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (NKA), se expresa en la membrana basolateral de todos los segmentos y es el mecanismo activo que permite el movimiento de iones. Su estudio en corteza y médula puede ofrecer una aproximación acerca de lo que ocurre en esas porciones del nefrón. El cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ tipo 2 (NKCC2) se ubica en la membrana apical del asa ascendente gruesa de Henle y el cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) en la membrana apical del túbulo distal. Ambos pueden tener una expresión diferente en machos y hembras y ser regulados al variar la ingesta de sodio.⁽⁹⁻¹¹⁾

De igual manera, el CYP450 4A, una isoforma del citocromo abundante en riñón, participa en la regulación de la actividad y expresión de los transportadores de sodio precipitados y es regulado en su expresión por sexo e ingesta de sodio.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Por lo expuesto es dado esperar que sean diferentes los mecanismos natriuréticos que machos y hembras desarrollan ante una ingesta hipersódica.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si hay diferencias fisiológicas según sexo en los mecanismos del balance de sodio y si ello deter-

mina una regulación diferente de la presión arterial y de la hemodinamia renal. Simultáneamente, se estudió el comportamiento de los principales transportadores de sodio en el nefrón ante una ingesta normal o elevada de sodio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Se estudiaron ratas Wistar machos y hembras a los 150 días de vida, provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, NIH, USA. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf> [consulta feb. 2018]). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité institucional local para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento estándar para ratas (Cooperación, San Nicolás, Buenos Aires, Argentina) con 0,24% de NaCl (dieta normosódica) y agua corriente. Se alojaron a $22 \pm 2,2$ °C con un ciclo de oscuridad / luz de 12: 12 h. La dieta normosódica fue administrada a todos los animales desde el día 20 de vida hasta el 145. En los últimos 5 días del estudio la mitad de los animales, tanto machos como hembras, recibió una ingesta alta en sodio aportada en el agua de bebida como NaCl al 1%. Formaron 4 grupos: machos y hembras con ingesta normo ó hipersódica.

Recolección de orina, ingesta de alimentos y agua y estudios hemodinámicos

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar orina de 24 horas y registrar el consumo de alimentos, agua y sodio durante los días previos al experimento final. En el día 150, se anestesiaron con Inactina (50 mg/kg pc, i.p.) y se prepararon para estudios de depuración (*clearance*), como se describió con anterioridad

(15). Por vena yugular se infundieron inulina (IN, Inutest, Linz, Austria), y paraaminohipurato (PAH, Merck, Sharp & Dohme, PA, EE. UU.) para determinar el filtrado glomerular (VFG) y el flujo plasmático renal (FPR), respectivamente. La arteria carótida se canuló para obtener muestras de sangre y registrar la presión arterial media (PAM). Se colocó un catéter en la vejiga para la recolección de orina. La IN y el PAH se administraron hasta alcanzar concentraciones plasmáticas de 0,2 y 0,02 mg/ml, respectivamente. Luego se continuó con infusión sostenida. Tras un período de equilibrio de 45 minutos, se tomaron tres muestras de sangre en el medio de tres períodos de recolección de orina de 30 minutos. La IN y el PAH se determinaron en muestras de plasma y orina por métodos convencionales (16, 17). La fracción filtrada (FF) se calculó como el cociente entre VFG/FPR.

La excreción de agua y electrolitos en la orina se determinó mediante gravimetría y fotometría de llama, respectivamente. La aldosterona en plasma se midió con radioinmunoensayo competitivo. Al finalizar el *clearance*, se practicó una incisión en la línea media abdominal y se extrajeron y pesaron ambos riñones. Luego se separó corteza y médula externa y se homogeneizaron en solución para el estudio del perfil proteico (en mM: Tris 20, EGTA 2, EDTA 2, PMSF 1, beta mercaptoetanol 10 y aprotinina 100 unidades de inhibición de kalikreína/ml, pH 7,4). Los homogenatos se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Estudios de Western Blot

Expresión de Na⁺-K⁺-ATPasa

Se utilizaron las proteínas de corteza y médula renal, se separaron electroforéticamente y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como ya fuera descrito.⁽¹⁸⁾ La NKA total (t-NKA) y NKA defosforilada (d-NKA) fueron inmunodetectadas por un anticuerpo común que reconoce la subunidad α -1 de la NKA independientemente de su estado de fosforilación (anticuerpo primario hecho en ratón anti NKA

$\alpha 1$ sc-21712 τ -NKA, dilución 1:7000, Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) y por un anticuerpo monoclonal específico (McK1, cortesía de la Dra. K J Sweadner) que se une a la Ser 23 de la subunidad α -1 de la NKA cuando está defosforilada, respectivamente. El McK-1 se une a Ser-23, sitio de fosforilación de protein-kinasa C, cuando está defosforilada y no cuando se fosforila (19, 20). La defosforilación se correlaciona con un aumento en la actividad de NKA.⁽²¹⁻²²⁾

Expresión de los cotransportadores NKCC2 y NCC

Se procedió de la manera descrita para NKA, utilizando un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra el cotransportador NKCC2 de rata (AB3562P, dilución 1:1000, Millipore Corporation, Temecula, USA) y otro contra el cotransportador NCC (AB3553, dilución 1:2000, Millipore, Billerica, USA).

Expresión de citocromo P450 4A:

Para la detección del CYP P450 4A se empleó un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra el citocromo CYP4A de rata (ab3573, dilución 1:1500, Abcam, UK).

En cada experimento, como control de carga proteica se detectó la expresión de β -Actina empleando anticuerpo hecho en ratón (sc-47778, dilución 1:2000, Santa Cruz Biotechnology Inc, USA).

Para revelar las bandas proteicas unidas a los anticuerpos primarios se emplearon anticuerpos secundarios anti-ratón (Vector Laboratories, USA) y anti-conejo (Abcam, Cambridge, USA) conjugados con peroxidasa y se visualizaron mediante un sustrato quimioluminiscente (Pierce ECL, USA).

