UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

SENSIBILIDAD A LA SAL EN EL HIPERTIROIDISMO EXPERIMENTAL Y FUNCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE SODIO EN RATAS CON DISFUNCIÓN TIROIDEA

ROCÍO PÉREZ ABÚD

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada Autor: Rocío Pérez Abúd D.L.: GR 2331-2012 ISBN: 978-84-9028-105-5

JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental y función y expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea, presentada por Rocío Pérez Abúd, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de Enero de 2012

Fdo. José Félix Vargas Palomares

ANTONIO OSUNA ORTEGA, JEFE DE SERVICIO DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES.

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental y función y expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea, presentada por Rocío Pérez Abúd, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de Enero de 2012

Fdo. Antonio Osuna Ortega

JUAN MANUEL MORENO AYUSO, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental y función y expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea, presentada por Rocío Pérez Abúd, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de Enero de 2012

Fdo. Juan Manuel Moreno Ayuso

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

• Pérez-Abúd R, Rodríguez-Gómez I, Villarejo AB, Moreno JM, Wangensteen R, Tassi M, O'Valle F, Osuna A, Vargas F. Salt sensitivity in experimental thyroid disorders in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Aug; 301(2):E281-7. Epub 2011 Apr 26.

• Moreno JM, Pérez-Abúd R, Wangensteen R, Rodríguez Gómez I, López Merino I, Osuna A, Vargas F. Function and Expression of Renal Epithelial Sodium Transporters in Rats with Thyroid Dysfunction. *J Endocrinol Invest*. 2011 Nov 8.

A mis padres, a Martín y Lourdes

AGRADECIMIENTOS

Hoy finaliza un largo camino que he decidido recorrer desde muy lejos, y quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido para que ello sea posible.

En primer lugar a mis directores de tesis: al Profesor José Félix Vargas, no sólo por su continua dedicación, sino por transmitir a todo aquel que quiera aprender, sus conocimientos y el espíritu investigador; a D^o Antonio Osuna Ortega por darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo de trabajo y a D^o Juan Manuel Moreno Ayuso, por haber sido mi guía incondicional en este proyecto.

A Isabel, por su apoyo moral y técnico brindado en todo momento y por su solidaridad desinteresada hacia los demás.

A D^a Rosa Wangensteen y D^o Francisco O' Valle por su colaboración en varias técnicas realizadas en este trabajo.

Al personal de la unidad experimental del Hospital Virgen de las Nieves, por contribuir con la realización de esta tesis y por el afecto brindado todo este tiempo.

A mis padres, por haberme acompañado y apoyado en cada paso que he dado y por ser ejemplo de valores, sabiduría y amor. A mi hermana Daniela, por su cariño y por animarme siempre a seguir.

A Martín por estar siempre a mi lado, ayudándome y alentándome.

A mi gran amiga Jimena por su amistad incondicional, su ayuda sin límites y por invitarme a compartir sus sueños conmigo.

A todas las personas que he conocido aquí y que me han brindado tanto cariño.

Mi más sincero agradecimiento a las profesoras de la Universidad Nacional de Salta, Argentina, por habernos brindado las herramientas necesarias para desempeñar nuestra labor profesional.

I. ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO.	
MANIFESTACIONES CARDIOVASCULARES Y RENALES	3
1.1. Función cardiovascular	3
1.1.1. Cambios hemodinámicas	3
1.1.2. Hipertrofia cardiaca	4
1.2. Función renal	7
1.2.1. Masa renal y manejo del sodio renal	7
1.2.2. Flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular	9
1.2.3. Proteinuria	10
1.3. Estrés oxidativo en el hipertiroidismo	11
1.4. Óxido nítrico en la disfunción tiroidea	12
1.4.1.Óxido nítrico sintasa	12
1.4.2. Efectos del bloqueo de la NOS en el hipertiroidismo	14
2. HIPERTENSION POR SENSIBILIDAD A LA SAL	17
2.1. Generalidades	17
2.2. Sal y Óxido Nítrico	20
2.3. Sal y Estrés Oxidativo	23
2.4. Sal e inflamación	26
2.4.1. Inflamación túbulo-intersticial e hipertensión	26
2.4.2. Estrés oxidativo y activación de los factores de inflamación	27
2.4.3. Ingesta de sal y factor de crecimiento transformante o TGF- β 1	28

3. TRANSPORTE DE SODIO A LO LARGO DE LA NEFRONA	29
3.1. Regulación de la reabsorción de NaCl y agua	34
3.2. Transporte de sodio en situaciones especiales	36
3.2.1. Cirrosis Hepática	36
3.2.2. Embarazo	37
3.2.3. Hipertensión por sensibilidad a la sal	38
3.2.4 Deficiencia de hormonas tiroideas	39
3.2.5. Hipertiroidismo	42
II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	45
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Fármacos e instrumentos utilizados	53
1.1. Fármacos	53
1.2. Instrumentos	54
2. Experimento 1. Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental.	55
2.1. Animales y distribución	55
2.1.1 Protocolo experimental	56
2.1.2 Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía	
en el rabo	57
2.1.3 Cateterización de la arteria femoral	58
2.2. Procedimientos analíticos	58
2.2.1. Determinación de la proteinuria	58
2.2.2. Determinación de aminopeptidasas	59
2.2.3. Determinación de citoquinas	60
2.2.3. Estudio histopatológico	60
Estudio morfométrico	60

3. Experimento 2. Función y Expresión de los transportadores de sodio en
ratas con disfunción tiroidea61
3.1. Animales y distribución
3.1.1. Protocolo experimental
3.2. Procedimientos analíticos
3.2.1. Preparación de tejidos para western blots
3.2.2. Electroforesis y western blots de proteínas de membrana64
3.2.3. Preparación de ARN total
3.2.4. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en
tiempo real (RT-PCR)65
4. Análisis estadístico
IV RESULTADOS
1. Experimento 1. Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental71
1.1. Presión sanguínea y frecuencia cardiaca71
1.2. Variables morfológicas
1.3. Variables plasmáticas y niveles de hormona tiroidea73
1.4. Variables urinarias y metabólicas75
1.5. Excreción de nitritos y nitratos
1.6. Variables de estrés oxidativo
1.7. Aminopeptidasas urinarias
1.8. Resultados morfométricos
1.9. Variables de inflamación en la corteza renal
2. Experimento 2. Función y expresión de los transportadores de sodio renal
en la disfunción tiroidea
2.1 Variables biológicas

2.2. Respuesta urinaria a la sobrecarga salina intraperitoneal hipertónica	
e isotónica en ratas hipo e hipertiroideas conscientes	83
2.3. Respuesta renal a acetazolamida en ratas conscientes y concentración	
de proteínas y expresión de ARNm de NHE3	85
2.4. Respuesta renal a la furosemida en ratas conscientes y concentración	
de proteínas y expresión de ARNm de NKCC2	86
2.5 Respuesta renal a hidroclorotiazida en ratas conscientes y concentración	
de proteínas y expresión de ARNm del TSC	87
2.6. Respuesta renal a amiloride en ratas conscientes y cantidad de	
proteínas y expresión de ARNm del αENaC	89
V. DISCUSIÓN	91
VI. CONCLUSIONES	113
VII. BIBLIOGRAFÍA	117

I. INTRODUCCIÓN

1. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPERTIROIDISMO. MANIFESTACIONES CARDIOVASCULARES Y RENALES

1.1. Función cardiovascular

1.1.1. Cambios hemodinámicos

Las alteraciones tiroideas se acompañan de cambios importantes en la hemodinámica y en la función cardiaca (Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998; Klein y Ojamaa, 2001). Se producen alteraciones en la regulación de la presión arterial sistémica tanto en el hipo como en el hipertiroidismo en humanos y animales (Klein y Ojamaa, 1995; 2001; Larsen y cols., 1998).

El hipertiroidismo produce una circulación hiperdinámica con incremento del gasto cardiaco, frecuencia cardiaca y disminución de las resistencias periféricas, mientras el hipotiroidismo crónico tiene un bajo gasto cardíaco, bradicardia y aumento de las resistencias periféricas (Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998). Además, el hipertiroidismo acelera (Vargas y cols., 1988), mientras el hipotiroidismo previene y revierte algunos modelos experimentales de hipertensión (Vargas y cols., 1988; Andrade y cols., 1992).

El hipertiroidismo está asociado con un aumento del volumen sanguíneo, y a la inversa ocurre con el hipotiroidismo (Graettinger y cols., 1957; Anthonisen y cols., 1960). La eritropoyesis y los niveles de eritropoyetina en suero varían directamente con los cambios en los niveles de T_4 en suero.

Una de las respuestas cardiovasculares más tempranas a la administración de la hormona tiroidea es una disminución de la resistencia vascular periférica (Klein y Ojamaa 1995; Larsen y cols., 1998; Klein y Ojamaa, 2001). Esto se ha observado en pacientes hipotiroideos así como en animales eutiroideos después de la administración

aguda de la hormona tiroidea. El hipertiroidismo puede estar asociado con un 50% de caída en la resistencia vascular sistémica (RVS) (Graettinger y cols., 1959; Anthonisen y cols., 1960). Una resistencia vascular reducida podría considerarse por un aumento de la vasculatura y/o alteraciones en el mecanismo del control vascular favoreciendo una mayor vasodilatación. Se ha visto que el hipertiroidismo está asociado con un mayor número de capilares en los músculos de humanos (Celsing y cols., 1986) y ratas (Capo y Sillau, 1983). El aumento de la densidad capilar puede estar acompañado en paralelo por un aumento en el número de vasos arteriales de resistencia que podría reducir la resistencia vascular. La liberación local de vasodilatadores en tejidos periféricos asociados con el hipertiroidismo podría causar dilatación de los vasos de resistencia (Büssemaker y cols., 2003). Una hipótesis alternativa involucra la propiedad de la hormona tiroidea de reducir directamente el tono arteriolar del músculo liso en vasos de conducción y de resistencia (Ichikawa y cols., 1994; Zwaveling y cols., 1997). También se ha observado en vasos sanguíneos periféricos de animales que el bloqueo de los βreceptores invierte la bajada de la resistencia vascular periférica mediada por la T_3 y anula el incremento del gasto cardiaco (Kapitola y Vilimovská, 1981). Es más, que este aumento del flujo sanguíneo en el hipertiroidismo pueda ser abolido parcialmente por la atropina, hace pensar en una respuesta vasodilatadora mediada por catecolaminérgicos.

1.1.2. Hipertrofia cardiaca

El estado hipertiroideo se asocia a una hipertrofia cardiaca (Klein y Ojamaa, 1995; García del Río y cols., 1997; Rodriguez-Gomez y cols., 2003). La hormona tiroidea podría promover el desarrollo de una hipertrofia cardiaca, bien por un efecto directo en la síntesis de la proteína de miocardio, y/o indirectamente a través de cambios en el gasto cardiaco (Klein y Hong, 1986; Klein, 1990). El hipertiroidismo aumenta el gasto cardíaco y la frecuencia cardiaca basal, y estudios realizados en cultivos de células sugieren que los efectos de la T_4 en el corazón están mediados por efectos directos de la T_4 en el metabolismo proteico (Sanford y cols., 1978).

El hipertiroidismo produce hipertensión arterial y un incremento de la tasa peso del corazón/peso corporal (PC/PCF), una medida de la hipertrofia ventricular relativa. Además, el tratamiento con T_4 , no afecta o reduce la tasa peso ventrículo izquierdo/ventrículo derecho (VI/VD) (Gerdes y cols., 1987; Rodríguez-Gómez y cols., 2005). Por lo tanto, ambos pesos ventriculares, aumentaron con el tratamiento tiroideo en animales, pero la masa ventricular derecha aumentó más que la masa ventricular izquierda. Esta observación contrasta con el aumento de la tasa VI/VD normalmente observada en otros tipos de hipertensión, y puede ser debida a que el hipertiroidismo produce una circulación hiperdinámica, un tipo de hipertrofia cardiaca secundaria a sobrecarga de volumen (Klein y Ojamaa, 1995) (Tabla 1).

Se ha observado que cuando el propanolol se administra simultáneamente con T_4 , ambas respuestas, frecuencia e hipertrofia cardiaca, se previenen (Klein, 1990). Sin embargo, Gerdes y cols. (1987), mostraron que el propranolol modifica las dimensiones del miocito en ratas eutiroideas e hipertiroideas, pero no previene la hipertrofia cardiaca inducida por la hormona tiroidea, y este grupo (Gerdes y cols., 1987) también mostró que el propranolol no previene la hipertrofia cardiaca y necrosis celular multifocal en la rata con hipertiroidismo crónico.

Uno de los factores que contribuyen directamente, o junto con la elevada presión arterial (PA), al desarrollo de hipertrofia cardiaca es el sistema renina angiotensina (SRA) (Dahlöf, 1988; Morgan y Baker, 1991, Vargas y cols., 2011). La hormona tiroidea induce hipertrofia cardiaca junto con aumentos en la expresión cardiaca del ARNm de renina,

renina cardiaca y angiotensina II (ANG II) cardiaca (Kobori y cols., 1997; Kobori y cols., 1998). Estos autores, sugirieron que el SRA local juega un papel primario en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por el hipertiroidismo, y este mismo grupo (Kobori y cols., 1997) observó que la administración de inhibidores del sistema reninaangiotensina suprimió el SRA cardiaco, sugiriendo que contribuye al retroceso de la hipertrofia cardiaca en el estado hipertiroideo. Después, Basset y cols. (2001) también observaron que el tratamiento crónico con valsartán, un antagonista del receptor tipo 1 de la ANG II, previno el desarrollo de la hipertrofia del ventrículo izquierdo asociado con tirotoxicosis. Y Asahi y cols. (2001), observaron que el cilazapril y propranolol disminuyeron la presión arterial en la misma magnitud en ratas hipertiroideas, pero sólo el cilazapril redujo la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, el bloqueo crónico de la enzima convertidora de angiotensina (García del Río y cols., 1997) o AT₁ (Rodríguez-Gómez y cols., 2003) no altera significativamente la hipertrofia ventricular relativa tanto en ratas normotensas (Bedotto y cols., 1989) como en hipertensas (García del Río y cols., 1997; Rodríguez-Gómez y cols., 2003) hipertiroideas, indicando que el SRA circulante no juega un papel esencial en este tipo de hipertrofia cardiaca.

Otras observaciones indican que la hipertrofia ventricular en el hipertiroidismo no está relacionada con la presión arterial. Así, aumentos en la presión arterial inducidos por N^{G} -nitro-L-arginina metilester (L-NAME) (Klein y Ojamaa, 1995) o reducciones producidas por losartán (Rodriguez-Gomez y cols., 2003) en ratas hipertiroideas no modifican la hipertrofia ventricular. Estos datos indican que la hipertrofia cardiaca en el hipertiroidismo no está relacionada con la presión arterial. En este sentido, Bedotto y cols. (1989), también observaron que la hipertrofia cardiaca producida por la hormona tiroidea es independiente de la sobrecarga cardiaca. Podría proponerse que un efecto trófico directo de las hormonas tiroideas en el corazón puede ser el responsable de la

hipertrofia cardiaca en el hipertiroidismo. En apoyo a esta propuesta, estudios realizados en cultivos de cardiomiocitos han demostrado que la hormona tiroidea controla directamente la expresión génica y factores de crecimiento (Morgan y Baker, 1991).

Grupos	Hipertiroidismo	Hipotiroidismo
Variables morfológicas		
Peso Corporal Peso Tiroideo Peso ventricular Peso Renal Peso ventricular/peso corporal Peso renal/peso corporal Ventrículo izquierdo/ventrículo	$\rightarrow \rightarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow \rightarrow$	$\rightarrow \leftarrow \rightarrow \rightarrow$
Variables Hemodinámicas Presión arterial Volumen sanguíneo Gasto cardiaco Resistencia periférica total Frecuencia cardiaco Presión de pulso	$\uparrow \uparrow $	$\rightarrow \rightarrow \rightarrow \leftarrow \rightarrow \rightarrow$

Tabla 1. Variables hemodinámicas en el hiper e hipotiroidismo experimental

2. Función renal

1.2.1 Masa renal y manejo del sodio renal

Existe evidencia que sustenta que el hipotiroidismo disminuye y el hipertiroidismo aumenta el peso del riñón relativo al peso corporal. Este mecanismo no está completamente claro, pero parece que participa el SRA.

Las alteraciones tiroideas tienen importantes efectos en la función renal y en el metabolismo hidrosalino (Michael y cols., 1972; Bradley y cols., 1974; Emmanuel y cols., 1974). El hipotiroidismo inducido por tiroidectomía o medios químicos genera un

aumento de diuresis y natriuresis en condiciones basales (Michael y cols., 1972; Bradley y cols., 1974; Emmanuel y cols., 1974), después de una expansión salina (Taylor y Fregly, 1964; Holmes y DiScala, 1970) o en condiciones de restricción de sodio (Taylor y Fregly, 1964). Esta natriuresis sugiere que puede ser un mecanismo por el cual el hipotiroidismo previene la hipertensión arterial experimental (Bradley y cols., 1974). Sin embargo, otros autores fueron incapaces de detectar un aumento en la excreción de sodio en ratas hipotiroideas tratadas con metimazol en las mismas condiciones descritas anteriormente (Vargas y cols., 1991). Además, la excreción normal de sodio y agua en ratas hipotiroideas en un estudio de presión-diuresis-natriuresis (Vargas y cols., 1994), demuestra que el hipotiroidismo inducido por metimazol no puede ser considerado un síndrome de pérdida de sal. Estos resultados también indican que la hipotensión arterial inducida por el estado hipotiroideo no se acompaña por un desplazamiento a la izquierda de la curva presión-diuresis-natriuresis, como predice la teoría de Guyton sobre la regulación de la presión arterial. La diferencia de los resultados de nuestro grupo con otros autores puede ser debida a los diferentes protocolos usados, como cambios en la duración del hipotiroidismo, uso del anestésico (Michael y cols., 1972) y el uso de expansiones con el mismo volumen que en las ratas control (Stephan y cols., 1964), sin tener en cuenta el reducido peso corporal de las ratas hipotiroideas. Por otro lado, otros autores tampoco encontraron una elevación en la diuresis o natriuresis (Katz y Lindheimer, 1973; Emmanuel y cols., 1974) en ratas hipotiroideas. También se ha observado en ratas hipotiroideas una reducción en la capacidad de concentrar la orina (Holmes y DiScala, 1970; Michael y cols., 1972). Sin embargo, nuestro grupo observó que, la capacidad de concentración, no disminuyó en ratas tratadas con metimazol (Vargas y cols., 1991); mientras, que las ratas hipertiroideas mostraron un incremento

en la capacidad de concentrar la orina después de la privación de agua (Vargas y cols., 1991).

Mientras que en el hipotiroidismo se han estudiado extensamente los efectos en la función renal, en el hipertiroidismo hay menos datos acerca de su efecto, donde se ha visto una tendencia hacia la retención de sodio. Así, la excreción absoluta y fraccional de sodio disminuyó en ratas hipertiroideas en condiciones normales (Katz y Lindheimer, 1973), observándose también una reducida natriuresis después de sobrecargas salinas isotónicas e hipertónicas (Vargas y cols., 1991). Además, las ratas hipertensas hipertiroideas también muestran un desplazamiento en la respuesta presión-diuresis-natriuresis hacia presiones más altas (Vargas y cols., 1994). Este desplazamiento es debido a una disminución en la carga filtrada de sodio y a un aumento en la reabsorción tubular de sodio. La consecuencia de estos cambios en la relación presión-natriuresis es que la presión de perfusión renal tendría que ser elevada en ratas hipertiroideas para lograr la misma excreción de sodio que las controles. Estas observaciones coinciden con los resultados en otros modelos experimentales de hipertensión (Guyton, 1980).

1.2.2. Flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular

Tanto para el flujo sanguíneo renal (FSR) como para la tasa de filtración glomerular (TFG) se han observado resultados contradictorios tanto en pacientes hipertiroideos (Ford y cols., 1961; Cutler y cols., 1967), como en el hipotiroidismo humano y de ratas (Taylor y Fregly, 1964; Michael y cols., 1972; Emmanuel y cols., 1974). Estas diferencias pueden ser debidas a que tanto el FSR como la TFG, en algunos estudios, no estaban relacionados con el peso del riñón, especialmente en ratas hiper e hipotiroideas que tienen mayor y menor tamaño renal, respectivamente, que las ratas controles. En

este sentido, Fregly y cols. (1962), mostraron que cuando se relacionaban FSR y TFG al tamaño del riñón, las ratio eran las mismas que los controles. Varias observaciones de nuestro grupo indican que el aclaramiento de creatinina, en ratas conscientes, relacionado con el peso del riñón, disminuye con la administración de tiroxina de forma relativa al tiempo de inducción del hipertiroidismo y de la dosis de T₄ empleada (Vargas y cols., 1994; Garcia-Estañ y cols., 1995; Rodríguez-Gómez y cols., 2003; Rodríguez-Gómez y cols., 2005).

1.2.3 Proteinuria

Se ha demostrado en varios trabajos que las ratas hipertiroideas promueven una proteinuria aumentada en consonancia con la presencia de proteinuria descrita en los pacientes con la enfermedad de Grave (Weetman y cols., 1985). Esta alteración no está relacionada con la presión arterial, ya que una terapia antihipertensiva no es capaz de reducir la proteinuria (Rodríguez-Gómez y cols., 2003). La proteinuria parece también no estar relacionada con la actividad del SRA (Rodríguez-Gómez y cols., 2003). Estas observaciones sugieren que la proteinuria en el estado hipertiroideo puede estar producida por una acción directa de las hormonas tiroideas, aumentando la permeabilidad de la barrera glomerular. En este contexto, Tanwani y cols. (2002), aportaron datos de una posible asociación entre los pacientes tirotóxicos y un síndrome nefrótico atribuible a una nefropatía de cambios mínimos, una entidad clínica definida por una proteinuria que ocurre en ausencia de lesión en la pared capilar glomerular.

1.3. Estrés oxidativo en el hipertiroidismo

Algunas evidencias indican que el hipertiroidismo en humanos y en animales cursa con un incremento del estrés oxidativo (Venditti y cols., 1997; Tapia y cols., 1999; Sewerynek y cols., 2000; Fernández y cols., 2002).

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel esencial en el metabolismo energético del organismo. El desarrollo de un estado hipertiroideo en mamíferos conduce a un aumento significativo de su metabolismo basal, caracterizado por un aumento en el consumo total de oxígeno de los tejidos diana, efecto conocido como calorigénesis tiroidea. La inducción del hipertiroidismo experimental en la rata produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de óxido-reducción. A nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), como el anión superóxido (O2) y/o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y a nivel citoplasmático aumenta la generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERNs), como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO⁻) (Fernández y col., 1997; Tapia y cols., 1999), siendo, éste último, un potente oxidante que participa en la oxidación de grupos sulfidrilos, de lípidos y la nitración de residuos de tirosina, y en altas concentraciones es sumamente tóxico (Beckman y Koppenol, 1996; Combes y cols., 2001). Además puede oxidar de forma no enzimática al ácido araquidónico y liberar F₂-isoprostano que ejerce una potente vasoconstricción y efectos antinatriuréticos (Roberts y Morrow, 1997).

1.4 Óxido nítrico en la disfunción tiroidea

1.4.1 Óxido nítrico sintasa (NOS)

La actividad de la NOS está regulada principalmente en los tejidos relacionadas con el control de la presión sanguínea en ratas con hipertiroidismo (Moncada y cols., 1991). El mecanismo responsable del aumento de la actividad de la NOS en ratas hipertiroideas no se conoce y varios factores pueden participar solos o en combinación. Esto podría deberse a un efecto directo de las hormonas tiroideas; así, la estimulación de la actividad de la NOS a través de la generación de una señal no genómica (10 a 30 s) se ha observado en sinaptosomas preparados a partir de la corteza cerebral de adultos después de la adición de T_3 (Chakrabarti y Ray, 2000), la actividad de la NOS también puede estar aumentada en respuesta a la presión sanguínea elevada de estos animales (Vaziri y cols., 1998), o a la liberación aumentada de sustancias vasoactivas como la angiotensina II (Hennington y cols., 1998) o endotelina (Hirata y cols., 1995), que incrementan la producción de NO y están aumentadas en ratas hipertiroideas. Por último, también puede participar el mecanismo del estrés de rozamiento inducido por la circulación hiperdinámica de estos animales. El estrés de rozamiento regula la expresión de la NOS (Xiao y cols., 1997) y se ha descrito un elemento de la supuesta respuesta al estrés de rozamiento en la secuencia del gen promotor de la NOS (Marsden y cols., 1993). Se ha demostrado una regulación al alza de la NOS constitutiva en la aorta de otras enfermedades que cursan con circulación hiperdinámica, como la cirrosis hepática y la anemia por deficiencia de hierro (Ni y cols., 1997).

La actividad de la NOS en los tejidos de ratas hipotiroideas muestra un patrón heterogéneo, lo cual es difícil de conciliar con una explicación común o una hipótesis, aunque puede ser el resultado de cambios en la expresión de las diferentes isoformas de

la NOS, o incluso relacionado a cambios en la actividad de la NOS de las fracciones subcelulares. De hecho, se ha demostrado recientemente que la NOS mitocondrial del músculo esquelético y del hígado está aumentada en el hipotiroidismo e inversamente correlacionada la T_3 sérica, mientras que en los tejidos neuronales el hipotiroidismo se asocia a una reducción de la actividad de la NOS (Ueta y cols., 1995).

El aumento y la disminución de la actividad de la NOS en la aorta de ratas hiper e hipotiroideas respectivamente, debido a la importancia del NO en el control del tono vascular (Moncada y cols., 1991), sugiere que esta alteración puede jugar un papel en los cambios en la resistencia vascular periférica total (RPT) previamente demostrada en estos animales. Estos datos concuerdan con la respuesta aumentada y disminuida a la acetilcolina, el vasodilatador dependiente del endotelio, en riñones perfundidos y en aortas aisladas de ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente (Letizia y cols., 1997).

