

JIMENO, MIGUEL ALFRE
Diferencias en la ex

2014

73199

73199



Maestría en Anatomía y Fisiología Veterinaria

Facultad de Agronomía y Veterinaria

UNRC

TEMA

Diferencias en la excreción de sodio y en el estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico entre ratas hembras y machos.

2014

MAESTRANDO: MV Miguel Alfredo Jimeno

DIRECTORA: Lic. Cs Biológicas/MSc. /Dra. Ana María Niebylski

CO-DIRECTORA: Lic. Microbiología/Dra. Nora Bensi

00187

ee 127

73199

MFN:
Clasif:
T.861

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	2
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
Estrés, breve historia	7
Respuesta al estrés.....	9
El eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA).....	11
El eje Simpato-adreno-medular (SAM).....	14
Estrés e hipertensión.....	17
Estrés oxidativo y estrés.....	22
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Experimento 1: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en ratas machos y hembras.....	31
Experimento 2: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en hembras castradas con y sin suplemento de Valerato de estradiol	33
RESULTADOS	46
Experimento 1: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en ratas machos y hembras.....	46
Experimento 2: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en hembras castradas con y sin suplemento de Valerato de estradiol	58
Comparación Experimento 1 y 2	67
DISCUSIÓN.....	76
CONCLUSIÓN.....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	101

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis hijos **Miguel Andrés** y **Sofía Macarena**, motores de mi vida, por quienes no ha habido un solo día en que mi esfuerzo y trabajo, no fuera hecho pensando en ellos y para ellos.

También a la memoria de mis padres **Rafael** y **Marta Tregoning**, quienes estimularon mi entusiasmo al permanente deseo de aprender, de respetar y de compartir en la vida.

Quiero dedicar también este proyecto hecho realidad, a mi compañera de vida **Gabriela Reale**, y agradecerle su tolerancia, comprensión y apoyo incondicional en este trabajo; sin su codo a codo, difícilmente lo hubiese logrado.

Un especial reconocimiento a mi directora de Tesis **Dra. Ana María Niebylski** y a mi codirectora **Dra. Nora Bensi**, por haberme guiado en este trabajo con infinita paciencia, inagotable vocación docente y categórica actitud científica. Ha sido una satisfacción conocerlas y un orgullo trabajar con tan brillantes investigadoras.

A la **Dra. Silvana Binotti**, por su permanente apoyo, enseñanza en el laboratorio y contribución para esta tesis.

A **Marcos Farías**, **Soledad Stagnoli**, **Leda Polop** y **Alberto Barzola**, por su absoluta colaboración en el desarrollo de esta inigualable experiencia.

Agradezco la invaluable colaboración de **Miguel Bueno** y **Leonardo Fantuzzi** quienes han aportado su granito de arena a esta realización a través de su silencioso pero excelente trabajo en el bioterio de la UNRC.

A **Miguel Andrés** por su incondicional apoyo técnico-administrativo.

Quiero agradecer a la **Dra. Alicia Rolando**, al **Dr. Rubén D'Espósito** y al **Dr. Héctor Gauna**, miembros de mi comisión de tesis, por el tiempo dedicado en la corrección y ajustes del presente trabajo de investigación.

Deseo también agradecer a mis profesores de la maestría, ya que cada uno supo entregar una parte de su conocimiento, para que pudiera aprender un poco más.

Finalmente, quiero agradecer especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Fisico-Químicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Río Cuarto el haberme permitido desarrollar mi carrera de Magister.

ABREVIATURAS

A = Adrenalina
ACTH = Hormona Adenocorticotrófica
Ang II = Angiotensina II
AT₁R = Receptor de Angiotensina I
AT₂R = Receptor de Angiotensina II
AVP = Arginina Vasopresina
CAT = Enzima Catalasa
CMLV = Células del Músculo Liso Adyacente
CRFR1 = Receptor de CRF tipo 1
CRFR2 = Receptor de CRF tipo 2
CRF ó CRH = Hormona Liberadora de Corticotrofina
DCE = Depuración de Creatinina Endógena
E₂ = Prostaglandina E₂
ENaC = Canales Epiteliales de Sodio
eNOS = Enzima Óxido Nítrico Sintetasa endotelial
EO = Estrés Oxidativo
ER- α = Receptor de Estrógenos alfa
ER- β = Receptor de Estrógenos beta
GMPc = Guanosín Monofosfato cíclico
GR = Receptor de glucocorticoides
GSPx = Enzima Glutation Peroxidasa
H₂O₂ = Peróxido de Hidrógeno
HHA= Hipotálamo Hipofisiario Adrenal
HOCl = Ácido Hipocloroso
HTA = Hipertensión Arterial
IAS = Índice Adreno Somático
IMO = Inmovilización en tabla
iNOS = Enzima Óxido Nítrico Sintetasa inducida
LC = Locus Coeruleus
LEC = Líquido Extracelular
MAPK = Enzima Proteína quinasa activada por Mitógenos
MDA = Malonildialdehído

MnSOD = Manganese Superóxido Dismutasa

MR = Receptor de mineralocorticoides

NA = Noradrenalina

NAD(P)H oxidasa = Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa

nNOS = Enzima Óxido Nítrico Sintetasa neuronal

NO = Óxido Nítrico

NO_x = Nitritos totales

O₂⁻ = Radical Anión Superóxido

O₃ = Ozono

OH⁻ = Radical Hidroxilo

OVX = Ratas Ovariectomizadas

PVN = Núcleo ParaVentricular

RL = Radicales Libres

RNS = Especies Reactivas del Nitrógeno

ROS = Especies Reactivas del Oxígeno

SAM = Simpático Adreno Medular

SNA = Sistema Nervioso Autónomo

SNC = Sistema Nervioso Central

SNS = Sistema Nervioso Simpático

SOD = Enzima Superóxido Dismutasa

SRAA = Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TFG = Tasa de Filtrado Glomerular

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de vida de las sociedades actuales colocan a los individuos en un escenario en el cual, día a día, todos los sistemas orgánicos son sometidos a distintos elementos estresantes y provocan en consecuencia, cambios adaptativos. Este proceso evolutivo no es gratuito. Alguno o algunos de los sistemas biológicos podrían acusar el golpe dado por este esfuerzo de adaptación. Cada día que pasa, el concepto de estrés gana más y más espacio; ya no es una palabra restringida al vocabulario médico o científico, por el contrario, se hace cada vez más popular y hoy es factible encontrarla en una mesa de café, en el trabajo y hasta en una reunión familiar. Es sabido que de una u otra manera estamos bajo estrés, aún así, es un término difícil de definir y un concepto que admite infinitos abordajes, dado los múltiples factores que lo componen.

ESTRÉS - BREVE HISTORIA

Para intentar una comprensión del estrés debemos introducir el concepto que el fisiólogo francés Claude Bernard (1813-1878), considerado fundador de la medicina experimental, desarrolló acerca del "medio interno", el que es mantenido en forma muy estable mediante la activación de diferentes mecanismos regulatorios y de control. Según el concepto fundamental de Claude Bernard el medio interno es el ambiente líquido en que viven las células del organismo. Los seres más simples tienen sus células en contacto con el medio exterior o cósmico, pero a medida que se vuelven más complejos, sus células viven en el medio interno, de composición muy constante y que asegura condiciones físicas y químicas estables, permitiendo así la vida libre e

independiente. Fue Walter Cannon (1871-1945) quién definió a la homeostasis y ayudó a ampliar nuestra comprensión sobre el estrés. En el año 1915 acuñó el concepto de respuesta al estrés planteándolo como una dicotomía inmediata: luchar o huir (“Fight or Flight”). En su libro “La Sabiduría del Cuerpo” publicado en 1932, plasmó sus teorías para describir la respuesta de un animal a amenazas corporales como el dolor, el hambre, el miedo y la excitación.

Se han postulado muchas definiciones en la literatura desde que Hans Selye (Selye, 1936) acuñara el término de estrés. Aunque no se han alcanzado consensos sobre su definición precisa en biología, una definición sencilla y útil se refiere al término como *cualquier estímulo, real o percibido, que puede amenazar la homeostasis* (Charmandari y col, 2005; Rivest y Rivier, 1991; Rivier y Rivest, 1995; Smith y col, 2003). Otros autores lo definen como *la incapacidad de un animal para hacer frente a su medio ambiente* (Dobson y Smith, 2000; Dobson y col, 2001), situación evidenciada por la falla en alcanzar el máximo potencial genético.

Aunque no existe acuerdo respecto a la definición de estrés, la propuesta por Vigas en 1984 es muy apropiada. Esta expresa que el estrés es un “estado de emergencia del organismo provocado por estímulos externos o internos, real o potencialmente nocivos que desembocan en una respuesta específica, que se ha desarrollado en el curso de la filogenia y que tiene, primariamente, un valor adaptativo”. (Nadal y Armario, 2010). Los estímulos que afectan la homeostasis se definen como factores o agentes estresantes, mientras que la respuesta del animal a este estímulo se conoce como respuesta al estrés (Möstl y Palme, 2002).

Por otra parte, también se han utilizado otros términos en relación a las situaciones de estrés. Uno de ellos es el eustrés que define aquellas situaciones que pueden ser motivadoras y por lo tanto ser positivas para el individuo y el distrés que se refiere a las situaciones que producen efectos negativos, pudiendo generar enfermedades (Slipak, 2003). El término alostasis se define como un proceso activo que permite mantener la homeostasis, protegiendo al organismo ante cualquier condición psicológica o fisiológica que lo perturbe. Por medio de la alostasis, se puede cambiar el *set point* o *término de referencia* de ciertos parámetros fisiológicos por corto tiempo para adecuarlos a nuevas condiciones de exigencia (presión arterial, glucemia, lipemia, etc.). Por último el término homeorrexis indica el conjunto de mecanismos que aseguran la prioridad de un determinado proceso o estado metabólico apartándose de la homeostasis, sin comprometer las funciones vitales (crecimiento, preñez, lactancia) (McEwen, 2000).

RESPUESTA AL ESTRÉS

La respuesta al estrés es coordinada por los sistemas de estrés que tienen componentes localizados tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en la periferia y engloba una serie de cambios fisiológicos y conductuales que permiten afrontar situaciones peligrosas o potencialmente peligrosas y es, por lo tanto, considerada como un proceso adaptativo que aumenta la probabilidad de supervivencia del individuo (Charmandari y col, 2005).

Existe un amplio acuerdo en que los estímulos estresantes pueden clasificarse en estímulos físicos o sistémicos (reactivos) o estímulos psicológicos o emocionales (anticipatorios), aunque muchos estímulos pueden

tener un perfil mixto (Pacak y Palkovits, 2001, Herman y col, 2003). Los estímulos sistémicos son aquellos que provocan perturbaciones directas en la homeostasis, como las infecciones, las alteraciones metabólicas u osmóticas, la hipoxia, la hemorragia, estímulos físicos, químicos y la mayoría de los farmacológicos. Los estímulos emocionales son de tipo social (sumisión, subordinación, aislamiento, privación materna). Los estímulos mixtos tienen componentes físicos y emocionales: dolor por exposición a choque eléctrico, nado forzado, inmovilización en tubo, inmovilización en plancha, etc. (Nadal y Armario, 2010).

Las rutas que convergen en la activación de la respuesta de estrés a nivel del SNC son muy diferentes entre los distintos tipos de estímulos sistémicos y entre éstos y los emocionales (Pacak y Palkovits, 2001). Cada uno de los estímulos sistémicos activa áreas muy específicas del SNC en el tallo encefálico y áreas circunventriculares. Desde estas áreas se envían señales directas al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), que juega un papel clave en la respuesta fisiológica al estrés. En cambio, los estímulos emocionales inducen la activación de un gran número de áreas del SNC, que incluyen la corteza prefrontal y diversos núcleos límbicos (amígdala, septum, núcleo estriado ventral). El procesamiento de estos estímulos en las zonas límbicas converge finalmente en estructuras como el PVN que son áreas de gran importancia pero de un nivel jerárquico bajo en la orquestación de la respuesta al estrés (Herman y col, 2003).

Los componentes centrales del sistema del estrés están localizados en el hipotálamo y en el tallo cerebral e incluyen:

- Neuronas parvocelulares que contienen hormona liberadora de corticotropina (CRH)

- Neuronas secretoras de Arginina-Vasopresina (AVP) del núcleo paraventricular del hipotálamo
- Neuronas secretoras de CRH de los núcleos paragigantocelular y parabraquial de la médula y del locus coeruleus (LC)
- Otros grupos neuronales noradrenérgicos (NA) en la médula y en el puente de Varolio (sistema LC/NA).

Los componentes periféricos incluyen:

- La rama periférica del eje HHA
- Eferentes del sistema simpato-adreno-medular (SAM)
- Componentes del sistema parasimpático

La respuesta al estrés comprende una amplia gama de modificaciones fisiológicas. Entre ellas se destacan la activación del eje simpático-adreno-medular (SAM), la que da lugar a cambios cardiovasculares y a la liberación de catecolaminas, y la activación del eje HHA, responsable de la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo (Charmandari y col, 2005; DeVries y col, 2003; O'Connor y col, 2000).

EL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISO ADRENAL

La activación del eje HHA es una de las respuestas neuroendocrinas más estudiadas del estrés, las tres hormonas principales de dicho eje (CRH, Hormona Adrenocorticotrófica (ACTH) y cortisol) son a menudo denominadas *hormonas del estrés* (DeVries y col, 2003). Respecto a este eje, el procesamiento de la información concerniente a un estímulo estresante particular converge en el PVN donde se localizan neuronas que envían sus axones al sistema portal-hipofisiario situado en la eminencia media. Las señales nerviosas promueven la síntesis del factor liberador de corticotrofina (CRF o CRH) y de otros péptidos como la vasopresina y su liberación al

sistema portal-hipofisiario, desde donde son conducidos a la hipófisis anterior. Allí, estos péptidos estimulan la síntesis y liberación de la ACTH (Nadal y Armario, 2010).

El CRH es el principal regulador hipotalámico del eje HHA, el cual estimula la secreción de ACTH desde la hipófisis anterior. La AVP, aunque es un potente factor sinérgico de CRH, tiene una pequeña actividad secretagoga sobre ACTH. Una interacción recíproca positiva entre CRH y AVP también existe a nivel del hipotálamo, cada uno estimulando la secreción del otro. En situaciones no estresantes, tanto CRH como AVP son secretadas al sistema portal de una manera circadiana, pulsátil y altamente coordinada. La amplitud de los pulsos de CRH y AVP incrementa temprano a la mañana, resultando en un incremento en la amplitud de la secreción pulsátil de ACTH y cortisol. Durante el estrés agudo, hay un incremento en la amplitud y sincronización de la liberación desde el PVN de CRH y AVP al sistema porta hipofisiario. El CRF no sólo actúa en la hipófisis sino que tiene una amplia distribución en el SNC. Ejerce sus efectos mediante dos tipos de receptores, CRFR1 y CRFR2 que presentan una distribución diferencial en el SNC (Aguilera y col, 2004).

La AVP de las neuronas magnocelulares también es secretada al sistema porta hipofisiario vía fibras colaterales. Además, dependiendo del estresor, otros factores como Angiotensina II, varias citokinas y mediadores de la inflamación son secretados y actúan sobre los componentes hipotalámicos, hipofisarios y/o adrenales del eje HHA y potencian su actividad (Charmandari y col, 2005).

La ACTH es un péptido de 30 aminoácidos derivado de la proopiomelanocortina (POMC) que actúa principalmente en la zona fasciculada

de la corteza de la glándula adrenal, promoviendo la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en ratas) (de Kloet y col, 2005). En la regulación de la secreción de cortisol también participan otras hormonas, citokinas y la activación del sistema nervioso autónomo (Charmandari y col, 2005).

Los glucocorticoides juegan un rol importante en la regulación de la actividad basal del eje HHA así como en la terminación de la respuesta al estrés. Éstas hormonas ejercen una potente y compleja inhibición sobre el eje HHA, que tiene lugar a nivel de la hipófisis anterior, el PVN y estructuras extrahipotalámicas como la formación hipocampal y la corteza prefrontal medial (Armario, 2006).