Las densitometrías de las bandas se realizaron utilizando el programa NIH ImageJ 1.34s. La magnitud de la inmunoseñal se expresó en unidades de densidad (UD) y es el cociente entre las bandas de las diferentes proteínas y la banda correspondiente de β -actina.

Análisis de expresión génica de *Atp1a1*

La expresión génica de NKA se evaluó mediante PCR en tiempo real sobre ADNc retrotranscrito a

partir de muestras de ARN total aisladas tanto de la corteza como de la médula utilizando el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El rendimiento y pureza del ARN total obtenido se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y su absorbancia relativa a 260 y 280 nm, respectivamente. El ARN se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit *Illustra Ready-To-Go de RT-PCR* (GE Healthcare UK Limited, UK). La PCR en tiempo real se realizó con el kit *LightCycler® Fast-Start DNA Master SYBR Green I* (Roche Applied Bioscience, Roche Diagnostic GmbH, Alemania) con el equipo LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostic GmbH, Alemania). Las secuencias de los cebadores fueron 5'-GGTGCAGCCCTTAGGATGTA-3' y 5'-GATGAGAAGGGAGTAGGGGAAG-3' para el gen *Atp1a1* y 5'-AGGCCCTCTGAACCTA-3' y 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA-3' para el gen de la β -actina. Los cebadores fueron diseñados por el software Primer3Web (<http://primer3.ut.ee/>) usando NM_012504.1 y NM_031144.3 como secuencias de referencia para cada gen. La validez del producto de PCR se ensayó tanto por la especificidad del cebador con el software Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) como por la visualización de una banda única de tamaño esperado en gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. Cada reacción se realizó en duplicado para cada muestra y la expresión génica se calculó como método $\Delta\Delta$ Ct de acuerdo con Pfaffl.⁽²³⁾

Análisis estadístico

Las variables se expresan como media \pm error estándar de la media. Se analizaron por test de *t* de Student y ANOVA de una o dos vías y test de Tukey *post hoc*. Fue considerada como significativa una probabilidad menor al 5 %, ($p < 0.05$). Para cada dieta se utilizaron 4 o más ratas por grupo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS statistics 17.0.

RESULTADOS

El peso corporal fue mayor en machos que en hembras con dieta normosódica, mientras que las hembras con ingesta hiperosódica disminu-

TABLA 1. Parámetros de peso, ingesta de sodio, diuresis y aldosterona.

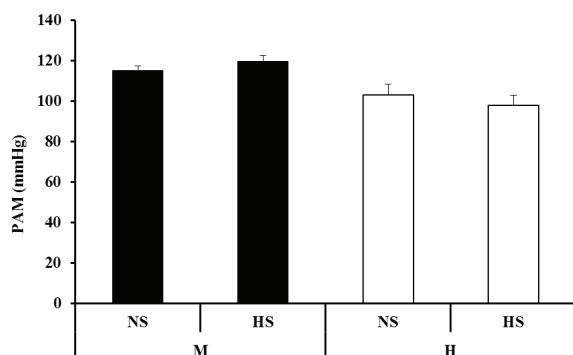
	PC	PR	Ing Na+	V	Aldo	Cociente Exc/Ing Na+
M NS	456±19	2,8±0,09	0,31±0,02	2,37± 0,08	69,0±8,0	1,16±0,03
M HS	471±12	2,7±0,08	1,72±0,18 #	4,36 ± 0, 32 #	7,6±1,1 #	0,73±0,10* #
H NS	282±4 *	1,8±0,05 *	0,41±0,01 *	3, 88 ± 0,26 *	98,0±32,5	1,26±0,12
H HS	267±3 * #	1,8±0,03 *	2,55±0,14 * #	9,90 ±0,93 * #	32,5±0,5 * #	1,01±0,06

Peso corporal (PC, g); peso renal (PR, g); ingesta de sodio (Ing Na+, mEq/día/100gPC), diuresis (V; ml/día/100gPC); aldosterona plasmática (Aldo, pg/ml); cociente Excreción (Exc)/Ingesta (Ing) de sodio por 100g de PC. Los valores se expresan como media±ESM y corresponden a un n de al menos 6 ratas por grupo. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Los símbolos denotan * p<0,05 entre sexos; # p<0,05 entre dietas.

yeron de peso (**Tabla 1**).

Los machos tienen mayor peso renal que las hembras y esto no cambió con la ingesta hipersódica (**Tabla 1**). A semejanza de otras descripciones, observamos que los machos tienen una PAM mayor que las hembras con dietas normo- o hipersódicas. La ingesta hipersódica no incrementó la PAM. (**Figura 1**)

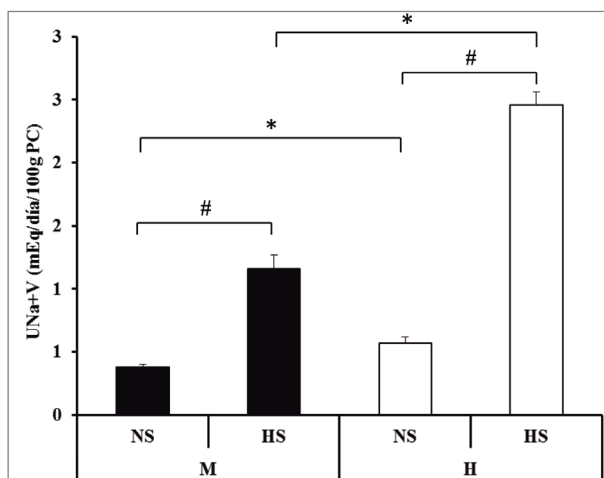
Figura 1. Presión Arterial Media (PAM). Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 5 ratas por grupo. Los valores se muestran como media±EEM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Los símbolos denotan * p<0,05 entre sexos.