El NO de la médula renal juega un papel importante en la regulación de la excreción de sodio y agua y por lo tanto en el control de la presión sanguínea (Romero y cols., 1992). Los valores normales en la actividad de la NOS medular en nuestras ratas hipotiroideas indican que la médula tiene una capacidad suficiente para sintetizar NO, lo cual concuerda con el manejo normal de sodio de las ratas hipotiroideas en condiciones normales (Iwata y Honda, 2004). La actividad aumentada de la NOS en la corteza renal de ratas con hipertiroidismo puede ser secundaria a la circulación hiperdinámica de estos animales, ya que la actividad de la NOS cortical se produce principalmente por la NOS endotelial constitutiva (Mattson y Higgins, 1996).

Los niveles similares de la actividad de la NOS en la corteza y en la médula renal de nuestras ratas hipertiroideas pueden producir un defecto en la producción del NO en la médula renal, que podrían participar en la falta de respuesta de la diuresis- natriuresis de presión de estos animales (Iwata y Honda, 2004).

La actividad de la NOS en el ventrículo izquierdo de ratas con hipertiroidismo fue dos veces mayor que en los controles. Esta alteración podría ser secundaria a la presión sanguínea elevada de estas ratas en lugar de ser causada por la circulación hiperdinámica o la frecuencia cardiaca aumentada, ya que la actividad de la NOS en el ventrículo derecho fue similar a las controles.

El aumento de la actividad de la NOS en los tejidos cardiovascular y renal de las ratas hipertiroideas está de acuerdo con los resultados publicados en otros tejidos. Un estudio utilizando hibridación histoquímica cuantitativa in situ con un oligodesoxinucleótido específico, mostró que el hipertiroidismo inducido por la T₃ duplicó la prevalencia de la transcripción del gen de la NOS en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON), mientras que el hipotiroidismo produjo una reducción altamente significativa en la transcripción de los genes de la NOS en el PVN y SON (Ueta y cols., 1995). Fernández y cols. (1997) demostraron que el hipertiroidismo produce un aumento significativo y reversible en la actividad de la NOS en el hígado de la rata. La expresión del gen de la óxido nítrico sintasa del hipotálamo está regulado por las hormonas tiroideas y la regulación al alza de las transcripciones de genes de la NOS inducida por el estímulo osmótico de la sobrecarga de sal crónica fue significativamente atenuada por el hipotiroidismo inducido por el propiltiouracilo.

1.4.2. Efectos del bloqueo de la NOS en el hipertiroidismo

Se sabe que el óxido nítrico juega un papel importante en la regulación del tono vascular y la excreción renal de sodio (Romero y cols., 1992; Cowley y cols., 1995) y, en consecuencia, de la presión arterial (Moncada y cols., 1991). De este modo, tanto la

administración aguda o crónica de inhibidores de la NOS aumentan la presión arterial sistémica. (Fernández y cols., 1997).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que las ratas tratadas con T_4 se vuelven hipertensas tras la inhibición parcial de la NOS con una dosis de L-NAME, un inhibidor no específico de la NOS, que en ratas controles no modificó la presión arterial. Varios mecanismos o conjuntos de mecanismos pueden participar en la sensibilidad aumentada al bloqueo parcial de la NOS en ratas hipertiroideas. Muchos estudios (Moncada y cols., 1991; Fernández y cols., 1997) proporcionan evidencia de que la circulación hiperdinámica del hipertiroidismo se acompaña de un aumento en la producción de NO. La anemia (Ni y cols., 1997) y la cirrosis hepática también se asocian con circulaciones hiperdinámicas y la producción aumentada de NO; las ratas con cirrosis también muestran una respuesta presora incrementada al NO. Estas observaciones indican que la respuesta presora incrementada al L-NAME en ratas hipertiroideas puede ser secundaria a una producción aumentada de NO, que puede tener un importante papel homeostático en estos animales.

Está bien documentado que el bloqueo del NO aumenta la respuesta a vasoconstrictores, sobre todo en los vasos de resistencia (Marsden y cols., 1993), y este efecto es mayor en las ratas hipertiroideas (Ganong, 1982); este mecanismo puede aumentar la resistencia periférica y por lo tanto, aumentar la PA. Más aún, el hipertiroidismo afecta el manejo renal de sodio en las ratas (Iwata y Honda, 2004), reduce la excreción de sodio después de una sobrecarga salina, y disminuye la respuesta de presión-diuresis-natriuresis (Iwata y Honda, 2004). Estos efectos antinatriuréticos puede ser agravados por deficiencia de NO (Romero y cols., 1992) y contribuir al desplazamiento hacia la derecha de la curva de diuresis-natriuresis de presión.
La hipertensión causada por la administración crónica de T_4 más la dosis supresora de L-NAME es atenuada por la administración de losartán, lo que indica que el SRA juega un papel importante en este tipo de hipertensión (Grassby y McNeill, 1988). Un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo (datos no publicados) proporciona evidencia de que la actividad aumentada de la NOS podría desempeñar un papel protector homeostático en el hipertiroidismo contra los efectos prohipertensivos de la hormona tiroidea.

El óxido nítrico puede ser generado por la actividad neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). Estas isoformas de la NOS están ampliamente distribuidas en los órganos relacionados con el control de la presión arterial y en el riñón de ratas normales (Grassby y McNeill, 1988), por lo que han sido implicados en la regulación de la excreción de sodio y la presión sanguínea. Por lo tanto, también estudiamos los efectos de la inhibición crónica de las iNOS o nNOS en el control de la presión sanguínea a largo plazo y las variables morfológicas y renales en ratas hipertiroideas. Para ello, se utilizó aminiguanidina (AG) y 7-nitroindazole (7NI). La AG es un inhibidor selectivo de la iNOS in vitro (Griffiths y cols., 1993) e in vivo (Mattson y cols., 1998) y el 7NI produjo una inhibición relativamente selectiva de la nNOS sobre la eNOS (Moore y cols., 1996) y disminuyó la expresión de la nNOS en la aorta (Xu y cols., 2000).

La AG aumentó la presión sanguínea en las ratas con hipertiroidismo en dosis que no tenía ningún efecto presor en las controles. Los niveles plasmáticos elevados de nitratos + nitritos (un índice de la producción de NO) en los animales con hipertiroidismo disminuyó con la administración de la droga, lo que indica que este efecto presor importante se relaciona con la inhibición de la producción de NO. Debido a que se ha demostrado que la AG inhibe la iNOS (Griffiths y cols., 1993; Mattson y cols., 1998),

estos resultados indican que la isoforma inducible se activa en los animales con hipertiroidismo.

Curiosamente, hemos observado que la administración del inhibidor de la nNOS, 7-NI, suprime o atenúa el aumento de la presión sanguínea, frecuencia cardiaca y la presión de pulso producido por dosis crecientes de tiroxina en ratas (datos no publicados). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la nNOS puede participar en el desarrollo de las manifestaciones características de la circulación hiperdinámica en ratas hipertiroideas, probablemente debido a un mecanismo central.

En resumen, puede decirse que la iNOS podría contrarrestar los efectos prohipertensivos de la T_4 y que la nNOS participa en la manifestación hemodinámica característica del hipertiroidismo. Los mecanismos por los cuales la administración de 7-NI suprime la circulación hiperdinámica en ratas hipertiroideas, requieren una investigación posterior.

2. HIPERTENSION POR SENSIBILIDAD A LA SAL

2.1. Generalidades

La hipertensión ha sido reconocida como una enfermedad multifactorial resultante de los efectos de una combinación de factores genéticos y ambientales. Un exceso de sal en la dieta es el factor ambiental más común que contribuye a la patogénesis de la hipertensión (Gu y cols., 1998; Aviv, 2001; Sacks y cols., 2001; Frohlich y Veragic, 2005), y la moderación en la ingesta de sal se recomienda frecuentemente para proteger los incrementos excesivos de la presión sanguínea (Houston, 1986; Law y cols., 1991; Kuller, 1997). La sensibilidad a la sal (SS) tiene un papel importante como un factor contribuyente a la manifestación y progresión de la enfermedad renal crónica y cardiovascular (Campese, 1994; Klag y cols., 1996; Johnson y cols., 2002). Acerca del 50% de los pacientes con hipertensión esencial presenta hipertensión SS, los cuales manifiestan sensibilidad a la sal y progresión más severa de hipertensión con daño en órganos diana, incluyendo enfermedad renal terminal (Campese y cols., 1994; Morimoto y cols., 1997; Manning y cols., 2005).

Se ha visto que la respuesta renal pro-inflamatoria, como la acumulación de células inmunes en los riñones, podría tener un papel importante en la retención de sodio y por lo tanto en el desarrollo de hipertensión (Rodríguez-Iturbe y cols., 2002 (b)). A su vez hay estudios que demuestran que una reducción en el infiltrado celular inflamatorio renal previene el desarrollo de hipertensión SS (Álvarez y cols., 2002; Rodríguez-Iturbe y cols., 2002 (b)).

Estudios epidemiológicos han demostrado la correlación entre la ingesta de sal de la dieta con la prevalencia y progresión de la hipertensión (Haddy y Pamnani, 1995). A pesar que el grado de sensibilidad a la sal es variable, algunos individuos son especialmente propensos a padecer hipertensión en respuesta a una dieta con elevado contenido de sal. Los sujetos con hipertensión esencial tienen mayor frecuencia de sensibilidad a la sal que la población normotensa (Luke, 1993). Existe evidencia que demuestra que la sensibilidad a la sal se asocia con una actividad de renina plasmática (PRA) baja y dificultad para la excreción renal de sodio (Weinberger, 1993).

La tabla 2 muestra estudios llevados a cabo por diferentes autores en ratas con dietas ricas en sal, en agua de bebida o en el pienso, observándose en la mayoría un aumento de la presión sanguínea.

En un estudio realizado por nuestro grupo (Cruz y cols., 2011), la administración crónica de NaCl al 2% en el agua de bebida durante 5 semanas produjo un aumento moderado de la presión arterial sistólica (15 mmHg) en ratas Wistar machos, al igual

que varios estudios que describen un aumento moderado de la presión sanguínea con una ingesta de sal elevada en ratas Sprague-Dawley (Wang y cols., 1996; Ni y Vaziri, 2001; Newaz y cols., 2005), la sal también aumentó la frecuencia cardíaca, la presión de pulso, los isoprostanos urinarios, metabolitos del NO en orina (NOx), vasopresina, endotelina y la proteinuria. Sin embargo, otros estudios no encontraron cambios significativos en la presión sanguínea en ratas Sprague-Dawley con una ingesta de sal elevada (Debinski y cols, 1990; Osborn y Hornfeldt, 1998). Estas discrepancias pueden reflejar diferencias en la duración del tratamiento o en la vía de administración (en la comida o en el agua de bebida).

 Tabla 2. Estudios llevados a cabo en ratas por diferentes autores con dietas ricas en sal,

 en pienso o en agua de bebida

AUTOR	(SAL)	RATA	P.A.	MÉTODO	T'
Banday (2007)	1% agua	S-D	-	Directo	12 días
Sankaralingam (2006)	0,9% agua	S-D	1	Indirecto	3 sem
Gu (2006)	4%	Dhal-S-S	1	Indirecto	5 sem
Kobori (2003)	8%	Dhal-S-S	Ť	Indirecto	4 sem
Lenda (2000)	7%	S-D	-	Directo	3-4 sem
Osborn (1998)	4%	S-D	1	Directo	5-7 sem

2.2. Sal y Óxido Nítrico

Estudios previos demuestran que una dieta con elevado contenido en sal dificulta la relajación dependiente del endotelio en los vasos sanguíneos, inducido por una variedad de agentes vasodilatadores. (Campese, 1994; Chen y cols., 1998; Liu y cols., 1999; Lenda y cols., 2000; Bragulat y cols., 2001). Un factor que podría impedir la relajación vascular a un estímulo dilatador en animales con una dieta elevada en sal, es la función endotelial deteriorada. Esto puede deberse tanto porque la producción de NO del endotelio mediada por la acetilcolina (Ach) está afectada o porque el NO no produce vasodilatación. (Boegehold, 1993; Campese, 1994; Chen y cols., 1998; Liu y cols., 1999; Lenda y cols., 2000; Bragulat y cols., 2001).

El NO es el principal regulador del tono vascular. Su disminución en la producción o biodisponibilidad o una respuesta vascular disminuida al NO constituye un factor implicado en la patogénesis de la hipertensión (Panza y cols., 1990; Berry y cols., 2001). Un incremento de la presión sanguínea (PS), debido al elevado consumo de sal (sensibilidad a la sal) es un fenómeno bien documentado en humanos y se considera un factor importante en la patogénesis de la hipertensión (Campese, 1994). En modelos animales, la hipertensión por sensibilidad a la sal y el incremento de la PS después de una sobrecarga salina se caracterizan por una reducción en la producción de NO (Campese y cols., 1996; Chen y cols., 1998; Fujiwara y cols., 2000). En humanos con hipertensión por sensibilidad a la sal sucede algo similar, ya que después de una sobrecarga salina se encuentran niveles más bajos de metabolitos de NO tanto en plasma como en orina (Campese y cols., 1996; Fujiwara y cols, 2000; Bragulat y cols., 2001).

Se observó que las especies reactivas de oxígeno disminuyen la función endotelial en diversas formas de hipertensión y aumentan el estrés oxidativo en los microvasos de ratas espontáneamente hipertensas SHR y ratas Dahl hipertensas sensibles a la sal (Suzuki y cols., 1995; Swei y cols., 1997; Manning, 2003). Un estudio llevado a cabo por Lenda y cols. (2000) indica que las especies reactivas de oxígeno también pueden contribuir a una disminución de la dilatación dependiente del endotelio en ratas normotensas que tienen una dieta con elevado contenido en sal (Cai y Harrison, 2000; Francois y Kojda, 2004; Satoh y cols., 2005).

Estudios experimentales demuestran que el tratamiento con L-NAME, un análogo de la L-arginina, produce aumento de la presión arterial en mayor medida a ratas alimentadas con una dieta con alto contenido en sal que en las ratas con una dieta baja en sal; después de 8 semanas, los animales tratados con L-NAME y sal presentaron alteración de la función renal y proteinuria, lo que sugiere que los cambios adaptativos en la producción de óxido nítrico parecen jugar un papel crítico en la homeostasis del sodio y de la presión sanguínea (Tolins y Shultz, 1994). La disminución de la actividad de la NOS puede ser un factor patogénico en el desarrollo de la hipertensión inducida por sal. El consumo de una dieta con alto contenido en sal y la regulación a la baja de la expresión de la iNOS en la corteza y médula renal, aorta y el corazón; regulación a la baja marcada de la eNOS en la corteza renal y aorta, y menor expresión de la nNOS en el cerebro, corteza y médula renal (Ni y Vaziri, 2001). En comparación con ratas adaptadas a una alta ingesta de sal, las alimentadas con una dieta baja en sal mostraron aumento en la expresión de la eNOS en el endotelio microvascular renal y aumento en la expresión de la enzima N^{G} dimetilarginina dimetilaminohidrolasa que metaboliza la dimetilarginina asimétrica o ADMA, un inhibidor endógeno de la NOS (Tojo y cols., 2000). La respuesta vasodilatadora a ACh, mediada por el óxido nítrico en arterias

mesentéricas perfundidas, fue atenuada en perros alimentados con una dieta alta en sal en comparación con el grupo con una dieta con bajo contenido en sal, y la respuesta a nitroprusiato de sodio fue idéntica en ambos grupos, lo que sugiere disfunción endotelial inducida por la sal (Sofola y cols., 2004).

Hodge y cols. (2002) observaron que el tratamiento con L-NAME produjo un aumento en la presión sanguínea que fue por sensibilidad a la sal, ya que el componente sensible a la sal se asoció con un aumento de los niveles de ANG II en el plasma, este componente es ANG II-dependiente. Kopkan y Cervenka (2009) sugirieron que las interacciones fisiológicas del SRA, el óxido nítrico, y el superóxido proporcionan una regulación coordinada de la función renal y que el desequilibrio de estas interacciones está críticamente relacionado con la fisiopatología de la sensibilidad a la sal y la hipertensión.

Los experimentos realizados años anteriores mostraron que la producción de NO aumentó en ratas normotensas cuando el contenido de sal en la dieta estaba incrementado (Song y cols., 2004; Kopkan y Cervenka, 2009), pero no ocurrió lo mismo en ratas Dahl/Rapp SS (Kopkan y Majid, 2005; Hirai y cols., 2006; Kopkan y Cervenka, 2009). En ratas, la respuesta de la presión sanguínea a un aumento en el consumo de sal es dependiente de la producción de NO (Banday y cols., 2007). Los seres humanos sanos muestran ganancia de peso y un aumento en el flujo sanguíneo renal, asociado a una disminución de la resistencia vascular renal cuando la ingesta de sodio es entre 77 mEq/d y 250 mEq/d. Estos cambios en los parámetros hemodinámicos renales fueron contrarrestados con la adición de N^G-mono-metil-L-arginine (L-NMMA), lo que indica una dependencia de la producción de NO y confirma el papel importante que desempeña el NO en la respuesta hemodinámica a la ingesta de sal (Álvarez y cols., 2000).

2.3. Sal y Estrés Oxidativo.

Basándose en hallazgos en donde animales tratados con elevadas cantidades de sal tuvieron una disminución en la actividad de la NOS y eran normotensos, se postula la teoría que el estrés oxidativo puede ser un factor disparador de la sensibilidad a la sal. Se ha visto una baja vasorrelajación tanto para agentes dependientes como independientes del endotelio acompañado de un aumento en la PS en animales con una ingesta de sal elevada (Suzuki y cols., 1995; Swei y cols., 1997; Swei y cols., 1999; Trolliet y cols., 2001).

El estrés oxidativo se produce en un tejido o en todo el cuerpo cuando la producción total de oxidante (NADPH oxidasa, xantina oxidasa, NO sintasa, ciclooxigenasa) excede la capacidad antioxidante (superóxido dismutasa (SOD), glutation (GSH) y catalasa). Estudios previos sobre la hipertensión esencial en humanos indican que la producción de radicales libres aumenta y los niveles de antioxidantes disminuyen, y más de la mitad de los hipertensos tienen un tipo de hipertensión sensible a la sal con daño renal progresivo. Se ha descripto que el estrés oxidativo puede aumentar durante la hipertensión debido a un aumento en la producción de EROs, como el O2-, el H2O2 o el radical hidroxilo o por una disminución de enzimas antioxidantes como la SOD (Manning y cols., 2003) Existen estudios que demuestran que los seres humanos hipertensos esenciales tienen una capacidad antioxidante disminuida (Ceriello y cols., 1991, Buczynski y cols., 1993, Galley y cols., 1997, Russo y cols., 1998) y producen una cantidad excesiva de EROs (Prabha y cols., 1990, Lacy y cols., 1998), y más de la mitad de estos hipertensos tienen hipertensión SS (Weinberger, 1996) con un manejo anormal renal de sodio (Bianchi y cols., 1979) y daño renal progresivo (Lea y Nicholas, 2002). Se ha descripto que la actividad de la SOD (Kumar y Das, 1993, Russo y cols.,

1998) y los niveles de vitamina E (Kumar y Das, 1993) en los eritrocitos está disminuida en pacientes con hipertensión esencial. El O_2 - y H_2O_2 producido por los leucocitos y los niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos aumentan en los pacientes hipertensos no controlados (Salón y cols., 1991). Estos datos sugieren que un aumento en el estrés oxidativo es un mecanismo que contribuye a la hipertensión SS, y puede jugar un papel importante en el daño renal asociado a la hipertensión SS.

También se han llevado a cabo estudios sobre estrés oxidativo en modelos animales de hipertensión SS. Se han desarrollado varios modelos experimentales de hipertensión SS, incluyendo 1) ratas Dahl sal-sensibles (S), 2) ratas espontáneamente hipertensas predispuestas accidente cerebro vascular (SHRSP), 3) hipertensión а e mineralocorticoide. El hilo común que une a estos modelos es una mayor producción de O₂- en los vasos arteriales o en el riñón. Este aumento de EROs puede conducir a la hipertensión o daño renal. Algunos autores (Trolliet y cols., 2001; Meng y cols., 2002) han encontrado que la producción renal de O2- aumenta en las ratas Dahl S con una dieta con alto contenido en sodio, en parte debido a una disminución en los niveles renales de SOD. (Meng y cols., 2003).

Las ratas Dahl constituyen un buen modelo de hipertensión por sensibilidad a la sal. Se ha descripto que las ratas Dahl S experimentan un marcado aumento de la presión sanguínea durante la ingesta de Na aumentada, y varios laboratorios indican que el estrés oxidativo es muy importante en las ratas Dahl S. Swei y cols. (1999) observaron que las ratas hipertensas Dahl S presentaron niveles significativamente más altos de O_{2^-} en la microvasculatura mesentérica y de H_2O_2 plasmático que las ratas Dahl S desarrollaron hipertensión, aumento de la producción renal de O_{2^-} y de los niveles de F2-isoprostanos e incremento de la disfunción renal después de 2 semanas de una dieta con alto contenido en sal (8%). El estrés oxidativo se asoció con nefroesclerosis hipertensiva saldependiente.

Se ha demostrado que la NADPH oxidasa es uno de los prooxidantes más potentes, tanto en la vasculatura como en el riñón. Esta oxidasa está formada básicamente por los componentes de membrana gp91phox y p22phox y los componentes citosólicos p47phox, p67phox y p40phox. Se ha descripto que las ratas Sprague-Dawley con una dieta rica en Na experimentan incrementos en la corteza renal de las subunidades gp91phox y p47phox (Kitiyakara y cols., 2003).

En un estudio llevado a cabo por Niu y cols. (2008), se utilizaron ratas Dahl S o cepas de ratas R/Rapp, las que se mantuvieron durante 5 semanas con una dieta con un alto contenido en sodio (8%) o con un alto contenido en sodio + apocinina, que es un inhibidor de la NADPH oxidasa (1,5 mmol/l en el agua potable). Al final del tratamiento, el grupo Dhal S con una dieta alta en sal, presentó un incremento notable de la expresión del ARNm en la corteza renal de las subunidades gp91phox, p22phox, p47phox y p67phox, a diferencia del grupo tratado con sal + apocinina que presentó una disminución significativa en la expresión de estas subunidades de NADPH oxidasa. Al mismo tiempo, en las ratas tratadas con sal + apocinina 1) aumentó la relación GSH / GSSG (glutatión oxidado) en la corteza renal, 2) hubo liberación de $O_{2^{-}}$ en la corteza renal y disminución de la actividad de la NADPH oxidasa y 3) se redujo el daño glomerular renal e intersticial considerablemente. La apocinina también disminuyó la infiltración renal cortical de monocitos/macrófagos y atenuó los descensos de la hemodinámica renal y provocó una disminución de la presión sanguínea. Estos datos sugieren que la NADPH oxidasa tiene un papel importante en el desarrollo del estrés oxidativo y de la inflamación en la corteza renal, que conduce a una disminución en la hemodinámica renal, daño renal cortical y aumento de la presión arterial (Niu y cols., 2008).

2.4. Sal e inflamación

2.4.1. Inflamación túbulo-intersticial e hipertensión

Svendson (1976) describió un mecanismo inmune en la patogénesis de la hipertensión al observar infiltración renal de linfocitos perivasculares en el modelo de hipertensión DOCA-sal, mostrando una "reactividad inmune tardía" (Bendich y cols., 1981). Estos primeros hallazgos fueron interpretados por los investigadores como evidencia de que la hipertensión era resultado de una vasculitis autoinmune. Se ha llevado a cabo un estudio que proporciona evidencia de que la acumulación de células inmunes en el riñón podría ser responsable de la retención de sodio, y por lo tanto de la hipertensión. Primero, la infiltración túbulo-intersticial de linfocitos y macrófagos que parece estar universalmente presente en todos los modelos experimentales de hipertensión por sensibilidad a la sal (Rodríguez-Iturbe y cols., 2002 (b)), incluyendo la hipertensión DOCA-sal, hipertensión sal sensible por infusión de ANG II o post infusión de catecolaminas, sensibilidad a la sal inducida por hiperuricemia, hipertensión después de la inhibición crónica de NO, modelo de hipertensión two-kidney one-clip, hipertensión SHR y nefropatía por envejecimiento o ciclosporina. Segundo, se ha visto una correlación directa entre el número de células infiltradas y la severidad de la hipertensión, debido a la retención de sodio que provocan las mismas (Rodríguez-Iturbe y cols., 2002 (c), Rodríguez-Iturbe y cols., 2003). Finalmente existen numerosos estudios que demuestran tratamientos que reducen el infiltrado inflamatorio renal

previniendo el desarrollo de la hipertensión por sensibilidad a la sal (Álvarez y cols., 2002, Quiroz y cols., 2001, Rodríguez-Iturbe y cols., 2001).

Los mecanismos por los cuales el infiltrado inmune contribuye a la patogénesis de la hipertensión no están completamente definidos, pero pueden estar relacionados con la efectos de la ANG II intrarrenal inducida por la acumulación de células inmunes sobre la retención de sodio por efectos combinados: reducción de la filtración de sodio, incremento de la reabsorción de sodio a nivel del túbulo proximal y alteración de la curva de natriuresis de presión. El estrés oxidativo aumentado, junto a la ANG II intrarrenal constituye una curva de retroalimentación que mantiene la inflamación renal intersticial. Los efectos pro-hipertensivos sistémicos del estrés oxidativo incluyen vasoconstricción debido al consumo de NO y a los efectos directos de las EROs (Makino y cols., 2002) y las consecuencias de la remodelación vascular a largo plazo. Las curvas de retroalimentación entre los efectos sistémicos y renales implican la generación de EROs.

2.4.2. Estrés oxidativo y activación de los factores de inflamación

Las EROs pueden inducir distintas respuestas celulares, desde proliferación hasta apoptosis (Buttke y cols., 1994; Gulbins y cols., 2000, Irani y cols., 2000). Algunos factores de transcripción, tales como el factor nuclear κ B (NF- κ B) y el activador de proteína 1 son redox sensibles y pueden activarse a través de oxidantes (Dröge y cols., 2002). Las proteínas mitógenas activadas o MAP kinasas como la ERK 1 y 2 son activadas por el anión superóxido en las células del músculo liso vascular.