El feed back negativo de los glucocorticoides sobre la secreción de CRH y AVP sirve para limitar la duración de la exposición de los tejidos del organismo a los glucocorticoides, minimizando los efectos catabólicos, lipogénicos, antirreproductivos e inmunosupresores de éstas hormonas (Charmandari y col, 2005). Los glucocorticoides actúan a través de dos tipos de receptores genómicos: el tipo I o receptor de mineralocorticoides (MR) y el tipo II o receptor de glucocorticoides (GR). La existencia de dos tipos de receptores para glucocorticoides tiene un gran impacto en todas las teorías del estrés y sus procesos patológicos, por cuanto se considera que los receptores de mineralocorticoides están ocupados en condiciones basales, mientras que la máxima ocupación de los GR se alcanza en situaciones de estrés (de Kloet y col, 2005). El *feed back* negativo de la secreción de CRH y ACTH es mediado a través de los GR tipo II (Charmandari y col, 2005). En la periferia, los efectos de los glucocorticoides parecen encaminados, en su gran mayoría, a la

redistribución de la energía entre diferentes tejidos y al control de la respuesta inflamatoria e inmune. A nivel central inhiben el transporte y la utilización de glucosa en las neuronas y en la glía, modulan el apetito y la ingesta, favorecen el aprendizaje y la memoria de situaciones emocionalmente relevantes y pueden favorecer la muerte neuronal y los procesos neurodegenerativos causados por otros factores, especialmente en la formación hipocampal (Sapolsky y col, 2000). Figura 1.

EL EJE SIMPATO-ADRENO-MEDULAR

El segundo de los sistemas periféricos de la respuesta al estrés es el sistema SAM. La activación de este sistema proviene de axones desde el PVN del hipotálamo que se ramifican ampliamente en núcleos autónomos del tallo cerebral, pero particularmente en un núcleo denso del tallo, el *locus coeruleus* (LC). En este núcleo se localizan el 50 % de las neuronas simpáticas productoras de noradrenalina (NA) del cerebro. En el estrés, el CRH estimula la producción de tirosina hidroxilasa, la enzima limitante de la síntesis de NA; la NA es entonces sintetizada y secretada. El resultado de la activación del LC es la liberación de NA desde las terminaciones nerviosas simpáticas periféricas, como así también la liberación de catecolaminas de la médula adrenal a través de la vía simpática del SNA (Nadal y Armario, 2010). Elevados niveles de A y NA están invariablemente presentes durante el estrés siendo sus efectos más importantes la estimulación de la glucogenolisis, lipólisis, incremento de la fuerza y frecuencia de la contracción miocárdica, aumento del estado de atención o alerta, vasoconstricción, vasodilatación en el músculo, incremento de la tasa metabólica, etc. (Tilbrook y col, 2000). Figura 1.

EJES NEUROENDÓCRINOS
DE RESPUESTA AL ESTRÉS

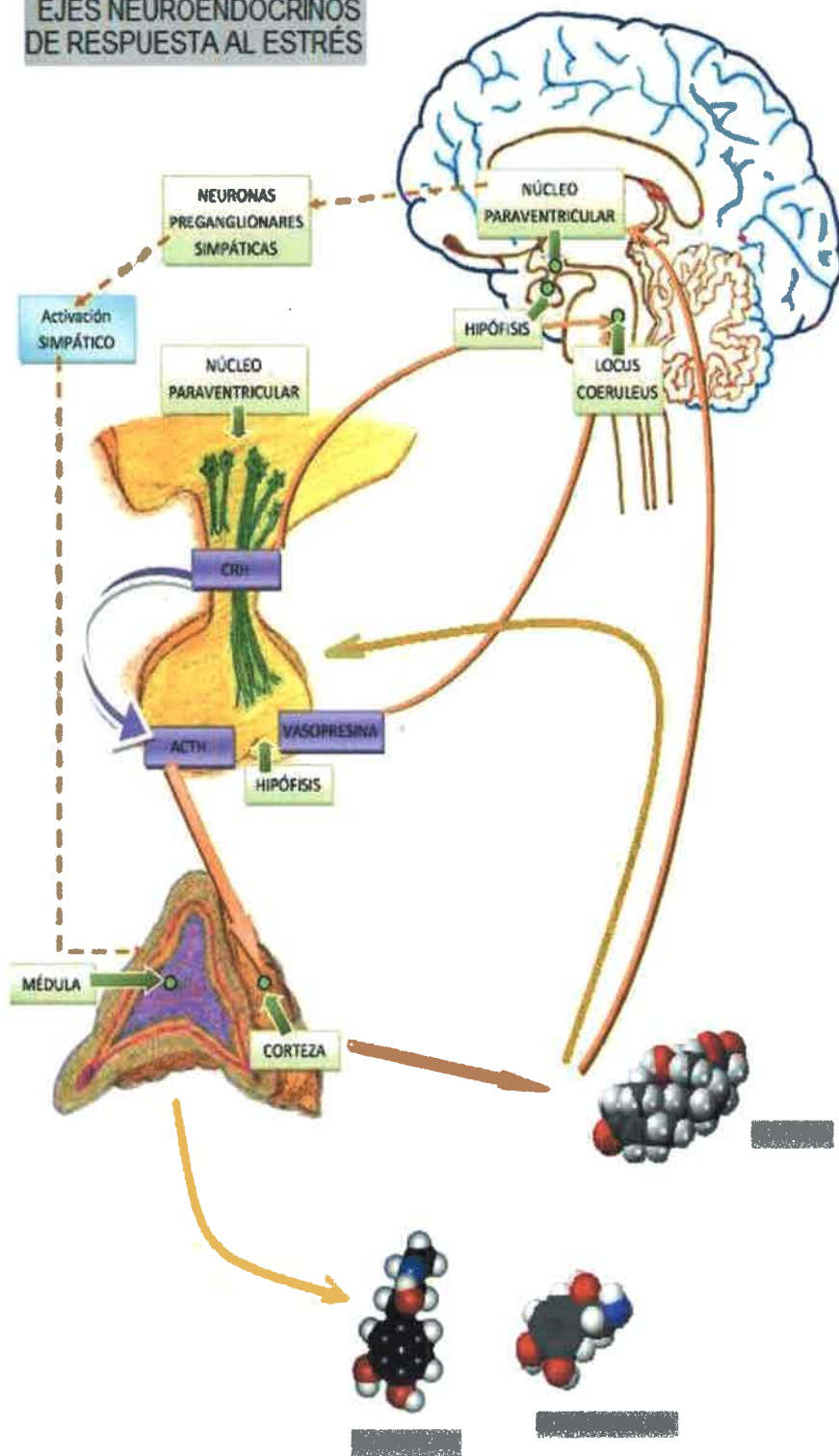


Figura 1. Las vías clásicas del estrés involucran inicialmente al Hipotálamo que integra la información procedente de las vías sensoriales y viscerales, el Hipotálamo activaría dos rutas paralelas: el eje SAM (Simpático-Adreno-Medular) y el eje HHA (Hipotalámico-Hipófisis-Adrenal) Tomado de Sirera y modificado (Sirera y col, 2006).

Una respuesta adecuada al estrés puede ser importante para la supervivencia, mientras que una respuesta exagerada o sostenida en el tiempo puede dar lugar a alteraciones fisiológicas o psicológicas como hipertensión arterial y otros problemas cardiovasculares, inmunosupresión, patologías del sistema gastrointestinal, inhibición del sistema reproductor, envejecimiento prematuro, trastornos de ansiedad, depresión y facilitación del consumo de drogas de abuso, entre otras (Charmandari y col, 2005).

Está bien establecido que las consecuencias fisiológicas y patológicas de la exposición al estrés dependen de las características de la situación estresante, pero también de las diferencias individuales. Entre las primeras, la intensidad de la situación, su duración, los niveles de imprevisibilidad y el grado de control sobre la situación juegan un papel crítico. Los niveles plasmáticos de catecolaminas (especialmente adrenalina), la glucosa (como reflejo de la liberación de adrenalina), la prolactina, las hormonas del eje HHA y el nivel de ingesta de comida, se consideran adecuados marcadores de la intensidad del estrés agudo (Armario, 2006; Marquez y col, 2002). Los marcadores de estrés crónico, incluyen cambios en la actividad del eje HHA y en distintos parámetros metabólicos e inmunológicos, incluyendo marcadores de inflamación como la proteína C reactiva o citoquinas circulantes como la interleucina-6 (Kelly y col, 1997; Miller y col, 2008).

Respecto a las diferencias individuales, existen rasgos de personalidad que pueden modular el impacto de las situaciones estresantes o determinar el patrón general de respuesta conductual y fisiológica a las mismas (Nadal y Armario, 2010). El tema de la vulnerabilidad o susceptibilidad al estrés frente a la resistencia a sus efectos (resiliencia), es de gran importancia teórica (de

Kloet y col, 2005). El uso de modelos animales permite ahondar en la neurobiología de estos procesos y ofrecer estrategias preventivas y terapéuticas (Krishnan y Nestler, 2008).

Por otra parte, se han encontrado diferencias en la respuesta del eje HHA ante situaciones de estrés entre hembras y machos. Se ha postulado la participación del estradiol como modulador de esta respuesta al actuar sobre los mecanismos de retroalimentación (Young, 1995a,b). Algunos autores encuentran una acción estimuladora del estradiol sobre el eje HHA (Handa y McGivern, 1999; Norman y col, 1992; Xiao y col, 1994), mejorando la transcripción de genes de CRH en el hipotálamo (Vamvakopoulos y Chrousos, 1993). Además, el estradiol podría incrementar la sensibilidad de la glándula adrenal a la ACTH circulante ofreciendo un mecanismo periférico adicional para la hipersecreción de glucocorticoides en las hembras (Young y col, 2008).

De lo expresado anteriormente se desprende que el estrés en sus innumerables formas de presentación e independientemente de la especie a la que afecte, pone en marcha mecanismos que repercuten en la fisiología de los individuos, provocando cambios moleculares y hormonales que, dependiendo de su magnitud, se pueden traducir en manifestaciones de observación clínica tales como cambios reproductivos, productivos, de conducta, alimentación, etc.

ESTRÉS E HIPERTENSIÓN

En humanos, una respuesta exagerada o sostenida en el tiempo a situaciones estresantes, puede dar lugar a alteraciones como la hipertensión y



problemas cardiovasculares. Las evidencias más convincentes acerca de que el estrés induce hipertensión provienen de estudios en animales.

La hipertensión arterial esencial o hipertensión de causa no determinada, es responsable de más del 90% de los casos de hipertensión vistos en la práctica médica. El hallazgo tiende a aparecer con carácter familiar más que individual y es representativo de un conjunto de síndromes que, con una base genética, son dependientes de la interacción con el ambiente. En consecuencia, difiere en la severidad y en el tiempo de aparición. Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la hipertensión esencial. El incremento en la actividad del sistema nervioso simpático relacionado con excesiva exposición o respuesta al estrés es de gran importancia. La disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la remodelación vascular, la alta ingesta de sodio; el incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la deficiencia de vasodilatadores (prostaciclina y óxido nítrico) pueden anteceder a la hipertensión y contribuir a su patogénesis (Gamboa, 2006; Ge y col, 2009; Seeliger y col, 2010).

Con respecto al sodio, las funciones principales de este ión se relacionan con el transporte a nivel capilar y celular, la excitación nerviosa y muscular, el equilibrio ácido base, el equilibrio osmótico y fundamentalmente interviene en la regulación del intercambio y distribución del agua y por lo tanto, del volumen del líquido intra y extra celular (Gannong, 2002).

El balance total de sodio y agua del organismo refleja la diferencia entre la ingesta y las pérdidas, siendo la ingesta una función de la dieta y está influenciada por factores culturales, mientras que las pérdidas son determinadas por el sudor y en gran parte por la excreción renal (Guyton,

2006). Dado el rol central del sodio en el mantenimiento de los volúmenes líquidos corporales y por ende de la presión arterial, cualquier factor que modifique la ingesta o la excreción de este ión, puede conducir a alteraciones en la homeostasis del mismo.

El estrés es un factor ambiental que puede alterar el balance de sodio en el organismo. Trabajos previos (Bensi y col, 1997; Niebylski y col, 2000; Niebylski y col, 2011) han demostrado que la exposición a un estrés tanto físico como social en ratas normotensas, indujo una reducción en la excreción renal de sodio. Además, se ha establecido que la excreción urinaria de sodio tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés es un fenotipo heredable que puede ser utilizado para estudiar la etiología genética del desarrollo de la hipertensión (Ge y col, 2009). En este sentido, se ha demostrado que un porcentaje significativo de individuos de raza negra y obesos tienen una menor respuesta natriurética al estrés mental y presentan incrementos significativos en la presión arterial (Harshfield y col, 2009), lo que indica la participación importante de la genética en el manejo renal del sodio en respuesta al estrés. Se estima que del 30 al 60% de las familias hipertensas tiene una base genética poligénica, por lo que los factores de riesgo, tienden frecuentemente a agregarse.

Se han observado además, diferencias en los valores de presión arterial entre machos y hembras tanto en animales como en humanos. Los hombres presentan valores más altos de este parámetro que las mujeres hasta que ellas llegan a la menopausia, momento a partir del cual los valores tienden a igualarse. Además, los varones tienen más probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares y complicaciones renales que las mujeres. Las

causas de estas discrepancias no son del todo conocidas, aunque se han elaborado varias hipótesis sugiriendo un rol importante tanto de los andrógenos como de las hormonas sexuales femeninas (Pechere-Berstchi y Burnier, 2004).

Numerosos estudios realizados en las últimas dos décadas indican un rol importante de las hormonas sexuales en la regulación de la estructura o función de varios tejidos y órganos entre los que se cuentan el cerebro, los huesos, el hígado y los riñones. Es conocido que las funciones secretorias y reabsortivas renales dependen de las características del epitelio y de la polaridad del mismo. La polaridad de la membrana tanto apical como basolateral, representan barreras de permeabilidad altamente selectivas entre el citoplasma y el espacio extracelular. Esta selectividad está determinada por transportadores que transfieren las moléculas a través de la bicapa lipídica reabsorbiéndolas desde el fluido tubular o secretándolas desde el espacio peritubular hacia el interior del túbulo. Gran cantidad de estudios han mostrado que la regulación de las funciones absortivas y secretorias incluyen cambios en la actividad o abundancia de los transportadores específicos. Estos cambios estarían influenciados por diferentes hormonas entre las que se encuentran las hormonas sexuales. En este sentido se ha demostrado que la progesterona puede unirse al receptor de mineralocorticoides y ejercer varias acciones que antagonizan con las funciones de la aldosterona o de la corticosterona en el riñón (Bumke-Vogt, 2002). También se ha informado en estudios realizados en tejidos renales humanos, la presencia de enzimas capaces de producir andrógenos a partir de la pregnenolona, sugiriendo la posibilidad de una regulación autocrina o paracrina de la función de las células

renales, dada por los andrógenos. Finalmente, otros autores han encontrado que los riñones de ratas de ambos sexos pueden convertir la androstenediona y la testosterona en estradiol el cual puede unirse a su receptor específico y causar acciones autocrinas y paracrinas aún en ausencia de estrógenos circulantes (Sabolic y col, 2007). Todos estos datos indican la participación de las hormonas sexuales en los procesos de absorción y secreción a nivel tubular renal.

Con respecto al manejo renal del sodio todavía está en discusión la participación de las hormonas sexuales femeninas en este parámetro. Es conocido que, tanto el ciclo menstrual como la menopausia están caracterizados por variaciones en los niveles plasmáticos de progesterona, estrógenos, aldosterona y renina y que estas hormonas juegan un rol importante en la reabsorción tubular de sodio tanto a nivel proximal como distal. Además, se han localizado receptores de andrógenos en los segmentos proximales de la nefrona, sugiriendo que la testosterona puede afectar también el manejo renal del sodio (Pelletier, 2000). A pesar que las investigaciones en este sentido presentan resultados contradictorios, Pechère-Berstchi y col (2002) han encontrado diferencias entre la fase folicular y luteal en la respuesta tubular al incremento a la ingesta de sal en mujeres normotensas. En la fase folicular la respuesta tubular a un incremento de sodio en la dieta es semejante a la encontrada en los varones en tanto que en la fase luteal el incremento en la ingesta de sal lleva a un incremento en la excreción, debido a un efecto a nivel de la nefrona distal. Esto puede reflejar un rol anti-aldosterona de la progesterona, efecto que es particularmente demostrable cuando hay una carga de sal (Pechère Berstchi y col, 2002). Otros autores han

informado que las hormonas sexuales protegen del incremento de la presión arterial inducido por la sal, favoreciendo la excreción renal de sodio.

ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTRÉS

Un radical libre (RL) es una especie química (atómica o molecular) que posee uno o más electrones desapareados que los hacen extremadamente reactivos. Debido a su gran reactividad, se caracterizan por tener una vida media corta (del orden de los milisegundos) aunque varía según el tipo de radical libre. Los radicales se pueden formar por la pérdida o la ganancia de un electrón de una especie no radical. Dos radicales pueden reaccionar compartiendo sus electrones desapareados y formar una unión covalente (estable); sin embargo, cuando un radical reacciona con un no radical, resulta en una nueva especie radical. Es así como pueden darse reacciones en cadena (Halliwell, 2006).

La combinación de una molécula funcional con un RL da lugar a una molécula disfuncional, lo que puede repercutir en la vida celular. Los RL son producidos continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de óxido-reducción con oxígeno en distintos procesos. En el metabolismo normal de las células a niveles fisiológicos de presión parcial de oxígeno, se estima que alrededor del 1 al 3% del oxígeno reducido en la mitocondria formará el radical anión superóxido (O_2^-) (Halliwell, 2006). Los radicales libres son formados también en la reacción de defensa de los neutrófilos, en respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, a los rayos ultravioletas, a la contaminación ambiental, el humo de cigarrillos, la hiperoxia y el exceso de ejercicio e isquemia (Uttara y col, 2009).

La generación de radicales libres proviene de dos sistemas diferentes e interactivos: las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Ambas especies reactivas tienen efectos deletéreos y efectos beneficiosos (Chakraborti y col, 2008). Sin embargo, la excesiva producción de radicales libres puede sobrepasar el mecanismo de defensa endógeno y puede modificar irreversiblemente diversas macromoléculas biológicas (las proteínas, los lípidos y el ADN) (Evans y col, 2003; Stefanska y Pawliczak, 2008).

Las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) agrupan no sólo a los radicales del oxígeno como el O_2^- y el radical hidroxilo (OH^\cdot), sino también a los derivados no radicales tales como el H_2O_2 , el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ozono (O_3) (Halliwell, 2006).

Una gran cantidad de especies reactivas diferentes de las del oxígeno pueden generarse en los sistemas vivos. Algunos óxidos del nitrógeno como el NO y dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) se agrupan bajo el nombre de RNS (Tabla 1).

Tabla 1. Especies reactivas del Nitrógeno.

Radicales	No radicales
Óxido nítrico (NO^\cdot)	Ácido nitroso (HNO_2)
Dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot)	Tritóxido de dinitrógeno (N_2O_3)
	Ión nitrilo (NO_2^+)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Ácido peroxinitroso ($ONOOH$)
	Anión nitroxilo (NO^-)

La importancia de estas especies ha crecido enormemente en los últimos años abriendo un nuevo panorama de investigación sobre la incumbencia de las RNS en el desarrollo de numerosas enfermedades.

Los RL son inactivados continuamente por el sistema de defensa antioxidante. Se ha propuesto que un antioxidante puede ser cualquier sustancia que retarda o previene significativamente la oxidación del sustrato e involucra una gran cantidad de componentes químicos de origen endógeno y exógeno que interaccionan mediante efectos sinérgicos y complementarios (Halliwell, 2006). Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno (enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)) o provenir con la dieta (carotenos, flavonoides, etc). Si los RL superan a la capacidad antioxidante del organismo, se llega a un estado de estrés oxidativo (EO) lo que puede acelerar la aparición de algunas enfermedades (Rahmann, 2007).

La SOD es una metaloproteína y se encuentra ampliamente distribuida en el riñón puesto que constituye la primera línea de defensa al daño oxidativo que puede causar el anión superóxido y las especies reactivas que se derivan de su presencia. La SOD cataliza la reacción que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual es catabolizado por la catalasa produciendo $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ (Touyz, 2005). Cabe destacar que el anión superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la velocidad de dismutación es baja pero se incrementa en presencia de la SOD.

Se ha sugerido que el estrés oxidativo está involucrado en la patofisiología de varias formas de hipertensión y parece estar relacionado con una disfunción endotelial. Además, el incremento en el estrés oxidativo contribuye a la activación del sistema nervioso simpático al inactivar a su modulador, el óxido nítrico (Torok, 2008). El óxido nítrico derivado del endotelio, es un gas de acción paracrina que difunde rápidamente a través de

las membranas celulares. Controla el tono vascular, inhibe la función de las plaquetas, previene la adherencia de los leucocitos, y reduce la proliferación de la íntima. Es sintetizado por un grupo de enzimas llamadas óxido nítrico sintetasas (NOS) que comprenden tres isoformas: NOS neuronal (nNOS), que originalmente fuera identificada en el sistema nervioso, la NOS endotelial (eNOS), que es activa en la regulación de la presión sanguínea y la NOS inducible (iNOS) que fue identificada en macrófagos, hepatocitos, astrocitos y otras estirpes celulares protagonistas de eventos pro inflamatorios. Estas enzimas convierten al aminoácido L-arginina en NO y L-citrulina (Ferroni y col, 2006; Binotti, 2012).

El NO es generalmente poco reactivo con la mayoría de las especies no radicales, sin embargo, reacciona rápidamente con el radical superóxido, peróxido e hidroxilo, generando peroxinitritos (Ferroni y col, 2006). Las consecuencias de la reacción entre el superóxido y el NO son dobles. Primero, da como resultado una reducción en la biodisponibilidad del NO y así se reduce la acción protectora de esta molécula. Segundo los peroxinitritos tienen poder oxidante y han sido implicados como mediadores de la peroxidación lipídica y nitración de proteínas en las enfermedades vasculares (Selemidis y col, 2008).

La inactivación o reducción de la síntesis de NO se considera dentro de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Esta condición, conocida como disfunción endotelial, puede promover el vasoespasmo, trombosis, inflamación vascular y proliferación de las células musculares lisas vasculares. El estrés oxidativo vascular con un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuye a los mecanismos de la disfunción

vascular y está causado principalmente por un desequilibrio entre la actividad de las enzimas pro-oxidantes (tales como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa o la cadena respiratoria mitocondrial) y las enzimas antioxidantes (Förstermann, 2010).

Evidencias recientes indican un posible efecto del género en el EO vascular y en la biodisponibilidad de la molécula vasoprotectora óxido nítrico (NO). La producción total de NO es mayor en la mujer premenopáusica que en los hombres. Además, el NO liberado de las células endoteliales es mayor en las arterias de las hembras comparadas con los machos. Por lo tanto, es posible que, debido a estos mayores niveles de NO, las hembras sean menos susceptibles al EO vascular. Existen evidencias que sugieren que los estrógenos son responsables de estas diferencias de género en la liberación de NO endotelial. Se ha postulado que el anillo aromático presente en los estrógenos, que está ausente en progestinas y andrógenos, funciona como una unidad antioxidante. Además, se ha postulado que numerosos productos metabólicos del estradiol particularmente el 2-hidroxiestradiol y el 2-metoxiestradiol, quienes no pueden unirse a los receptores de estrógenos, son más potentes que el estradiol, en la protección del daño oxidativo renal. Además, se encontró que el estradiol incrementa la expresión de la eNOS renal, la que juega un importante rol en la producción de NO, de la Manganese superóxido dismutasa (MnSOD) que es una metaloenzima responsable del metabolismo y detoxificación de las ROS en ratas y ratones y también aumenta la metalotioneína que es una proteína que actúa como un eficiente neutralizador de las ROS, regulando de esta manera, el potencial redox celular (Miles y col, 2000).

Existen evidencias que el 17-beta-estradiol puede suprimir la actividad de la NADPH oxidasa por una disminución en la expresión de varias de sus subunidades. De esta manera habría menor producción de anión superóxido. Además, hay algunas evidencias de que los estrógenos pueden inhibir los efectos activadores de la Ang II sobre la NADPH oxidasa, modulando la expresión y/o señales desde los receptores AT1, de esta manera se estaría inhibiendo la producción del anión superóxido. Los estrógenos actuando directamente sobre las células vasculares tienen un rol vasorrelajante mediante la activación de la eNOS (Miller y col, 2007).

Se ha encontrado que la protección de los estrógenos a nivel renal estaría mediada por el NO, al igual que a nivel cardiovascular. Estos efectos podrían ser agudos (no genómicos) estimulando la liberación de NO o podrían tener efectos a largo plazo incrementando el RNAm y la expresión de proteínas para las isoformas de NO sintetasa y de esta manera aumentar la actividad de la NOS en una variedad de tejidos (Dubey y Jackson, 2001; Baylis, 2008). Además, se ha probado que el riñón de las ratas hembras presenta mayores niveles de NOS comparados con los machos o con hembras ovariectomizadas (Neugarten, 1997; Reckelhoff y col, 1998).

Por otra parte, se ha observado que la reacción entre especies oxidativas y nitrosativas no solamente llevan a la bioinactivación del NO, sino también a la disfunción endotelial y activación del sistema nervioso simpático (De la Serna, 2000; Bendersky, 2004; Cooper, 2004; Wilcox, 2005; Torok, 2008). La rápida activación del sistema nervioso simpático es una respuesta característica al estrés, con la liberación de catecolaminas (Miczek y col, 2008). Esto podría influir en la actividad de las enzimas antioxidantes y participar en

una producción incrementada de RL, aumentando el estrés oxidativo (Pajovic, 2006; Harsfield y col, 2009). Además, la activación del sistema simpático debido a su amplia distribución en el riñón, modifica la excreción renal de sodio lo que podría aumentar el volumen líquido extracelular. Tanto el incremento en el estrés oxidativo como el aumento del volumen plasmático pueden aumentar la presión arterial.

De acuerdo a los antecedentes expuestos surge que las hembras tendrían una respuesta incrementada al estrés dada por una mayor secreción de glucocorticoides que los machos. Por otra parte, los estrógenos ejercerían un rol protector frente al estrés oxidativo vascular aumentando la producción de óxido nítrico. Debido a que la mayor respuesta al estrés podría generar un importante aumento de la presión arterial pero la mayor biodisponibilidad del NO se opondría a este efecto, es que surge la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS

Los cambios renales y oxidativos en respuesta al estrés crónico son menores en las hembras adultas que en los machos adultos, siendo los estrógenos los responsables de éstas diferencias.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar los cambios en la excreción de sodio, en la formación de radicales libres y en el sistema de defensa antioxidante endógeno en ratas hembras enteras, hembras castradas, hembras castradas suplementadas con estradiol y machos, sometidas a estrés crónico. Dilucidar la participación de los estrógenos en dichos cambios.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Determinar los niveles de corticosterona plasmática, glucemia y el índice adreno-somático.
- 2- Valorar la concentración plasmática y la excreción renal de Na^+ en respuesta al estrés crónico.
- 3- Calcular el filtrado glomerular por medio de la depuración de creatinina endógena.
- 4- Investigar la formación de radicales libres a través de la determinación de Malonildialdehído (MDA) hepático y renal y Nitritos plasmáticos.
- 5- Valorar la capacidad antioxidante por medio de la determinación de la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa.
- 6- Comparar los resultados obtenidos entre los distintos grupos de hembras y machos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y CONDICIONES DE BIOTERIO

Se utilizaron ratas hembras y machos Wistar adultas de alrededor de 250-300 g de peso corporal. Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales y mantenidas en condiciones estándar de bioterio con ciclos de luz-oscuridad 12/12 hs (con fotoperíodo desde las 7:30 AM hasta las 7:30 PM) y temperatura de $20 \pm 2^\circ$ C. Los animales fueron provistos de agua y alimento "ad libitum", durante todo el período experimental. En las semanas previas a los experimentos, los diferentes grupos de ratas se colocaron en jaulas metabólicas con el objeto de familiarizarlas con estas jaulas y evitar el agregado de un estrés adicional, luego se repusieron en sus respectivas jaulas individuales.

Experimento 1: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en ratas machos y hembras

Se utilizaron dos grupos de ratas, un grupo de machos (n= 12) y un grupo de hembras (n= 12). La mitad de los animales de cada grupo permaneció como control (C) (n= 6) y la otra mitad fue sometida a estrés (E) (n= 12) por inmovilización en tabla (IMO), 1 hora por día, durante 14 días, entre las 09:00 y las 10:00 AM. El modelo de estrés descrito por Michajloskij y col. (1988), consiste en colocar al animal sobre una base rectangular de madera con cuatro soportes metálicos apoya-miembros en sus ángulos. Las

extremidades del animal se sujetan a dichos soportes metálicos por medio de cinta adhesiva.

El día 13, luego de la sesión de estrés y del chequeo de la fase del ciclo estral en las hembras (mediante citología del exudado vaginal que fue observado al microscopio sin teñir, inmediatamente después de realizar la extracción del material), a todos los animales se les extrajo sangre de la cola mediante el sistema de extracción de sangre capilar (Microvette, CB300, Lab.Starstedt, Alemania), para la determinación de creatinina. Posteriormente, todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 6 horas para la recolección de orina y medición del consumo voluntario de agua. En las muestras de orina se determinó el volumen, la osmolaridad, la creatinina, la excreción de sodio y los niveles de nitritos totales.

El día 14, luego de la última sesión de estrés, todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recolectaron muestras de sangre y se les extrajeron los riñones, el hígado y las glándulas adrenales.

La sangre se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos, se separó el plasma o el suero y se guardó en alícuotas a -80°C hasta la realización de las diferentes determinaciones.

En el plasma se determinaron los niveles de corticosterona y glucemia (como marcadores de estrés) y la osmolaridad. En el suero se determinó la creatinina y los nitritos totales.

Los órganos fueron retirados en forma inmediata (dentro de los primeros cinco minutos postmortem) y conservados en hielo. Las glándulas adrenales fueron desgrasadas y pesadas para el posterior cálculo del Índice Adreno Somático (IAS).

En el riñón e hígado se determinaron las concentraciones de Malonil dialdehído (MDA) como sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.

Los días 1 y 14, se pesaron todos los animales para los cálculos de ganancia de peso y del índice adreno-somático.

Experimento 2: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en hembras castradas con y sin suplemento de Valerato de estradiol

Se utilizó un grupo de ratas hembras (n= 26) adultas mantenidas en las mismas condiciones que en el experimento anterior, las que fueron ovariectomizadas (OVX). Luego de un período de 15 días de recuperación de la cirugía, los animales fueron divididos en dos grupos: uno de hembras OVX con un suplemento de valerato de estradiol, 125 ug/semana ip, diluido en aceite de girasol y otro grupo de ratas que recibió sólo el vehículo de la hormona.

Luego de 3 semanas de suplementación, la mitad de los animales de cada grupo fue sometida a IMO, 1 hora por día, durante 14 días, según el método descrito anteriormente y la otra mitad permaneció como control (C). Durante el período de estrés, los animales siguieron recibiendo el suplemento de estradiol.

De esta manera quedaron conformados los siguientes grupos:

- A- Ratas OVX + Suplemento con Estradiol Control (n= 6).
- B- Ratas OVX + Suplemento con Estradiol y sometidas a estrés (n= 6).
- C- Ratas OVX + vehículo de la droga Control (n= 6).
- D- Ratas OVX + vehículo de la droga y sometidas a estrés (n= 6).

El día 13, luego de la sesión de estrés, a todos los animales se les extrajo sangre de la cola mediante el sistema de extracción de sangre capilar (Microvette, CB300, Lab.Starstedt, Alemania) para la determinación de

creatinina. Posteriormente, todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 6 horas para la recolección de orina y medición del consumo voluntario de agua. En las muestras de orina se determinó el volumen, la osmolaridad, la creatinina, la excreción de sodio y los niveles de nitritos totales.

El día 14, luego de la última sesión de estrés, todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se procedió a la recolección de sangre y vísceras y se realizaron las mismas determinaciones que en el experimento 1.

DETERMINACIONES

a) Glucemia

Se determinó con el Kit comercial de Wiener Lab., que emplea un método enzimático para la determinación de glucosa en plasma:

- Fundamentos del método:

El esquema de reacciones que fundamenta el método es el siguiente:



- Procedimiento:

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) se colocaron:

	B	S	D
Standard	--	20 ul	--
Muestra	--	--	20 ul
Reactivo*	2 ml	2 ml	2 ml

* Reactivo de trabajo: de acuerdo al volumen de trabajo, se colocó en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de reactivo 4-AF, 50 partes de

reactivo fenol y se llevó a 1000 partes con agua destilada. Se agregó 3 partes de GOD/POD previamente homogeneizadas. Dicha solución se mezcló por inversión, sin agitar.