En tanto diferencias de género, las hembras ingieren más sodio que los machos, ya sea con ingesta normo- o hipersódica (p<0,05) (**Tabla 1**). Las hembras excretan más sodio que los

machos, independientemente del contenido de sodio en la dieta (**Figura 2**). Una respuesta similar se observa con la diuresis. (**Tabla 1**)

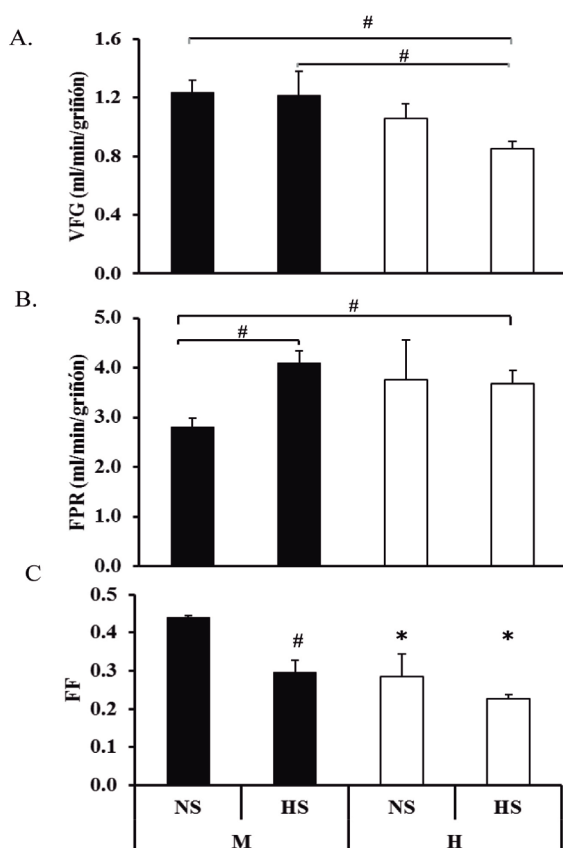
Figura 2: Excreción diaria de sodio (UNa+V). Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 5 ratas por grupo. Los valores se muestran como media±EEM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Los símbolos denotan * p<0,05 entre sexos; # p<0,01 entre dietas.



Para analizar la relación entre el sodio ingerido y su excreción urinaria, se determinó el cociente excreción/ingesta de sodio corregido por peso corporal. Como se aprecia en **Tabla 1**, el valor de dicho cociente con dieta hipersódica es

menor en machos que en hembras ($p < 0,05$). La **figura 3** muestra la hemodinamia renal. El VFG no fue diferente entre machos y hembras con dieta normosódica. El VFG fue menor en hembras con ingesta hipersódica comparado con el de machos con ambas dietas ($p < 0,05$, **Figura 3A**). El FPR en machos aumentó cuando consumieron dieta hipersódica (**Figura 3B**). La FF fue mayor en machos que en hembras con dieta normosódica ($p < 0,05$) y disminuyó en machos con dieta hipersódica *vs* normosódica. (**Figura 3C**)

Figura 3: Hemodinamia renal. A. Volumen de filtrado glomerular (VFG), B. Flujo plasmático renal (FPR) y C. Fracción filtrada (FF). Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 5 ratas por grupo. Los valores se muestran como media \pm EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Los símbolos denotan en A. # $p < 0,05$ H HS vs M NS y HS, en B. # $p < 0,01$ M HS vs M NS y H HS y C.* $p < 0,05$ H NS y HS vs M NS y # $p < 0,05$ M NS vs M HS.



La expresión de t-NKA y d-NKA se muestra en las figuras 4 y 5, respectivamente. En la corteza renal no se observó diferencia significativa en la expresión de t-NKA entre hembras y machos (**Figura 4A**), mientras que en médula renal fue mayor en machos (**Figura 4B**). Además, la expresión de t-NKA disminuye con la ingesta de dieta hipersódica en las hembras (**Figura 4B**).

En corteza renal, el estado de defosforilación de la Ser 23 de la subunidad α -1 de la NKA mostró diferencias de género con la dieta hipersódica. Cuando las hembras consumen dieta hipersódica, la d-NKA disminuye ($p < 0,05$, **Figura 5A**). En cambio, la ingesta hipersódica en los machos no modifica d-NKA. En médula renal, la ingesta hipersódica redujo la d-NKA en machos y hembras aunque siempre fue mayor en machos. (**Figura 5B**)

Los niveles de ARNm del gen *Atp1a1* mostraron diferencias de sexo sin cambios por la ingesta hipersódica. En médula renal, las ratas machos tienen mayores niveles que las hembras. (**Figura 6**)

La expresión renal de CYP 4A, como se muestra en la figura 7, fue mayor en machos con ingesta normosódica que en hembras. Al aumentar la ingesta de sodio, la expresión de CYP4A aumentó sólo en hembras ($p < 0,01$).

La **Figura 8** muestra la expresión del NCC y el NKCC2. Respecto al NCC, los machos tienen mayor expresión que las hembras en ambas dietas. Durante la ingesta hipersódica la expresión del NCC disminuyó en hembras y no cambió en machos. (**Figura 8 A**)

El cotransportador NKCC2 mostró un marcado descenso de su expresión con ingesta hipersódica en las ratas hembras mientras que aumentó en los machos. (**Figura 8 B**)

La aldosterona plasmática en dieta normosódica no fue diferente entre machos y hembras, pero disminuyó en ambos con ingesta hipersódica. El descenso por la ingesta hipersódica fue más marcado en machos que en hembras. (**Tabla 1**)

Figura 4. Expresión de subunidad α -1 total de Na^+ , K^+ -ATPasa (t-NKA). A. Corteza y B. Médula renal. Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 4 ratas por grupo. Los valores se muestran como media \pm EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Debajo de cada gráfico de barras se muestran las bandas representativas de Western-Blots de NKA total y Beta Actina utilizada como control de carga proteica. Los símbolos denotan * $p < 0,05$ vs sexo y # $p < 0,05$ vs dieta.