El NF-κB interviene en la síntesis de una gran variedad de citoquinas. Además estimula la infiltración leucocitaria al incrementar la expresión de las moléculas de adhesión E-Selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (Miagkov y cols., 1998; Chen y cols., 2001; Tak y

Firestein, 2001). Como resultado de estos efectos, el estrés oxidativo puede inducir inflamación no específica, que duraría mientras el estrés oxidativo sea sostenido. En modelos de hipertensión por sensibilidad a la sal, la inflamación intersticial se asocia con una apotosis aumentada y activación del NF- κ B.

Varios genes celulares implicados en el proceso temprano de inmunidad, fase aguda y respuesta inflamatoria están regulados a nivel de transcripción por el NF- κ B (Arrigo, 1998; Álvarez y cols., 2002). El NF- κ B activa numerosos genes proinflamatorios incluyendo el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina 6 (IL 6), interferon- γ y quimioquinas (CC) tales como la CCL28 (Baldwin, 1996; Ghosh y cols., 1998; Nakamichi y cols., 2005; Venkatesha y cols., 2004).

2.4.3. Ingesta de sal y factor de crecimiento transformante o TGF-β1

Durante décadas se ha sabido que el aumento de la ingesta de sal (NaCl) reduce la vida media de las ratas de forma dosis-dependiente. Para los médicos y científicos interesados en la enfermedad renal progresiva, tal vez el factor de crecimiento identificado más importante, es el factor de crecimiento- β (TGF- β). Después del descubrimiento del TGF- β en 1980 (Roberts y cols., 1980), numerosos estudios han demostrado que este factor de crecimiento fibrogénico o proesclerótico participa integralmente en la fibrosis renal en una variedad de estados de enfermedad (Akagi y cols., 1996; Dahly y cols., 2002). Experimentos recientes demostraron que una dieta con elevado contenido en sal produce un aumento en los niveles de ARNm de TGF- β en la corteza renal de ratas Sprague-Dawley; el efecto se produjo sin cambios en la presión sanguínea y se desarrolló al día siguiente del aumento en el consumo de sal y se mantuvo a lo largo del experimento (Ying y cols., 1998). Inoue y cols. (1995) utilizaron cultivos de células endoteliales de aorta bovina para demostrar que el TGF- β 1 incrementa la tasa transcripcional de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (NOS3). Estos hallazgos impulsaron una investigación sobre el efecto de la regulación al alza del TGF- β 1 asociado a la producción de NOS3 durante el consumo de una dieta rica en sal. Se incubaron tejidos de aorta y glomérulo, bajo condiciones de sal aumentada, con un anticuerpo que neutralizó directamente el TGF- β 1, disminuyendo los niveles de NOS3 a valores basales, indicando el efecto directo del TGF- β 1 en el control de los niveles de NOS3 y la consiguiente producción de NO. (Ying y Sanders, 1998).

3. TRANSPORTE DE SODIO A LO LARGO DE LA NEFRONA

El manejo renal de sodio es una función fisiológica esencial en los mamíferos para el mantenimiento de los fluidos corporales y la regulación de la presión sanguínea. El balance de sodio sistémico ocurre predominantemente a través del control de la reabsorción de sodio tubular renal (Li y Wang, 2007).

Túbulo proximal

El túbulo proximal reabsorbe aproximadamente el 67% del agua filtrada, Na, Cl, K, toda la glucosa, los aminoácidos filtrados por el glomérulo y otros solutos. El elemento clave de la reabsorción es la bomba Na, K- ATPasa de la membrana basolateral.

El Na se reabsorbe por diferentes mecanismos en la primera y segunda mitades del túbulo proximal. En la primera mitad del túbulo proximal, el Na se reabsorbe principalmente con bicarbonato (HCO_3), por el contrario, en la segunda mitad se

reabsorbe principalmente con el Cl⁻. Esta disparidad está mediada por diferencias en los sistemas de transporte y en la composición del líquido tubular en estos lugares.

En la primera mitad del túbulo proximal, la captación de Na al interior de la célula está acoplada con el H⁺ o con solutos orgánicos. Proteínas de transporte específicas median en la entrada de Na en la célula a través de la membrana apical. Por ejemplo, el intercambiador Na⁺ H⁺, acopla la entrada de Na con la expulsión de H⁺ de la célula, dando lugar a la reabsorción de bicarbonato sódico (CO₃HNa). El Na⁺ también entra en las células del túbulo proximal por medio de varios mecanismos de cotransporte, que incluyen el Na⁺-glucosa, el Na⁺-aminoácidos, el Na⁺- Pi y el Na⁺- lactato. La glucosa y otros solutos orgánicos que entran en la célula con el Na abandonan la célula a través de la membrana basolateral por mecanismos de transporte pasivo. Cualquier Na⁺ que entre a través de la membrana apical abandona la célula y entra en la sangre por vía de la Na⁺- K⁺-ATPasa.

En la segunda mitad del túbulo proximal, el Na se reabsorbe principalmente con el Cl⁻ en lugar de con los solutos orgánicos o el CO_3H^+ como anión acompañante. El Na entra en la célula a través de la membrana luminar por medio del funcionamiento paralelo del antitransportador Na⁺ H y uno o más antitransportadores Cl anión. Como el H⁺ secretado se combina con el anión en el líquido tubular y penetra de nuevo en la célula, el funcionamiento de los antitransportadores Na, H y Cl anión es equivalente para captar NaCl del líquido tubular al interior de la célula. El Na abandona la célula vía Na^{+,} K⁺-ATPasa, y el Cl abandona la célula y penetra en la sangre por medio de un cotransportador KCl de la membrana basolateral.

El NaCl se reabsorbe también en la segunda mitad del túbulo proximal, por medio de una ruta paracelular. Su reabsorción se produce porque el aumento de [Cl] en el líquido tubular desde la primera mitad del túbulo proximal genera un gradiente de [Cl] (140 mEq/l en la luz del túbulo y 105 mEq/l en el intersticio), favoreciendo así la difusión del Cl de la luz tubular a través de las uniones estrechas al espacio lateral intercelular. El movimiento del Cl cargado negativamente da lugar a que el líquido tubular se quede con carga positiva con respecto a la sangre. Este voltaje transepitelial origina la difusión del Na cargado positivamente hacia afuera del líquido tubular a través de las uniones estrechas a la sangre.

Aproximadamente el 67% del NaCl filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal, de éste dos tercios se mueven a través de la vía transcelular y el tercio restante de la vía paracelular (Berne y Levy, 2009).

Asa de Henle

El asa de Henle reabsorbe acerca del 25% del NaCl filtrado y el 15% del agua filtrada. En la rama ascendente delgada se reabsorbe NaCl por un mecanismo pasivo, mientras en el asa ascendente gruesa el principal mecanismo es la Na^{+,} K⁺-ATPasa de la membrana basolateral. Esta bomba mantiene una [Na] intracelular para el movimiento del Na desde el líquido tubular al interior de la célula. El movimiento de Na a través de la membrana apical dentro de la célula está mediada por el co-transporte 1Na-1K-2Cl (NKCC2). El canal del K en la membrana plasmática apical desempeña un papel importante en la reabsorción de NaCl por la rama ascendente gruesa. Este canal de K permite que el K transportado dentro de la célula por el co-transporte NKCC2 regrese de vuelta al líquido tubular. Al ser la [K] relativamente baja, este K es necesario para que actúe continuamente el cotransporte NKCC2.

El voltaje a través de la rama ascendente es importante par la reabsorción de varios cationes, este voltaje es una fuerza conductora importante para la reabsorción de varios cationes que incluyen Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺, a través de una vía paracelular.

En resumen, la reabsorción de NaCl a través de la rama ascendente gruesa se lleva a cabo por vías transcelular y paracelular. La rama ascendente gruesa, no reabsorbe agua, la reabsorción de NaCl y otros solutos reducen la osmolaridad del líquido tubular a menos de 150 mOsm/kg de H₂O, produciendo de esta manera un líquido que está diluido con respecto al plasma. Por esto, la rama ascendente del asa de Henle se denomina segmento dilutor (Berne y Levy, 2009).

Túbulo distal y conducto colector

El túbulo distal y el conducto colector reabsorben acerca del 8% del NaCl filtrado. El segmento inicial del túbulo distal reabsorbe Na⁺, Cl⁻ y Ca⁺⁺ y es impermeable al agua. El Na deja la célula por la acción de la Na^{+,} K⁺- ATPasa. Por ello, la dilución del líquido tubular comienza en la rama ascendente y continúa en el principio del túbulo distal.

El túbulo distal inicial reabsorbe el 5% del Na⁺ filtrado. A nivel celular, el mecanismo es un cotransportador de Na⁺ Cl⁻ en la membrana luminal, cuya energía deriva del gradiente de sodio. Los dos iones entran en la célula con el cotransportador de Na⁺ Cl⁻, el Na⁺ es bombeado después al exterior de la célula, a la sangre, por la Na⁺ K⁺ ATPasa y el Cl⁻ sale de la célula por los canales de Cl⁻ en la membrana basolateral.

El cotransportador de Na⁺Cl⁻ se inhibe con los diuréticos tiazídicos, por ejemplo clorotiazida, hidroclorotiazida y metolazona). Igual que los diuréticos de asa, las tiazidas son ácidos orgánicos, que son aniones a pH fisiológico. Los diuréticos tiazídicos se unen al lugar de Cl⁻ e impiden el ciclo, inhibiendo, por tanto, la reabsorción de NaCl en el túbulo distal inicial.

El túbulo distal inicial es impermeable al agua, por tanto, reabsorbe soluto, pero deja el agua atrás, que luego es diluida por el líquido tubular. Por esta razón, el túbulo distal

inicial se llama segmento diluyente cortical (los túbulos distales están en la corteza renal).

El segmento último del túbulo distal y el conducto colector, están compuestos de dos tipos de células: células principales y células intercaladas. Las primeras reabsorben NaCl y agua y segregan K⁺. Las células intercaladas segregan H⁺ o Co3H⁻ y por ello, son importantes en la regulación del equilibrio ácido-base. Estas células, también reabsorben K por la actuación de H, K-ATPasa, localizada en la membrana plasmática apical. Tanto la reabsorción de Na como la secreción de K por las células principales dependen de la actividad de la ATPasa Na-K. El Na penetra en la célula a través de la membrana apical por (ENaCs) de la membrana apical, y la carga negativa del interior de la célula facilita la entrada de Na. El sodio abandona la célula a través de la membrana basolateral y penetra en la sangre por acción de la Na^{+,} K⁺- ATPasa. La reabsorción de sodio genera un voltaje luminal negativo al final del túbulo distal y del conducto colector que proporciona la fuerza conductora para la reabsorción del Cl⁻ a través de la vía paracelular.

La reabsorción de agua está mediada por el canal de agua AQP2, localizado en la membrana plasmática apical y por los AQP3 y AQP4 localizados en la membrana basolateral de las células principales. En presencia de hormona antidiurética (ADH), el agua se reabsorbe, por el contrario, en ausencia de ADH, el túbulo distal y el conducto colector reabsorben poca cantidad de agua. (Berne y Levy, 2009).

La figura 4 muestra los diferentes transportadores a lo largo de la nefrona

3.1. Regulación de la reabsorción de NaCl y agua

Cuantitativamente la ANG II, la aldosterona, las catecolaminas, los péptidos natriuréticos y la uroguanilina son las hormonas más importantes que regulan la reabsorción de Na y de ese modo la excreción urinaria de NaCl. Sin embargo otras hormonas (que incluyen la dopamina y la adrenomedulina), las fuerzas de Starling y el fenómeno del equilibrio glomerulotubular, influyen en la reabsorción de NaCl.

La ANG II tiene un potente efecto estimulador en la reabsorción de NaCl y agua en el túbulo proximal.

La mayor parte del efecto de la aldosterona sobre la reabsorción del NaCl se realiza en el túbulo distal y en el conducto colector. La aldosterona también estimula la secreción de K por el túbulo distal y el conducto colector. La aldosterona aumenta el número de cotransportes Na⁺Cl⁻ al principio del túbulo distal mediante cuatro mecanismos:

- a) Aumentando la cantidad de Na, K ATPasa en la membrana basolateral;
- b) Aumentando la expresión del canal del sodio (ENaC) en la membrana apical celular;
- c) Elevando los niveles de la cinasa sérica estimulada por glucocorticoides, que también estimulan la expresión de ENaC en la membrana apical celular;
- d) Estimulando la CAP 1 (proteasa activadora del canal, también denominado prostatina), una serina proteasa que directamente activa los ENaC por proteólisis.

El péptido natriurético atrial (PNA) y el péptido natriurético cerebral (PNB) inhiben la reabsorción de NaCl y agua. La secreción de PNA por la aurícula cardíaca y de PNB por los ventrículos cardíacos se estimula por un aumento de la presión sanguínea y un aumento en el volumen del líquido extracelular (LEC). El PNA y PNB reducen la

presión sanguínea por disminuir la resistencia periférica total y aumentar la excreción urinaria de NaCl y agua. Además el PNA y el PNB también reducen la secreción de ADH de la pituitaria posterior (Berne y Levy, 2009).



Figura 1: Transportadores a lo largo de la nefrona

La uroguanilina y la guanilina se producen por las células neuroendócrinas del intestino como respuesta a la ingestión oral de NaCl. Estas hormonas penetran en la circulación e inhiben la reabsorción de NaCl y agua por los riñones mediante la activación de receptores guanililciclasa ligados a la membrana que incrementan la (GMPc) intracelular.

Las catecolaminas estimulan la reabsorción de NaCl en los cuatro segmentos de la nefrona. Aunque los nervios simpáticos no se activan cuando el volumen del LEC es

normal, cuando éste desciende (después de una hemorragia) la actividad nerviosa simpática asciende y estimula la reabsorción de NaCl y agua por estos cuatro segmentos de la nefrona.

La dopamina, una catecolamina, se libera de los nervios dopaminérgicos en los riñones y también se sintetiza por células del túbulo proximal. La secreción de dopamina se estimula por un aumento del volumen del LEC y su secreción inhibe directamente la reabsorción de NaCl y agua en el túbulo proximal (Berne y Levy, 2009).

3.2. Transporte de sodio en situaciones especiales

3.2.1. Cirrosis Hepática

La cirrosis hepática se asocia con la regulación defectuosa del sodio y del agua. Este balance anormal de sodio y de agua aparece de forma secuencial (Jiménez y cols., 1985; Wong y cols., 1995). En los primeros estadios de la cirrosis descompensada, la retención de sodio y agua por el riñón es inicialmente isosmótica y se piensa que es secundaria a la estimulación excesiva de la reabsorción tubular de sodio. El aumento en la reabsorción de sal conlleva al desarrollo de ascitis. Si la cirrosis hepática es más severa, la retención de agua libre puede ocurrir en exceso de retención de sodio causando dilución del líquido extracelular e hiponatremia (Wong y cols., 1995).

Con respecto a la cirrosis hepática, varias líneas de investigación sugieren que el túbulo distal es el segmento clave implicado en la retención renal de sodio y en la pérdida de potasio. Por ejemplo, está bien establecido en la práctica clínica que la espironolactona, antagonista del receptor de mineralocorticoide, con su principal acción en el túbulo distal, restablece el volumen del líquido extracelular en pacientes con cirrosis hepática. (Gregory y cols., 1977). De estudios experimentales ha quedado claro que son varios los

mecanismos que explican la avidez renal aumentada por el sodio en la cirrosis hepática y están más probablemente localizados en el túbulo distal.

En la cirrosis hepática se ha visto concentraciones aumentadas de ligandos para la activación del receptor de mineralocorticoide (MR) en el conducto colector. En algunos modelos de cirrosis en animales y humanos se han encontrado niveles de aldosterona y/o de cortisol incrementados para el MR, debido a la inhibición de la enzima 11 B-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, enzima necesaria para la activación del MR por el glucocorticoide cortisol (Jiménez y cols., 1985; Ackermann y cols., 1999; Quattropani y cols., 2001). En su conjunto, estos hallazgos sugieren que los mecanismos a nivel tubular renal son responsables de la retención de sodio, que principalmente ocurre en el túbulo distal, el lugar de acción de los mineralocorticoides.

En la cirrosis hepática inducida en ratas al ligar el conducto biliar, no se observó aumento en la expresión del ENaC. Por el contrario, se observó un aumento en la expresión del co-transportador de NaCl tiazida-sensible (TSC) en la fase inicial después de ligar el conducto biliar, seguido de un marcado descenso. Así, una activación aumentada del MR podría incrementar la expresión del TSC y/o la reabsorción de sodio y contribuir a la retención del mismo en esta patología (Yu y cols., 2005).

3.2.2. Embarazo

El embarazo normal se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos (Phippard y cols., 1986; Schrier y Briner, 1991). Una de las adaptaciones importantes incluyen el aumento del líquido extracelular y el volumen plasmático se incrementa en un 30-50% (Ohara y cols., 1998) como así también la tasa de filtración glomerular aumenta de un 40 a un 65% (Jeyabalan y Conrad, 2007).

El NO tiene un papel importante en el control de la función renal y en la resistencia periférica total, como así también interviene en el control de la presión sanguínea a largo plazo (Herrera y Garvin, 2005). Está implicado en la vasodilatación y en la consiguiente hiperfiltración durante el embarazo. Este hecho está relacionado con la excreción urinaria aumentada de NO observado en mujeres embarazadas y en animales. La inhibición aguda de NO bloquea la vasodilatación y la hiperfiltración glomerular en ratas y la inhibición crónica de NO provoca hipertensión, función renal deteriorada y daño endotelial (Agre y cols., 2003).

Además de lo mencionado anteriormente, en el embarazo los transportadores renales se encuentran alterados. Se ha visto un aumento en la expresión de ARNm de AQP 2, NHE3 y TSC, contribuyendo a la retención de agua y sodio. El aumento en la expresión de ARNm del TSC y del NHE3 sugiere que el embarazo induce un aumento en la actividad tubular para reabsorber sodio y podría contribuir a la expansión de volumen del líquido extracelular (Giebisch y Wang, 1996; Giebisch, 1998). En las ratas preñadas normotensas, se encontró un aumento en la expresión del NHE3 apoyando la hipótesis que este transportador renal tiene una importante función en la retención renal de sodio durante el embarazo (Abreu y cols., 2008)

3.2.3. Hipertensión por sensibilidad a la sal

Estudios en modelos animales de hipertensión genética han hecho hincapié en la importancia del riñón en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial (Crowley y cols., 2006). En particular en las ratas adultas hipertensas de la cepa Milan (MHS), la hipertensión se desarrolla debido a una alteración primaria en la reabsorción

tubular de sodio renal (Bianchi y cols., 1975), relacionado con una actividad y expresión aumentadas de la ATPasa Na-K (Melzi y cols., 1991).

Se ha visto en las MHS, caracterizadas por hipertensión por sensibilidad a la sal, que la expresión del NHE3 y del NKCC2 no es diferente, mientras que el TSC está más expresado en la zona cortical del túbulo contorneado distal, probablemente debido a los niveles de aldosterona elevados en el plasma. Estos últimos resultados han sido confirmados con experimentos que demuestran una gran sensibilidad a bendroflumetiazida en MHS y con estudios de inmunohistoquímica que demuestran un aumento del TSC en las células de la membrana apical del túbulo contorneado distal.

La entrada aumentada del NaCl se correlaciona con el aumento en la regulación del canal basolateral del cloruro, es decir ClC-K en el TSC, identificándose así este segmento como el lugar de mayor reabsorción de cloruro de sodio y explicando la sensibilidad a la sal de esta forma de hipertensión. Finalmente, en los conductos colectores de estos animales se observó una cantidad menor de proteínas de las subunidades α y β -ENaC. Por lo tanto una combinación de un aumento en la expresión del TSC y del ClC-K podría explicar el incremento de la presión sanguínea a través de su acción en la reabsorción de sal, que está sólo parcialmente contrarrestado por la baja regulación de las subunidades anteriormente mencionadas del ENaC. (Capasso y cols., 2008)

3.2.4. Deficiencia de hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas regulan el metabolismo en muchos órganos y células y son críticas para el desarrollo normal así como para la función celular. Además, el desarrollo y la función renal están influenciados por las hormonas tiroideas. Por lo tanto, en completa ausencia de hormona tiroidea y en el hipotiroidismo se asocian frecuentemente con un desarrollo anormal del riñón y/o con una función renal deteriorada. (Alcalde y cols., 1999).

En ausencia de hormonas tiroideas, un número importante de proteínas transportadoras renales están disminuidas tanto en su expresión como en su función, como se demostró para el co-transportador de Na-fosfato, NaPi-IIa, (Alcalde y cols., 1999, Schmitt y cols., 2003) o el co-transportador de Na-sulfato, NaSi, en el riñón de rata. Además disminuyó la actividad del intercambiador Na/Ca² en la membrana del borde en cepillo (Kumar y Prasad, 2002), la actividad de la ATP-asa Na-K (Cadnapaphornchai y cols., 2003) y también fue menor la expresión del co-transportador NKCC2 en el asa ascendente de Henle (Cadnapaphornchai y cols., 2003, Schmitt y cols., 2003).

Además de estos efectos sobre la expresión de las proteínas transportadoras renales, se ha visto en ratas tiroidectomizadas que la ausencia de hormona tiroidea conlleva a una expresión reducida del principal intercambiador Na/H, NHE3, durante la maduración del túbulo proximal (Baum y cols., 1998; Gupta y cols., 2004) y también en el riñón adulto (Cadnapaphornchai y cols., 2003, Schmitt y cols., 2003). Funcionalmente el hipotiroidismo se asocia con dificultad para acidificar la orina y excretar amonio después de una sobrecarga de NH4Cl. Sin embargo, bajo condiciones controladas las ratas hipotiroideas no mostraron ningún signo de acidosis metabólica o pérdida urinaria de bicarbonato a pesar de la baja regulación del NHE3. Esto se explicaría mejor por un aumento en la regulación de mecanismos compensatorios en la región distal de la nefrona y coherentemente un aumento en la expresión del intercambiador cloruro/bicarbonato, expresado en las células intercaladas tipo A. (Sabolic y cols., 1997; Huber y cols., 1999).

Hay experimentos que demuestran que después de la inducción de acidosis metabólica con sobrecarga oral de NH₄Cl, se observó una acidosis metabólica más pronunciada en ratas hipotiroideas que en las eutiroideas o ratas controles, observándose también una adaptación respiratoria para compensar la acidosis. (Mohebbi y cols., 2007). A su vez, hay estudios que describen el efecto del hipotiroidismo en ratas sobre los componentes que intervienen para concentrar la orina (DiScala y Kinney, 1971; Vaamonde y cols., 1976). Estos componentes durante la restricción de líquidos incluyen la liberación de hormona antidiurética, arginina vasopresina (AVP) y aumento en la regulación de los canales de agua AQP2, en las células principales del conducto colector. El cotransportador Na-K-Cl en el asa ascendente de Henle es el principal responsable de iniciar el mecanismo compensatorio de concentración de la orina. Por lo tanto, una disminución en esta proteína transportadora podría disminuir la osmolaridad medular e impedir la máxima capacidad de concentración de la orina. En un estudio llevado a cabo por Cadnapaphornchai y cols. (2003) en ratas hipotiroideas tratadas con metimazol, se ha visto una disminución significativa del co-transportador Na-K-2Cl en la corteza y en la médula externa de las ratas hipotiroideas con respecto a las eutiroideas o controles y en otros estudios subsiguientes se ha observado una disminución significativa de la expresión de las proteínas AQP2, 3 y 4, en ratas hipotiroideas comparadas con sus controles, contribuyendo al descenso de la capacidad máxima de concentración de la orina, como consecuencia principalmente de la baja regulación de la proteína AQP2. Sin embargo, se asoció al movimiento osmótico disminuido del agua a través del conducto colector con un significativo descenso medular del co-transportador Na-K-2Cl en el asa ascendente de Henle.

3.2.5. Hipertiroidismo

Las hormonas tiroideas (T_4 y T_3) tienen un papel significativo en el control de la masa renal y su función. Las hormonas son importantes reguladores del flujo plasmático renal, la tasa de filtración glomerular, la concentración y dilución de la orina, el consumo de oxígeno, y la reabsorción de fosfato, Ca² y Na⁺ (Edelman, 1975; Katz y Lindheimer 1977). Las hormonas tiroideas estimulan los cambios de la actividad renal de la ATPasa Na⁺, K⁺ relacionados con las alteraciones en el transporte de Na⁺ (Ismail-Beigi y Edelman, 1971; Katz y Lindheimer 1973). Se sabe que la T₃ induce la síntesis de la ATPasa- Na⁺, K⁺ (Lo y Edelman, 1976), también se ha propuesto que las hormonas tiroideas aumentan la actividad renal de la ATPasa Na⁺, K⁺ por un mecanismo de adaptación en respuesta a cambios en la reabsorción de Na⁺ (Katz y Lindheimer, 1973). Ambos mecanismos, la inducción de los elementos de la bomba de Na⁺ y la respuesta adaptativa a un aumento de Na⁺ filtrado, podrían intervenir conjuntamente en la mediación de la acción de las hormonas tiroideas en la reabsorción de Na⁺ (Edelman, 1975). Otra hipótesis que merece consideración es que las hormonas tiroideas estimulan la entrada de Na⁺ del filtrado hacia la célula tubular a través de la membrana luminal. El Na⁺ a concentraciones fisiológicas atraviesa la membrana del borde en cepillo luminal del túbulo proximal en su mayoría por el intercambio Na⁺/H⁺. (Ulirich y cols., 1975, Sacktor y Cheng, 1981)

Se ha descripto que la absorción de NaCl y NaHCO3 en el túbulo proximal de los mamíferos se ve afectada por el status tiroideo del animal (Michael y cols., 1972; Michael y cols., 1979; De Santo y cols., 1980; De Santo y cols., 1982) y está precedida por un aumento en los niveles circulantes de hormona tiroidea (Walker y cols., 1980). El transporte de NaCl y NaHCO₃ en el túbulo proximal está mediado por el intercambio Na/H

en la membrana apical (Preisig y cols., 1987; Preisig y Rector 1988). Se ha descripto que la actividad del intercambio Na/H en las vesículas de la membrana apical de la corteza renal es mayor en animales hipertiroideos que en los hipotiroideos (Kinsella y Sacktor, 1985; Kinsella y cols., 1986). Aunque el efecto en el intercambio Na/H puede estar mediado en parte por los cambios en la tasa de filtración glomerular, la hemodinámica sistémica y/o los cambios neurohumorales (Katz y cols., 1975), se ha demostrado un efecto directo de la hormona tiroidea sobre la velocidad máxima del intercambiador Na/H en un modelo de cultivo de células del túbulo proximal de riñones de comadreja (Yonemura, 1990). Con la identificación de cADNs de la isoforma del intercambiador Na/H (Wakabayashi y cols., 1997), actualmente se disponen de reactivos específicos para determinar los mecanismos de regulación del intercambiador Na/H en el túbulo proximal. La isoforma predominante responsable del intercambio Na/H en la membrana apical del túbulo proximal es NHE3 (Amemiya y cols., 1995, Biemesderfer y cols., 1993), y un homólogo del NHE3 se expresa en las células renales. La mayoría de los efectos biológicos crónicos de la hormona tiroidea están mediados probablemente por la activación de la transcripción de genes (Ribeiro y cols., 1995). Cano y cols. (1999) demostraron que la administración de hormona tiroidea en ratas adultas aumenta la actividad del intercambiador NHE3 al activar el promotor y la transcripción del gen NHE3 como así también incrementa la presencia de proteínas.