Standard: solución de glucosa 1 g/l.

GOP/POD: solución de glucosa oxidada (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml).

Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenasona 25 mmol/l en buffers tris 0.92 mol/l.

Reactivo Fenol: solución de fenol 55 mmol/l.

Se incubó durante 10 minutos en baño de agua a 37 °C; luego se leyó en espectrofotómetro a 505 nm llevando el aparato a cero con el blanco.

- Cálculo de los resultados:

Empleando las lecturas obtenidas por colorimetría (D) se calculó el nivel de glucosa en la muestra aplicando la fórmula:

Glucosa g/l = D x f

donde $f = 1 \text{ g/l} / S$

S= absorbancia del estándar

b) Corticosterona plasmática

Los niveles de corticosterona plasmática fueron determinados según el método descrito por Armario y Castellanos (1985).

El tampón utilizado fue un tampón fosfato 0,01 M, conteniendo NaCl 0,09 % y gelatina 0,1%, pH final 8,2.

La corticosterona no marcada (fría) fue obtenida comercialmente (Merk) y diluida en etanol absoluto hasta obtener una concentración de 10 ug/ml. Los estándares de mayor concentración, 1600 pg/ml fueron preparados en tampón de RIA a partir de la solución de 10 ug/ml y mantenidos a -20 grados. A partir de esta solución se prepararon diluciones entre 25 y 1600 pg/ml para la realización de la curva de calibración.

La corticosterona marcada preparada fue (1,2,6,7) 3H-corticosterona con una actividad específica de 72-93 Ci/mmol (Merck). Como solución de trabajo se diluyó la hormona de manera de obtener 7000-8000 cpm/100 ul de corticosterona colocada en cada tubo de RIA.

El anticuerpo utilizado fue un anticuerpo policlonal en cordero (Millipore) diluido de manera de obtener un porcentaje de unión de alrededor de 20-25 %.

Para realizar las determinaciones se colocaron 10 ul de las muestras o de los estándares en tubos de 5 ml de polipropileno. Se agregaron a todos los tubos con muestras y al (Total (T), cero (O), unión no específica (NSB)) 200 ul de tampón, se agitaron en vortex y se colocaron a 70 grados durante 30 minutos para desnaturalizar la transcortina presente en la muestra. Posteriormente, se enfriaron en un baño de agua y hielo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron a todos los tubos 100 ul de corticosterona tritiada e inmediatamente 100 ul de anticuerpo excepto a los T y NSB a los que se agregó 100 ul de tampón. Se agitaron todos los tubos y se incubó por 18-24 hs a 4 grados centígrados. A partir de este paso, todos los tubos fueron siempre mantenidos a 4 grados en un baño de agua y hielo, procediéndose a separar la fracción de corticosterona unida de la libre, utilizando carbón activado (Merck). La suspensión de carbón activado se preparó a una concentración de 1 g /100 ml de tampón RIA y se mantuvo a 4 grados con agitación previa (como mínimo 10 minutos). Se añadieron a cada tubo 0,5 ml de carbón (excepto al T, al cual se le agregó 0,5 ml de tampón). Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 grados. Finalizada la centrifugación, se procedió rápidamente a decantar el sobrenadante en viales de centelleo a los cuales se les agregó 1 ml de líquido de centelleo (Opti-phase Hi-safe, Wallac). Finalmente, todos los tubos fueron mezclados por inversión y contadas las emisiones beta, en un contador beta. La representación gráfica y el cálculo de las concentraciones se realizaron mediante el método de logit-log.

c) Índice Adreno Somático (IAS)

Las glándulas adrenales fueron desgrasadas y pesadas inmediatamente de extraídas. Para el cálculo del Índice Adreno Somático se tuvo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{IAS} = [(\text{peso adrenal/peso corporal}) * 1000].$$

d) Ganancia de peso

Para el cálculo de la ganancia de peso diario se tomaron los pesos de todos los animales al inicio y al final del período experimental. Los resultados se obtuvieron por simple diferencia entre ellos según la siguiente ecuación y divididos por el número de días de duración del experimento:

$$GP = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{14 \text{ días}}$$

e) Determinación de la Natriuresis, Kaliuresis.

Los niveles de sodio y potasio urinarios fueron determinados con un analizador de iones, mod. T-40, TECNOLAB, el cual determina la concentración de estos iones por un electrodo ión sensitivo. La actividad de este analizador está basada en las propiedades de ciertas membranas y vidrios de desarrollar un potencial eléctrico según la ecuación de Nerst-Peters para un ión específico en solución.

f) Determinación de Creatinina en suero

Se utilizó el Kit comercial de Wiener Lab.

- Fundamentos del método:

La creatinina reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino dando un complejo color rojo que se cuantifica mediante lectura fotométrica. La adición de ácido al medio destruye el picrato de creatinina pero no el color formado por los demás compuestos.

- Procedimiento:

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) se colocaron:

	B	S	D
Agua destilada	0,1 ml	--	--
Standard	--	0,1 ml	--
Muestra	--	--	0,1 ml
Reactivo de trabajo	1 ml	1 ml	1 ml

Se mezcló e incubó durante 10 minutos en baño a 37 °C. Dentro de los 15 minutos de retirado del baño se leyó el Standard (S) y el Desconocido (D) en espectrofotómetro a 510 nm, donde previamente se había llevado a cero con el Blanco. Luego se agregó:

	B	S	D
Stopper	50 ul	–	50 ul

Se mezcló y se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos; se volvió a leer el Desconocido (D), llevando a cero previamente con el Blanco.

- Cálculo de los resultados:

$$1\text{- Creatinina en suero (mg/l)} = (D_1 - D_2) \times f \quad f = 20 \text{ mg/l} / S$$

$$2\text{- Creatinina en orina (g/24 hs)} = \frac{D_1 - D_2}{S} \times V$$

Siendo:

V: volumen de la diuresis expresado en litros /24 hs.

La fórmula surge de:

$$\text{Creatinina en orina (g/24 hs)} = \frac{D_1 - D_2}{S} \times 0.020 \text{ g/l} \times 50 \times V$$

Donde:

0.020 g/l= concentración del Standard

50= factor de dilución

g) Depuración de Creatinina Endógena (DCE)

Con los valores obtenidos de creatinina en suero y orina se calculó la DCE considerando la siguiente ecuación:

Creatinina en orina (g/24 hs)

$$\text{D.C.E. ml/min} = \frac{\text{Creatinina en orina (g/24 hs)}}{\text{Creatinina en suero (mg/l)}} \times 694 \text{ ml/min}$$

Donde:

$$694 \text{ ml/min} = \frac{\text{g/24 hs}}{\text{mg/l}} = \frac{1000 \text{ mg} \times 1000 \text{ ml}}{1 \text{ mg} \times 1440 \text{ min}} = \frac{1.000.000 \text{ ml}}{1440 \text{ min}}$$

h) Volumen de orina

La orina fue recolectada en forma individual durante un periodo de 6 horas en tubos Falcon colocados en el embudo de cada jaula metabólica. Los tubos fueron pesados al inicio (vacíos) y al final (con orina) del lapso establecido. Finalmente por simple diferencia de peso se calculó el volumen.

$$\text{VO} = (\text{Peso Final Tubo c/orina} - \text{Peso Inicial Tubo vacío})$$

i) Determinación de MDA

Los niveles de peroxidación lipídica fueron evaluados determinando la concentración de MDA como una de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS: thiobarbituric acid reactive substance). Esta variable fue medida utilizando el método de Marcincák y col. (2003).

▪ Procedimiento:

La técnica consistió en colocar 600 microlitros al 30% (p/v) de homogenato de hígado o riñón mezclado con butil hidroxitolueno (BHT) como antioxidante y ácido tricloroacético (TCA) al 15 %. Se agitó e incubó a 90 °C durante 30 minutos. Luego del enfriado y centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos, se extrajeron 600 microlitros del sobrenadante y se hicieron reaccionar con un

volumen igual de ácido clorhídrico 0.25 N y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375%. La mezcla de reacción fue luego nuevamente incubada a 90 °C durante 30 minutos, se colocó en hielo y se le agregaron 3 volúmenes de butanol. Se centrifugó 10' a 2500 rpm y se separó el sobrenadante que fue leído a 535 nm, usando 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP) (Sigma) como estándar, para realizar la curva patrón.

- Cálculo de los resultados

Obtenidas las lecturas colorimétricas correspondientes a cada una de las muestras de homogenato de hígado o riñón, se calculó la concentración de MDA utilizando la fórmula que relaciona lecturas colorimétricas (A) con concentraciones de malonildialdehído conocidas (B), en una regresión de potencia, según la fórmula:

$$\log y \text{ (DO)} = \log A + \log B \times (\text{concentración de MDA})$$

$$x = \log^{-1} (\log y - \log A) / B$$

Las concentraciones de malonildialdehído fueron calculadas como nmol/gr de tejido.

j) Nitratos (NO₂⁻) y Nitritos (NO₃⁻) totales.

En el presente trabajo se utilizó el método de Griess según la técnica descrita por Schmidt y col. (1995). La determinación de óxido nítrico (ON) es casi imposible de realizar debido a que es un gas, que tiene una vida media muy corta. Por lo tanto, es ampliamente utilizada la detección de sus metabolitos estables, nitritos y nitratos por colorimetría. Como la reacción de Griess mide sólo nitritos (NO₂⁻), es necesario primero la reducción de los nitratos (NO₃⁻). Previo a la determinación de los NO₂⁻, las muestras fueron desproteinizadas por el agregado de 10 ul de SO₄Zn al 30% (P/V) en solución, e incubadas a temperatura ambiente por 15'. Luego se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a 2 tubos de ensayo, uno que contenía una pastilla de cadmio granulado para la reducción de los NO₃⁻, y el otro se utilizó para la determinación de los NO₂⁻ formados espontáneamente.

Se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche con agitación; se centrifugó y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de nitritos.

Determinación de nitritos: A 50 ul del sobrenadante (perteneciente al suero u orina) se le adicionó 850 ul de agua destilada y 100 ul de la mezcla 1:1 de las soluciones A y B del reactivo de Griess (Solución A= N-(1-naftil) etilamina dihidroclorada 1%; Solución B= sulfanilamida 10% en HCl 1N). Se agitó suavemente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia a 540 nm. La curva de calibración se realizó utilizando una solución estándar de NaNO₂ (nitrito de sodio 500 uM). A partir de esta solución patrón se tomó 75 ul de NaNO₂ y se diluyó en 5 ml de agua destilada, obteniéndose una solución de 7.5 uM, a partir de ella se preparó por duplicado la siguiente batería de tubos:

Componentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
NaNO ₂ 7.5 uM (ul)	0.0	2	10	20	40	80
H ₂ O (ul)	900	898	890	880	860	820
Reactivo de Griess (ul)	100	100	100	100	100	100
Volumen final	1000	1000	1000	1000	1000	1000
[uM]	0.0	0.015	0.075	0.150	0.300	0.600
Absorbancia a 540 nm	0.00	0.013	0.213	0.416	0.821	1.631

Se calculó el coeficiente de regresión lineal (r).

Donde: $Y=a+bX$

[X]= concentración (uM)

Y= Absorbancia (muestra)

Absorbancia – a

[X]=-----

b

De las muestras tratadas con Cadmio se obtuvieron los NO_2^- totales. El cálculo de los NO_3^- se obtuvo por diferencia entre los nitritos totales y los formados espontáneamente.

k) Determinación de actividad de SOD

La actividad de la SOD se puede determinar por su habilidad de inhibir la autooxidación de la epinefrina a pH alcalino. El anión superóxido es un intermediario de dicha reacción.

1- Se homogeneizó tejido hepático o renal en buffer de homogeneización.

2- Del homogenato se sacó una alícuota para medir proteínas y el resto se centrifugó a 2500 g (10000 rpm) 15 minutos a 4°C.

El contenido de proteínas de las muestras fue determinado por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar.

3- Se agregó 50 μl de epinefrina y 2.85 ml de buffer glicina (50 mM pH=10-11) a la muestra.

4- Se determinó la aparición de epinocromo a 480 nm.

5- Cálculo: Se obtuvo la pendiente del gráfico de la oxidación de la epinefrina pura (a) y la pendiente del gráfico de la oxidación de la epinefrina con 3 volúmenes de cada muestra (b_1 , b_2 y b_3).

Se calcularon los μl de muestra que inhiben en un 50 % la velocidad de formación del epinocromo, lo que corresponde a 1 unidad SOD (U SOD) y se expresaron los datos como U SOD/mg de proteínas.

l) Determinación de actividad de Catalasa

La medición de la actividad de esta enzima se realizó por el método de Aebi (1984). Se homogeneizó el tejido hepático o renal, tomando 100 mg de tejido + 1 ml de buffer PiK 30 mM ClK 120 mM pH 7,4. El homogenato se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se utilizó de inmediato.

1. Se colocó en una cubeta de cuarzo 2,9 ml de Buffer PiK 50 mM y se llevó a 0 el espectrofotómetro usando una longitud de onda de 300 nm.

2. Se preparó Buffer sustrato de la siguiente manera: 100 ul de H₂O₂ puro + 50 ml de Buffer PiK 50 mM y se agitó.
3. Se tomó 2,9 ml de Buffer sustrato, se colocó en la cubeta y se leyó la D₀. Cuando este parámetro se estabilizó entre 0,4 y 0,6, se agregó 50 ul de sobrenadante y se leyó cada 10 segundos (sin sacar la cubeta del espectrofotómetro) durante 1 minuto.

Cálculos:

1. Se calculó el log de cada absorbancia.
2. Se graficó el log en función del tiempo.
3. Se calculó la pendiente de la recta (una para cada muestra).

Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de Catalasa (pmol/mg de proteína)} = \frac{\text{pendiente} \times 3 \times 100.000}{46 \times 1000 \times 0,1 \times \text{mg proteína}}$$

m) Ciclo estral

La secreción vaginal fue colectada después de la sesión de estrés del día 13 del experimento N° 1, de todas las hembras enteras para determinar la fase del ciclo en la que se encontraban. El material sin teñir fue observado al microscopio, inmediatamente después de realizar el exudado.

Se determinó la fase según la siguiente descripción de los exudados vaginales:

Proestro: predominio de células epiteliales nucleadas.

Estro: presencia de células epiteliales anucleadas fundamentalmente.

Metaestro: existe la misma proporción entre leucocitos, células epiteliales nucleadas y células cornificadas.

Diestro: predominio de leucocitos.

OVARIECTOMIA

Previo a la cirugía se realizó la sedación, aplicación de analgésico y antibioticoterapia según el peso individual de cada animal, se esperó alrededor de 5 minutos y se procedió a la administración de una combinación de Ketamina y Diazepam ip con lo que se logró el estado anestésico adecuado

para el acto quirúrgico. El acceso quirúrgico se realizó mediante laparotomía por línea media incidiendo con el bisturí piel y subcutáneo, lo que permitió visualizar inmediatamente debajo, la línea alba la que se incidió con una tijera. Para ello, se levantó la pared muscular con una pinza de mano izquierda, de manera de crear un espacio entre la misma y las vísceras abdominales y se realizó una incisión sobre la línea alba con tijera Metzembraum la que se amplió posteriormente, en una extensión de no más de 1,5 cm. Esta incisión incluye al peritoneo que se halla firmemente adherido a la línea alba y músculos abdominales. Los cuernos uterinos discurren en forma de “Y” desde la zona inguinal hasta la zona abdominal, a ambos lados de la línea media. Normalmente hay que desplazar los intestinos para visualizar los cuernos uterinos. En su punto más craneal están anclados, junto con el ovario, a la porción superior de la cavidad abdominal, mediante el ligamento ovárico. Una vez localizado el cuerno uterino, con tracción suave se lo expuso fuera de la cavidad abdominal lo que permitió la observación, en su porción más craneal, del ovario; se procedió a ligar con una sutura de 4/0 de nylon a uno y otro lado del mismo para seccionar luego la estructura en la que queda incluido el ovario completo, entre las dos ligaduras. Una vez separado el ovario del cuerno uterino, se realizó la misma operación con el ovario opuesto. La cavidad abdominal se cerró por planos, primero el muscular (que incluye peritoneo) con sutura discontinua mediante un punto en X y posteriormente la piel con puntos en U, ambos planos con nylon 4/0.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos del experimento N°1 se utilizó un ANOVA de 2 vías considerando el factor SEXO con dos niveles (Hembra; Macho) y TRATAMIENTO con dos niveles (Control; Estrés crónico).