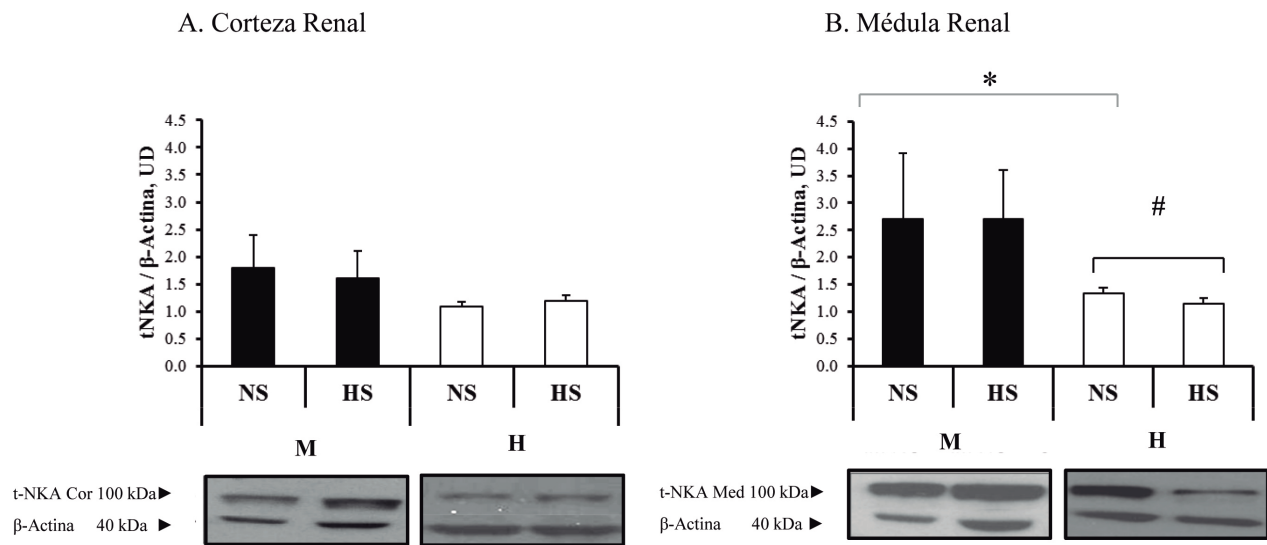


Figura 5. Expresión de subunidad α -1 defosforilada en Ser 23 de Na^+ , K^+ -ATPasa (d-NKA) como cociente d-NKA/t-NKA en unidades de densidad óptica (UD). A. Corteza y B. Médula renal. Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 4 ratas por grupo. Los valores se muestran como media \pm EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Debajo de cada gráfico de barras se muestran las bandas representativas de Western-Blots de NKA defosforilada y NKA total (t-NKA). Los símbolos denotan * $p < 0,05$ vs sexo y # $p < 0,05$ vs dieta.

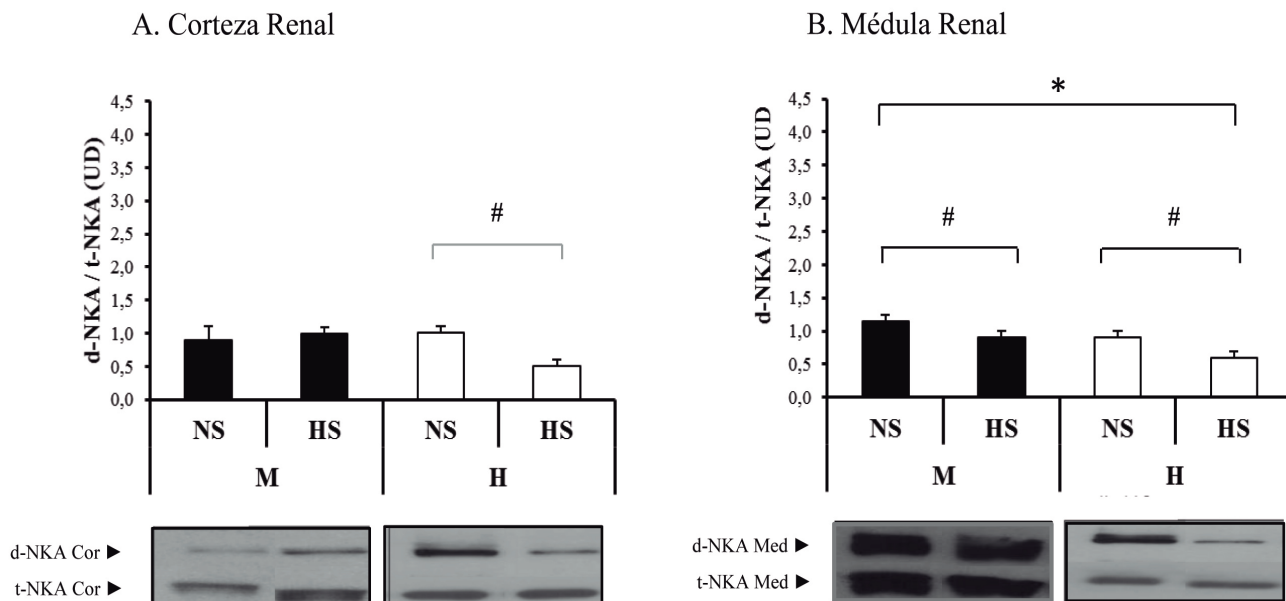


Figura 6: Expresión genómica de α -1 Na⁺, K⁺-ATPasa renal (Atp1a1) por PCR en tiempo real, representada como cociente de los niveles de ARNm de Atp1a1 y de Beta Actina. A. Corteza renal y B. Médula renal. Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 4 ratas por grupo. Los valores se muestran como media±EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. El símbolo denota * p<0,05 entre sexos.