II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

La disfunción tiroidea tiene efectos importantes sobre la función renal y el metabolismo del agua y la sal (Bradley y cols., 1974; Vargas y cols., 2006). Estudios previos han demostrado que las ratas hipotiroideas tienen dificultad para concentrar la orina y aumento de la natriuresis cuando hay sobrecarga de sal o agua (Holmes y DiScala, 1970, Taylor y Fregly, 1964; Emmanuel y cols., 1974; Michael y cols., 1972), junto con imposibilidad de retener el sodio; provocando todo esto un balance negativo de sodio y muerte cuando se restringe la ingesta de sodio (Fregly y cols., 1962). Sin embargo, nuestro grupo no observó un aumento en la excreción de sodio en las ratas hipotiroideas tratadas con metimazol en las condiciones mencionadas anteriormente (Vargas y cols., 1991) o en respuesta de presión diuresis- natriuresis (Vargas y cols., 1994). Por otra parte, en las ratas tratadas con tiroxina se observaron cambios en la hemodinámica renal y en la reabsorción de sodio (Vargas y cols, 2006), volumen sanguíneo aumentado (Rodríguez-Gómez y cols., 2003), polidipsia y poliuria (García del Río y cols., 1997) y una capacidad reducida para excretar sodio después de una sobrecarga salina hipertónica (Vargas y cols., 1991) y también se observó un bloqueo en la respuesta de diuresis-natriuresis de presión (Vargas y cols., 1994) en las ratas hipotiroideas. Todos estos datos indican que la disfunción tiroidea se acompaña de cambios importantes en el manejo renal de sodio.

El hipotiroidismo reduce la presión sanguínea y previene el desarrollo de la hipertensión experimental (Vargas y cols., 2006), mientras que la administración de T_4 incrementa la PS (Rodríguez-Gómez y cols., 2003) y acelera el curso de la hipertensión (Vargas y cols., 2006). A pesar de que muchos mecanismos pueden influir la presión sanguínea a corto plazo, la regulación de la presión sanguínea a largo plazo depende de la excreción renal de sodio (Cowley, 1992). La PS aumentada en respuesta al sodio de la dieta (sensibilidad a la sal) ha sido descripta en humanos y en animales y se propone como un factor importante en la patogénesis de la hipertensión (Campese, 1994).

Los transportadores tubulares de sodio son responsables de la reabsorción de sodio y del balance de líquidos y por lo tanto, estos transportadores son claves para los cambios observados en la presión sanguínea en la disfunción tiroidea.

La regulación del balance de sodio ocurre mayormente a través del control de la reabsorción de sodio tubular renal. A pesar que la ATPasa Na-K mantiene activamente los gradientes iónicos, los ajustes en la excreción de sodio ocurren en parte a través de cambios adaptativos en los transportadores de sodio expresados en los diferentes segmentos de los túbulos renales, que normalmente representan la tasa limitante en la reabsorción tubular de sodio (Kim y cols., 1998, Masilamani y cols., 1999, Masilamani y cols., 2002). Los transportadores de sodio más importantes que contribuyen significativamente a esta regulación son: el intercambiador tipo 3 Na/H o NHE3 en el túbulo proximal, el co-transportador tipo 2 bumetanide-sensible Na+K+2Cl o NKCC2 en el asa ascendente de Henle (TAL), el co-transportador tiazida sensible NaCl o TSC en el túbulo contorneado distal y el canal de sodio epitelial amiloride sensible o ENaC en los túbulos colectores (Reeves y Andreoli, 2001). De esta manera existe un mecanismo responsable de la reabsorción de sodio renal anormal en la disfunción tiroidea, probablemente secundario a cambios en la presencia o actividad de los transportadores de sodio. Así, se estudió la expresión de los transportadores de sodio en el estado hipotiroideo, encontrándose resultados contradictorios (Cadnapaphornchai y cols., 2003; Schmitt y cols., 2003), existiendo poca información con respecto al estado hipertiroideo sobre la expresión de estas proteínas (Cano y cols., 1999; Wang y cols., 2007). Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún análisis completo e integral que incluya una evaluación funcional y molecular de estos transportadores.

Con estos antecedentes los objetivos del presente trabajo son:

- Examinar el posible papel modulador de las hormonas tiroideas sobre la sensibilidad a la sal en ratas, analizando la respuesta de la PS, variables morfológicas, función renal y estrés oxidativo en ratas hiper e hipotiroideas con ingesta de sal aumentada.
- Determinar los efectos del hiper- e hipotiroidismo sobre la función de los transportadores renales de sodio más importantes (NHE3, NKCC2, NCC y ENaC) y su correlación con la expresión y la cantidad de estas proteínas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS
1. Fármacos e instrumentos utilizados

1.1 Fármacos

Acetazolamida

Ácido clorhídrico Tris

Alanil- β -naftilamida

Albúmina sérica bovina

Amiloride

Anticuerpo secundario conjugado de cabra anti-conejo

Anticuerpos policlonales de conejo

Aspartil- β-naftilamida

Cistinil-_β-naftilamida

Cloroformo (Sigma)

Dietiltrietidio

Dimetilsulfóxido

Etanol

Etil éter

Formaldehído

Furosemida

Glutamil- β-naftilamida

Hidroclorotiazida

Inhibidor de proteasa

Isopropilo de alcohol

Metimazol

NaCl

NaOH

Oligos

PBS (Sigma)

Pentobarbital sódico

Salino isotónico

Solución de TRIzol

Sucrosa

Suero salino heparinizado

Tampón acetato

Tampón salino tribásico

Tiroxina (Merck).

1.2. Instrumentos

Autoanalizador inmunolite 2000

Balanza (Sartorius, Pacisa).

Centrífuga (Grigel).

Congelador -80C°

Espectrofotómetro.

Estufa (Selecta).

Hilos de sutura 000.

Jaulas metabólicas individuales (Tecniplast Gazzada, COD).

Material de laboratorio

Pletismógrafo (Letica).

Politrón

2. Experimento 1. Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental

2.1. Animales y distribución

Para los experimentos realizados en la elaboración de esta tesis se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para cuidados éticos en animales de la Comunidad Europea.

Los animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

Control: Grupo control. (n=8).

Hipotiroideo: Grupo tratado con metimazol en agua de bebida al 0,03% (n=8).

Hipertiroideo-75: Grupo tratado con T₄ (75 µg/rata/día). (n=8).

Los grupos control, hipertiroideo e hipotiroideo, se les asignó una dieta normal con 0.4% de NaCl o una dieta con un elevado contenido en sal, al 8% de NaCl (n = 8 por grupo). Para el grupo control, la dieta alta en sal se preparó mezclando 76 g de NaCl con 924 g de pienso. En los grupos hiper e hipotiroideos se ajustó la concentración de NaCl en el pienso de acuerdo a las mediciones semanales de peso corporal y registros diarios de la ingesta de comida a fin de proporcionar la misma dosis que en las ratas control.

Se indujo el hipertiroidismo al inyectar tiroxina por vía subcutánea (75 µg/rata/día), mientras que se indujo el hipotiroidismo por la administración continua de metimazol al 0,03% a través del agua de bebida, como se demostró previamente (Vargas y cols., 1994; García del Río y cols., 1997; Vargas y cols., 2006). Estos tratamientos se administraron durante 6 semanas.

2.1.1 Protocolo experimental

Cuando se completó el período experimental, todas las ratas fueron introducidas en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) con acceso libre a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo en estudio, por un período de cuatro días (dos días para la adaptación más dos días de experimentación), durante el cual se cuantificó la ingesta de comida y de bebida y también se recolectaron las muestras de orina. Se determinaron: el volumen de orina de 24 horas y el sodio urinario total, potasio, proteinuria, creatinina, isoprostanos, H₂O₂ (como índices de estrés oxidativo), y aminopeptidasas (AP) (como marcador de daño renal). Se compararon entre los grupos los valores promedios de todas las variables de ingesta y urinarias obtenidas durante los dos días de experimentación. Los balances de agua y sodio se calcularon con respecto a las pérdidas renales, sin tener en cuenta las pérdidas extrarrenales.

Una vez finalizado el estudio metabólico, se anestesiaron las ratas con etil éter. Se introdujo en la arteria femoral un catéter de polietileno (PE-50) con 100 unidades de heparina en una solución de NaCl isotónico estéril para medir la PS, FC y PP intraarterial en ratas conscientes y para extraer muestras de sangre

El catéter fue introducido por vía subcutánea y extraído a través de la piel en la región dorsal del cuello. La PS intra-arterial se midió a las 24 h después de la implantación del catéter femoral. Se registraron de forma continua y directa la PS y la FC durante 60 minutos con una frecuencia de muestreo de 400/s (McLab, AD Instruments, Hastings, Reino Unido). Los valores de PS y de FC obtenidos durante los últimos 30 minutos se promediaron para realizar las comparaciones entre grupos. Posteriormente, se utilizaron las muestras de sangre extraídas con el catéter femoral para determinar las siguientes

56

variables plasmáticas: urea, proteínas totales, electrolitos (sodio y potasio), y las hormonas tiroideas ($FT_3 y FT_4$).

Por último, las ratas fueron sacrificadas por exsanguinación y los riñones y los ventrículos se retiraron y se pesaron. Se dividió al corazón en ventrículo derecho y el septo del ventrículo izquierdo y además el riñón se seccionó para separar la corteza y la médula.

2.1.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en el rabo

Se determina la presión arterial de forma incruenta en el rabo de la rata. El sistema utilizado consta de un manguito de presión conectado a una unidad de insuflado semiautomática y a la unidad transductora del pletismógrafo, a la que también se conecta un sensor neumático. La unidad transductora está conectada con la unidad de registro visual del pletismógrafo (LE 5001-Pressure Meter, Letica SA, Barcelona, Spain).

Se somete al animal a la temperatura de 36°C durante 30 minutos en una estufa ventilada, con objeto de producir la vasodilatación de la arteria del rabo. Alrededor del mismo, y en su extremo proximal, se coloca el manguito de presión. A continuación se coloca el sensor automático adecuado a la medida del grosor del rabo de la rata, de modo que quede ajustado y situado en la cara ventral del rabo junto al manguito. La operación puede repetirse transcurrido al menos un minuto. Se realizan varias determinaciones sucesivas a la misma rata (de 10 a 15 aproximadamente) y se expresa la presión sistólica como la media de cinco determinaciones sucesivas estables, descartando las primeras y las últimas.

La presión arterial se determinó dos veces en semana a todas las ratas que previamente habían sido numeradas y clasificadas por grupos, separándolas en sus correspondientes jaulas.

2.1.3. Cateterización de la arteria femoral

Tras anestesiar a la rata, se rasura la zona inguinal. Se practica una incisión longitudinal y se diseca el paquete vasculonervioso, separando con cuidado la arteria del resto de las estructuras. Una vez realizada la disección de la arteria, se pasan por debajo de ella tres hilos de lino. Se procede entonces a ligar distalmente y se clampa proximalmente la arteria femoral, para después realizar un pequeño corte en la pared arterial por el que se introduce la cánula. Tras hacerla progresar aproximadamente 1 cm por el interior del vaso en dirección al corazón, se inmoviliza anudándola a la pared vascular con el hilo.

2.2. Procedimientos analíticos

2.2.1. Determinación de la proteinuria

La proteinuria se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los electrolitos y la creatinina en plasma y orina se midieron en un autoanalizador (Hitachi 912, Roche, España). Los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas (T₃ y T₄ libres) se determinaron mediante kits de radioinmunoensayo para ratas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EE.UU.). Se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático (8-isoprostano EIA Kit Cayman Ann Arbor, MI, EE.UU.) para medir los niveles urinarios de 8-isoprostanos y previamente se purificaron las

muestras mediante un kit de purificación de afinidad (Cayman). El H_2O_2 se midió con un kit para peróxido de hidrógeno (Cayman).

2.2.2. Determinación de aminopeptidasas

Las actividades glutamil (GluAp), alanil-(AlaAP), aspartil-(AspAp), У cistinilaminopeptidasa (CysAp) se determinaron por duplicado mediante un ensayo fluorométrico utilizando como sustratos glutamil-alanil-aspartil- y cistinil-β-naftilamida (Segarra y cols., 2006). En resumen, se incubaron 20 µl de orina durante 60 min a 37°C con 90 μl de una solución de su correspondiente sustrato (2,72 mg/dl de glutamil-βnaftilamida, 10 mg/dl de BSA, 10 mg/dl de DTT, y 555 mg/dl de CaCl₂ en 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 2,14 mg/dl de alanil-β-naftilamida, 10 mg/dl de BSA, 10 mg/dl de DTT en tampón fosfato 50 mM pH 7,4; 2,58 mg/dl de aspartil-β-naftilamida, 10 mg/dl de BSA, 39,4 mg/dl de MnCl₂ en 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5,63 mg/dl de cistinil-β-naftilamida, 10 mg/dl de BSA; 10 mg/dl de DTT en 50 mM Tris-HCl pH 6). Los sustratos se disolvieron previamente en 1 ml de DMSO y se almacenaron a -20 ° C. Todas las reacciones se detuvieron por la adición de 90 μl de tampón acetato 0,1 M pH 4,2. La cantidad de βnaftilamina liberada como resultado de las actividades de AP se midió mediante fluorescencia con una longitud de onda de emisión de 412 nm y una longitud de onda de excitación de 345 nm y se cuantificó mediante una curva estándar de β -naftilamina. Las muestras correspondientes a los blancos se realizaron por duplicado utilizando una solución de incubación que no contenía el sustrato de la enzima. Las actividades AP específicas se expresaron como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por mg de creatinina. Los ensayos fluorométricos fueron lineales con respecto al tiempo de hidrólisis y al contenido de creatinina.

2.2.3. Determinación de citoquinas

Las cortezas renales se homogeneizaron en 50 mm HCl-Tris, pH 7.4, con 1% de Tritón X-100, y se centrifugaron 15 minutos a 1000 g.

Las citoquinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF α y VEGF fueron analizadas por tecnología Luminex x-MAP con un kit de Millipore (Boston, MA, EE.UU.).

La proteína del tejido se determinó con el kit de proteínas DC (Bio-Rad, Madrid, España).

2.2.4. Estudio histopatológico

Para la morfología convencional, se tiñeron secciones longitudinales del riñón de rata en el plano sagital incrustadas en parafina y formaldehído tamponado al 4%, con hematoxilina, eosina y ácido periódico de Schiff. Se evaluó la extensión de la lesión vascular (estenosis, arteriopatía hialina e hiperplasia de la mioíntima mediante el examen de los perfiles de las arterias y arteriolas en una sola sección del riñón y contando los vasos afectados. La presencia de lesiones glomerulares (glomeruloesclerosis y fibrosis capsular) se evaluó en al menos 200 glomérulos. También se evaluó la atrofia tubular, necrosis y cilindros tubulares. El estudio morfológico se realizó de forma ciega en las secciones de 4 µm con microscopía de luz, utilizando la tinción más adecuada para cada lesión.

• Estudio morfométrico

Las muestras fijadas en formalina tamponada al 4% e incrustadas en parafina se seccionaron en cortes de 5 µm de espesor. Posteriormente, se tiñeron con rojo Sirio al 1%

F3BA (Gurr, BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido) para la cuantificación del análisis de imagen. Para mejorar la tinción, los cortes de tejido se mantuvieron después de la desparafinación durante 3-5 días en alcohol al 70%, utilizado como fijador. El rojo Sirio tiñe las fibras conectivas de color rojo oscuro y los núcleos celulares y las estructuras citoplasmáticas se distinguen en rojo / amarillo brillante (Sweat y cols., 1964). El tejido conectivo intersticial y la morfometría glomerular se cuantificaron automáticamente en cortes histológicos de riñón de rata utilizando varios algoritmos de procesamiento de imagen desarrollado en una aplicación de análisis de imágenes individuales, Fibrosis HR ® (Masseroli y cols., 1998).

3. Experimento 2. Función y Expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea.

Al igual que en el experimento anterior, se utilizaron ratas Wistar machos nacidas y criadas en el servicio animal experimental de Granada. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con las pautas de cuidados éticos de la Unión europea. Las ratas que inicialmente pesaban 180-200 g fueron mantenidas con una dieta estándar y agua ad libitum.

3.1. Animales y distribución

Los animales se dividieron en tres grupos:

Control: Grupo control. (n=8).

Hipotiroideo: Grupo tratado con metimazol en agua de bebida al 0,03% (n=8).

Hipertiroideo-75: Grupo tratado con T₄ (75 µg/rata/día). (n=8).

Se indujo hipertiroidismo al inyectar tiroxina de forma subcutánea 300 μ g/kg/day disuelto en 1 μ g/ μ l de salino isotónico (100 ml) más 1 ml de NaOH. Se indujo hipotiroidismo por administración continua de metimazol al 0,03% en agua de bebida. Se inyectaron las ratas controles con la misma solución que las ratas hipertiroideas, pero sin tiroxina. Estos tratamientos se administraron durante 6 semanas.

Se evaluó la efectividad de estos tratamientos al comparar la tiroxina sérica (T_4), triiodotironina sérica (T_3), presión arterial sistólica, frecuencia cardiaca y pesos corporales finales (PCF) y renales (PR) de las ratas controles y tratadas (n=8, por grupo). La presión arterial y la FC fue determinada del mismo modo que en el experimento 1. Las muestras de sangre se obtuvieron del catéter arterial para determinar los niveles séricos de T_3 y T_4 .

3.1.1. Protocolo experimental

Seis semanas después de haber inducido hiper e hipotiroidismo, se escogieron al azar ocho ratas de cada grupo experimental y se ubicaron en jaulas metabólicas individuales proporcionándoles pienso y agua o una solución de metimazol ad limitum durante 3 días (dos días de adaptación y un día experimental) para determinar la ingesta de agua y bebida y para recoger la orina. Al final del estudio metabólico se sometió a los animales a una sobrecarga intraperitoneal salina isotónica (0.9% NaCl) e hipertónica (3% NaCl) a una tasa de 3 ml/100 g de peso. Las muestras de orinas fueron tomadas 5 h después de las inyecciones. Después de un intervalo de 48 h entre cada sobrecarga salina, se administraron soluciones salinas isotónicas (3 ml/100g) conteniendo los siguientes diuréticos: acetazolamida (50 mg/kg), un inhibidor de la anhidrasa carbónica para inducir el bloqueo de la actividad funcional del NHE3; furosemida (2 mg/kg), un antagonista selectivo del NKCC2, hidroclorotiazida (20 mg/kg), un antagonista selectivo del TSC y

amiloride (1 mg/kg), un antagonista selectivo del ENaC. Se ha demostrado que estas dosis bloquean los respectivos iones transportadores (Li y Wang, 2007).

Durante las 5 horas de recolección de la orina, las ratas fueron desprovistas de agua y comida. Antes y después de la recogida de orina, se aplicó una ligera presión suprapúbica para asegurarse el vaciado de la vejiga. Se determinaron las siguientes variables en muestras de orina: volumen urinario (U_v), sodio urinario ($U_{Na}V$) y excreción de potasio (U_KV). Después que los estudios urinarios se completaron, se recogieron muestras de sangre por punción aórtica y se extrajo corazón, riñón y tiroides. Se eligió la respuesta a las sobrecargas de NaCl en ratas conscientes porque este método evita el uso de anestesia o manipulación quirúrgica que puede modificar el nivel de hidratación basal, lo que podría ser diferente en controles y animales experimentales.

3.2. Procedimientos analíticos

Los niveles séricos de T_4 y T_3 se determinaron mediante ELISA, adquirido del Immunoassay System, Baxter, Miami, USA. El Na⁺ y k⁺ urinario fue determinado dentro de las 4 h después de la recolección de la orina, por fotometría de llama (Corning Instruments 435, Halstead, Essex, UK) con litio como estándar interno.

3.2.1. Preparación de tejidos para western blots

Se determinó la expresión de NHE3, NKCC2, TSC y α -ENaC por Western Blot en el riñón de las ratas hiper, hipo y eutiroideas (n = 6, por grupo). Los riñones fueron aislados rápidamente, congelados y almacenados a -80°C hasta que fueron analizados. El riñón fue homogenizado utilizando un homogenizador Politrón en una solución que contenía 250

mM de sucrosa, un cocktail de inhibidor de proteasa y Tris-HCL mM a un pH de 7,6 y centrifugados a 1.000 g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 100.000 g por una hora y el precipitado fue re-suspendido en el mismo tampón para obtener preparaciones enriquecidas en proteínas de membrana. Se determinó la concentración de proteínas en las muestras utilizando un kit de Ensayo de Proteínas DC (Bio-Rad).

3.2.2. Electroforesis y western blots de proteínas de membrana

Se analizaron 75 μ g de proteínas con SDS-PAGE utilizando 8% de geles. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa. La membrana fue marcada con una tinción de Ponceau, que confirmó la uniformidad de la carga de proteínas y la eficiencia de la transferencia a través de las pruebas de muestras. Después de bloquear con tampón salino Tri-básico conteniendo 5% de leche desnatada, las membranas fueron evaluadas con anticuerpos policionales de conejo anti NHE3, anti NKCC2, anti TSC y anti α -ENaC (Acris Antibodies, Herford, Germany) utilizados a 1 μ g/ml en tampón bloqueante a 4°C toda la noche. Los anticuerpos ligados fueron detectados con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Biomedal, Sevilla, Spain). Las membranas fueron re-analizadas con anticuerpo policional de conejo anti alfa-tubulina (Labfrontier, Seoul, Korea) a 0,1 μ g/ml, como control de sobrecarga y los anticuerpos ligados fueron detectados con un anticuerpo secundario conjugado HRP cabra anti-conejo (Biomedal, Sevilla, Spain).

Las bandas se visualizaron utilizando un sistema de quimioluminiscencia Lumiglo Reserve (KPL, Gaithersburg, MD, USA) y las imágenes fueron captadas utilizando una

64

película de radiografía, reveladas y cuantificadas con el programa Image J (National Institute of Health).

3.2.3. Preparación de ARN total

Después de sacrificar la rata, se seccionó la mitad del riñón izquierdo (n=6 por grupo) en pequeños trozos y se colocó en una solución de TRIzol (Invitrogen). Los trozos fueron homogeneizados con un homogenizador de tejidos (PowerGun 125, Fisher Scientific) y se añadió cloroformo (Sigma). Después de agitar, se incubó 1 ml de muestra a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min. Se aisló la porción transparente y se añadió isopropilo de alcohol. Después de agitar, la muestra se incubó 10 min a temperatura ambiente, seguido por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min. Se eliminó el isopropilo de alcohol después de confirmar la presencia de ARN en el pellet en el fondo de cada tubo y se añadió 75% de etanol. Se repitió la agitación y la centrifugación durante 5 min. Después de eliminar el etanol, cada pellet fue secado y se añadió agua libre de nucleasa (50 μ l). Se midió la concentración de ARN mediante espectofotómetro y se determinó la pureza al medir A260/A280. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

3.2.4. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando 1 µg de ARN total, oligos al azar y transcriptasa inversa ImProm-II TM (Promega) en un volumen total de 20 µl. La PCR fue realizada en el sistema de detección iCycler iQ PCR en tiempo real (Bio-Rad, Denmark)

utilizando un marcador verde (Quiagen). Las condiciones del ciclo de la PCR incluyeron un paso de calentamiento a 95°C durante 5 min, dejándose luego a 59-60°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 60 segundos. La secuencia de los oligos fueron NKCC2 de 5'-CATAACCCATGCCTTTACGA-3' (seguido), 5'rata TGAAGGAGACTCCGCACAC-3' (reversa); NHE3 de 5'rata, CATTGAGGAGGAACCGAACA-3' (seguido), 5'-TGGGTGTGAGTGTGAAGGAG-3' (reversa); TSC de rata, 5'-CTGCACCGCAAGAAGAGATG-3' (seguido), 5'-GATGTCAGGAAGGACGTGGA-3' 5'αENAC de (reversa); rata, GAGCCTCAACATCAACCTCAA-3' (seguido), 5'-AGCCTGGCGAGTGTAGGAA-5'-GCTGGGGGCTCACCTGAAGG-3' (seguido). 3' (reversa); GAPDH 5'-GGATGACCTTGCCCACAGCC-3' (inverso). Los datos generados del verde SYBR se analizaron utilizando la Expresión génica Macrote (Versión 1.1; modelo matemático Jo Vandesompele) Bio-Rad

4. Análisis estadístico

La evolución de la PS y la FC se comparó mediante un diseño anidado, con grupos y días como factores fijos y la rata como factor aleatorio. Se utilizó el método de Bonferroni cuando la diferencia fue significativa. Se aplicó la prueba de ANOVA de una cola para la comparación de cada variable al final de los experimentos. Cuando la prueba de ANOVA fue significativa, se llevaron a cabo las comparaciones por pares utilizando el método de Bonferroni. Se emplearon las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para las variables morfométricas. Se consideró significativa una P <0,05. Los datos cuantitativos del segundo experimento se presentan como \pm ES. Para la comparación estadística se utilizó el test-t no pareado (cuando las varianzas fueron las

mismas) y el test de la suma de los rangos Mann-Whitney (cuando las varianzas difirieron significativamente entre los grupos). Los valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

1. Experimento 1. Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental

1.1 Presión sanguínea y frecuencia cardíaca. La gráfica de la izquierda (Figura 2) muestra la evolución de la presión arterial sistólica (PAS) y de la frecuencia cardíaca (FC); y la gráfica de la derecha indica la presión arterial media final (PAM) y la FC medida por registro directo en los grupos experimentales. Los valores de PAS aumentaron y disminuyeron en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente, en comparación con las controles. La ingesta elevada de sal no modificó la presión sanguínea en ratas controles e hipotiroideas, pero produjo un aumento de la PAS en el grupo hipertiroideo. La FC aumentó y disminuyó en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas respectivamente, pero no fue modificada por la ingesta de sal en ningún grupo. Estos datos fueron validados a través del registro directo.