Para el experimento N°2 también se utilizó una ANOVA de 2 vías considerando los factores SUPLEMENTACIÓN, con dos niveles (Vehículo; Estradiol) y TRATAMIENTO, con dos niveles (Control; Estrés crónico).

Por último, para algunas variables, se realizó la comparación entre todos los grupos del experimento N°1 y N°2, utilizando una ANOVA de 2 vías considerando el factor GRUPO con 4 niveles (Hembras; Machos; Hembras

Castradas y Hembras Castradas Suplementadas) y el factor TRATAMIENTO (Control; Estrés crónico).

Se utilizó el test de Duncan como prueba "a posteriori". Cuando fue necesario se realizaron transformaciones logarítmicas de manera de obtener homogeneidad de la varianza y se consideró significativo una $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico en ratas machos y hembras

a) Glucemia

Se observó un aumento en la concentración de glucosa sanguínea sólo en los grupos estresados ($F_{(1,34)} = 19,4$; $p = 0,0001$). No se encontró efecto del sexo ni interacción entre los factores (Gráfico 1).

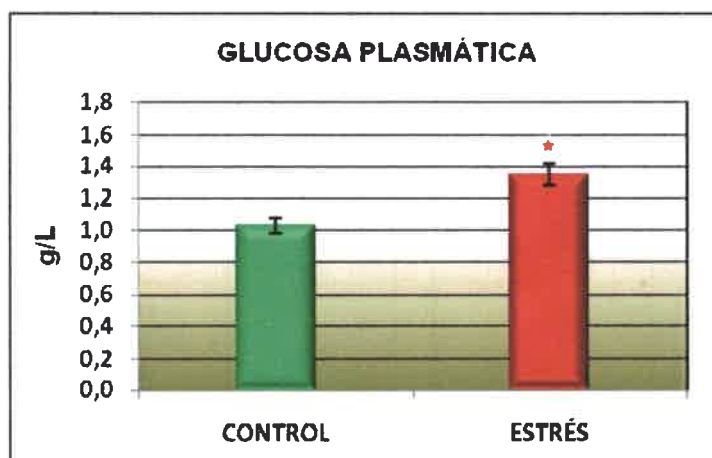


Gráfico 1: Glucosa plasmática (g/L)

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p = 0,0001$

b) Corticosterona plasmática

Se observó interacción entre los factores ($F_{(1,19)} = 66,3$; $p = 0,00001$). El test *a posteriori* indicó un incremento de los niveles de corticosterona en hembras y machos estresados, respecto de sus controles ($p = 0,0003$ y $p = 0,00006$, respectivamente) (Gráfico 2).

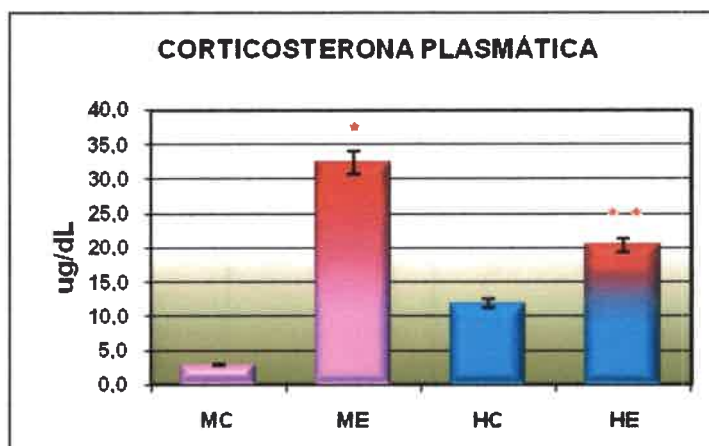


Gráfico 2: Corticosterona plasmática (ug/dL) HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p = 0,00006$ vs MC; ** $p = 0,0003$ vs HC.

c) Índice Adreno Somático (IAS)

En este parámetro, se observó efecto del sexo ($F_{(1,22)} = 63,0$; $p = 0,000001$), y del estrés ($F_{(1,22)} = 29,16$; $p = 0,00002$). El test *a posteriori* mostró un incremento del IAS en las hembras comparado con los machos ($p = 0,00014$) y en los animales estresados respecto de sus controles ($p = 0,00016$) (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Índice Adreno Somático según sexo.

INDICE ADRENO SOMATICO	
GRUPO	
Hembras	0,21 ± 0,02
Machos	0,10 ± 0,01 *

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).
* $p = 0,00014$.

Tabla 2: Índice Adreno Somático según tratamiento.

INDICE ADRENO SOMATICO	
GRUPO	
Control	0,11 ± 0,01
Estrés	0,19 ± 0,02 *

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).
* $p = 0,00016$.

d) Ganancia de peso

Se encontró efecto del sexo ($F_{(1,20)} = 26,4$; $p = 0,00005$) y del estrés ($F_{(1,20)} = 38,3$; $p = 0,00005$). En el análisis *a posteriori* se observó una mayor ganancia de peso en las hembras ($p = 0,0002$), y una menor ganancia en los animales sometidos a estrés ($p = 0,00015$). No se encontró interacción entre los factores (Tablas 3, 4 y 5).

Tabla 3: Ganancia de Peso (g/día) según sexo.

GANANCIA DE PESO	
GRUPO	g/día
Hembras	0,54 ± 0,08 *
Machos	0,24 ± 0,05

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).
* $p= 0,0002$.

Tabla 4: Ganancia de Peso (g/día) según tratamiento.

GANANCIA DE PESO	
GRUPO	g/día
Control	0,57 ± 0,07
Estrés	0,21 ± 0,05 *

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).
* $p= 0,00015$.

Tabla 5: Comparación Ganancia de Peso (g/día) según sexo y tratamiento.

GANANCIA DE PESO	
GRUPO	g/día
Hembras Control	0,77 ± 0,07
Hembras Estrés	0,32 ± 0,07
Machos Control	0,38 ± 0,02
Machos Estrés	0,10 ± 0,06

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

e) Excreción urinaria de Na⁺

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la excreción de sodio en las distintas fases del ciclo estral. Por lo tanto, se consideraron todas las hembras como control o estrés, sin discriminar la fase del ciclo en la que se encontraban.

Se halló efecto del sexo ($F_{(1,41)} = 12,6$; $p= 0,0009$) y del estrés ($F_{(1,41)} = 19,04$; $p= 0,00008$). Las ratas estresadas de ambos sexos mostraron una menor excreción renal de sodio que sus controles. Además las hembras excretaron menos sodio que los machos (Gráficos 3, 4 y Tabla 6).

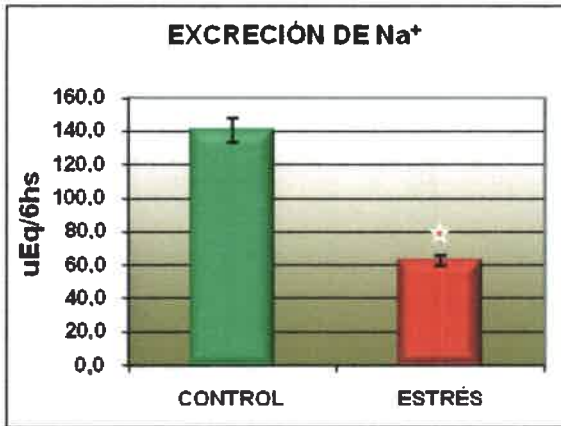


Gráfico 3: Excreción urinaria de sodio según tratamiento ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM)
★ $p=0,00008$.

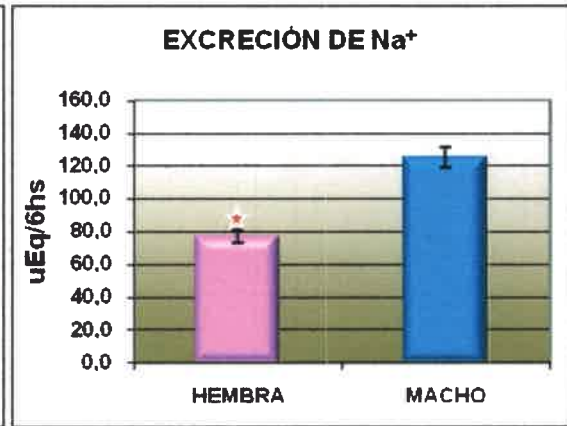


Gráfico 4: Excreción urinaria de sodio según sexo ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM)
★ $p=0,0009$.

Tabla 6: Excreción urinaria de sodio por grupos ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$).

EXCRECIÓN URINARIA DE Na^+	
GRUPO	$\mu\text{Eq}/6\text{hs}$
Hembras Control	92,20 \pm 21,42
Hembras Estrés	48,80 \pm 11,80
Machos Control	185,90 \pm 20,165
Machos Estrés	68,90 \pm 7,94

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

f) Excreción urinaria de K^+

No se hallaron efectos del sexo o del estrés en la excreción urinaria de potasio (Tabla 7).

Tabla 7: Excreción urinaria de potasio ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$).

EXCRECIÓN URINARIA DE K^+	
GRUPO	$\mu\text{Eq}/6\text{hs}$
Hembras Control	284,90 \pm 38,51
Hembras Estrés	206,50 \pm 53,80
Machos Control	233,40 \pm 25,84
Machos Estrés	273,30 \pm 16,57

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

g) Relación K^+/Na^+

Se halló efecto del sexo ($F_{(1,31)} = 6,74$; $p = 0,014$) y un efecto marginal del estrés ($p = 0,06$). Las hembras mostraron una relación K^+/Na^+ mayor que los machos. Se observa una tendencia a que los animales estresados tengan una mayor relación que los controles (Tablas 8 y 9).

Tabla 8: Relación Potasio-Sodio según sexo.

RELACIÓN K^+/Na^+	
GRUPO	
Hembras	3,88 ± 0,45 ★
Machos	2,13 ± 0,35

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0.014$.

Tabla 9: Relación Potasio-Sodio según tratamiento.

RELACIÓN K^+/Na^+	
GRUPO	
Control	2,66 ± 0,38
Estrés	3,72 ± 0,55 ★

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0.06$.

h) Depuración de Creatinina Endógena (DCE)

En este parámetro se observó efecto del sexo ($F_{(1,17)} = 4,19$; $p = 0,05$) y del estrés ($F_{(1,17)} = 5,26$; $p = 0,035$). Los machos y los animales estresados presentaron una DCE mayor que las hembras ($p = 0,05$) y que los animales controles ($p = 0,035$) respectivamente (Tablas 10 y 11).

Tabla 10: Depuración de Creatinina Endógena (ml/min) según sexo.

DEPURACIÓN DE CREATININA ENDÓGENA	
GRUPO	ml/min
Hembras	1,23 ± 0,12
Machos	1,50 ± 0,09 ★

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0,05$.

Tabla 11: Depuración de Creatinina Endógena (ml/min) según tratamiento.

DEPURACIÓN DE CREATININA ENDÓGENA	
GRUPO	ml/min
Control	1,21 ± 0,08
Estrés	1,50 ± 0,11 ★

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p=0,035$.

i) Volumen de orina

Se halló interacción entre los factores ($F_{(1,27)} = 3,94$; $p=0,05$). El test *a posteriori* mostró antidiuresis en las hembras sometidas a estrés ($p=0,007$), sin diferencias significativas entre los machos. Por otra parte, las hembras controles presentaron un volumen de orina mayor que los machos controles. ($p=0,012$) (Gráfico 5).

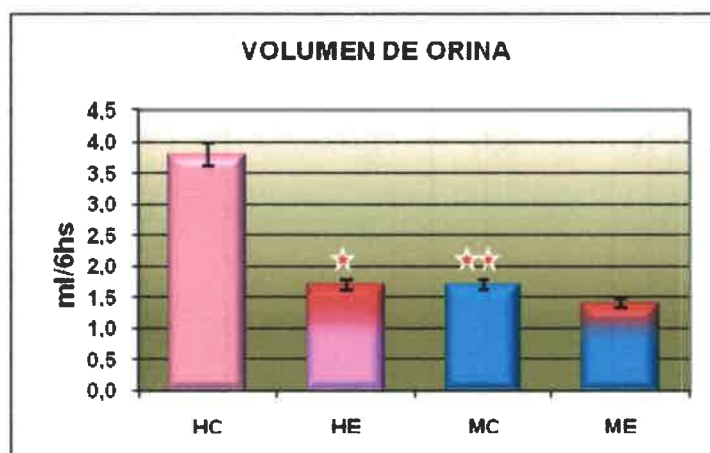


Gráfico 5: Volumen de orina (ml/6hs). HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p=0,007$ vs HC; ★★ $p=0,012$ vs HC.

j) Actividad de SOD Hepática

Se encontró interacción entre los factores sexo y estrés en la actividad de la SOD hepática ($F_{(1,18)} = 9,51$; $p=0,006$). El test *a posteriori* mostró que el estrés disminuyó la actividad de la enzima sólo en los machos ($p=0,018$), sin encontrarse diferencias entre las hembras. Además, las hembras controles presentaron menor actividad de la SOD que los machos controles ($p=0,014$) (Gráfico 6).

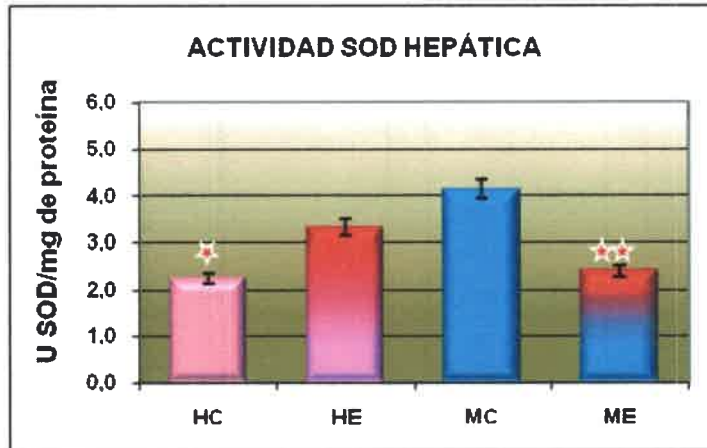


Gráfico 6: Actividad SOD Hepática (U SOD/mg de proteína) HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p= 0,0014$ vs MC; ★★ $p= 0,018$ vs MC.

k) Actividad de SOD Renal

Se encontró interacción entre los factores en la actividad de la SOD renal ($F_{(1,15)} = 7,36$; $p= 0,016$). Las hembras sometidas a estrés presentaron una mayor actividad de la enzima que las hembras controles ($p= 0,0008$) y que los machos estresados ($p= 0,024$), en tanto que no hubo diferencias entre los machos controles y estresados (Gráfico 7).

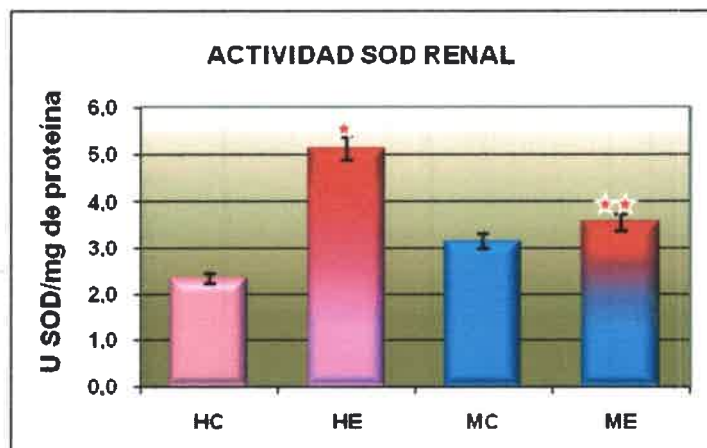


Gráfico 7: Actividad SOD Renal (U SOD/mg de proteína). HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p= 0,0008$ vs HC; ★★ $p= 0,024$ vs HE

I) Actividad de Catalasa Hepática

La actividad de la catalasa en el hígado sólo evidenció efectos por sexo ($F_{(1,18)} = 10,3$; $p = 0,005$). Las hembras presentaron menor actividad de la enzima hepática que los machos ($p = 0,017$) (Gráfico 8 y Tabla 12).