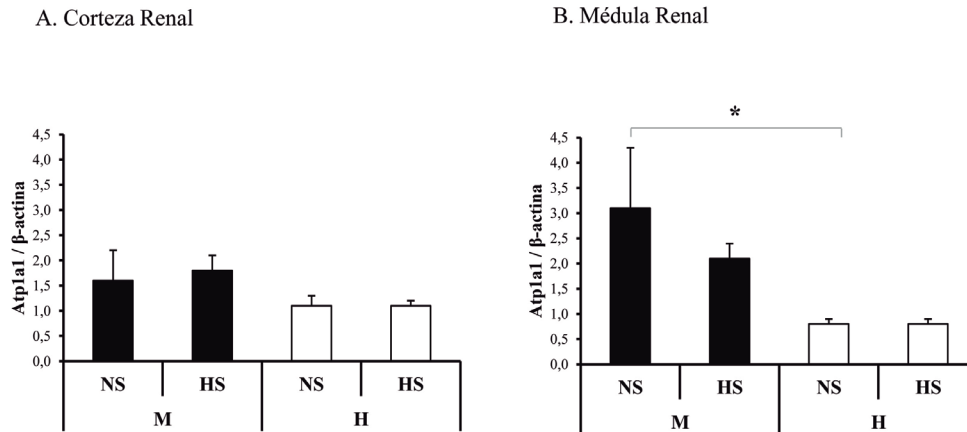


Figura 7. Expresión del citocromo 450 4 A (Cyp4A) en homogenatos renales expresada como cociente Cyp4A/Beta -Actina en unidades de densidad óptica. Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 4 ratas por grupo. Los valores se muestran como media±EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Debajo de cada gráfico de barras se muestran las bandas representativas de Western-Blots de Cyp4A y Beta Actina utilizada como control de carga proteica. Los símbolos por sobre las barras denotan * p<0,05 entre sexos y # p<0,05 entre dietas.

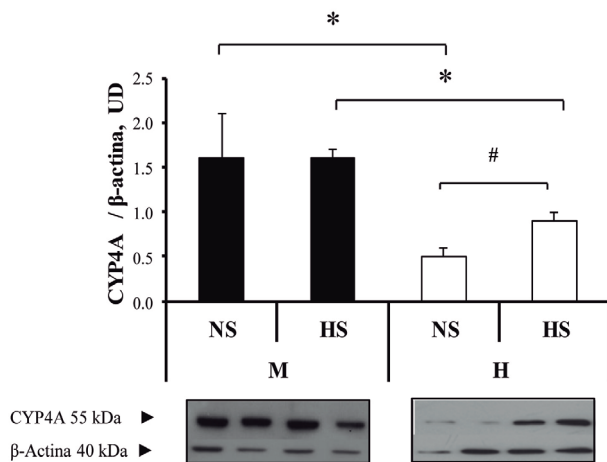
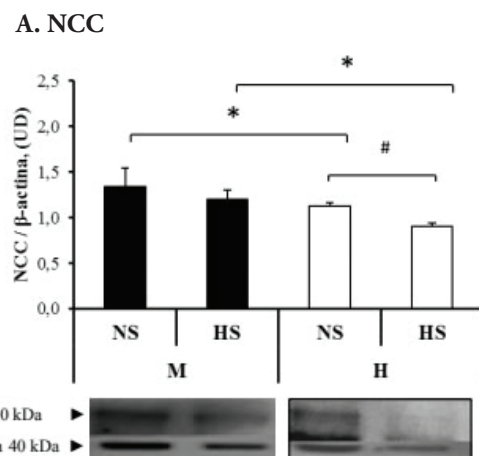
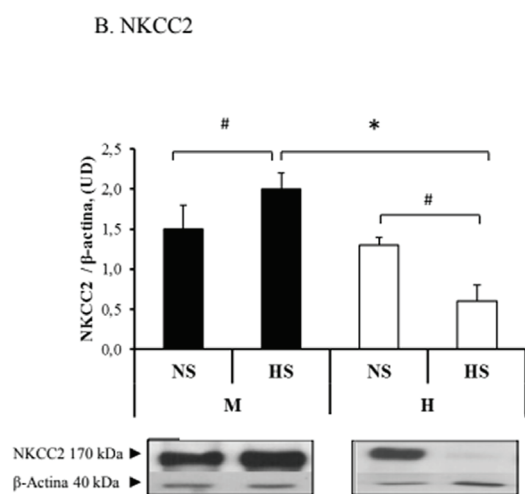


Figura 8. A. Expresión del cotransportador Na-Cl sensible a tiazidas (NCC) en corteza renal. B. Expresión del cotransportador Na-K-2Cl sensible a furosemida y bumetanida (NKCC2) en médula renal. Ambos expresados como cociente con Beta Actina en unidades de densidad óptica. Las barras negras representan a las ratas machos (M) y las barras blancas a las hembras (H) con al menos 4 ratas por grupo. Los valores se muestran como media±EMM. NS: sodio normal, HS: sodio elevado. Debajo de cada gráfico de barras se muestran las bandas representativas de Western-Blots de NCC, NKCC2 y Beta Actina utilizada como control de carga proteica. Los símbolos denotan* p<0,05 entre sexos y # p<0,05 entre dietas.





DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe que en animales con ingesta normosódica, los niveles basales de PAM son más altos, aunque normales, en machos que en hembras, hallazgo similar a los reportados por otros grupos.^(1,6,24) Por consiguiente, la diferencia en la PAM es una característica asociada al sexo. Esta diferencia se mantiene cuando las ratas consumen una dieta más alta en sodio. Ni machos ni hembras elevan la PAM de manera anormal cuando ingieren dieta alta en sodio (**Figura 1**). Ambos desarrollan mecanismos homeostáticos adecuados para evitar el aumento de la PAM. Sin embargo, al analizar el manejo del balance del sodio resulta ser muy diferente (**Figura 2 y Tabla 1**). Las hembras excretan más sodio que los machos en ambas dietas, pero también ingieren más sodio. Si se analiza el balance de sodio como cociente entre excreción/ingesta, se observa que los machos con dieta hipersódica tienen un cociente menor que el resto de los grupos. Esto indica que ingieren menos sodio pero también lo excretan en menor cantidad, o más lentamente, con relación a lo ingerido. Las hembras con dieta hipersódica ingieren más sodio y alcanzan un balance más eficiente, ya que el cociente excreción/ingesta se acerca a 1. Con ingesta normosódica no hay diferencias en los cocientes entre machos y hembras.