Figura 2: (Izquierda) Evolución de la presión arterial sistólica (SBP) y de la frecuencia cardíaca (HR) en los grupos experimentales medidos por pletismografía. (Derecha) Presión arterial media (MAP) y frecuencia cardiaca (HR) medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes, al final del período experimental (seis semanas). Los datos se expresan como medias \pm E.E.M. * p <0,01, ** p <0,001 en comparación con los controles. p <0,01 en comparación con sus respectivos grupos sin tratamiento con sal. Para mayor claridad, los símbolos de significación de las gráficas de la derecha sólo se dan al final del período estudiado.

1.2. Variables morfológicas. Al final del período de estudio (seis semanas), el peso corporal fue significativamente menor en los grupos hiper e hipotiroideos que en los controles. La ingesta elevada de sal produjo una disminución del peso corporal adicional en ratas hiper e hipotiroideas. El peso del riñón y la relación peso del riñón/peso del cuerpo (PR/PCF) aumentaron y disminuyeron significativamente en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente. La ingesta elevada de sal produjo un aumento adicional del PR y de la relación PR/PCF en las ratas hipertiroideas. El peso del corazón (PC) y la relación del peso del corazón/peso del cuerpo (PC/PCF) aumentaron y disminuyeron significativamente en las ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente en las ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente. La ingesta elevada de sal produjo un aumento adicional del PR y de la relación del peso del corazón/peso del cuerpo (PC/PCF) aumentaron y disminuyeron significativamente en las ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente. La ingesta elevada de sal produjo un aumento adicional del peso del corazón y de la relación PC/PCF en todos los grupos y estos efectos se acentuaron más en el hipertiroidismo. La relación ventrículo izquierdo/peso del corazón (VI/PC), un índice de hipertofia cardíaca ventricular izquierda, no fue significativamente

modificado por los tratamientos, lo que indica que se ven afectadas de la misma manera tanto la masa ventricular izquierda como derecha (tabla 3).

	X 7 • 11	6 1/ •	1	• 4 1
Tahla 4	Variahlac	mortologicae	on loc grunos	ovnorimontaloc
I avia J.	v al lautos	monuercas	CII 105 21 UD05	UNDER INITIALES
				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

Grupos	Control	Sal	Hipotiroidea	Hipotiroidea- Sal	Hipertiroidea	Hipertiroidea- Sal
PCF (g)	388 ± 11	363 ± 7.4	265 ± 5.7***	253 ± 3.2*** ^{,+}	302 ± 7.0 ***	$283 \pm 5.8^{***,+}$
PR (mg)	1028 ± 17	1038 ± 35	606 ± 17***	621 ± 21***	1149 ± 27***	1265 ± 24 **** ⁺⁺
PC (mg)	943 ± 6	976 ± 9*	$546 \pm 9.7 \text{***}$	$579 \pm 11^{***,+}$	1043 ± 9***	1216 ± 11***,++
PR/PCT (mg/g)	2.66 ± 0.06	2.87 ± 0.11	2.29 ± 0.12**	2.55 ± 0.11	3.84 ± 0.09***	$\begin{array}{c} 4.48 \pm \\ 0.06^{***} \end{array}$
PC/PCF (mg/g)	2.43 ± 0.04	2.69 ± 0.2*	$2.07 \pm 0.06^{***}$	$2.38 \pm 0.08^{*,+}$	3.41 ± 0.07***	3.96 ± 0.06***. ⁺⁺⁺
PVI/PC	0.780 ± 0.009	0.791 ± 0.006	0.785 ± 0.008	0.794 ± 0.015	0.802 ± 0.012	0.763 ± 0.021

Los datos se expresan como media \pm E.E.M. PCF, peso corporal final, PR, peso del riñón, PC, peso del corazón; PR/PCF, relación peso del riñón/peso del cuerpo; PC/PCF, relación peso del corazón/peso del cuerpo; PVI/PC, relación peso del ventrículo izquierdo/peso del corazón; . * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 frente al grupo control; + p <0,05, + + p <0,01, + + + p <0,01 vs sus respectivos grupos no tratados con sal.

1.3. Variables plasmáticas y niveles de hormona tiroidea. Estos resultados se resumen en la tabla 4. El sodio plasmático fue similar en todos los grupos. Los niveles plasmáticos de potasio aumentaron y disminuyeron en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente, y se redujeron por el alto consumo de sal en las ratas controles e hipertiroideas. Los niveles plasmáticos de creatinina se redujeron y aumentaron en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente por la ingesta de sal en ningún grupo.

Los niveles plasmáticos de calcio se redujeron significativamente en el grupo hipertiroideo, pero no se modificaron significativamente en el grupo hipotiroideo; el alto consumo de sal no cambió estos niveles en las ratas controles o hipertiroideas, pero los redujo en el grupo hipotiroideo. Los niveles plasmáticos de proteínas totales se redujeron y aumentaron en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente, pero no se modificaron por la ingesta elevada de sal en ningún grupo. Los valores de triiodotironina libre (FT₃) y de tiroxina libre (FT₄) se incrementaron y disminuyeron significativamente en las ratas con hipertiroidismo e hipotiroidismo, respectivamente, mientras que estos niveles se redujeron por el alto consumo de sal en las ratas con hipertiroidismo.

Grupos	Control	Sal	Hipotiroidea	Hipotiroidea- Sal	Hipertiroidea	Hipertiroidea- Sal
Na	$140.0 \pm$	142.0	143.0 ± 1.12	142.7 ± 1.86	139.8 ± 1.58	140.4 ± 0.98
(mEq/l)	0.53	± 0.76				
K (mEq/l)	$4.20 \pm$	$3.89 \pm$	2.94 ±	3.05 ± 0.08 ***	6.03 ± 0.31**	$3.95 \pm 0.22^{+++}$
	0.08	0.09*	0.08***			
Ca (mg/dl)	$10.2 \pm$	$10.1 \pm$	10.1 ± 0.04	$8.85\pm0.39^+$	8.50 ± 0.04 ***	8.34 ± 0.18 ***
_	0.14	0.11				
Urea	44.7 ±	$42.6 \pm$	$52.2 \pm 2.1*$	46.7 ± 2.5	41.3 ± 1.5	40.1 ± 3.1
(mg/dl)	2.2	1.4				
Creatinina	$0.41 \pm$	$0.40 \pm$	$0.58 \pm$	$0.49 \pm 0.02^{*,+}$	$0.26 \pm 0.04 **$	0.22 ± 0.01 ***
(mg/dl)	0.02	0.01	0.01***			
Proteínas	$5.56 \pm$	$5.63 \pm$	$6.01 \pm 0.13*$	5.54 ± 0.34	4.67 ± 0.04 ***	4.52 ± 0.10 ***
Totales	0.08	0.10				
(g/dl)						
FT ₃	3.21 ±	$3.49 \pm$	$1.65 \pm$	1.47 ± 0.07 ***	8.10 ± 0.30 ***	5.03 ±
(pg/ml)	0.05	0.09	0.11***			0.37** ^{,+++}
FT ₄	2.68 ±	$2.98 \pm$	0.073 ±	0.081 ±	7.56 ± 0.23***	$4.58 \pm 0.58^{*,+++}$
(ng/dl)	0.13	0.11	0.003***	0.005***		

Tabla 4. Variables plasmáticas y en los grupos experimentales

Los datos s expresan como media \pm E.E.M. FT₃, triiodotironina libre, FT₄, tiroxina libre. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs el grupo control; + p <0,05, + + + p <0,01 vs sus respectivos grupos no tratados con sal.

1.4. Variables urinarias y metabólicas. La ingesta de comida se incrementó y disminuyó en las ratas hipertiroideas e hipotiroideas, respectivamente. La ingesta elevada de sal redujo la ingesta de comida en todos los grupos, aunque la reducción no alcanzó significación estadística en el grupo hipotiroideo. El consumo de agua aumentó notablemente en las ratas hipertiroideas, y la ingesta de sal duplicó la ingesta de agua en las ratas controles e hipertiroideas, pero no modificó la ingesta de líquidos en las ratas hipotiroideas. En consonancia con estos resultados, el volumen de orina diaria fue mayor en las ratas con hipertiroideo e incluso hipotiroideo (tabla 6). El balance de agua fue mayor en las ratas con hipertiroidismo y reducido notablemente en el grupo hipotiroideo sal. El balance de sodio fue mayor en las ratas hipertiroideas, y el consumo elevado de sal aumentó el balance de sodio en todos los grupos con respecto a sus controles (tabla 5).

Los balances positivos de agua y de sodio de las ratas hipertiroideas no tratadas se correlacionan con las pérdidas aumentadas extrarrenales de agua y sodio; (Larsen y cols, 1998) y un mayor volumen sanguíneo (Masseroli y cols., 1998; Rodríguez-Gómez y cols., 2003; Vargas y cols., 2006) en estos animales.

Grupos	Control	Sal	Hipotiroidea	Hipotiroiea- Sal	Hipertiroidea	Hipertiroidea- Sal
Ingesta de comida	6.68 ± 0.29	4.71 ± 0.43**	$4.59 \pm$ 0.40***	3.87 ± 0.24***	14.27 ± 1.79***	$11.50 \pm$ 0.58***+
(g/100 g)	0.22	*	0110	0.2.		
Ingesta de	6.27 ±	12.65 ±	7.47 ± 0.79	7.73 ± 1.31	14.43 ±	$33.1 \pm$
agua (ml/100 g)	0.29	1.88** *			2.73***	4.65***
Balance de	$3.73\pm$	$5.25 \pm$	3.94 ± 0.61	$0.76 \pm 0.56^{*,++}$	$9.33 \pm 1.64*$	7.73 ± 3.41
agua (ml/100 g)	0.17	1.41				
Balance de	$0.14 \pm$	3.64 ±	0.08 ± 0.02	4.05 ±	$0.42 \pm$	9.07 ±
sodio	0.01	0.47**		0.36***+++	0.01***	$1.04^{***,+++}$
(mmol/100 g)		*				

	T 7 • 11	• •	4 1 /11	1	• • 1
Tahla 5	Variables	urinarias v	z metaholicas e	n las grun	os exnerimentales
I abla 5.	v al labics	ui mai lab	metabolicub c	11 105 SI up	os experimentales

Los datos se expresan como media \pm E.E.M. Todos los datos se refieren a 24 h. * p <0,05, *** p <0,001 frente al grupo control; + p <0,05, + + p <0,01, + + + p <0,01 vs sus respectivos grupos no tratados con sal.

La excreción total de potasio se incrementó y disminuyó en las ratas con hipertiroidismo e hipotiroidismo, respectivamente, y fue aumentada por la ingesta de sal en las ratas controles e hipertiroideas. La excreción de creatinina fue similar en las ratas control e hipotiroideas y disminuida en el grupo hipertiroideo, mientras que se incrementó por la ingesta elevada de sal en las ratas con hipertiroidismo. Los niveles de proteinuria fueron dos veces mayor en las ratas hipertiroideas que en las controles, la ingesta elevada de sal no modificó estos niveles en las ratas normales o hipotiroideas, pero produjo un marcado incremento en las ratas con hipertiroidismo. El aclaramiento de creatinina fue similar en todos los grupos, a excepción de un valor más alto en el grupo hipertiroideo sal (tabla 6).

Grupos	Control	Sal	Hipotiroide	Hipotiroidea- Sal	Hipertiroidea	Hipertiroidea Sal
Volumen urinario (ml/100 g)	2.54 ± 0.20	7.40 ± 0.80 ***	3.08 ± 0.57	$6.91 \pm 0.70^{+++}$	5.10 ± 1.31*	27.5 ± 1.22*** ⁺⁺⁺
U _K V (µEq/100g)	699 ± 35	794 ± 45	505 ± 51***	407 ± 60	971 ± 62***	1331 ± 71*** ^{,+}
Proteinuria (mg/mg creat)	9.93 ± 0.74	9.71 ± 0.92	8.65 ± 0.60	9.21 ± 0.37	20.24 ± 1.17***	29.42 ± 1.92*** ⁺⁺
U _{cr} V (mg/g riñón)	4.86 ± 0.24	4.82 ± 0.19	5.35 ± 0.55	$6.12 \pm 0.22^{*}$	3.52 ± 0.16*	$4.08 \pm 0.16^{*+}$
CrC (ml/min/g kidney)	$0,83 \pm 0.06$	0.84 ± 0.05	0.61 ± 0.08	0.88 ± 0.04	1.13 ± 0.24	1.48 ± 0.13***

Tabla 6. Variables urinarias y renales en los grupos experimentales

Los datos se expresan como medias \pm E.E.M. U_KV , excreción total de potasio, $U_{cr}V$, excreción total de creatinina; CrC, aclaramiento de creatinina. Todos los datos se refieren a 24 hs. * p <0,05, *** p <0,001 frente al grupo control; + p <0,05, + + p <0,01, + + + p <0,01 vs sus respectivos grupos no tratados con sal.

1.5. Excreción de nitritos y nitratos. La excreción urinaria total de nitratos y nitritos se incrementó significativamente en el grupo sal e hipertiroideo sal comparado con los controles y a su vez el grupo hipertiroideo sal presentó un aumento significativo con respecto al grupo hipertiroideo (Figura 3).



Figura 3: Excreción urinaria total (24 h) de nitratos y nitritos (NOx) en los grupos experimentales después de seis semanas de tratamiento. Los datos se expresan como medias \pm E.EM. * p <0.05, * p <0.01 en comparación con los controles ** p <0.001 versus el grupo sal, ** p <0.001 versus el grupo tratado con T₄ (n=7 por grupo)

1.6. Variables de estrés oxidativo. Estos datos se resumen en la figura 4. Los isoprostanos urinarios y el H_2O_2 fueron similares en las ratas controles e hipotiroideas y aumentadas en las ratas hipertiroideas. Los niveles de estos parámetros se incrementaron por la ingesta de sal elevada en todos los grupos, pero más notablemente en las ratas hipertiroideas.



Figura 4: Excreción urinaria total (24 h) de isoprostanos y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los grupos experimentales después de seis semanas de tratamiento. Los datos se expresan como medias \pm E.EM. * p <0.05, * p <0.01, ** p <0.001 en comparación con los controles. + p <0.01, ++ p <0.001 en comparación con sus respectivos grupos no tratados con sal.

1.7. Aminopeptidasas urinarias. La excreción urinaria de GluAP, AlaAP, CysAp y AspAp aumentó significativamente en las ratas hipertiroideas, mientras que el grupo hipotiroideo mostró niveles similares a las controles (figura 5). La GluAp y AlaAP se incrementaron por el alto consumo de sal en el grupo control, y todas las AP aumentaron por la ingesta elevada de sal en el grupo hipertiroideo, alcanzando valores más elevados que en el grupo control (figura 3), a pesar de sus valores más altos de excreción de creatinina que se utilizaron para normalizar los valores de AP, la ingesta elevada de sal no modificó de forma significativa las AP urinaria en ratas hipotiroideas, pero las GluAp y AlaAP se redujeron en comparación con sus respectivos grupos no tratados con sal.



Figura 5. Niveles urinarios de aminopeptidasas en los grupos experimentales después de seis semanas de tratamiento. Glutamil-(GluAP), alanil-(AlaAp), aspartil-(AspAp), y cistinil-aminopeptidasa (CysAp). Los datos se expresan como medias \pm E.E.M. * p <0,01, ** p <0,001 en comparación con los controles. * p< 0,01, ** p <0,001 en comparación con sus respectivos grupos no tratados con sal.

1.8. Resultados morfométricos. No se encontraron diferencias significativas en el análisis entre los grupos en el área o porcentaje de tejido conectivo intersticial renal con una ingesta de sal normal (controles 4,1 ± 1,4%, hipotiroideas 4.3% ± 1.3, hipertiroideas 5.6% ± 2.4), o después de la ingesta de sal elevada (controles 4,8% ± 1,1, hipotiroideas 6,2% ± 2.4, hipertiroideas 3,9% ± 0,5). Las ratas hipertiroideas sal mostraron un aumento significativo de las zonas glomerular y mesangial, en comparación con las ratas hipotiroideas sal (32.790 µm² ± 406 vs 28.678 µm² ± 1.119; 6795 µm² ± 2.094 vs. 3321 µm² 623; 25071 µm² ± 3.972 vs 16324 µm² ± 4,043, respectivamente (p = 0.029, Mann-Whitney U-test), lo que indica un papel modulador de las hormonas tiroideas en el área glomerular, cuando las ratas se encuentran bajo una ingesta aumentada de sal.

1.9. Variables de inflamación en la corteza renal. La tabla 7 resume las variables inflamatorias medidas en la corteza renal de los diferentes grupos experimentales. Se observa que el grupo hipotiroideo presentó niveles más bajos de IL2, IL6, IFN- γ , TNF- α y VEGF que el grupo control, sin embargo, en las ratas hipertiroideas se observó un aumento significativo del VEGF con respecto a las controles e hipotiroideas. Los grupos control e hipertiroideo tratados con sal mostraron una disminución de las variables inflamatorias en comparación a sus respectivos grupos controles. Sin embargo en las ratas hipotiroideas tratadas con sal se produjo un incremento en las variables inflamatorias respecto a las no tratadas, pero nunca fue superior a los niveles encontrados en las ratas controles sin tratar.

Corteza renal	IL2	IL6	IFN-γ	TNF-α	VEGF
Control	105 ± 13.7	355 ± 29.0	13.7 ± 1.94	1.53 ± 0.16	21.1 ± 2.22
				4	
Sal	76.3 ± 7.59	251 ± 25.5 *	9.23 ± 1.04	0.99 ± 0.09 *	16.3 ± 3.07
Hipotiroidea	51.9 ± 4.44 *	187 ± 12.5 [*]	5.98 ± 0.72 *	0.71 ± 0.05 *	9.08 ± 2.18 *
Hipotiroidea+Sal	81.9 ± 10.8 **	324 ± 23.7***	9.77 ± 1.45 **	1.07 ± 0.13	17.4 ± 3.85
Hipertiroidea	127 ± 14.6	323 ± 38.3	14.3 ± 1.13	1.42 ± 0.11	31.0 ± 3.76 *
Hipertiroidea+Sal	82.5 ± 5.91 ^{**}	279 ± 22.6	7.74 ± 0.51 *	1.03 ± 0.08 **	14.3 ± 1.18 ^{**}

Tabla	7.	Variables	inflamatorias	de	los	grupos	experimentales	medidos	en	la
corteza	a re	enal								

*p<0.05, * p<0.01 versus control o grupo sal; ** p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 versus sus respectivos grupos hipo o hipertiroidea.

Experimento 2. Función y Expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea.

2.1. Variables Biológicas. Los efectos de la administración del metimazol o de la tiroxina sobre las variables biológicas se detallan en la tabla 8. A los animales que se les suministró tiroxina o metimazol durante seis semanas, ganaron menos peso en comparación a sus machos controles de la misma edad durante este período. El peso renal, la presión arterial sistólica, la frecuencia cardíaca y los niveles séricos de T₃ y T₄ disminuyeron e incrementaron en las ratas hipo e hipertiroideas respectivamente. Por lo tanto, las ratas a las que se les suministró metimazol durante seis semanas, desarrollaron manifestaciones características del hipotiroidismo, mientras a aquellas que se les administró tiroxina por un período similar desarrollaron hipertiroideas respectivamente. La ingesta de agua

incrementó en las ratas hipertiroideas. La diuresis se incrementó en las ratas hipo e hipertiroideas y el balance de agua y sodio se incrementó en las ratas hipertiroideas. El pH urinario disminuyó de forma marcada en las ratas hipertiroideas.

2.2. Respuesta urinaria a la sobrecarga salina intraperitoneal hipertónica e isotónica en ratas hipo e hipertiroideas conscientes

Los resultados de la respuesta urinaria a la sobrecarga salina se resumen en la tabla 8. La respuesta diurética y natriurética a la sobrecarga isotónica fue similar en todos los grupos. La kaliuresis (U_KV) disminuyó e incrementó en las ratas hipo e hipertiroideas respectivamente y consecuentemente la relación Na/K se incrementó en las ratas hipotiroideas y se redujo en las ratas hipertiroideas. U_V y U_{Na}V en respuesta a la sobrecarga salina hipertónica aumentaron en ratas hipotiroideas y disminuyeron de forma marcada en las ratas hipertiroideas. (U_KV) fue similar en todos los grupos. La relación Na/K también se incrementó en ratas hipotiroideas y se redujo en ratas hipertiroideas.

Tabla 8. Variables biológicas y respuesta renal a la sobrecarga salina (2 ml/100g) isotónica (NaCl 0.9 %) o hipertónica (NaCl 3%), en ratas controles, hipotiroideas (tratadas con Metimazol, 0.03 % en agua de bebida) e hipertiroideas (tratadas con T₄, 75 μ g/rata/día s.c.).

	Metimazol	Control	T_4
Variables Morfológicas			
Peso corporal (g)	$266 \pm 3.7 ***$	328 ± 4.2	315 ± 4.3*
Peso del riñón (g)	$0.63 \pm 0.02^{***}$	0.94 ± 0.03	$1.14 \pm 0.04 ***$
Variables Hemodinámicas			
Presión arterial sistólica (mmHg)	117 ± 4.0 ***	130 ± 3.1	$156 \pm 1.9 ***$
Frecuencia cardíaca (latidos/min)	$352 \pm 6.5 **$	403 ± 9.9	487 ± 17.6***
Variables Metabólicas			
Ingesta de comida (g/100 g)	4.68 ± 0.21 **	5.65 ± 0.23	$9.86 \pm 0.36^{***}$
Ingesta de agua (ml/100 g)	9.17 ± 0.64	8.77 ± 0.30	14.2 ± 1.21 **
Diuresis (ml/100 g)	$5.58\pm0.43*$	4.04 ± 0.36	7.67 ± 1.13*
Balance de agua (ml/100 g)	3.59 ± 0.48	4.73 ± 0.31	$6.52 \pm 0.49*$
Balance de sodio (mmol/100 g)	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.02	$0.51 \pm 0.07*$
U _{pH}	8.33 ± 0.11	7.97 ± 0.19	$6.81 \pm 0.13^{***}$
Niveles de Hormonas Tiroideas			
Hormona			
$T_4(\mu g/dL)$	0.5 ± 0.3 ***	4.6 ± 0.3	41 ± 5***
$T_3(ng/dL)$	6 ± 2.2***	78 ± 3.2	204 ± 9***
Sobrecarga salina isotónica			
Diuresis (ml/100 g)	0.60 ± 0.08	0.75 ± 0.10	0.62 ± 0.06
Natriuresis (µmol/100 g)	94.4 ± 3.36	99.7 ± 5.02	100.7 ± 6.24
Kaliuresis (µmol/100 g)	$57.2 \pm 8.18*$	83.0 ± 8.40	111.1 ± 14.12
Sobrecarga salina hipertónica			
Diuresis (ml/100 g)	$2.5\pm0.08*$	2.14 ± 0.10	$1.3 \pm 0.06*$
Natriuresis (µmol/100 g)	867.9 ± 10.6*	691.1 ± 7.06	546.4 ± 8.24*
Kaliuresis (µmol/100 g)	$20\overline{3.6 \pm 12.4}$	196.8 ± 10.3	196.8 ± 13.2

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 versus controles.

2.3. Respuesta renal a acetazolamida en ratas conscientes y concentración de proteínas y expresión de ARNm del NHE3 (Fig. 6)

La administración de acetazolamida que induce la inhibición funcional del transportador de sodio NHE3 produjo disminución e incremento de la respuesta kaliurética, natriurética y diurética en ratas hipo e hipertiroideas respectivamente al compararse con las controles. El análisis densitométrico de los blots mostró cambios en la expresión del NHE3 en el grupo hipotiroideo y un aumento marcado en los riñones hipertiroideos comparado con los controles. Los niveles de ARNm del NHE3 disminuyeron e incrementaron en la corteza renal de los riñones hipo e hipertiroideos, respectivamente, mientras que en la médula renal no se encontraron diferencias significativas.





Figura 6: Respuesta diurética, natriurética y kaliurética a acetazolamida (50 mg/kg, ip, en NaCl isotónico, 3ml/100 g) en ratas conscientes y expresión del NHE3 en el riñón, corteza y médula.

2.4. Respuesta renal a la furosemida en ratas conscientes y concentración de proteínas y expresión de ARNm del NKCC2 (Fig. 7)

El bloqueo del NKCC2 con furosemida produjo un aumento significativo en la respuesta natriurética y diurética en las ratas hipotiroideas, mientras que en las ratas hipertiroideas produjo un incremento de $(U_K V)$ al compararse con las controles.

La cantidad de proteína del NKCC2 se incrementó en los riñones hipertiroideos pero aumentó considerablemente en los riñones hipotiroideos. Los niveles de ARNm del NKCC2 se incrementaron significativamente en la corteza y en la médula renal de ratas hiper e hipotiroideas, encontrándose mayores niveles en los riñones de las ratas hipotiroideas.



Figura 7. Respuesta diurética, natriurética y kaliurética a furosemida (50 mg/kg, ip, en NaCl isotónico, 3ml/100 g) en ratas conscientes y expresión del NKCC2 en el riñón, corteza y médula.