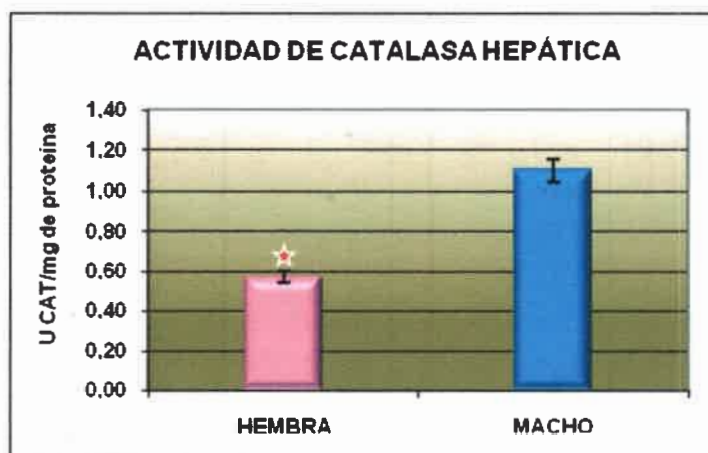


Gráfico 8: Actividad de Catalasa Hepática según sexo (U catalasa/mg de proteína). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).
★ $p = 0,017$.

Tabla 12: Actividad de Catalasa Hepática en todos los grupos (U catalasa/mg de proteína).

ACTIVIDAD CATALASA HEPÁTICA	
GRUPO	U catalasa/mg de proteína
Hembras Control	0,31 \pm 0,05
Hembras Estrés	0,82 \pm 0,26
Machos Control	1,07 \pm 0,16
Machos Estrés	1,15 \pm 0,40

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

m) Actividad de Catalasa Renal

Cuando se comparó la actividad de la catalasa renal se encontró sólo efecto del sexo ($F_{(1,18)} = 21,2$; $p = 0,0002$). La actividad de la catalasa renal es mayor en las hembras que en los machos (Gráfico 9 y Tabla 13).

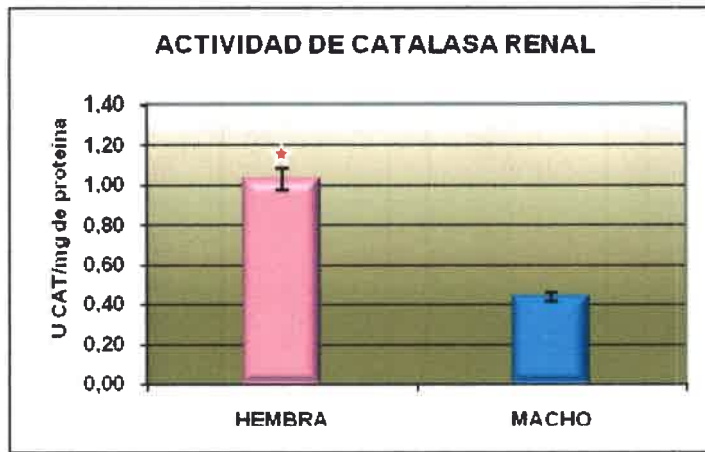


Gráfico 9: Actividad de Catalasa Renal según sexo (U catalasa/mg de proteína). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). $\star p = 0,0002$

Tabla 13: Actividad de Catalasa Renal en todos los grupos (U catalasa/mg de proteína).

ACTIVIDAD CATALASA RENAL	
GRUPO	U catalasa/mg de proteína
Hembras Control	0,93 \pm 0,11
Hembras Estrés	1,13 \pm 0,16
Machos Control	0,43 \pm 0,09
Machos Estrés	0,48 \pm 0,08

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

n) Nitratos plasmáticos

Respecto de los nitratos se encontró efecto del sexo ($F_{(1,17)} = 6,29$; $p = 0,022$) y del estrés ($F_{(1,17)} = 8,00$; $p = 0,01$). Las ratas hembras y todos los animales estresados mostraron niveles menores que los machos o las ratas controles respectivamente (Tablas 14 y 15).

Tabla 14: Nitratos ($\mu\text{M}/\text{ml}$) según sexo.

NITRATOS (NO_3)	
GRUPO	$\mu\text{M}/\text{ml}$
Hembras	7,32 \pm 2,01 *
Machos	14,60 \pm 2,40

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p=0,022$.

Tabla 15: Nitratos ($\mu\text{M}/\text{ml}$) según tratamiento.

NITRATOS (NO_3)	
GRUPO	$\mu\text{M}/\text{ml}$
Control	15,03 \pm 2,53
Estrés	6,90 \pm 1,58 *

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p=0,01$.

o) Nitritos totales

En cuanto a los nitritos se encontró efecto del sexo ($F_{(1,17)} = 5,17$; $p=0,03$) y del estrés ($F_{(1,17)} = 10,9$; $p=0,004$). El test *a posteriori* mostró que tanto las hembras como todos los animales estresados, presentaron menos nitritos totales que los machos o sus controles (Gráficos 10, 11 y Tabla 16).

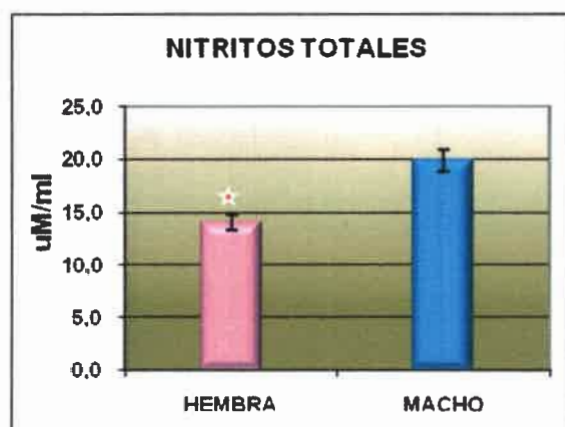


Gráfico 10: Nitritos totales ($\mu\text{M}/\text{ml}$) según sexo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p=0,03$.

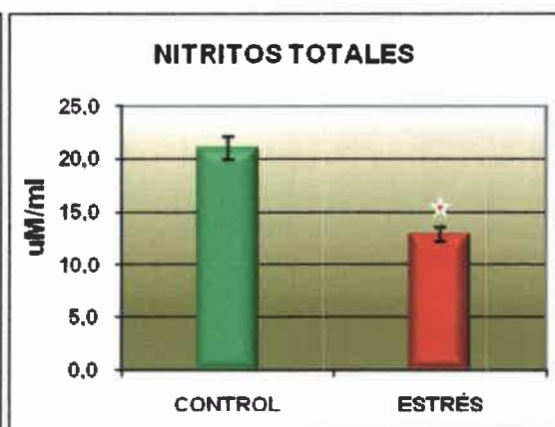


Gráfico 11: Nitritos totales ($\mu\text{M}/\text{ml}$) según tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). * $p=0,004$.

Tabla 16: Comparativo de Nitritos totales ($\mu\text{M/ml}$).

NITRITOS TOTALES (NO_2)	
GRUPO	$\mu\text{M/ml}$
Hembras Control	21,71 \pm 2,54
Hembras Estrés	9,44 \pm 1,92
Machos Control	22,80 \pm 1,65
Machos Estrés	16,50 \pm 1,39

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

p) Relación NO_2/NO_3

Para la relación NO_2/NO_3 se encontró interacción entre los factores sexo y estrés ($F_{(1,14)} = 6,5$; $p = 0,022$). El test *a posteriori* mostró una mayor relación NO_2/NO_3 en los machos estresados respecto de sus controles ($p = 0,023$). Además las hembras controles mostraron un incremento de este parámetro comparado con los machos controles ($p = 0,0009$). No se encontraron diferencias entre hembras controles y hembras estresadas (Tabla 17).

Tabla 17: Relación Nitritos/Nitratos.

RELACIÓN NITRITOS/NITRATOS (NO_2/NO_3)	
GRUPO	$\mu\text{M/ml}$
Hembras Control	1,81 \pm 0,60 ★★
Hembras Estrés	1,15 \pm 0,35
Machos Control	0,31 \pm 0,08
Machos Estrés	0,76 \pm 0,12 ★

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p = 0,023$; HC vs MC ★★ $p = 0,0009$.

q) Niveles de MDA Hepático

Se observó interacción entre los factores ($F_{(1,32)} = 7,13$; $p = 0,01$). El test *a posteriori* mostró un incremento en el nivel de MDA hepático en respuesta al estrés sólo en los machos ($p = 0,003$) (Gráfico 12).

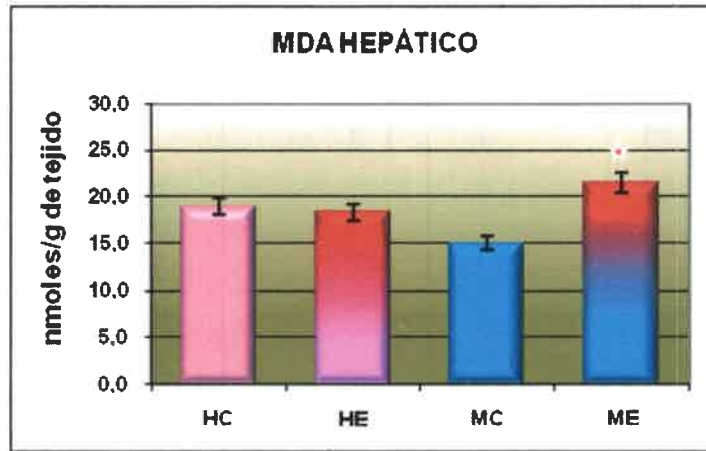


Gráfico 12: MDA Hepático (nmoles/g de tejido) HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p=0,003$ vs MC.

r) Niveles de MDA Renal

Se halló interacción entre sexo y estrés ($F_{(1,23)} = 9,92$; $p=0,004$). El estrés aumentó el MDA renal en ambos sexos (Hembras controles vs Hembras estrés $p=0,005$ y Machos controles vs Machos estrés $p=0,00006$). Además, se observaron mayores niveles de MDA en los machos estresados que en las hembras estresadas ($p=0,0002$) (Gráfico 13).

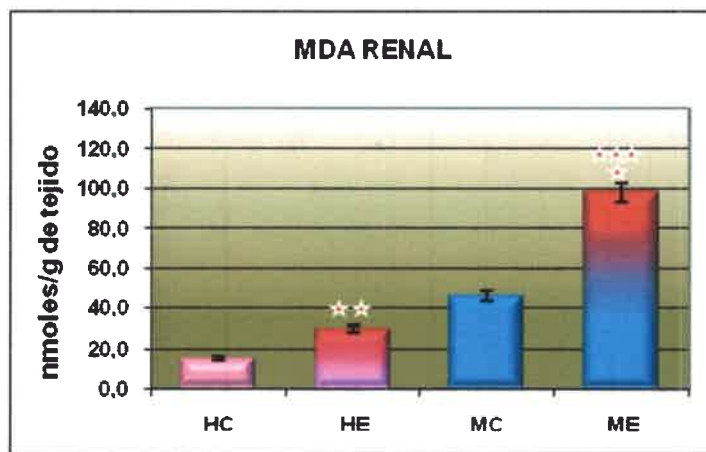


Gráfico 13: MDA Renal (nmoles/g de tejido) HC= Hembras Control, HE= Hembras Estrés, MC= Machos Control y ME= Machos Estrés. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p=0,00006$ vs HC. ★★ $p=0,005$ vs MC. ★★★ $p=0,0002$ vs ME.

Experimento 2: Excreción de sodio y estrés oxidativo en respuesta al estrés crónico, en ratas hembras castradas sin suplemento y suplementadas con Valerato de estradiol

a) Estrógenos

Con el fin de conocer los valores basales, los efectos de la ovariectomía y los efectos de la suplementación sobre estas hormonas ováricas, se determinaron los niveles de estrógenos en los tres grupos de hembras consideradas (Tabla 18).

Tabla 18: Comparación de la concentración de estrógenos en plasma (pg/mL), entre los tres grupos de hembras de ambos experimentos.

ESTRÓGENOS	
GRUPO	pg/mL
Hembras Enteras	24,70 ± 0,82
Hembras Castradas	< 20 ± 0,00
Hembras Castradas Suplementadas	287,30 ± 43,11

Los valores se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

b) Glucemia

Se observó un aumento en la concentración de glucosa sanguínea en los animales sometidos a estrés ($F_{(1,29)} = 20,9$; $p = 0,00008$). No se encontró efecto de la suplementación ni interacción entre los factores (Gráfico 14).

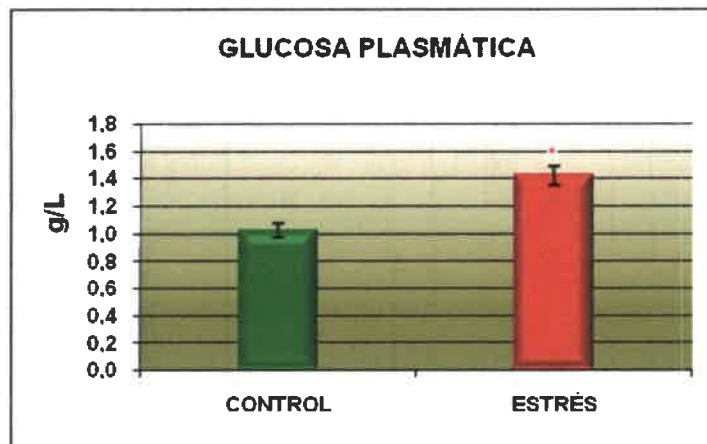


Gráfico 14: Glucosa plasmática (g/L). Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).
★ $p = 0,00008$

c) Corticosterona plasmática

Se observó interacción entre los factores ($F_{(1,16)} = 17,46$; $p = 0,0007$). El test *a posteriori* indicó un incremento de corticosterona en las hembras estresadas no suplementadas, respecto de sus controles ($p = 0,0004$) (Tabla 19).

Tabla 19: Corticosterona plasmática (ug/dL).

CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	
GRUPO	µg/dL
Hembras Castradas Control	10,60 ± 1,42
Hembras Castradas Estrés	16,30 ± 0,49 *
Hembras Castradas Suplementadas Control	16,60 ± 0,51
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	15,20 ± 1,03

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). * $p = 0,0004$.

d) Índice Adreno Somático (IAS)

En este parámetro se observó una disminución del IAS en las hembras castradas estrés respecto de sus controles ($p = 0,00001$) (Tabla 20).

Tabla 20: IAS en todos los grupos.

ÍNDICE ADRENO SOMÁTICO	
GRUPO	
Hembras Castradas Control	0,74 ± 0,03
Hembras Castradas Estrés	0,16 ± 0,03 *
Hembras Castradas Suplementadas Control	0,16 ± 0,02
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	0,17 ± 0,01

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). * $p = 0,00001$ vs Hembras Castradas Control.

e) Ganancia de peso

Se observaron diferencias entre los animales estresados y sus respectivos controles. El estrés provocó una pérdida de peso significativa en las hembras castradas ($p = 0,00048$) y una menor ganancia de peso en las hembras castradas suplementadas ($p = 0,05$) (Gráfico 15).

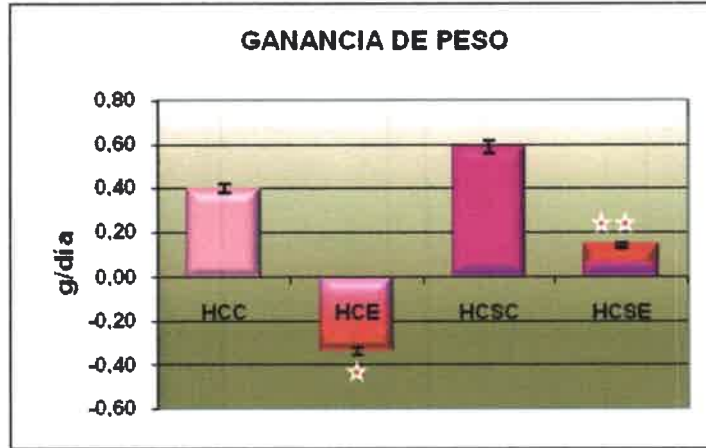


Gráfico 15: Ganancia de Peso (g/día) en todos los grupos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control, HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. * $p= 0,00048$ vs HCC; ** $p= 0,05$ vs HCSC.

f) Excreción urinaria de Na⁺

Se halló interacción entre los factores ($F_{(1,21)} = 4,63$; $p= 0,043$). El estrés disminuyó la excreción de sodio sólo en las hembras castradas sin suplemento ($p= 0,007$). Además, las hembras castradas controles tuvieron una mayor excreción que las hembras castradas suplementadas controles ($p= 0,006$) (Gráfico 16).