Aunque los machos con dieta hipersódica presentan esta disminución en la excreción de sodio, tampoco elevan la PAM. Probablemente

utilicen mecanismos adaptativos de regulación del volumen del líquido extracelular⁽³⁾ o del sodio subcutáneo⁽²⁵⁾ que evitan su incremento. En esto adquiere importancia el descenso marcado de la aldosterona en machos con ingesta hipersódica.

Así como se aprecian estas diferencias en las variables descriptas, también la respuesta renal, tanto hemodinámica como los cambios en la expresión de los transportadores de sodio, son diferentes entre sexos en condiciones de ingesta normosódica y se acentúan al ingerir dieta hipersódica. Los machos, al ingerir hipersódica aumentan el FPR, el VFG no cambia y, por lo tanto, disminuye la FF. Estos cambios en la perfusión renal pueden afectar la reabsorción de sodio. El aumento del FPR con disminución de la FF puede modificar los factores físicos peritubulares post-glomerulares, presión hidrostática (Ph) y presión coloidooncótica (Π) en favor de una mayor Ph y, por lo tanto, disminuir la reabsorción de sodio en los segmentos proximales del nefrón.⁽²⁶⁾ En las hembras con ingesta hipersódica se observa una disminución moderada del VFG, el FPR no cambia y la FF disminuye menos que en el macho, lo que probablemente influya escasamente sobre la Ph y la Π en la reabsorción de sodio. Otros grupos reportaron que el VFG es menor en hembras que en machos⁽²⁷⁾ y que esto sería secundario a la menor reabsorción proximal en hembras. Por lo tanto el volumen de filtrado remanente que alcanza la mácula densa aumenta y esto reduce el diámetro de la arteriola aferente.^(11,28)

La expresión de los transportadores y mediadores de la reabsorción tubular de sodio es diferente entre machos y hembras en condiciones de dieta normosódica y la carga de sodio magnificó esas diferencias.

La expresión de t-NKA y d-NKA es mayor en médula renal de machos que en hembras con ingesta normosódica (**Figuras 4 y 5**). En corteza, en cambio, no se hallaron diferencias entre sexos en la t-NKA. Al aumentar la carga de sodio de la ingesta, no se observaron cambios en la t-NKA de corteza de machos y hembras. Tampoco en médula de machos, mientras que su expresión disminuyó en médula de hembras con dieta

hipersódica. Al evaluar la capacidad de fosforilación, por lo tanto de inhibición de la función de NKA, las hembras con ingesta hipersódica fueron capaces de fosforilar la d-NKA en corteza y en médula renal. En cambio, la respuesta a la ingesta hipersódica en machos es menor y solo se apreció una disminución de la d-NKA en médula renal.

La expresión del gen de la NKA no cambió con las diferentes dietas, descartando que los cambios en la expresión de NKA secundarios al cambio en la ingesta de sodio sean de origen genómico, aunque sí concuerda con la mayor expresión de NKA total en médula renal de los machos. Los machos, independientemente del sodio, tienen mayor expresión que las hembras en médula renal, lo que constituye una característica de diferencia de sexo. Los cambios en la NKA son post-traduccionales y se vinculan a mecanismos regulatorios de la proteína. Uno de los mecanismos que disminuye la reabsorción de sodio en el riñón es la fosforilación/defosforilación de la subunidad α_1 de la NKA, en el residuo Ser23. La fosforilación de la NKA inhibe a la enzima y promueve una mayor excreción de sodio. Y la defosforilación causa el efecto opuesto.⁽²⁰⁻²²⁾

Nuestros hallazgos en la NKA concuerdan con los de otros grupos, en donde no encontraron diferencias en la expresión de NKA α_1 entre dieta normosódica y hipersódica en homogenatos o en superficie de membrana renal de ratones macho.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, otros investigadores tampoco refieren diferencias en la expresión de NKA en corteza y médula de machos y hembras.⁽¹¹⁾ Esta aparente discrepancia puede deberse al uso de diferente cepa de rata y/o en la edad de las mismas.

Los cambios en la expresión de NKA de médula renal en hembras con dieta hipersódica pueden relacionarse con la disminución de la aldosterona actuando sobre los conductos colectores. La aldosterona tiene efectos genómicos y no genómicos en los segmentos distales del nefrón sensibles a la hormona,⁽²⁹⁾ allí regula la expresión de la subunidad α_1 de NKA.⁽³⁰⁾ Previamente describimos que la ingesta hipersódica en

hembras causa un aumento en la fosforilación de la NKA en corteza y médula renal^(14,18) vinculado a la fosforilación por efecto de la dopamina renal, que aumenta con ingesta hipersódica.⁽¹⁸⁾ La escasa respuesta en machos contrasta con lo observado en hembras, lo que podría presuponer que la NKA de machos no cambia su estado de fosforilación o lo hace escasamente, como lo observado en médula. Pero en experimentos *ex vivo* la NKA de machos en segmentos proximales del nefrón cambia su fosforilación al variar el sodio intracelular⁽²⁰⁾ o en asa de Henle luego del tratamiento con dopamina^(22,31) o en conducto colector tratado con hormona antidiurética.⁽³²⁾

Parte de esta regulación diferencial entre machos y hembras puede vincularse con la expresión del CYP450 4A, un citocromo con buenos niveles de expresión en tejido renal.⁽¹²⁾ Un producto de la actividad del CYP4A es el 20-HETE. El 20-HETE estimula la proteína-kinasa C que fosforila e inhibe a la NKA.^(31,33) Como se muestra en este trabajo y en anteriores⁽¹⁴⁾, el CYP4A aumenta en hembras con ingesta hipersódica. En cambio, su expresión en machos con dieta normosódica es mayor que en hembras y se modifica al cambiar a ingesta hipersódica. Esto explicaría la escasa fosforilación de NKA en machos y, contrariamente, el cambio significativo en hembras.