2.5. Respuesta renal a hidroclorotiazida en ratas conscientes y concentración de proteínas y expresión de ARNm del TSC (Fig. 8)

El bloqueo del TSC con hidroclorotiazida produjo una respuesta diurética y natriurética similar en todos los grupos. La respuesta kaliurética se incrementó en las ratas hipertiroideas respecto a las controles. La evaluación densitométrica reveló que no hubo diferencias en la densidad de la banda del TSC en los riñones hipotiroideos, con un incremento en las membranas renales en los riñones hipertiroideos comparado con los
controles. Los riñones hipertiroideos mostraron un aumento de los niveles de ARNm del TSC en la corteza y en la médula, mientras que no se observaron cambios significativos en los riñones de las ratas hipotiroideas.



Figura 8: Respuesta diurética, natriurética y kaliurética a hidroclorotiazida (50 mg/kg, ip, en NaCl isotónico, 3ml/100 g) en ratas conscientes y expresión de TSC en el riñón, corteza y médula.

2.6. Respuesta renal a amiloride en ratas conscientes y cantidad de proteínas y expresión de ARNm del α -ENaC (Fig. 9)

El bloqueo del α -ENaC con amiloride produjo un aumento significativo de la diuresis y de la natriuresis en las ratas hipotiroideas, mientras que en las ratas hipertiroideas produjo una reducción de la diuresis y de la natriuresis y una aumentada kaliuresis, cuando se comparó con sus controles. La expresión de las proteínas del α -ENaC fue similar en los riñones de ratas hipotiroideas y controles, mientras mostró un descenso significativo en riñones hipertiroideos. Los niveles de ARNm del α -ENaC se incrementaron significativamente en la corteza y médula renal de los riñones hipotiroideos y se redujeron notablemente en los riñones hipertiroideos.





Figura 9: Respuesta diurética, natriurética y kaliurética a amiloride (50 mg/kg, ip, en NaCl isotónico, 3ml/100 g) en ratas conscientes y expresión del α -ENaC en el riñón, corteza y médula.

La figura 10 muestra imágenes representativas de los western blots, resumiendo los resultados de los cuatro transportadores en los tres grupos experimentales.

Methimazole	Control	T ₄		
			\leftarrow	NHE3 α-tubuline
	inerest appendix and	===	\leftarrow	NKCC2 α-tubuline
			\leftarrow	TSC α-tubuline
			\leftarrow	α-ENaC α-tubuline

V. DISCUSIÓN

Experimento 1. Sensibilidad a la sal en el hipertiroidismo experimental

Efecto de un aumento de ingesta salina

Los principales hallazgos del estudio fueron que la dieta con alto contenido de sodio exacerbó la hipertensión, la hipertrofia cardíaca, la hipertrofia renal y la albuminuria; e incrementó el balance de sodio, el estrés oxidativo y la actividad AP urinaria asociada con el hipertiroidismo en ratas, inducido por la T_4 , mientras que las ratas hipotiroideas fueron resistentes a la elevación de la PS, la hipertrofia renal y no aparecieron signos de lesión renal después de la ingesta de sal elevada.

Un aumento de la presión sanguínea en respuesta a la dieta con alto contenido en sodio (sensibilidad a la sal) está bien documentada en los seres humanos y se considera un factor importante en la patogénesis de la hipertensión (Campese, 1994). El presente estudio muestra que el aumento de sodio en la dieta a través de la ingesta de comida acelera el aumento de la presión sanguínea inducida por la administración de T₄. Sin embargo, la misma sobrecarga de sodio no aumentó la PS en las ratas controles e hipotiroideas. Estos datos difieren de un estudio reciente de nuestro laboratorio, en donde una sobrecarga crónica de NaCl al 2% en el agua de bebida produjo un incremento moderado de la PS en las ratas Wistar macho (Cruz y cols., 2011). Estas discrepancias pueden reflejar las diferentes consecuencias fisiopatológicas de las al en el agua de bebida se produce un síndrome de poliuria-polidipsia, y el balance de sodio se altera por la ingesta elevada de líquidos que conduce a un círculo vicioso sedingesta salina-sed. Sin embargo, cuando se administra en la comida, la ingesta de agua diluye el exceso de sodio y facilita su excreción.

Se ha demostrado que las ratas hipertiroideas presentan anomalías en la hemodinámica renal y una respuesta disminuida de presión diuresis-natriuresis (García-Estañ y cols., 1994; Vargas y cols., 1994; Moreno y cols., 2008), lo que puede afectar al manejo renal de sodio y por lo tanto participar en la sensibilidad a la sal en estos animales.

Sal y NO

El NO juega un papel importante en la función renal y la excreción de sodio y regula la respuesta homeostática a una ingesta de sodio aumentada (Shultz y Tolins, 1993). Así, Shultz y Tolins (1993) demostraron que la ingesta de sal elevada en ratas durante 2 semanas provocó un aumento de la concentración sérica y la excreción urinaria de los productos de descomposición del NO (NOx) e incluso, más recientemente se ha utilizado la sobrecarga de sal como un mecanismo para activar la producción de NO (Newaz y cols., 2004). En relación con ello, el presente estudio confirma que el aumento en la producción de NOx renal se observa después de la ingesta elevada de sal. Nuestro grupo describió un aumento en los niveles plasmáticos de NOx en las ratas hipertiroideas (observaciones no publicadas), datos que se confirman con la elevación en la excreción urinaria de NOx en las ratas hipertiroideas del presente trabajo. La figura 5 además indica que el tratamiento conjunto de hormona tiroidea y sal produce un efecto aditivo en la producción de NOx, fenómeno que puede ser un mecanismo homeostático para facilitar la excreción renal de sodio en estos animales que presentan anomalías en el manejo renal del mismo (Vargas y cols., 1991, Vargas y cols., 1994). Se ha demostrado que la angiotensina II (García-Estañ y cols., 1995) y el estrés oxidativo (Moreno y cols., 2008) desempeñan un papel importante en estas anomalías.

Sal y Estrés Oxidativo en el hipertiroidismo

El hipertiroidismo en ratas está asociado con una actividad enzimática antioxidante reducida en los tejidos renal y cardíaco, y se observó un aumento dosis-dependiente del malonildialdehído o MDA plasmático y de la excreción urinaria de 8-isoprostanos en ratas tratadas con T₄ (Moreno y cols., 2005). Además, el tempol, un mimético de la superóxido dismutasa (Mitchell y cols., 1990), atenúa el desarrollo de hipertensión inducida por la T₄ (Moreno y cols., 2005) y mejora las variables hemodinámicas renales y la respuesta de presión diuresis natriuresis en ratas (Moreno y cols., 2008). Estas observaciones indican que el hipertiroidismo produce un aumento del estrés oxidativo. Por otra parte, se ha demostrado que la sobrecarga salina incrementa la actividad de la NAD(P)H oxidasa (Lenda y cols., 2000) y la excreción urinaria de isoprostanos (Cruz y cols., 2011).

En el presente estudio, los isoprostanos y el H_2O_2 urinarios, marcadores del aumento del estrés oxidativo endógeno (Fam y Morrow 2003; Dutta y cols., 2006), se incrementaron en las ratas con hipertiroidismo y fue debido al alto consumo de sal en todos los grupos, más notablemente en el grupo hipertiroideo. Estos resultados indican que el estado hipertiroideo sensibiliza a las ratas al estrés oxidativo inducido por un aumento de la ingesta de sal. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otros potenciales factores antidiuréticos y antinatriuréticos. Así, la endotelina y la vasopresina, que se estimulan de manera compensatoria cuando el sistema reninaangiotensina está atenuado (Letizia y cols., 1997), se encuentran aumentadas en las ratas con hipertiroidismo (Vargas y cols., 2006). Además, la activación del sistema reninaangiotensina intrarrenal por el receptor metabólico GPR91 del succinato, estrechamente asociado con el estrés oxidativo, tiene una sustancia similar a una hormona con función de señalización en los conductos colectores de la nefrona distal, que es la principal fuente de (pro) renina en algunas enfermedades (Peti-Peterdi, 2010). Por último, las hormonas tiroideas pueden producir retención de sodio al actuar directamente sobre los sistemas de transporte (por ejemplo, $Na^+/H^+ + y Na^+- K^+- ATPasa$) en los túbulos renales (Katz, 1982; Yonemura y cols., 1990).

Ingesta de sal elevada y efectos de los biomarcadores de inflamación en el hiper e hipotiroidismo experimental.

Los primeros trabajos de Meneely y cols. (Meneely y cols., 1953; Meneely y Ball, 1958) demostraron que el aumento de la ingesta de sal promueve una reducción dosisdependiente de la vida media de las ratas; y los resultados destacados en estos estudios fueron lesiones vasculares e insuficiencia renal. En modelos animales de enfermedad renal progresiva, la sal en la dieta también juega un papel en la progresión de la enfermedad. Por el contrario, la restricción de sal de la dieta ha demostrado ser tan eficaz como la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en la prevención de lesión glomerular (Weir y Dworkin, 1998) y la utilización de diuréticos en la reducción de la esclerosis glomerular en ratas espontáneamente hipertensas uninefrectomizadas (Benstein y cols., 1990).

Se han realizado muchos estudios analizando el papel del TGF- β 1, un agente profibrótico esclerogénico en diversas patologías (Border, 1990; Dahly y cols., 2002), en el efecto lesivo de la sal sobre el riñón. Así, se ha descrito que la sal de la dieta produce un aumento en los niveles de ARNm del TGF- β 1 en la corteza renal de ratas Sprague-Dawley, no observándose cambios en la presión sanguínea pero, en un día de consumo de sal si ocurrieron los cambios mencionados y persistieron a lo largo del

experimento (Ying y cols., 1998). La ingesta de sal aumentada también ocasionó un aumento en la producción de TGF- β 1 en los anillos aórticos, y el efecto se perdió tras la eliminación del endotelio (Ying y cols., 1999). Sin embargo, hay menos estudios sobre el papel proinflamatorio de la dieta rica en sodio.

Una dieta con alto contenido de sal, 8%, provoca activación del receptor AT_1 , causando un aumento de la producción de EROs y estrés oxidativo mediante la activación y/o regulación al alza de la NAD(P)H oxidasa en el riñón y los tejidos cardiovasculares (Chandramohan y cols., 2008). Además, la activación del receptor AT_1 promueve la inflamación estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y profibróticas, y quimioquinas; así como la expresión de moléculas de adhesión, lo que puede conducir a infiltración de leucocitos, fibrosis y lesión tisular (Conger y cols., 1989). Además, se sabe que el NF-kB activa numerosos genes proinflamatorios, incluyendo el TNF- α , IL-6, interferón-γ, y quimioquinas como CCL28 (Baldwin, 1996; Ghosh y cols., 1998; Venkatesha y cols., 2004; Nakamichi y cols., 2005). En este sentido, Gu y cols. (2006) demostraron que 5 semanas bajo una dieta con alto contenido en sal produce la activación del NF-kB y la regulación al alza del TNF-α en los riñones, asociado con el desarrollo de hipertensión, albuminuria, y marcadas alteraciones histológicas renales, incluyendo infiltración túbulo intersticial de células inflamatorias en las ratas Dahl SS. También observaron que los niveles plasmáticos de TNF-a se incrementaron significativamente en las ratas Dahl SS con una dieta rica en sal, en comparación con una dieta con bajo contenido en sal y que aumentaron fisiológicamente la concentración de sodio (10 mmol/l) que estimula directamente la activación del NF-kB en células epiteliales cultivadas del túbulo proximal renal en humanos. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que la activación del NF-kB y la regulación al alza del TNF- α son los mecanismos renales más importantes que vinculan la respuesta proinflamatoria con la hipertensión SS (Gu y cols., 2006). Así, hay otros autores que también evidencian que la respuesta renal pro-inflamatoria, como la acumulación de células inmunes en los riñones, podría tener un papel importante en la retención de sodio y por lo tanto en el desarrollo de hipertensión (Rodríguez-Iturbe y cols., 2002 (b)). A su vez hay estudios que demuestran que una reducción en el infiltrado celular inflamatorio renal previene el desarrollo de hipertensión SS. (Rodríguez-Iturbe 2002 (c)).

Nuestros datos (tabla 7) muestran que las ratas hipotiroideas tienen una reducción en las variables inflamatorias, hallazgo que puede estar en consonancia con el efecto protector del hipotiroidismo sobre las agresiones renales (Conger y cols., 1989). También se ha visto el efecto protector de la tiroidectomía en un modelo de rata con insuficiencia renal crónica. Nuestros datos demuestran, además; que la dieta rica en sodio produjo una disminución de las variables inflamatorias en los grupos control e hipertiroideo respecto a sus grupos controles. Sin embargo en las ratas hipotiroideas tratadas con sal se produjo un incremento en las variables inflamatorias respecto a las no tratadas, pero nunca fue superior a los niveles encontrados en las ratas controles sin tratar. El hecho de que la dieta rica en sodio no aumente los niveles de las variables inflamatorias en la corteza renal de las ratas controles e hipertiroideas (sal sensibles) contrasta con los artículos previamente citados, sin que tengamos una explicación razonable para esta discrepancia, especialmente cuando estos animales presentaron un aumento de las variables de estrés oxidativo, que según se ha descrito (Chandramohan y cols., 2008) actúan como factores desencadenantes de la inflamación. Por otra parte, también se ha descrito (Liu F y cols., 2011) que los niveles de VEGF-C aumentan significativamente en los sujetos sensibles a la sal tras una ingesta de sal aumentada, sugiriendo los autores que el VEGF-C podría ser utilizado como un biomarcador de sensibilidad a la sal, fenómeno que no se confirma en nuestro estudio.

Efectos de la sal sobre la morfología

Los datos morfológicos muestran que la masa cardiaca aumentó y disminuyó significativamente en los grupos hipertiroideos e hipotiroideos, respectivamente. La relación del peso del ventrículo izquierdo con el del corazón, un índice de la hipertrofia cardíaca ventricular izquierda, no se modificó significativamente por los tratamientos, lo que indica que la disfunción tiroidea afectó por igual a la masa ventricular izquierda y derecha. Estos datos son similares a observaciones previas de nuestro grupo (Vargas y cols., 2006; Wangensteen y cols., 2006). La ingesta de sodio puede modular la masa cardíaca (Rugale y cols., 2003). Por lo tanto, una alta ingesta de sodio aumenta la masa cardíaca en ratas normotensas (Yuan y Leenen, 1991) y agrava la hipertrofia cardíaca en ratas hipertensas (Frohlich y cols, 1993). Por el contrario, una ingesta baja en sodio previene la hipertrofia cardíaca asociada con la hipertensión Goldblatt "two kidneys one clip" (Pasquié y cols., 1994) y la hipertensión producida por la administración de ANG II (Morgan y cols., 1998), independientemente de la reducción de la PS. En el presente estudio, el consumo elevado de sal produjo un aumento del peso del corazón y de la relación peso del corazón/peso corporal en todos los grupos, mientras que las ratas hipertiroideas mostraron mayor sensibilidad a la hipertrofia cardíaca inducida por la sal.

Niveles plasmáticos de hormonas tiroideas, creatinina y proteinuria tras una elevada ingesta de sal

La ingesta elevada de sal redujo los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas en las ratas con hipertiroidismo, en consonancia con los niveles bajos de hormona tiroidea observados en diferentes modelos de hipertensión sal dependientes (MacParland y Rapp, 1982; Vargas y cols., 1988; Cruz y cols., 2011). Se cree que este fenómeno está mediado por la acción de una sustancia no identificada, denominada «factor depresor del tiroides" por Threatte y cols. (1982). Las lesiones renales también se asocian con concentraciones bajas de hormona tiroidea, debido a los efectos centrales, a cambios en el metabolismo hormonal periférico y a la unión a proteínas de la hormona tiroidea (Van Hoek y Damineta, 2009). Además, se sabe que las enfermedades no tiroideas concomitantes pueden suprimir las concentraciones séricas de T_4 (Peterson y Gamble, 1990), como se observó en el presente grupo hipertiroideo sal.

La creatinina plasmática se redujo y aumentó en las ratas hipertiroideas e hipotiroidismo, respectivamente. Estos resultados son comparables con los cambios en la creatinina plasmática observada en humanos (Threatte y cols., 1982) y gatos (Van Hoek y Damineta, 2009). La reducción de la concentración sérica de creatinina en el hipertiroidismo puede ser debido a la producción disminuida por una masa muscular reducida (Ford y cols., 1989), mientras que el aumento observado en el hipotiroidismo es causado por la función glomerular disminuida y aumento de generación de creatinina por miopatia y rabdomiolisis (Sekine y cols., 1993). Por otra parte, estos cambios en la creatinina plasmática pueden, en parte, ser explicados por la expansión y dilución del volumen; y por la disminución del volumen en ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente, como lo indicaron los niveles plasmáticos de proteínas. Los valores del aclaramiento de creatinina no presentaron cambios en nuestras ratas hipertiroideas, lo que no tiene relación con la disminución de la tasa de filtración glomerular observada en los experimentos de presión-natriuresis en ratas hipertiroideas anestesiadas (Moreno y cols., 2008; Vargas y cols., 1994). En los últimos experimentos, la tasa de filtración glomerular se midió como aclaramiento de [3H] de inulina, y se administraron varias hormonas para controlar las influencias neuronales y hormonales, a las cuales las ratas

hipertiroideas podrían ser más sensibles, como se sugirió en nuestra primera publicación sobre este tema (Vargas y cols., 1994).

Los niveles de proteinuria fueron dos veces mayores en las ratas hipertiroideas. La proteinuria es habitual en las ratas (Moreno y cols., 2005; Rodríguez-Gómez y cols., 2003) y en los seres humanos con hipertiroidismo (Ford y cols., 1989), sin estar relacionado con la actividad del sistema renina-angiotensina, con los niveles de PS (Rodríguez-Gómez y cols., 2003), o con el estrés oxidativo (Moreno y cols., 2005). La proteinuria se agravó por la mayor ingesta de sodio en las ratas con hipertiroidismo. Esta observación está en concordancia con los estudios en los que la restricción de sodio en la dieta evita la proteinuria en ratas espontáneamente hipertensas (Benstein y cols., 1990), nefrectomizadas 5/6 (Dworkin, 1996), y ratas hipertensas por angiotensina II (Rugale y cols., 2003).

Aminopeptidasas como biomarcadores precoces de daño tubular renal

Hay una necesidad urgente de mejorar los biomarcadores que permitan un mejor diagnóstico de la enfermedad renal. Pueden ser útiles para el diagnóstico precoz y valoración de la gravedad de la lesión, para guiar las terapias necesarias, y para vigilar la progresión de la enfermedad, evolución y la resolución de la misma. Cuando las células tubulares están dañadas, liberan enzimas tubulares dentro del ultrafiltrado aumentando la actividad enzimática urinaria. Los marcadores urinarios de daño tubular (Price, 1992), tales como la proteína transportadora de retinol o la N-acetil-βglucosaminidasa, se elevan en los seres humanos con hipertiroidismo (Ford y cols, 1989; Nakamura, 1991) y en los gatos (Van Hoek, 2009). En este trabajo, se analizó la excreción urinaria de GluAP, AlaAP, CysAp y AspAp como posibles biomarcadores de disfunción tubular en la disfunción tiroidea y tras un aumento en la ingesta de sal. El aumento de los niveles urinarios de AP en ratas tratadas con sal y con tiroxina sugiere que la ingesta elevada de sal y el estado hipertiroideo tienen efectos aditivos causando disfunción tubular. Por el contrario, el estado hipotiroideo resultó resistente a los efectos de la sal sobre la actividad AP urinaria, indicando que el estado hipotiroideo puede prevenir la enfermedad renal crónica. En este contexto, se observó (Conger y cols., 1989) una reducción en la proteinuria y menor deterioro de la función renal, en ratas con insuficiencia renal, tras la tiroidectomía. Además, en otro entorno experimental, observamos que los niveles de AP aumentan incluso antes de la elevación de la excreción total de proteínas en las ratas hipertiroideas (observaciones no publicadas). Por lo tanto, desde un punto de vista diagnóstico, se puede concluir que los valores urinarios de AP son marcadores pronósticos adecuados de lesión renal.

Experimento 2. Función y Expresión de los transportadores de sodio en ratas con disfunción tiroidea.

La identificación de los transportadores renales de sodio ha permitido un mejor entendimiento del manejo renal de sodio en diferentes enfermedades. Nuestro laboratorio se ha centrado en la comprensión de las bases fisiológica y molecular de la homeostasis de sodio en la disfunción tiroidea (Vargas y cols., 1991; Vargas y cols., 1994; Rodríguez-Gómez y cols., 2003, García del Río y cols., 1997). Estudios previos sugieren que la alteración en la regulación de los transportadores renales de sodio contribuye a la dificultad para excretar sodio en numerosas enfermedades cardiovasculares y en la disfunción tiroidea (Reeves y Andreoli, 2001; Cadnapaphornchai y cols., 2003; Schmitt y cols, 2003; Cano y cols., 1999; Wang y cols., 2007). Sin embargo, no se ha realizado un análisis integral y completo incluyendo una evaluación molecular y funcional. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue examinar los mecanismos funcionales y moleculares que contribuyen a las anormalidades del sodio urinario en la disfunción tiroidea. Se ha proporcionado evidencia funcional y bioquímica de que las hormonas modulan positivamente la expresión y actividad del NHE3 en el túbulo proximal. Este hecho puede participar en los niveles disminuidos o aumentados de la presión sanguínea de las ratas hipo e hipertiroideas, respectivamente. Estas alteraciones son contrarrestadas por la regulación funcional al alza del NKCC2 y del α-ENaC en los segmentos de la nefrona de ratas hipotiroideas y por una regulación funcional y bioquímica a la baja del α-ENaC en ratas hipertiroideas, probablemente con el objeto de mantener el balance de sodio (figura 11). Sin embargo, la respuesta al bloqueo del TSC fue normal, pero la presencia de proteínas fue mayor en las ratas con hipertiroidismo, lo que sugiere que las hormonas tiroideas pueden afectar, por separado la actividad o expresión de algunos transportadores de sodio. Alteraciones en la expresión o en la actividad de los transportadores de sodio pueden llegar a ser funcionalmente relevantes si los riñones hipo e hipertiroideos son sometidos a sobrecargas salinas o hemodinámicas.

Dado que una solución salina isotónica fue el vehículo para la administración diurética, se caracterizó el manejo de sodio y agua después de una sobrecarga salina isotónica en las ratas hiper e hipotiroideas. La respuesta diurética y natriurética a la sobrecarga salina isotónica fue similar en ratas hipo e hipertiroideas al ser comparadas con sus controles. Esta observación es interesante porque permite comparar la respuesta al bloqueo directo de los transportadores de sodio.

En condiciones basales las ratas hipertiroideas muestran un incremento de la diuresis, natriuresis y kaliuresis como fue demostrado previamente por nuestro laboratorio (Vargas y cols., 1991). La poliuria y el aumento en la excreción de sodio también han sido demostrados en las ratas hipertiroideas aun cuando la ingesta de pienso y agua fue ajustada a los controles, sugiriendo que es secundario al catabolismo aumentado (Wang y cols., 2007). Se sabe que la diuresis de un soluto aumenta el flujo urinario, lo que podría estar relacionado con la poliuria del hipertiroidismo independientemente de la ingesta de sodio aumentada. Es interesante destacar que la diuresis de este soluto se asocia al hipertiroidismo a pesar de la expresión aumentada de numerosos transportadores incluyendo NHE3, NKCC2 y el TSC. Sin embargo cuando las ratas hipertiroideas son sometidas a una sobrecarga salina hipertónica estos animales responden con disminución de la diuresis y natriuresis (tabla 8), lo que está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio que demuestran que cuando las ratas hipertiroideas son sometidas a restricción hídrica o a una sobrecarga salina hipertónica (3% NaCl) (i.p.) estos animales responden con una disminución de la diuresis y de la

natriuresis y una osmolalidad incrementada y producción de AVP (Vargas y cols, 1991). La respuesta aumentada de AVP en las ratas hipertiroideas a estos estímulos se ha confirmado luego por Mogulkoc y Baltaci (2006). Estos incrementos de la respuesta de AVP pueden aumentar agudamente los transportadores de sodio NKCC2 y TSC (Ecelbarger y cols, 2001) y por lo tanto incrementar la reabsorción de sodio en estas ratas. Además, la excreción reducida de sodio tras la sobrecarga salina hipertónica en el grupo hipertiroideo podría estar mediada por la respuesta atenuada de natriuresis de presión de estos animales (Vargas y cols., 1994). Teniendo en cuenta que la presión sanguínea aumentada es parte de la respuesta hemodinámica homeostática a la sobrecarga salina hipertónica para facilitar la excreción renal de sodio con el objeto de restablecer el balance de sodio (Wangensteen y cols., 2004).

Respuesta renal a acetazolamida en ratas conscientes y niveles renales de proteínas y expresión de ARNm del transportador NHE3

Cuantitativamente, el intercambiador Na⁺/H⁺ es el responsable de la mayor parte de la reabsorción de sodio en el túbulo proximal. La administración de acetazolamida, que induce la inhibición funcional del transportador de sodio NHE3, produjo una respuesta diurética, natriurética y kaliurética disminuida y aumentada en ratas hipo e hipertiroideas, respectivamente, al ser comparadas con los controles. La cantidad de proteínas y los niveles de NHE3 en la corteza estuvieron en consonancia con las observaciones funcionales. Trabajos previos han demostrado una disminución en la presencia de proteínas en la corteza renal del NHE3 (Cadnapaphornchai y cols., 2003) y en western blots de las preparaciones de membrana de todo el riñón (Schmitt y cols., 2003) de ratas hipotiroideas y Chen y cols. (Chen y cols, 2005) demostraron que la

concentración de proteínas del NHE3 se correlacionó con la concentración de T_4 sérica. Sin embargo, Azuma y cols. (1996) no encontraron diferencias en la concentración de proteínas del NHE3 en la membrana cortical renal en ratas hipotiroideas, eutiroideas e hipertiroideas, a pesar que los niveles de ARNm del NHE3 fueron significativamente mayores en ratas hipertiroideas. Nuestros datos concuerdan con el efecto conocido de la T_3 para estimular la actividad del NHE3 directamente al activar la transcripción del gen NHE3 y el aumento en la concentración de proteína del NHE3 (Cano y cols., 1999; Yonemura y cols., 1990). A pesar del efecto directo de las hormonas tiroideas, los niveles de angiotensina disminuidos en el hipotiroidismo y aumentados en el hipertiroidismo (Ganong, 1982), también podrían jugar un papel importante en la modulación de la actividad y expresión del NHE3 en nuestros grupos experimentales. Así, se ha descrito que la angiotensina estimuló la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ (Gesek y Schoolwerth, 1991) e incrementó la concentración del mismo (Kwon y cols., 2003).