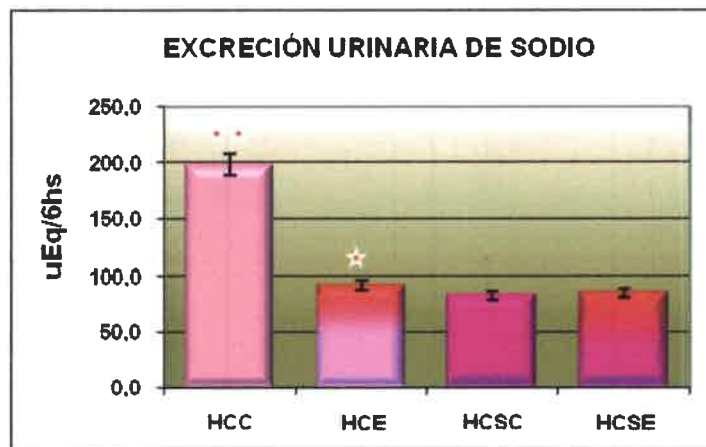


Gráfico 16: Excreción urinaria de sodio ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control, HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. * $p= 0,007$ vs HCC; ** $p= 0,006$ vs HCSC.

g) Depuración de Creatinina Endógena (DCE)

En este parámetro no se observó efectos de la suplementación, del estrés ni interacción entre los factores (Tabla 21).

Tabla 21: Depuración de creatinina endógena (ml/min).

DEPURACIÓN DE CREATININA ENDÓGENA	
GRUPO	ml/min
Hembras Castradas Control	1,21 ± 0,11
Hembras Castradas Estrés	1,21 ± 0,12
Hembras Castradas Suplementadas Control	1,21 ± 0,19
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	0,79 ± 0,23

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

h) Volumen de orina

No se hallaron diferencias significativas en este parámetro ($F_{(1,21)} = 3,93$; $p = 0,06$) (Tabla 22).

Tabla 22: Volumen urinario (ml/6hs).

VOLUMEN DE ORINA	
GRUPO	ml/6hs
Hembras Castradas Control	4,30 ± 0,72
Hembras Castradas Estrés	3,80 ± 0,53
Hembras Castradas Suplementadas Control	3,30 ± 0,34
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	2,70 ± 0,45

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

i) Actividad de SOD Hepática

La actividad de la enzima en el hígado no mostró diferencias significativas (Tabla 23).

Tabla 23: SOD Hepática (U SOD/mg de proteína).

ACTIVIDAD SOD HEPÁTICA	
GRUPO	U SOD/mg de proteína
Hembras Castradas Control	3,00 ± 0,96
Hembras Castradas Estrés	3,41 ± 0,76
Hembras Castradas Suplementadas Control	2,42 ± 1,27
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	2,47 ± 0,77

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

j) Actividad de SOD Renal

Se observó para este parámetro efecto del estrés ($F_{(1,17)} = 4,70$; $p = 0,044$). Los animales estresados mostraron mayor actividad de SOD renal que los controles (Gráfico 17).

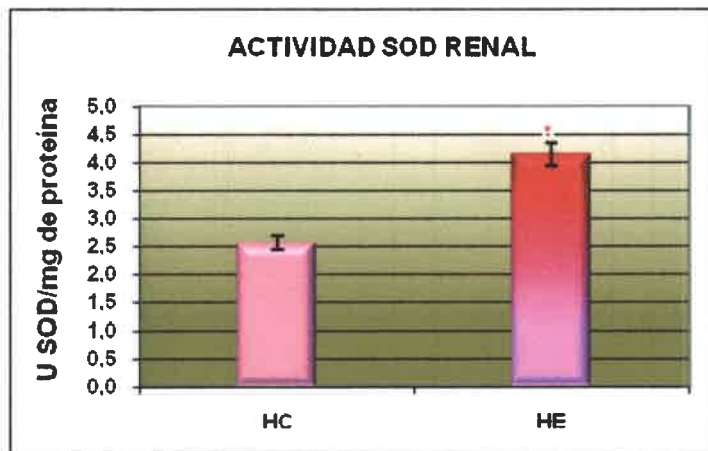


Gráfico 17: SOD Renal (U SOD/mg de proteína). HC= Hembras Castradas Controles, HE= Hembras Castradas Estresadas. Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0,044$.

k) Actividad de Catalasa Hepática

La catalasa en el hígado sólo evidenció efectos por suplementación ($F_{(1,21)} = 14,3$; $p = 0,001$), disminuyendo la actividad de la enzima en las ratas suplementadas (Gráfico 18).

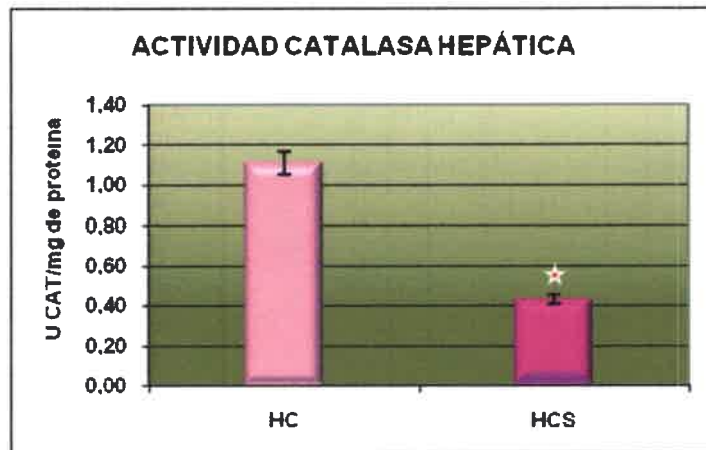


Gráfico 18: Catalasa Hepática según suplementación (U catalasa/mg de proteína). HC= Hembras Castradas, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). $\star p= 0,001$.

I) Actividad de Catalasa Renal

La enzima en el riñón también presentó efectos debidos a la suplementación ($F_{(1,22)} = 18,8$; $p= 0,0002$), con una menor actividad de catalasa en las ratas suplementadas (Gráfico 19).

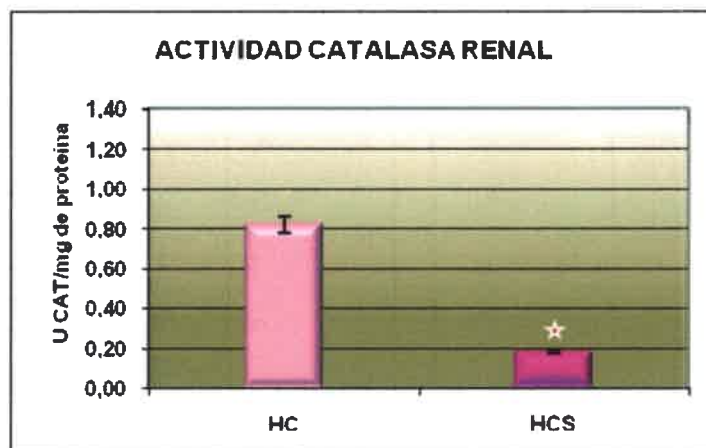


Gráfico 19: Catalasa Renal según suplementación. (U catalasa/mg de proteína). HC= Hembras Castradas, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). $\star p= 0,0002$.

m) Nitratos plasmáticos

Respecto de los nitratos, se hallaron diferencias por efecto de la suplementación ($F_{(1,21)} = 7,2$; $p = 0,01$), observándose mayores niveles en las ratas suplementadas (Gráfico 20).

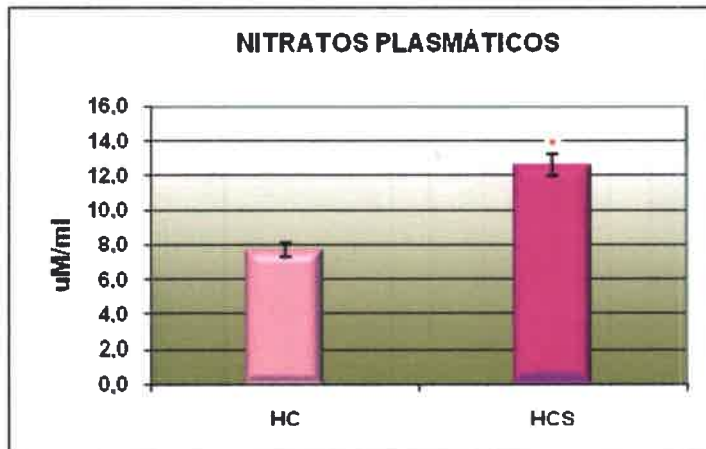


Gráfico 20: Nitratos ($\mu\text{M/ml}$) según suplementación. HC= Hembras Castradas, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM) $\star p = 0,01$.

n) Nitritos totales

En cuanto a los nitritos totales también se halló efecto por suplementación ($F_{(1,19)} = 6,31$; $p = 0,021$) con un aumento de este parámetro en los animales suplementados (Gráfico 21).

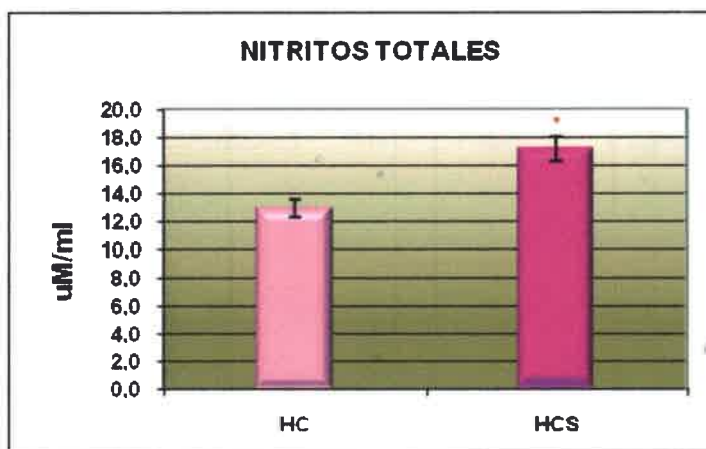


Gráfico 21: Nitritos totales ($\mu\text{M/ml}$) según suplementación. HC= Hembras Castradas, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM) $\star p = 0,021$.

o) Relación NO₂/NO₃

Para la relación NO₂/NO₃ hubo interacción entre los factores ($F_{(1,19)} = 4,64$; $p = 0,044$), se observó un incremento de esta relación en las HCE y en las HCSE respecto de sus controles ($p = 0,007$ y $p = 0,009$ respectivamente) (Tabla 24).

Tabla 24: Relación Nitritos/Nitratos.

RELACIÓN NITRITOS/NITRATOS (NO ₂ /NO ₃)	
GRUPO	
Hembras Castradas Control	1,41 ± 0,60
Hembras Castradas Estrés	2,33 ± 0,37 ★
Hembras Castradas Suplementadas Control	1,45 ± 0,16
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	1,50 ± 0,10 ★★

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0,007$. ★★ $p = 0,009$.

p) Niveles de MDA Hepático

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro (Tabla 25).

Tabla 25: MDA Hepático (nmoles/g de tejido).

NIVELES DE MDA HEPÁTICO	
GRUPO	nmoles/g de tejido
Hembras Castradas Control	17,10 ± 0,68
Hembras Castradas Estrés	17,20 ± 0,78
Hembras Castradas Suplementadas Control	11,80 ± 2,61
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	16,80 ± 2,33

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

q) MDA Renal

Se halló efecto por la suplementación ($F_{(1,19)} = 40,1; p = 0,000004$) y efecto del estrés ($F_{(1,19)} = 5,9; p = 0,025$). Los animales suplementados y los estresados mostraron mayores niveles de MDA renal que sus respectivos controles ($p = 0,000004$ y $p = 0,0025$ respectivamente) (Gráficos 22 y 23).

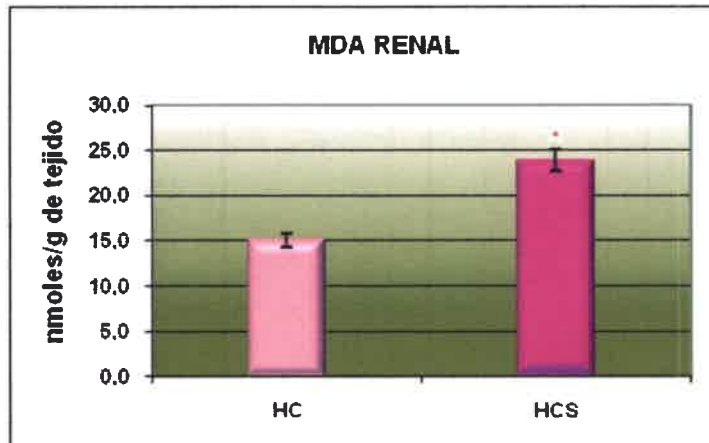


Gráfico 22: MDA Renal (nmoles/g de tejido) considerando el efecto de la suplementación. HC= Hembras Castradas, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM) ★ $p = 0,000004$.

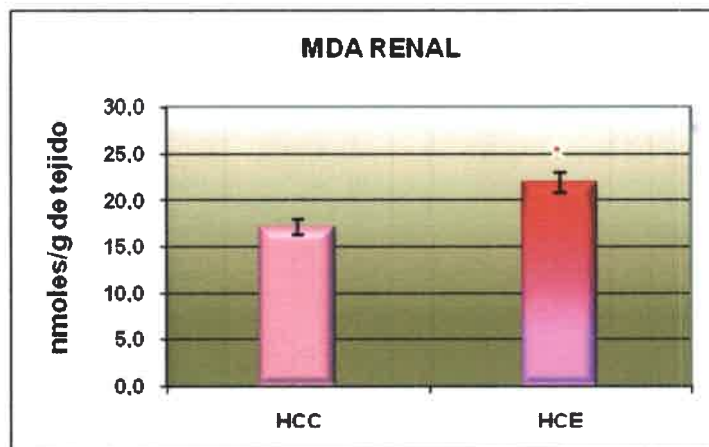


Gráfico 23: MDA Renal (nmoles/g de tejido) considerando el efecto del tratamiento. HCC= Hembras Castradas Controles, HCE Hembras Castradas Estrés. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM) ★ $p = 0,0025$.

COMPARACIÓN DE EXP1 Y EXP2

a) Excreción urinaria de Na⁺

Se halló interacción entre los factores ($F_{(3,63)} = 3,39$; $p = 0,023$). El estrés disminuyó la excreción de sodio en las hembras enteras ($p = 0,005$), en las castradas ($p = 0,0019$), en los machos ($p = 0,001$) y no mostró diferencias significativas entre las hembras castradas suplementadas. Por otra parte, las hembras castradas controles excretaron más sodio que las hembras enteras controles ($p = 0,0018$) y que las hembras castradas suplementadas controles ($p = 0,0015$) (Gráfico 24 y Tabla 26).

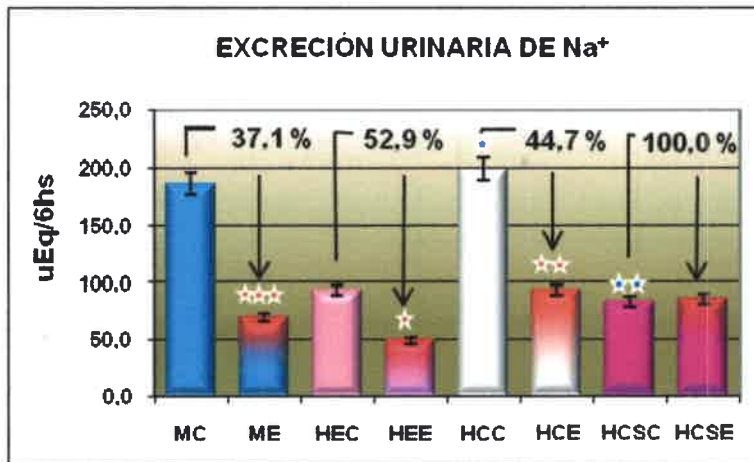


Gráfico 24: Excreción urinaria de sodio ($\mu\text{Eq}/6\text{hs}$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HEC= Hembras Enteras Control, HEE= Hembras Enteras Estrés, HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, MC= Machos Control, ME= Machos Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control, HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. ★ $p = 0,05$ vs HEC; ★★ $p = 0,0019$ vs HCC. ★★★ $p = 0,001$ vs MC; ★ $p = 0,0018$ vs HEC; ★★ $p = 0,0015$ vs HCC.