La expresión de los cotransportadores NCC y NKCC2 fue diferente en machos y hembras. La expresión de NCC fue mayor en machos que en hembras con dieta normosódica y, al aumentar la ingesta, no se observaron cambios en los machos mientras que disminuyó en hembras. El NCC, sensible a tiazidas, se localiza en la membrana apical del túbulo distal, reabsorbe el 7% del sodio filtrado y es estimulado por aldosterona.⁽⁹⁻¹⁰⁾ Algunos trabajos refieren que el NCC disminuye con hipersódica en machos⁽¹⁰⁾ pero otros muestran que no presenta cambios⁽³⁴⁾ como en el presente trabajo. Si bien no podemos descartar una reubicación de la membrana al citosol, que se asocia a natriuresis⁽¹⁰⁾, la respuesta difiere entre machos y hembras, representando una diferencia de sexo. El NCC es regulado por

la aldosterona,⁽⁹⁾ por lo que nuestros resultados indicarían una mayor sensibilidad a su efecto en las hembras con dieta hipersódica.

El NKCC2 tuvo una disminución marcada en las hembras con dieta hipersódica. En machos no mostró variaciones entre dietas. El NKCC2 se expresa en la membrana apical del asa gruesa de Henle y reabsorbe el 25-30% del sodio filtrado. Lo observado en hembras con ingesta hipersódica es un cambio notable en cuanto al efecto natriurético. El NKCC2 es inhibido por furosemida y bumetanida y tiene diferentes mecanismos de regulación.⁽³⁵⁻³⁶⁾ Uno de los principales compromete al 20-HETE, que disminuye la expresión y actividad el NKCC2.⁽³⁷⁾ Relacionando la expresión del NKCC2 y la fosforilación de la NKA, si se toma como paso previo a la síntesis del 20-HETE el aumento en la expresión del CYP4A, esto podría explicar la ausencia de cambios en el NKCC2 con dieta hipersódica en machos y su marcada disminución en hembras. Este perfil es análogo al observado en el estado de fosforilación de NKA entre machos y hembras, lo que sugeriría un mecanismo de regulación similar.

En resumen, las ratas normotensas logran adecuar su respuesta homeostática ante el incremento en la ingesta de sodio, esto se evidencia al no alterar la PAM, pero lo hacen por medio de mecanismos diferentes según el sexo. En los machos los mecanismos involucran una menor ingesta de sodio, modificación de la hemodinamia intrarrenal con aumento de FPR, fosforilación de NKA en médula y mayor descenso de la aldosterona plasmática.

Las hembras muestran cambios en todos los transportadores estudiados, en línea con una reducción en la reabsorción de sodio. Por lo ocurrido con los transportadores de sodio sensibles a aldosterona y el menor cambio de la hormona, se especula que las hembras son más sensibles al descenso en sus niveles plasmáticos. De acuerdo a lo publicado, este podría ser un efecto un efecto vinculado particularmente a los estrógenos.^(4,38)

El sexo condiciona la presión arterial y el

balance de sodio, disminuyendo su reabsorción en hembras y aumentando el FPR en machos. Esto sugiere posibilidades de estudio diferenciales según sexo en trastornos del metabolismo del sodio.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no poseer ningún interés comercial o asociativo que presente un conflicto de intereses con el trabajo presentado.

Aspectos bioéticos: Siguiendo los lineamientos de esta publicación, los autores expresan su adhesión a la “*NIH Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*”. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>.

Agradecimientos: El presente trabajo ha recibido el 1er premio de la Sociedad Argentina de Nefrología en el XX Congreso Argentino de Nefrología, septiembre de 2017, Mar del Plata. Es parte de las investigaciones del primer autor, Luis A. Di Ciano, como Becario Doctoral de la Universidad de Buenos Aires. Ha sido financiado por los subsidios UBACYT GC 2013-2016, 20020120100379BA, director FRI y por Préstamo BID-PICT 2013-2461 director PJA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Khoury S, Yarows SA, O'Brien TK, Sowers JR. Ambulatory blood pressure monitoring in a nonacademic setting. Effects of age and sex. *Am J Hypertens.* 1992;5(9):616-23.
- 2) Wiinberg N, Høegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, et al. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens.* 1995;8(10 Pt 1):978-86.
- 3) Toering TJ, Gant CM, Visser FW, van der Graaf AM, Laverman GD, Danser AHJ, et al. Gender Differences in Renin Angiotensin Aldosterone System Affect Extra Cellular Volume in Healthy Subjects. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017 Jun 7.
- 4) Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and