Los cambios en la actividad funcional y en la expresión del NHE3 observado en ratas hipo e hipertiroideas podrían contribuir a los cambios en la presión arterial observada en estas alteraciones hormonales (tabla 8). En este sentido, se ha observado un aumento de la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ en células del túbulo proximal de ratas jóvenes SH (Gesek y Schoolwerth, 1991). Además, el aumento de la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ en ratas con hipertiroidismo podría explicar la disminución del pH urinario de estos animales. Por otra parte, el pH urinario normal en ratas hipotiroideas concuerda con estudios anteriores que muestran que bajo condiciones controladas las ratas hipotiroideas no mostraron ningún signo de acidosis metabólica o pérdida de bicarbonato urinario a pesar de la regulación a la baja del NHE3 (Mohebbi y cols., 2007). Esto se explica por un aumento compensatorio de la expresión del

intercambiador cloruro/bicarbonato en las células intercaladas tipo A. Sin embargo, después de la inducción de acidosis metabólica con una sobrecarga oral de NH₄Cl, se observó una acidosis metabólica más pronunciada en las ratas hipotiroideas (Mohebbi y cols., 2007).

Respuesta renal a furosemida en ratas conscientes y niveles renales de proteínas y expresión de ARNm del transportador NKCC2

El co-transportador NKCC2 localizado en el TAL cortical y medular es el principal mediador de la reabsorción de sodio en la membrana apical del TAL. Aproximadamente el 20% del total de la reabsorción de NaCl se lleva a cabo a través del transporte ubicado en el TAL. El bloqueo del NKCC2 con furosemida produjo una respuesta diurética y natriurética significativamente mayor en ratas con hipotiroidismo, mientras que en ratas hipertiroideas produjo una respuesta diurética y natriurética normal. El aumento de la proteína del NKCC2 y sus niveles de ARNm se incrementaron en los riñones hipertiroideos pero más notablemente en los riñones hipotiroideos.

El aumento de la proteína del NKCC2 en los riñones hipotiroideos también fue observado por Schmitt y cols. (2003) que mostró un marcado incremento en el análisis densitométrico del NKCC2 y en el análisis histoquímico, un aumento del mismo en los riñones hipotiroideos. Por el contrario Cadnapaphornchai y cols. (2003) describieron que la proteína NKCC2 se redujo significativamente en la corteza y médula externa de los riñones hipotiroideos.

El aumento de proteínas del NKCC2 de los riñones hipertiroideos mostrado en la figura 7 concuerda con el estudio realizado por Wang y cols. (2007) en ratas hipertiroideas alimentadas *ad libitum* y con ingesta ajustada a las controles.

Evidencias experimentales indican que el aumento del NKCC2 está en parte, regulado por los niveles plasmáticos de ANG II a través de los receptores AT₁ (Kwon y cols., 2003) y por la vasopresina (Ecelbarger y cols., 2001) a través del receptor V₂ (Kim y cols., 1999). Aunque los niveles elevados de vasopresina se han implicado en el incremento de proteínas del NKCC2 en ratas tratadas con metimazol (Schmitt y cols, 2003), nosotros no observamos cambios significativos en la vasopresina urinaria en ratas tratadas con metimazol, incluso se observó una respuesta reducida de la vasopresina a la restricción hídrica o a una sobrecarga salina hipertónica (Vargas y cols., 1991). Estas diferencias sugieren que una alteración de la reabsorción tubular proximal, como indica la respuesta reducida a la acetazolamida, con el consiguiente aumento del aporte distal de sodio, puede ser un factor compensatorio causal de la hiperactividad del NKCC2 en ratas hipotiroideas. En este sentido, se ha demostrado que un aporte aumentado de sodio distal, incrementa la capacidad de transporte de la nefrona distal (Stanton y Kaissling, 1998).

Se ha demostrado que el gen NKCC2 es un candidato a interaccionar con el locus inductor de hipertensión en la hipertensión esencial humana (Glorioso y cols., 2001) y en modelos experimentales de hipertensión sal sensible en ratas (Li J y Wang, 2007; Kim y cols., 2006). La respuesta funcional normal a la furosemida en ratas hipertiroideas sugiere que el NKCC2 no parece desempeñar un papel en la hipertensión asociada al hipertiroidismo, al menos en condiciones normales, probablemente porque este tipo de hipertensión es un modelo dependiente de renina (García del Río y cols., 1997).

Respuesta renal a hidroclorotiazida en ratas conscientes y niveles renales de proteínas y expresión de ARNm del transportador TSC

El transportador de sodio TSC localizado en el túbulo contorneado distal tiene un papel importante en la regulación de la excreción renal de sodio. El bloqueo del TSC con hidroclorotiazida produjo una respuesta similar diurética y natriurética en todos los grupos. La evaluación densitométrica no reveló diferencias en la densidad de la banda del TSC en los riñones hipotiroideos, datos que concuerdan con los observados previamente por Schmitt y cols. (Schmitt y cols, 2003). Los riñones hipertiroideos mostraron un aumento en la densidad de la banda del TSC y del ARNm en la corteza y médula. Estas observaciones pueden estar mediadas por el aumento en los niveles de aldosterona en las ratas hipertiroideas, ya que se ha demostrado que un aumento en los niveles circulantes de aldosterona está asociado con un marcado incremento del TSC en el túbulo contorneado distal (Kim y cols., 1998). Además, la vasopresina también puede aumentar la expresión del TSC (Ecelbarger y cols., 2001). Este efecto puede ser especialmente relevante bajo una sobrecarga salina hipertónica que produce un marcado aumento en la producción de vasopresina en ratas con hipertiroidismo como se ha descripto anteriormente (Vargas y cols., 1991; Mogulkoc y Baltaci, 2006). El papel del TSC en el desarrollo de la hipertensión no está completamente establecido la hipertensión experimental. Aunque, se ha visto una mayor presencia de proteínas del TSC en los riñones de las ratas hipertensas L-NAME (Kim y cols., 2006) y existen datos contradictorios en el modelo SHR (Beaumont y cols., 1990; Kim y cols., 2005). La respuesta funcional normal al bloqueo del TSC a pesar del incremento de la presencia de proteínas y de la expresión del ARNm en ratas hipertiroideas, sugiere que

en condiciones normales el TSC no debe modular la presión sanguínea en la disfunción tiroidea.

Respuesta renal a amiloride en ratas conscientes y niveles renales de proteínas y expresión de ARNm del transportador ENaC

El canal de sodio amiloride sensible, ENaC, localizado en los tubos colectores, juega un papel crítico en la regulación renal de la excreción de sodio y en la presión sanguínea (Reeves y Andreoli, 2001). El ENaC es un hetero-oligómero formado por subunidades [alfa], [beta], y [gamma]-ENaC. La subunidad [alfa] es esencial para la función normal del canal, cuya actividad se ve aumentada por la asociación con las subunidades [beta] y [gamma]-ENaC (May y cols., 1997). Este transportador de sodio está regulado por la aldosterona, que provoca el aumento del transporte de sodio amiloride sensible en los túbulos colectores (Masilamani y cols., 1999; Masilamani y cols., 2002) y, específicamente, aumenta la expresión de la α -subunidad del ENaC (Masilamani y cols., 1999). En el presente estudio, encontramos que el bloqueo del ENaC con amiloride produjo un aumento y disminución significativa de la diuresis y natriuresis en ratas hipo e hipertiroideas, respectivamente, comparado con las controles.

Los niveles de ARNm del α -ENaC estuvieron de acuerdo con la respuesta funcional, y la presencia de proteínas del α -ENaC en los riñones de las ratas hipotiroideas no se modificó significativamente, mientras que en los riñones hipertiroideos mostró una marcada reducción. Estos resultados demuestran claramente que la actividad del ENaC esta modulada negativamente por las hormonas tiroideas y por lo tanto no deberían contribuir a los cambios de la presión sanguínea en estas enfermedades. El mecanismo por el cual las hormonas tiroideas reducen la actividad del ENaC se desconoce, pero podría ser una respuesta compensadora a los cambios en el transportador de sodio en el túbulo proximal. Así, se ha descrito que un aumento en el aporte distal de sodio aumenta la capacidad de transporte de la nefrona distal. (Stanton y Kaissling, 1998). Este mecanismo podría sobrepasar la capacidad de estimulación de la aldosterona (García del Río y cols., 1997; Ganong, 1982), que está aumentado en las ratas hipertiroideas. En los riñones hipotiroideos le presencia aumentada de proteínas α -ENaC permanece sin cambios, lo que está de acuerdo con las observaciones de Schmitt y cols. (2003) que no mostró diferencias en densitometría e inmunofluorescencia del α -ENaC entre las ratas tratadas con metimazol y las ratas controles. En los riñones hipertiroideos aún no existen datos publicados acerca de este transportador de sodio.



Figura 11. Efecto de la administración de los distintos diuréticos en la actividad de los transportadores de sodio a lo largo de la nefrona en ratas hipertiroideas e hipotiroideas

VI. CONCLUSIONES

1) El estado hipertiroideo se asocia con un aumento de la sensibilidad a la sal, que se manifiesta por una presión sanguínea elevada, aumento de la hipertrofía cardíaca y renal, estrés oxidativo, y signos de lesión renal en respuesta a la ingesta de sal elevada. Por el contrario, la ingesta de sal no produjo ningún aumento de la presión sanguínea, hipertrofía renal o signos de daño renal en ratas hipotiroideas. También se puede concluir que los niveles urinarios de AP son un marcador biológico adecuado de lesión renal.

2) Este estudio proporciona evidencias funcionales y bioquímicas que las hormonas tiroideas modulan positivamente la expresión y actividad del NHE3 en el túbulo proximal, fenómeno que podría participar en el aumento y disminución de la presión sanguínea en las ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente. Estas alteraciones están contrarrestadas por la regulación al alza del NKCC2 y del α ENaC en diferentes segmentos de la nefrona en ratas hipotiroideas y por una regulación a la baja del α ENaC en ratas hipertiroideas, probablemente con el objeto de mantener el balance de sodio. Además, las ratas hipertiroideas también mostraron una mayor presencia de proteínas y expresión del NKCC2 y del TSC, la cual no se correlacionó con una respuesta funcional.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abreu NP, Monerat Tardin J, Boim MA, Campos RR, Bergamaschi CT, and Schor N. Hemodynamic parameters during normal and hypertensive pregnancy in rats: evaluation of renal salt and water transporters. *Hypertension in Pregnancy* 27:49-63, 2008.

Ackermann D, Vogt B, Escher G, Dick B, Reichen J, Frey BM, Frey FJ. Inhibition of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase by bile acids in rats with cirrhosis. *Hepatology* 30: 623-629, 1999

Agre P, Kozono D. Aquaporin Water Channels: molecular mechanism for human disease. *FEBS Lett* 555:72-78, 2003.

Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. Inhibition of TGF-1expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 50: 148-155, 1996.

Alcalde AI, Sarasa M, Raldua D, Aramayona J, Morales R, Biber J, Murer H, Levi M, Sorribas V. Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. *Endocrinology* 140:1544-1551, 1999.

Álvarez G, Osuna A, Wangensteen R, Vargas F. Interaction between nitric oxide and mineralocorticoids in the long-term control of blood pressure. *Hypertension* 35:752-757, 2000.

Álvarez V, Quirz Y, Nava M, Pons H, and Rodríguez Iturbe B. Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(5):F1132-F1141, 2002.

Amemiya M, Loffing J, Lötscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 48:1206-1215, 1995.

Andrade J, Haro JM, Jódar E, Luna JD, and Vargas F. Effects of methimazole on low renal mass hypertension: changes on blood pressure and pressor responsiveness to vasoconstrictors. *Pharmacology* 44:315-323, 1992.

Anthonisen P, Holst E, and Thomsen AA. Determination of cardiac output and other hemodynamic data in patients with hyper- and hypothyroidism, using dye dilution technique. *Scand J Clin Lab Invest* 12:472-480, 1960.

Arrigo AP. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *J Biol Chem* 379:19-26, 1998

Asahi T, Shimabukuro M, Oshiro Y, Yoshida H, and Tasaku N. Cilazapril prevents cardiac hypertrophy and postischemic myocardial dysfunction in hyperthyroid rats. *Thyroid* 11:1009-1015, 2001.

Aviv A. Salt and hypertension: the debate that begs the bigger question. *Arch Intern Med* 26;161(4):507-510, 2001.

Azuma KK, Balkovetz DF, Magyar DE, Lescale-Matys L, Zhang Y, Chambrey R, Warnock DG, and. McDonough AA. Renal Na+/H+ exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone. *Am J Physiol* 270 (Cell Physiol. 39):C585-C592, 1996.

Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 110(1):225-228, 1993.

Baldwin AS. The NF-kB and IkB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-681, 1996.

Banday AA, Muhammad AB, Fazili FR, Lokhandwala M. Mechanisms of oxidative stress-induced increase in salt sensitivity and development of hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 49:664-671, 2007.

Basset A, Blanc J, Messas E, Hagege A, and Elghozi JL. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. *J Cardiovasc Pharmacol* 37:163-172, 2001.

Baum M, Dwarakanath V, Alpern RJ, Moe OW. Effects of thyroid hormone on the neonatal renal cortical Na/H antiporter. *Kidney Int* 53:1254-1258, 1998.

Beaumont K, Vaughn DA, Casto R, Printz MP, Fanestil DD. Thiazide diuretic receptors in spontaneously hypertensive rats and 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 12:215-226, 1990.

Beckman JS, and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437, 1996.

Bedotto JB, Gay RG, Graham SD, Morkin E, and Goldman S. Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade. *J Pharm Exp Ther* 248:632-636, 1989.

Bendich A, Belisle EH, Strausser HR. Immune system modulation and its effect on blood pressure of the spontaneously hypertensive male and female rat. *Biochem Biophys Res Commun* 99:600-607, 1981.

Benstein JA, Feiner HD, Parker M, Dworkin LD. Superiority of salt restriction over diuretics in reducing renal hypertrophy and injury in uninephrectomized SHR. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 258:F1675-F1681, 1990.

Berne y Levy. Fisiología. Sexta edición. Editores Bruce M. Koeppen y Bruce A. Stanton. Elsevier España, SL, 578-593, 2009.

Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 247-255, 2001

Bianchi G, Baer PG, Fox U, Duzzi L, Pagetti D, Giovannetti AM. Changes in renin, water balance, and sodium balance during development of high blood pressure in genetically hypertensive rats. *Circ Res* 36:153-161, 1975.

Bianchi G, Cusi D, Gatti M. A renal abnormality as a possible cause of essential hypertension. *Lancet* 1:173-177, 1979.

Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, and Aronson PS. NHE3: a Na1/H1exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 265:F736-F742, 1993.

Boegehold MA. Effect of dietary salt on arteriolar nitric oxide in striated muscle of normotensive rats. *Am J Physiol* 264:H1810-H1816, 1993

Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor 1. *Nature (Lond)* 346:371-374, 1990.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.

Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, Reville P. The thyroid and the kidney. Kidney Int 6:346–365, 1974.

Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension* 37:444-448, 2001.

Buczynski A, Wachowicz B, Kedziora-Kornatowska K, Tkaczewski W, Kedziora J. Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 100: 223-228, 1993.

Büssemaker E, Popp R, Fisslthaler B, Larson CM, Fleming I, Busse R, and Brandes RP. Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery. *Cardiovasc Res* 59: 181-188, 2003.

Buttke TM and Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:77-110, 1994.

Cadnapaphornchai MA, Kim YW, Gurevich AK, Summer SN, Falk S, Thurman JM, Schrier RW. Urinary concentrating defect in hypothyroid rats: role of sodium, potassium, 2-chloride co-transporter, and aquaporins. *J Am Soc Nephrol* 14: 566-574, 2003.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844, 2000.

Campese VM, Tawadrous M, Bigazzi R, Bianchi S, Mann AS, Oparil S, Raij L. Salt intake and plasma atrial natriuretic peptide and nitric oxide in hypertension. *Hypertension* 28:335-340, 1996.

Campese VM. Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension* 23:531-550, 1994.

Cano, A, Baum M, Moe OW. Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C102-C108, 1999.

Capasso G, Rizzo M, Garavaglia ML, Trepiccione F, Zacchia M, Mugione A, Ferrari P, Paulmichl M, Lang F, Loffing J, Carrel M, Damiano S, Wagner C, Bianchi G and Meyer G. Upregulation of apical sodium-chloride cotransporter and basolateral chloride channels is responsible for the maintenance of salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F556-F567, 2008.

Capo LA, and Sillau AH. The effects of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastroecnius muscles. *J Physiol* 342:1-14, 1983.

Celsing F, Blomstrand E, Melichna J, Terrados N, Clausen N, Lins PE, and Jansson E. Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content and enzyme activity in human skeletal muscle. *Clin Physiol* 6:171-181, 1986.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Lefebvre, PJ. Anti-oxidants show anti-hypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin Sci* 81:739-742, 1991.

Chakrabarti N, and Ray AK. Rise of intrasynaptosomal Ca2+ level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. *Neuropsychopharmacology* 22:36-41, 2000.

Chandramohan G, Bai Y, Norris K, Rodríguez-Iturbe B, Vaziri ND. Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. *Am J Nephrol* 28(1):158-167, 2008. (Abstract)

Chen PY, Gladish RD, Sanders PW. Vascular smooth muscle nitric oxide synthase anomalies in Dahl/Rapp salt-sensitive rats. *Hypertension* 31:918-924, 1998.

Chen X, Touyz RM, Park JB, and Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamin C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38:606-611, 2001.

Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Yang J, Summer SN, Falk S, Li C, Wang W, Schrier RW. Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F672-F678, 2005.

Combes A, McTiernan C, Brooks SS, and Feldmman AM. UV light synergistically enhances the cardiotoxic effects of interleukin 1b through peroxynitrite formation. *J Cardiac Fail* 7:165-175, 2001

Conger JD, Falk SA, Gillum DM. The protective mechanism of thyroidectomy in a rat model of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 13(3): 217-25, 1989.

Cowley AW, Mattson DL, Lu S, and Roman RJ. The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 25:663-673, 1995.

Cowley AW. Long-term control of arterial pressure. *Physiol Rev* 72:211-300, 2001.

Cowley AW. Long-term control of arterial pressure. Physiol Rew 72:211-300, 1992.

Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci* USA 103:17985-17990, 2006.

Cruz A, Rodríguez-Gómez I, Pérez-Abúd R, Vargas MA, Wangensteen R, Quesada A, Osuna A, Moreno JM. Effects of clofibrate on salt loading-induced hypertension in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011 469481.

Cutler RE, Glatte H, and Dowling JT. Effect of hyperthyroidism on the renal concentrating mechanism in humans. *J Clin Endocrinol* 27:453-460, 1967.

Dahlöf B. Factors involved in the pathogenesis of hypertensive cardiovascular hypertrophy. *A review*. *Drugs* 35:6-26, 1988.

Dahly AJ, Hoagland KM, Flasch AK, Jha S, Ledbetter SR, Roman RJ. Antihypertensive effects of chronic anti-TGF-antibody therapy in Dahl S rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R757-R767, 2002.

De Santo NG, Capasso G, Kinne R, Moewes B, Carella C, Anastasio P, Giordano C. Tubular transport processes in proximal tubules of hypothyroid rats: lack of relationship between thyroidal dependent rise of isotonic fluid reabsorption and Na1-K1-ATPase activity. *Pflügers Arch* 394:294-301, 1982.

De Santo NG, **Capasso G**, **Paduano C**, **Carella C**, **and Giordano C**. Tubular transport processes in proximal tubules of hypothyroid rats. Micropuncture studies on isotonic fluid, amino acid and buffer reabsorption. *Pflügers Arch* 384:117-122, 1980.

Debinski W, Kuchel O, Buu NT, Nemer M, Tremblay J, Hamet P. Effect of prolonged high salt diet on atrial natriuretic factor in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 194(3):251-257, 1990.

DiScala VA, Kinney MJ. Effects of myxedema on the renal diluting and concentrating mechanism. *Am J Med* 50: 325-335, 1971

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95, 2002.

Dutta UK, Lane J, Roberts LJ 2nd, Majid DS. Superoxide formation and interaction with nitric oxide modulate systemic arterial pressure and renal function in Salt-Depleted Dogs. *Exp Biol Med* 231:269-276, 2006.

Dworkin LD, Benstein JA, Tolbert E, Feiner HD. Salt restriction inhibits renal growth and stabilizes injury in rats with established renal disease. *J Am Soc Nephrol* 7:437-442, 1996.

Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, and Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol* 171:227-234, 2001.

Edelman IS. Thyroidal regulation of renal energy metabolism and (Na+ + K+)-activated adenosine triphosphatase activity. *Med. Clin North Am* 59:605-614, 1975.

Emmanuel DS, Lindheimer MD, Katz IA. Mechanism of impaired water excretion in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 54:926-934, 1974.

Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem* 10:1723-1740, 2003.

Fernández V, Cornejo P, Tapia G, and Videla LA. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide sinthase in the rat. *Nitric Oxide* 1:463-468, 1997.

Fernández V, Videla LA, Tapia G, and Israel Y. In creases in tumor necrosis factor-alfa in response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic Res* 36:719-725, 2002.

Ford HC, Lim WC, Chisnall WN, Pearce JM. Renal function and electrolyte levels in hyperthyroidism: urinary protein excretion and the plasma concentrations of urea, creatinine, uric acid, hydrogen ion and electrolytes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 30:293-301, 1989.

Ford RV, Owens JC, Curd GW, Moyer SH, and Spurr CL. Kidney function in various thyroid states. *J Clin Endocrinol* 21:548-553, 1961.

Francois M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem Int* 45:955-961, 2004.

Fregly MJ, Brimhall RL, Galindo OJ. Effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the sodium balance of rats. *Endocrinology* 71:693-700, 1962.

Frohlich ED and Veragic J. Sodium directly impairs target organ function in hypertension. *Curr Opin Cardiol* 20(5):424-429, 2005.

Frohlich ED, Chien Y, Sesoko S, and Pergam BL. Relationship between dietary sodium intake, hemodynamics, and cardiac mass in SHR and WKY rats. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol* 264:R30-R34, 1993.

Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 101:856-861, 2000.

Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduce blood pressure. *Clin Sci* 92: 361-365, 1997.

Ganong WF. Thyroid hormones and renin secretion. Life Sci 30:577-584, 1982.
García del Río C, Moreno MR, Osuna A, Luna JD, García-Estañ J, Vargas F. Role of the reninangiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. *Eur J Endocrinol* 136:656– 660, 1997.

García-Estañ J, Atucha N, Quesada T, Vargas F. Involvement of the renin-angiotensin in the reduced pressure-natriuresis response of hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268:E897-E901, 1995.

Gerdes AM, Moore JA, and Hines JM. Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats. *Lab Invest* 57:708-713, 1987.

Gesek FA, Schoolwerth AC. Hormone responses of proximal Na+-H+ exchanger in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 261:F526-F536, 1991.

Ghosh S, May M, Kopp E. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of the immune response. *Annu Rev Immunol* 16:225-260, 1998.

Giebisch G, Wang W. Potassium transport: from clearance to channels and pumps. *Kidney Int* 49:1624-1631, 1996.

7

Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. Am J Physiol 274:F817-833, 1998.

Glorioso N, Filigheddu F, Troffa C, Soro A, Parpaglia PP, Tsikoudakis A, Myers, RH; Herrera VLM,; Ruiz-Opazo N. Interaction of alpha(1)-Na,K-ATPase and Na,K,2Cl-cotransporter genes in human essential hypertension. *Hypertension* 38:204-209, 2001.

Graettinger JS, Muenster JJ, Checchia CS, Grissom RL, and Campbell JA. A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hypothyroidism. *J Clin Invest* 37:501-510, 1957.

Graettinger JS, Muenster JJ, Silverstone LA, and Campbell JA. A correlation of clinical and hemodynamic studies of patients with hyperthyroidism and with congestive heart failure. *J Clin Invest* 40: 1316-1329, 1959.

Grassby PF, and McNeill JH. Hyperthyroidism induces supersensitivity to biogenic amines in rat vascular tissue via a pre- and postjunctional mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 244:1027-1035, 1988.

Graves TK, Olivier NB, Nachreiner RF, Kruger JM, Walshaw R, Stickle RL. Changes in renal function associated with treatment of hyperthyroidism in cats. *Am J Vet Res* 55:1745-1749, 1994.

Gregory PB, Broekelschen PH, Hill MD, Lipton AB, Knauer CM, Egger M, Miller R. Complications of diuresis in the alcoholic patient with ascites: a controlled trial. *Gastroenterology* 73:534-538, 1977.

Griendling KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5):494-501, 2000.

Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110(3):963-968, 1993.

Gu JW, Anand V, Shek EW, Moore MC, Brady AL, Kelly WC and Adair TH. Sodium induces hypertrophy of cultered myiocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 31(5):1083-7, 1998.

Gu JW, Tian N, Shparago M, Tan W, Bailey AP, Manning RD Jr. Renal NF-kB activation and TNFα upregulation correlate with salt-sensitive hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1817-R1824, 2006. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz H, Grassme H, and Lang F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F605-F615, 2000.

Gupta N, Dwarakanath V, Baum M. Maturation of the Na/H antiporter (NHE3) in the proximal tubule of the hypothyroid adrenalectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F521-F527, 2004.

Guyton AC. Arterial pressure and hypertension. Philadelphia: Saunders 564, 1980.

Haddy FJ, Pamnani MB. Role of dietary salt in hypertension. *J Am Coll Nutr* 14(5):428-438, 1995. Harman D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3):298-300, 1956.

Harman D. The ageing process. Proc Natl Acad Sci USA 78(11):7124-7128, 1981.

Hennington BS, Zhang H, Miller MT, JP Granger, and Reckelhoff JF. Angiotensin II stimulates synthesis of endotelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 31:283-288, 1998.

Herrera M, Garvin JL. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. *Hypertension* 45:1062-1067, 2005.

Hirai T, Okumura K, Nishimoto Y, Shumiya T, Murakami R, Takahashi R, Asai T, Murakami H, Numaguchi Y, Matsui H, Murohara T. Upregulation of renal eNOS by high-sodium diet facilitates hypertension in doxorubicin-treated rat through enhanced oxidative stress. *Toxicology* 225:81-89, 2006.

Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Kimura K, Kikuchi K, Nagano T, Hirobe M, and Omata M. Direct measurement of endothelium-derived nitric oxide release by stimulation of endothelin receptors in rat kidney and its alterations in salt induced hypertension. *Circulation* 91:1229-1235, 1995.

Hodge G, Ye VZ, Duggan KA. Salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthase inhibition is associated with loss of regulation of angiotensin II in the rat. *Exp Physiol* 87:1-8, 2002.

Holmes EW, DiScala V. Studies on the exaggerated natriuretic response to a saline infusion in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 49:1224-1236, 1970.

Houston MC. Sodium and hypertension: a review. Arch Intern Med 146(1):179-185, 1986.

Huber S, Asan E, Jons T, Kerscher C, Puschel B, Drenckhahn D. Expression of rat kidney anion exchanger 1 in type A intercalated cells in metabolic acidosis and alkalosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F841-F849, 1999.

Ichikawa I, Kiyama S, and Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9, 1994.

Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1255-1261, 1995.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87:179-183, 2000

Ismail-Beigi F, Edelman IS. The mechanism of the calorigenic action of thyroid hormone. Stimulation of Na plus + K plus-activated adenosinetriphosphatase activity *J Gen Physiol* 57, 710-722, 1971.

Iwai J, Dhal LK, Knudsen KD. Genetic influence on the renin-amgiotensin system: low renin activities in hypertension-prone rats. *Circ Res* 32(6):678-684, 1973.

Iwata T, and Honda H. Acute hyperthyroidism alters adrenoceptor- and muscarinic receptor-mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries. *Eur J Pharmacol* 493:191-199, 2004.

Jeyabalan A, Conrad KP. Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci* 12:2425-2437, 2007.

Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, Rivera F, Rodés J. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 5:245-250, 1985.

Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF, and Rodríguez-Iturbe B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *New England J Med* 21;346(12):913-923, 2002.

Jones SA, Hancock J, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phax, p67phax, and p22 phax. *J Am Soc Nephrol* 5(7):1483-1491, 1995.

Jones SA, O'Donell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, and Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 271(4 Pt 2):H1626-634, 1996.

Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, and Jones OT. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 28;355(2):178-182, 1994.

Kapitola J, and Vilimovska D. Inhibition of the early circulatory effects of triiodothyronine in rats by propranolol. *Physiol Bohemoslov* 30:347-351, 1981.

Katz AE, Emmanouel DS, Lindheimer MD. Thyroid hormone and the kidney. *Nephron* 15:223-249, 1975.

Katz AI and Lindheimer MD. Actions of hormones on the kidney. Annu Rev Physiol 39: 97-134, 1977.

Katz AI and Lindheimer MD. Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 52:796-804, 1973.

Katz AI. Renal Na-K-ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J Physiol* 242:F207-F219, 1982.

Kim GH, Ecelbarger CA, Mitchell C et al. Vasopressin increases Na–K–2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 276: F96-F103, 1999.

Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchel C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci Usa* 95:14552-14557, 1998.

Kim JS, Choi KC, Jeong MH, Kim SW, OhY, Lee J. Increased expression of sodium transporters in rats chronically inhibited of nitric oxide synthesis. *J Korean Med Sci* 21:1-4, 2006.

Kim SW, Wang W, Kwon TH, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F957-F968, 2005.

Kinsella J and Sacktor B. Thyroid hormones increase Na1-H1 exchange activity in renal brush border membranes. *Proc Natl Acad Sci* USA 82:3606-3610, 1985.

Kinsella JL, Cujdik T, Sacktor B. Kinetic studies on the stimulation of Na/H exchange activity in renal brush border membranes isolated from thyroid hormone-treated rats. *J Membr Biol* 91:183-191, 1986.

Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Salt intake, oxidative stress, and renal expressionof NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol* 14:2775-2782, 2003.

Klag MJ, Wheltn PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, and Stamler J. Blood pressure and end stage renal disease in men. *New England J Med* 4;334(1):13-18, 1996.

Klein I, and Hong C. Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted heart. *J Clin Invest* 77:1694-1698, 1986.

Klein I, and Ojamaa K. Thyroid hormone and blood pressure regulation. In: Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and menagement (2nd ed), edited by Laragh JH and Brenner BN. New York: Raven Press Ltd: 2247-2262, 1995

Klein I, and Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344: 501-509, 2001.

Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. Am J Med 88: 631-637, 1990.

Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, and Saruta T. Mechanism of hyperthyroidisminduced renal hypertrophy. *J Endocrinol* 159:9-14, 1998.

Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, and Saruta T. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am J Physiol* 273: H593-H599, 1997.

Kopkan L, Cervenka L. Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt sensitivity and hypertension. *Physiol Res* 58 (Suppl 2):S55-S67, 2009.

Kopkan L, Majid DS. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension* 46:1026-1031, 2005.

Kuller LH. Salt and blood pressure: population and individual perspectives. *Am J Hypertension* 10 (pt2):29S-36S, 1997.

Kumar DS, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 19:59-66, 1993.

Kumar V, Prasad R. Molecular basis of renal handling of calcium in response to thyroid hormone status of rat. *Biochim Biophys Acta* 1586:331-343, 2002.

Kwon TH, Nielsen J, Kim YH, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F152-F165, 2003.

Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensive and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16:291-303, 1998.

Larsen PR, Davis TF, Hay ID. The thyroid gland. In: Williams Textbook of Endocrinology (6th ed.), edited by Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HK, and Larsen PR. *London: Saunders* 389-515, 1998.

Law MR, Frost CD, Wald NJ. Dietary salt and blood pressure. J Hypertens Suppl 9:S37-S49, 1991.

Lea JP, Nicholas SB. Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease. *J Natl Med Assoc* 94:7S-15S, 2002.

Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol* 279:H7-H14, 2000.

Letizia C, Cerci S, De Toma G, D'Ambrosio C, De Ciocchis A, Coassin S, Scavo D. High plasma endothelin-1 levels in hypertensive patients with low-renin essential hypertension. *J Hum Hypertens* 11:447-451, 1997.

Li J, Wang DH. Function and regulation of epithelial sodium transporters in the kidney of a salt-sensitive hypertensive rat model. *J Hypertens* 25:1065-1072, 2007.

Liu F, Mu J, Yuan Z, Lian Q, Zheng S, Wu G, Liu E. Involvement of the lymphatic system in saltsensitive hypertension in humans. *Med Sci Monit* 17(10):CR542-6, 2011.

Liu Y, Rusch NJ, Lombard JH. Loss of endothelium and receptor mediated dilation in pial arterioles of rats fed a short-term high salt diet. *Hypertension* 33:686-688, 1999.

Lo CS and Edelman IS. Effect of triiodothyronine on the synthesis and degradation of renal cortical (Na++k+)-adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 251:7834-7840, 1976.

Luke RG. Essential hypertension: a renal disease? A review an update of the evidence. *Hypertension* 21(3):380-90, 1993.

MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. Griffiths MJ, Messent M, *Br J Pharmacol* 110(3):963-968, 1993.

MacParland RP, Rapp JP. (Na+-K+) activated adenosine triphosphatase and hypertension in Dahl saltsensitive and salt-resistant rats. *Clin Exp Hypertens* 4:379-385, 1982.

Makino A, Skelton MM, Zou AP, Roman RJ, and Cowley AW Jr. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension* 39:667-672, 2002.

Manning RD Jr, Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiol Scand* 179:243-250, 2003.

Manning RD Jr, Tian N, and Men S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. AM J Nephrol 25(4):311-317, 2005.

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, and Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry* 268:17478-17488, 1993.

Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC [alpha], [beta], and [gamma] subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-R23, 1999.

Masilamani S, Wang X, Kim GH, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S, Nakamura K, Stokes JB, Knepper MA. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol* 283:F648-F657, 2002.

Masseroli M, O'Valle F, Andújar M, Ramírez C, Gómez-Morales M, de Dios Luna J, Aguilar M, Aguilar D, Rodríguez-Puyol M, Del Moral RG. Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest* 78:511-522, 1998.

Mattson DL, and Higgins DJ. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* 27:688-692, 1996.

Mattson DL, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW.Jr. Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension* 31(1):15-20, 1998.

May A, Puoti A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells. *J Am Soc Nephrol* 8:1813-1822, 1997.

Melzi ML, Syren ML, Assael BM, Sereni F, Aperia A. Increased renal tubular Na-K-ATPase activity in Milan hypertensive rats in the prehypertensive period. *Pediatr Nephrol* 5:700-703, 1991.

Meneely GR, Ball CO. Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and the protective effect of potassium chloride. *Am J Med* 25:713-725, 1958.

Meneely GR, Tucker RG, Darby WJ, Auerbach SH. Chronic sodium chloride toxicity: hypertension, renal failure and vascular lesions. *Ann Intern Med* 39:991-998, 1953.

Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD Jr. Oxidative stress in Dahl saltsensitive hypertension. *Hypertension* 41:1346-1352, 2003.

Meng S, Roberts LJ, Cason GW, Curry TS, Manning RD Jr. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and – resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R732-R738, 2002.

Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, and Makarov SS. NF-B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci* USA 95:13859-13864, 1998.

Michael UF, Barenberg RL, Chavez R, Vaamonde CA and Papper S. Renal handling of sodium and water in hypothyroid rat. Clearance and micropuncture studies. *J Clin Invest* 51:1405-1412, 1972.

Michael UF, Kelly J and Vaamonde CA. Impaired renal bicarbonate reabsorption in the hypothyroid rat. *Am J Physiol* 236 (Renal Fluid Electrolyte Physiol):F536-F540, 1979.

Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U and Russo A. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimetics. *Biochemistry* 29:2802-2807, 1990.

Mogulkoc R, Baltaci AK. Influences of isotonic, hypertonic and hypovolemic treatments on vasopressin response and fluid-electrolyte balance in l-thyroxine-induced hyperthyroid rat. *Life Sci* 79:817-821, 2006.

Mohebbi N, Kovacikova J, Nowik M, Wagner CA. Thyroid hormone deficiency alters expression of acid-base transporters in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F416-F427, 2007.

Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA.Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac Rev* 43:109-142, 1991.

Moore PK, Bland-Ward PA.7-nitroindazole: an inhibitor of nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268:393-398, 1996.

Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangensteen R, Alvarez-Guerra M, Luna JD, García-Estañ J, Vargas F. Tempol Improves Renal Hemodynamics and Pressure-Natriuresis in Hyperthyroid Rats. *Am J Physiol* 294:R867-R873, 2008.

Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Osuna A, Bueno P and Vargas F. Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 289:E776-E783, 2005.

Morgan HE, and Baker KM. Cardiac hypertrophy: mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83:13-25, 1991.

Morgan TO, Aubert JF, Wang Q. Sodium, angiotensin II, blood pressure, and cardiac hypertrophy. *Kidney Int Suppl* 67:S213-S215, 1998.

Morimoto A, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, and Kimura G. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *Lancet* 13;350(9093):1734-1737, 1997.

Nakamichi K, Saiki M, Sawada M, Takayama-Ito M, Yamamuro Y, Morimoto K, and Jurane I. Rabies virus-induced activation of mitogen activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia. *J Virol* 79:11801-11812, 2005.

Nakamura S, Ishiyama M, Kosaka J, Mutoh J, Umemura N, Harase C. Urinary N-acetyl-beta-d-glucosaminidase (NAG) activity in patients with Graves' disease, subacute thyroiditis, and silent thyroiditis: a longitudinal study. *Endocrinol Jpn* 38:303-308, 1991.

Newaz MA, Blanton A, Fidelis P, Oyekan AO. NAD(P)H oxidase/nitric oxide interaction in peroxisome proliferators activated receptor α (PPAR α)-mediated cardiovascular effects. *Mutat Res* 579:163-171, 2005.

Newaz MA, Ranganna K, Oyekan AO. Relationship between PPARalpha activation and NO on proximal tubular Na+ transport in the rat. *BMC Pharmacol* 6;4:1, 2004.

Ni Z, Morcos S, and Vaziri ND. Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in irondeficiency anemia. *Kidney International* 52:195-201, 1997.

Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens* 14:155-163, 2001.

Ohara M, Martin PY, Xu DL, St John J, Pattison TA, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of aquaporin 2 water channel expression in pregnant rats. *J Clin Invest* 101:1076-1083, 1998.

Osborn JW, Hornfeldt BJ. Arterial baroreceptor denervation impairs long-tern regulation of arterial pressure during dietary salt loading. *Am J Physiol* 275(5 Pt 2):H1558-566, 1998.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endotheliumdependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323:22-27, 1990.

Pasquié JL, Jover B, du Cailar G, Mimran A. Sodium but not chloride ion modulates left ventricular hypertrophy in two-kidney, one clip hypertension. *J Hypertens* 12:1013-1018, 1994.

Peterson ME, Gamble DA. Effect of nonthyroidal illness on serum thyroxine concentrations in cats: 494 cases. *J Am Vet Med Assoc* 197:1203-1208, 1990.

Peti-Peterdi J. High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. *Kidney Int* 78:1214-1217, 2010.

Phippard AF, Horvath JS, Glynn EM, Garner MG, Fletcher PJ, Duggin GG, Tiller DJ. Circulatory adaptation to pregnancy—serial studies of haemodynamics, blood volume, renin and aldosterone in the baboon (Papio hamadryas). *J Hypertens* 4:773-779, 1986.

Prabha PS, Das UN, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 41:27-33, 1990.

Preisig PA, Ives HE, Cragoe EJ Jr, Alpern RJ and Rector FC Jr. Role of the Na/H antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest* 80:970-978, 1987.

Preisig, PA, and Rector FC Jr. Role of Na/H antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24):F461-F465, 1988.

Price RG. Measurement of N-acetyl-beta-glucosaminidase and its isoenzymes in urine methods and clinical applications. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30:693-705, 1992.

Quattropani C, Vogt B, Odermatt A, Dick B, Frey BM, Frey FJ. Reduced activity of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase in patients with cholestasis. *J Clin Invest* 108:1299-1305, 2001.

Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincón J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, and Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F38-F47, 2001.

Reeves WB, Andreoli TE. Tubular sodium transport. In: Schrier RW, editor. Diseases of the kidney and urinary tract. *Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins* 135-175, 2001.

Ribeiro RC, Apriletti JW, West BW, Wagner RL, Fletterick RJ, Schaufele F and Baxter JD. The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann NY Acad Sci* 758:366-389, 1995.

Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3494-3498, 1980.

Roberts LJ, and Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1345: 121-135, 1997.

Rodríguez-Gómez I, Sainz J, Wangensteen R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, Vargas F. Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension* 42:220-225, 2003.

Rodriguez-Gómez I, Wangensteen R, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A and Vargas F. Effects of chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase in hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 288: E1252-1257, 2005.

Rodríguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, and Johnson RJ. Interstitial inflammation, sodium retention, and the pathogenesis of nephrotic edema: a unifying hypothesis. *Kidney Int* 62:1379-1384, 2002 (a).

Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Gordon K, Rincón J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egido J, and Johnson RJ. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int* 59:2222-2232, 2001.

Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, and Pons HA. The role of immune cells infiltrating the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 20(3):S9-14, 2002 (b).

Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chavez M, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, and Pons HA. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F191-F201, 2002 (c).

Rodríguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, and Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41:341-346, 2003.

Romero JC, Lahera V, Salom MG, and Biondi ML. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2:1371-1387, 1992.

Rugale C, Delbosc S, Cristol JP, Mimran A, Jover B. Sodium restriction prevents cardiac hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1744-H1750, 2003.

Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 16:1267-1271, 1998.

Sabolic I, Brown D, Gluck SL, Alper SL. Regulation of AE1 anion exchanger and H-ATPase in rat cortex by acute metabolic acidosis and alkalosis. *Kidney Int* 51:125-137, 1997.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, and Lin PH. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N England J Med* 4;344(1):3-10, 2001.

Sacktor B and Cheng L. Sodium gradient-dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles. Effect of an intravesicular greater than extravesicular proton gradient. *J Biol Chem* 256, 8080-8084, 1981.

Salon MG, Lahera V, Romero JC. Role of prostaglandins and endothelium-derived relaxing factor on the renal response to acetylcholine. *Am J Physiol* 260:145-149, 1991.

Sanford CF, Griffon EE, and Wildenthal K. Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyrroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 43: 688-694, 1978.

Sankaralingam S, Desai KM, Wilson TW. Clofibrate acutely reverses saline-induced endothelial dysfunction: role of calcium-activated potassium channels. *Am J Hypertens* 19(11):1167-1173, 2006.

Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol* 288: F1144-F1152, 2005.

Schmitt R, Klussmann E, Kahl T, Ellison DH, Bachmann S. Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F1097-F1104, 2003.

Schrier RW, Briner VA. Peripheral arterial vasodilation hypothesis of sodium and water retention in pregnancy: implications for pathogenesis of preeclampsia-eclampsia. *Obstet Gynecol* 77:632-639, 1991.

Scivoletto R, Fortes ZB, and García-Leme J. Thyroid hormones and vascular reactivity: role of the endothelial cell. *Eur J Pharmacol* 129:271-278, 1986.

Segarra AB, Wangensteen R, Ramirez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, Vives F, Duran R, Alba F, de Gasparo M, Prieto I. Atrial angiotensinase activity in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 48:117-120, 2006.

Sekine N, Yamamoto M, Michikawa M, Enomoto T, Hayashi M, Ozawa E, Kobayashi T. Rhabdomyolysis and acute renal failure in a patient with hypothyroidism. *Intern. Med* 32: 269-271, 1993.

Sewerynek J, Wiktorska J, Novak D, and Lewinski A. Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease. *Endocr Regul* 34:83-89, 2000.

Shultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest* 91(2):642-50, 1993

Singh G, Thompson EB, and Gulati A. Altered endothelin 1 concentration in the brain and peripheral regions during thyroid dysfunction. *Pharmacology* 49:184-191, 1994.

Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol* 15;543(Pt 1):255-60, 2002.

Sofola OA, Knill A, Myers D, Hainsworth R, Drinkhill M. High-salt diet and responses of the pressurized mesenteric artery of the dog to noradrenaline and acetylcholine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:696-699, 2004.

Song WZ, Chen AF, Wang DH. Increased salt sensitivity induced by sensory denervation: role of superoxide. *Acta Pharmacol Sin* 25:1626-1632, 2004.

Stanton BA, Kaissling B. Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na delivery. II. Na+ and K+ transport. *Am J Physiol* 255:F1269-F1275, 1998.

Stephan F, Jahn H, and Reville P. Etude comparative de la concentration, de la composition et du debit des urines du rat normal et du rat hypothyroïdien soumis a des epreuves aiguës de surcharge isotonique. *J Physiol* 56:233-258, 1964.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 25: 1083-1089, 1995.

Svendson UG. Evidence for an initial, thymus independent and achronic, thymus dependent phase of DOCA and salt hypertension in mice. *Path Microbiol Scand Acta* 84:523-528, 1976.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78:69-72, 1964.

Swei A, Lacy F, Delano FA, Parks DA, Schmid-Schonbein GW. A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation* 6:179-187, 1999.

Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30:1628-1633, 1997.

Tak PP and Firestein GS. NF-B: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 107:7-11, 2001.

Tanwani LK, Lohano V, Broadstone VL, and Mokshagundam SP. Minimal change nephropathy and graves' disease: report of a case and review of the literature. *Endocr Pract* 8:40-43, 2002.

Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA. Protein oxidation in the thyroid hormona-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 106:209-214, 1999.

Taylor RE, Fregly MJ. Renal response of propyl¬thiouracil-treated rats to injected mineralo-corticoids. *Endocrinology* 75:33-41, 1964.

Threatte RM, Fregly MJ, Field FP. Interrelationship among blood pressure, renal function, thyroid activity and renal thyroid depressing factor in renal hypertensive rats. *Pharmacology* 24:201-210, 1982.

Tian N, Moore RS, Phillips WE, Lin L, Braddy S, Pryor JS, Stockstill RL, Hughson MD, Manning RD Jr. NADPH oxidase contributes to renal damage and dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6):R1858-65, 2008.

Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin. *Kidney Int*; 58:2075-2083, 2000.

Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int* 46:230-236, 1994.

Trolliet MR, Rudd MA, Loscalzo J. Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res* 24:116-123, 2001.

Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, and Lightman SL. Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 136:4182-4187, 1995.

Ulirich KJ, Rumrich G, Baumann K. Renal phosphate transport: inhomogeneity of local proximal transport rates and sodium dependence. *Pflugers Arch* 357: 149-163, 1975.

Vaamonde CA, Michael UF, Oster JR, Sebastianelli MJ, Vaamonde LS, Klingler EL, Jr, Papper S: Impaired renal concentrating ability in hypothyroid man. Nephron 17:382-395, 1976.

Van Hoek I, Damineta S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: A review. *Gen Comp Endocrinol* 160:205-215, 2009.

Van Hoek I, Meyer E, Duchateau L, Peremans K, Smets P, Daminet S. Retinol-binding protein in serum and urine of hyperthyroid cats before and after treatment with radioiodine. *J Vet Intern Med* 23:1031-1037, 2009.

Vargas F, Atucha N, Sabio JM, Quesada T and García-Estañ J. Pressure-diuresis-natriuresis response in hyper- and hypothyroid rats. *Clin Sci* 87:323-328, 1994.

Vargas F, Baz MJ, Luna JD, Andrade J, Jodar E, Haro JM. Urinary excretion of digoxin-like immunoreactive factor and arginine vasopressin in hyper- and hypothyroid rats. *Clin Sci* 81:471-476, 1991.

Vargas F, García del Rio C, Luna JD, Haro JM, Osorio C. Studies on thyroid activity in deoxycorticoste prone-salt and Goldblatt two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Acta Endocrinol* 118:22-30, 1988.

Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Álvarez-Guerra M, Osuna A, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 154:197-212, 2006.

Vargas F, Rodriguez I, Vargas P, Jiménez E, Montiel M. The Renin-Angiotensin System in Thyroid Disorders and its Role in Cardiovascular and Renal Manifestations. J Endocrinol. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print] PMID:22043064[PubMed - as supplied by publisher].

Vaziri ND, Zhenmin N, and Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31:1248-1254, 1998.

Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, and De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 155:151-157, 1997.

Venkatesha RT, Ahamed J, Nuesch C, Zaidi AK, Ali H. Platelet activating factor-induced chemokine gene expression requires NF-kB and Ca²/calcineurin signaling pathways. *J Biol Chem* 279:44606-44612, 2004.

Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na/H exchangers. *Physiol Rev* 77:51-74, 1997.

Walker P, Dubois JD, Dussault JH. Free thyroid hormone concentrations during postnatal development in the rat. *Pediatr Res* 14:247-249, 1980.

Wang C, Chao C, Chen LM, Chao L, Chao J. High salt diet upregulates kininogen and down-regulates tissue kallikrein expression in Dahl-SS and SHR rats. *Am J Physiol* 271(4 Pt 2):F824-30, 1996.

Wang W, Li C, Summer SN, Falk S, Schrier RW. Polyuria of thyrotoxicosis: downregulation of aquaporin water channels and increased solute excretion. *Kidney Int* 72:1088-1094, 2007.

Wangensteen R, Rodríguez-Gómez, Moreno JM, Álvarez-Guerra M, Osuna A, Vargas F. Effects of chronic treatment with 7-nitroindazole in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:R1376-R1382, 2006.

Wangensteen R, Rodríguez-Gomez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Vargas F. Role of neuronal nitric oxide syntase in response to hypertonic saline loading in rats. *Acta Physiol Scand*. 182:389-395, 2004.

Weetman AP, Tomlinson K, Amos N, Lazarus JH, Hall R, and McGregor AM. Proteinuria in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol* (Copenh) 109:341-347, 1985.

Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. Hypertension 17:481-490, 1996.

Weinberger MH. Sodium sensitivity of blood pressure. Curr Opin Nephrol Hypertens 2(6):935-9, 1993.

Weir MR, Dworkin LD. Antihypertensive drugs, dietary salt, and renal protection: how low should you go and with which therapy? *Am J Kidney Dis* 32:1-22, 1998.

Wong F, Liu P, Allidina Y, Blendis L. Pattern of sodium handling and its consequences in patients with preascitic cirrhosis. *Gastroenterology* 108:1820-1827, 1995.

Xiao Z, Zhang Z, and Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium-activated. *Journal of Cell Physiology* 171:205-211, 1997.

Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(6):F1110-1115, 2000.

Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt enhances glomerular endothelial nitric oxide synthase through TGF-1. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2):F18-F24, 1998.

Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt increases endothelial nitric oxide synthase and TGF-1 in rat aortic endothelium. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2):H1293–H1298, 1999.

Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt modulates renal production of transforming growth factor in rats. *Am J Physiol* 274(4 Pt 2):F635–F641, 1998.

Yonemura K, Cheng L, Sacktor B, Kinsella JL. Stimulation by thyroid hormone of Na+-H+ exchange activity in cultured opossum kidney cells. *Am J Physiol* 258:F333-F338, 1990.

Yu Z, Serra A, Sauter D, Loffing J, Ackermann D, Frey FJ, Frey BM and Vogt B. Sodium retention in rats with liver cirrhosis is associated with increased renal abundance of NaCl cotransporter (NCC). *Nephrol Dial Transplant* 20:1833-1841, 2005.

Yuan BX, Leenen FH. Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 261(5 Pt 2):H1397-401, 1991.

Zwaveling J, Pfaffendorf M, and van Zwieten PA. The influence of hyperthyroidism on vasoconstrictor and vasodilator responses in isolated coronary and renal resistance arteries. *Pharmacology* 55:117-125, 1997.