- the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24(6):687-98.
- 5) Pechere-Bertschi A, Burnier M. Gonadal steroids, salt-sensitivity and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16(1):16-21.
 - 6) Maranon R, Reckelhoff JF. Sex and gender differences in control of blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125(7):311-8.
 - 7) Kim JM, Kim TH, Lee HH, Lee SH, Wang T. Postmenopausal hypertension and sodium sensitivity. *J Menopausal Med*. 2014;20(1):1-6.
 - 8) McGuire BB, Watson RW, Pérez-Barriocanal F, Fitzpatrick JM, Docherty NG. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2007;30(2):67-80.
 - 9) Lai L, Feng X, Liu D, Chen J, Zhang Y, Niu B, et al. Dietary salt modulates the sodium chloride cotransporter expression likely through an aldosterone-mediated WNK4-ERK1/2 signaling pathway. *Pflugers Arch*. 2012;463(3):477-85.
 - 10) Udwan K, Abed A, Roth I, Dizin E, Maillard M, Bettoni C, et al. Dietary sodium induces a redistribution of the tubular metabolic workload. *J Physiol*. 2017;595(22):6905-22.
 - 11) Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, Tran A, et al. Sexual dimorphic pattern of renal transporters and electrolyte homeostasis. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(12):3504-17.
 - 12) Ito O, Alonso-Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 2):F395-404.
 - 13) Yanes LL, Lima R, Moulana M, Romero DG, Yuan K, Ryan MJ, et al. Postmenopausal hypertension: role of 20-HETE. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(6):R1543-8.
 - 14) Di Ciano LA, Azurmendi PJ, Colombero C, Levin G, Oddo EM, Arrizurieta EE, et al. Defective renal dopamine function and sodium-sensitive hypertension in adult ovariectomized Wistar rats: role of the cytochrome P-450 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1358-68.
 - 15) De Luca Sarobe V, Nowicki S, Carranza A, Levin G, Barontini M, Arrizurieta E, et al. Low sodium intake induces an increase in renal monoamine oxidase activity in the rat. Involvement of an angiotensin II dependent mechanism. *Acta Physiol Scand*. 2005;185(2):161-7.
 - 16) Young MK Jr, Raisz LG. An anthrone procedure for determination of inulin in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1952;80(4):771-4.
 - 17) Smith HW, Finkelstein N, Aliminosa L, Crawford B, Graber M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J Clin Invest*. 1945;24(3):388-404.
 - 18) Di Ciano LA, Azurmendi PJ, Toledo JE, Oddo EM, Zotta E, Ochoa F, et al. Ovariectomy causes overexpression of renal Na(+),K(+)-ATPase and sodium-sensitive hypertension in adult Wistar rats. *Clin Exp Hypertens*. 2013;35(7):475-83.
 - 19) Feschenko MS, Sweadner KJ. Phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C at Ser¹⁸ occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17726-33.
 - 20) Ibarra FR, Cheng XYS, Agrén M, Svensson L-B, Aizman O, Aperia A. Intracellular sodium modulates the rate of protein kinase C phosphorylation of rat proximal tubule Na-K-ATPase. *Acta Physiol Scand*. 2002;175(2):1-7.
 - 21) Li D, Cheng SX, Fisone G, Caplan MJ, Ohtomo Y, Aperia A. Effects of okadaic acid, calyculin A, and PDBu on state of phosphorylation of rat renal Na+K+-ATPase. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 2):F863-9.
 - 22) Bertuccio CA, Cheng SX, Arrizurieta EE, Martín RS, Ibarra FR. Mechanisms of Na+K+-ATPase phosphorylation by PKC in the medullary thick ascending limb of Henle in the rat. *Pflugers Arch*. 2003;447(1):87-96.
 - 23) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
 - 24) Sandberg K, Ji H. Sex differences in primary hypertension. *Biol Sex Differ*. 2012;3:7.
 - 25) Titze J, Lang R, Ilies C, Schwind KH, Kirsch KA, Dietsch P, et al. Osmotically inactive skin Na+ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):F1108-17.
 - 26) Guyton AC, ed. Urine formation by the kidneys: II. Tubular processing of the glomerular filtrate. En: *Guyton and Hall's Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2005, p. 327.
 - 27) Munger K, Baylis C. Sex differences in renal hemodynamics in rats. *Am J Physiol*. 1988;254(2 Pt 2):F223-31.
 - 28) Ibarra ME, Albertoni Borghese MF, Majowicz MP, Ortiz MC, Loidl F, et al. Concerted regulation of

- renal plasma flow and glomerular filtration rate by renal dopamine and NOS I in rats on high salt intake. *Physiol Rep.* 2017;5(6). pii:e13202.
- 29) Le Moëllic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F, et al. Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(5):1145-60.
- 30) Blot-Chaubaud M, Djelidi S, Courtois-Coutry N, Fay M, Cluzeaud F, Hummler E, et al. Coordinate control of Na,K-ATPase mRNA expression by aldosterone, vasopressin and cell sodium delivery in the cortical collecting duct. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47(2):247-53.
- 31) Kirchheimer C, Mendez CF, Acquier A, Nowicki S. Role of 20-HETE in D1/D2 dopamine receptor synergism resulting in the inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1435-42.
- 32) Djelidi S, Beggah A, Courtois-Coutry N, Fay M, Cluzeaud F, Viengchareun S, et al. Basolateral translocation by vasopressin of the aldosterone-induced pool of latent Na-K-ATPases is accompanied by α 1 subunit dephosphorylation: study in a new aldosterone-sensitive rat cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(9):1805-18.
- 33) Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, et al. 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1224-30.
- 34) Frindt G, Palmer LG. Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of dietary sodium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(5):F1249-55.
- 35) Schiebl IM, Castrop H. Regulation of NKCC2 splicing and phosphorylation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(5):457-62.
- 36) Edwards A, Castrop H, Laghmani K, Vallon V, Layton AT. Effects of NKCC2 isoform regulation on NaCl transport in thick ascending limb and macula densa: a modeling study. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(2):F137-46.
- 37) Wu J, Liu X, Lai G, Yang X, Wang L, Zhao Y. Synergistic effect of 20-HETE and high salt on NKCC2 protein and blood pressure via ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Genet.* 2013;132(2):179-87.
- 38) Xue B, Badaue-Passos D Jr, Guo F, Gomez-Sanchez CE, Hay M, Johnson AK. Sex differences and central protective effect of 17 β -estradiol in the development of aldosterone/NaCl-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(5):H1577-85.

Recibido en su forma original: 29 de enero de 2018

En su forma corregida: 7 de febrero de 2018

Aceptación final: 14 de febrero de 2018

Dr. Fernando R. Ibarra

Laboratorio de Riñón Experimental y Bioquímica Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

e-mail: ibarraf@hotmail.com