Tabla 26: Excreción urinaria de sodio.

EXCRECIÓN URINARIA DE Na ⁺	
GRUPO	%
Machos Estrés	37,1%
Hembras Enteras Estrés	52,9%
Hembras Castradas Estrés	44,7%
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	100,0%

Expresado como el porcentaje de excreción de sodio en los grupos estresados, con respecto a sus controles.

b) Volumen de orina

En este parámetro se observó efecto del grupo ($F_{(3,48)} = 8.84$; $p = 0,00009$) y del estrés ($F_{(1,48)} = 5,79$; $p = 0,018$). Los machos excretaron menor volumen de orina respecto de las hembras enteras ($p = 0,05$), de las castradas ($p = 0,00006$) y de las castradas suplementadas ($p = 0,014$). Además las hembras enteras produjeron menor volumen que las castradas ($p = 0,04$). Por otra parte, el estrés produjo una marcada disminución de la diuresis en todos los grupos (Tablas 27, 28 y 29).

Tabla 27: Volumen urinario según grupo (ml/6hs).

VOLUMEN DE ORINA	
GRUPO	ml/6Hs
Hembras Enteras	2,98 ± 2,09
Hembras Castradas	4,01 ± 1,40 ★★
Machos	1,56 ± 0,65 ★★
Hembras Castradas Suplementadas	3,02 ± 1,10 ★★

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0,004$ vs Hembras Enteras; ★★ $p = 0,05$ vs Hembras Enteras; ★ $p = 0,00006$ vs Machos; ★★ $p = 0,0014$ vs Machos.

Tabla 28: Volumen urinario según tratamiento (ml/6hs).

VOLUMEN DE ORINA	
GRUPO	ml/6Hs
Controles	3,14 ± 1,79
Estrés	2,40 ± 1,34 ★

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM). ★ $p = 0,018$

Tabla 29: Volumen urinario de todos los grupos (ml/6hs).

VOLUMEN DE ORINA	
GRUPO	ml/6Hs
Hembras Enteras Control	3,80 ± 0,70
Hembras Enteras Estrés	1,70 ± 0,42
Hembras Castradas Control	4,30 ± 0,72
Hembras Castradas Estrés	3,80 ± 0,53
Machos Control	1,70 ± 0,28
Machos Estrés	1,40 ± 0,09
Hembras Castradas Suplementadas Control	3,30 ± 0,34
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	2,70 ± 0,45

Los datos se expresan como la media ± el error estándar (SEM).

c) Actividad de SOD Renal

Se observó efecto del tratamiento ($F_{(1,32)} = 12.05$; $p = 0,0015$). Los animales sometidos a estrés presentaron una mayor actividad de la enzima que los controles (Gráfico 25 y Tabla 30).

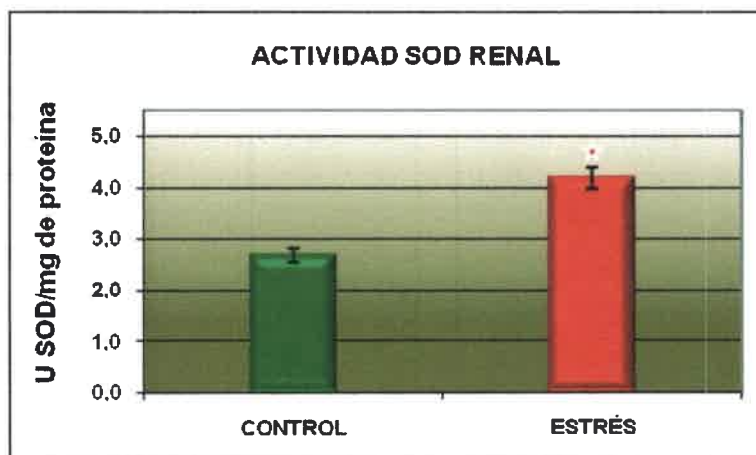


Gráfico 25: Actividad de SOD Renal (U SOD/mg de proteína). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). $\star p = 0,0015$.

Tabla 30: Actividad de SOD renal de todos los grupos (U SOD/mg de proteína).

ACTIVIDAD DE SOD RENAL	
GRUPO	U SOD/mg de proteína
Hembras Enteras Control	2,32 \pm 0,78
Hembras Enteras Estrés	5,11 \pm 0,36
Hembras Castradas Control	2,14 \pm 0,45
Hembras Castradas Estrés	5,33 \pm 0,95
Machos Control	3,15 \pm 0,24
Machos Estrés	3,54 \pm 0,39
Hembras Castradas Suplementadas Control	2,80 \pm 0,72
Hembras Castradas Suplementadas Estrés	3,35 \pm 0,90

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM).

d) Actividad de Catalasa Renal

En este parámetro se observó efecto del grupo ($F_{(3,40)} = 16.78$; $p = 0,0000001$). Las hembras enteras tuvieron una mayor actividad de esta enzima comparadas con las hembras castradas ($p = 0,0004$), los machos ($p = 0,0001$) y las hembras castradas suplementadas ($p = 0,0005$). Por otro lado, las hembras castradas suplementadas tuvieron una marcada disminución de la actividad enzimática renal comparadas con las hembras castradas sin suplemento ($p = 0,0012$) y con los machos ($p = 0,04$) (Gráfico 26).

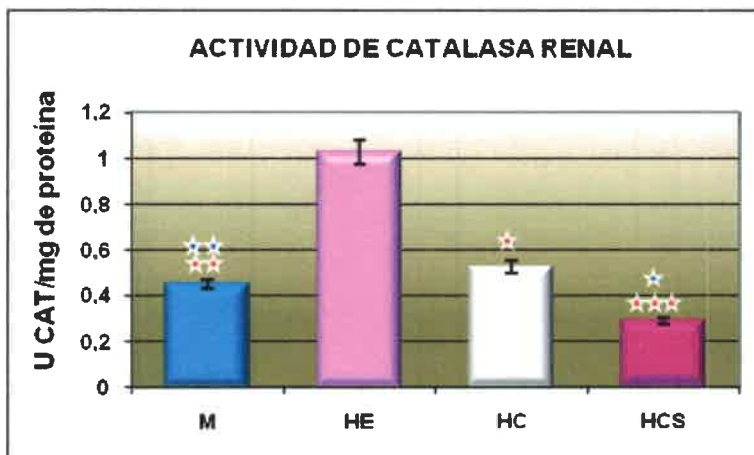


Gráfico 26: Actividad de catalasa renal por grupos (U CATALASA/mg de proteína). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HE= Hembras Enteras, HC= Hembras Castradas, M= Machos, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. ★ $p = 0,0004$ vs HE; ★★ $p = 0,0001$ vs HE. ★★★ $p = 0,00005$ vs HE; ★ $p = 0,0012$ vs HC; ★★ $p = 0,0048$ vs M.

e) Nitratos plasmáticos

Respecto de los nitratos se encontró efecto del tratamiento ($F_{(1,38)} = 5,61$; $p = 0,02$) y del grupo ($F_{(3,38)} = 4,59$; $p = 0,008$). El estrés disminuyó el nivel de nitratos plasmáticos comparado con los animales controles. Por otro lado, las hembras enteras tuvieron menos nitratos plasmáticos que los machos ($p = 0,007$) y que las hembras castradas suplementadas ($p = 0,03$). Además, las hembras castradas tuvieron menos nitratos que los machos ($p = 0,008$) y que las hembras suplementadas ($p = 0,036$) (Gráficos 27 y 28).

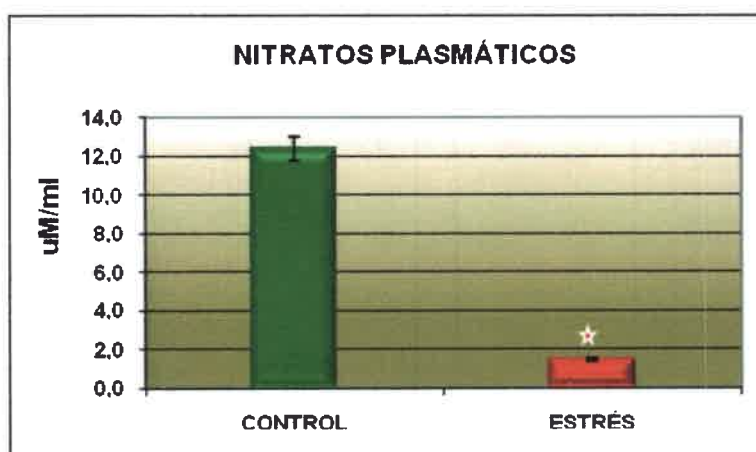


Gráfico 27: Nitratos plasmáticos considerando el efecto del tratamiento ($\mu\text{M/ml}$). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). ★ $p=0,02$.

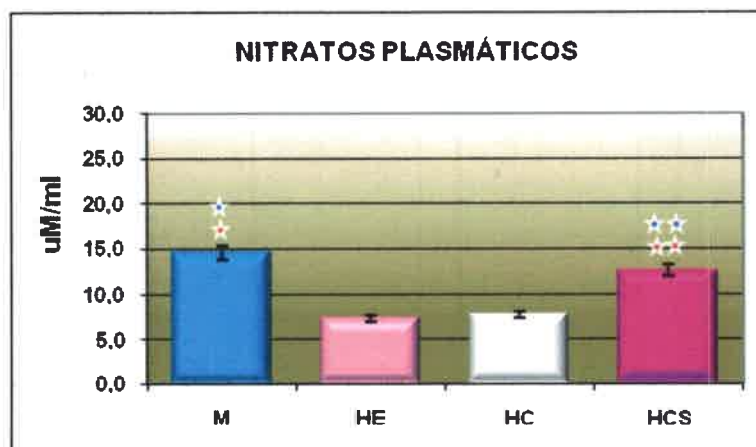


Gráfico 28: Nitratos plasmáticos considerando el efecto grupo ($\mu\text{M/ml}$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HE= Hembras Enteras, HC= Hembras Castradas, M= Machos, HCS= Hembras Castradas Suplementadas. ★ $p = 0,007$ vs HE; ★★ $p = 0,03$ vs HE; ★ $p = 0,008$ vs HC; ★★ $p = 0,0036$ vs HC.

f) Nitritos totales

En cuanto a los nitritos totales se halló interacción entre los factores ($F_{(3,36)} = 6,31$; $p = 0,00029$) El estrés disminuyó los nitritos totales en las hembras enteras ($p = 0,0003$) y en los machos ($p = 0,038$). No hubo diferencias entre las hembras castradas suplementadas estresadas y sus controles. Comparando sólo los grupos controles, las hembras castradas sin suplemento mostraron menos nitritos totales que las hembras enteras ($p = 0,0003$), que los machos ($p = 0,00006$) y que las hembras castradas suplementadas ($p = 0,016$). La comparación entre los grupos estresados mostró que las hembras enteras tuvieron menos nitritos totales que las castradas ($p = 0,044$), los machos ($p = 0,017$) y las castradas suplementadas ($p = 0,008$) (Gráfico 29).

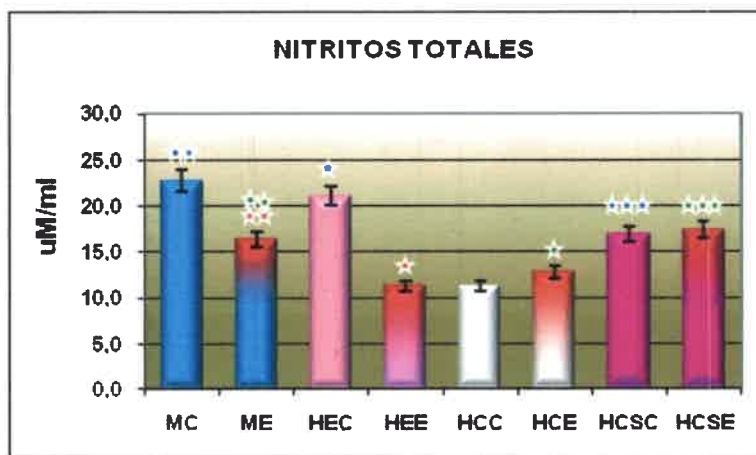


Gráfico 29: Nitritos totales según grupo ($\mu\text{M/ml}$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HEC= Hembras Enteras Control, HEE= Hembras Enteras Estrés, HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, MC= Machos Control, ME= Machos Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control y HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. ★ $p = 0,0003$ vs HEC; ★★ $p = 0,038$ vs MC; ★ $p = 0,0003$ vs HCC; ★★ $p = 0,00006$ vs HCC; ★★★ $p = 0,016$ vs HCC; ★ $p = 0,044$ vs HEE; ★★ $p = 0,017$ vs HEE; ★★★ $p = 0,008$ vs HEE.

g) Relación NO₂/NO₃

Para la relación NO₂/NO₃ se encontró interacción entre los factores ($F_{(3,35)} = 3.01$; $p = 0,042$). El test *a posteriori* mostró una mayor relación NO₂/NO₃ en los machos estresados respecto de sus controles ($p = 0,0004$). Además, las hembras enteras controles mostraron un incremento de éste parámetro comparadas con los machos controles ($p = 0,000027$). También se comprobó mayor relación de las hembras enteras estresadas respecto de los machos estresados ($p = 0,0004$) y con las hembras castradas suplementadas estresadas ($p = 0,045$). Por otra parte, los machos estresados tuvieron menor relación NO₂/NO₃ comparados con las hembras castradas estresadas ($p = 0,0001$) y con las hembras castradas suplementadas estresadas ($p = 0,008$) (Gráfico 30).

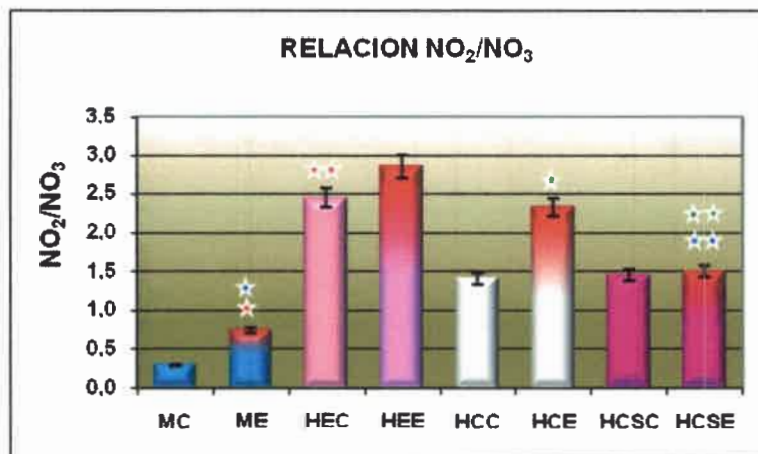


Gráfico 30: Relación Nitritos/Nitratos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HEC= Hembras Enteras Control, HEE= Hembras Enteras Estrés, HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, MC= Machos Control, ME= Machos Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control y HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. ★ $p = 0,0004$ vs MC; ★★ $p = 0,000027$ vs MC; ★ $p = 0,00004$ vs HEE; ★★ $p = 0,045$ vs HEE; ★ $p = 0,0001$ vs ME; ★★ $p = 0,008$ vs ME.

h) Niveles de MDA Renal

Se halló interacción entre los factores ($F_{(3,40)} = 73.6$; $p = 0,0000001$). Los niveles de MDA se incrementaron en respuesta al estrés sólo en las hembras enteras ($p = 0,00002$) y en los machos ($p = 0,0001$), respecto de sus controles. Las hembras castradas estresadas ($p = 0,0002$) y las hembras castradas suplementadas estresadas ($p = 0,0005$) mostraron menores niveles que los machos estresados.

Además, las hembras enteras controles mostraron menos MDA que los machos controles ($p = 0,0015$).

Las hembras castradas controles y las hembras castradas suplementadas controles mostraron también valores más bajos de MDA en el riñón que los machos controles ($p = 0,0002$ y $p = 0,0005$ respectivamente). (Gráfico 31).

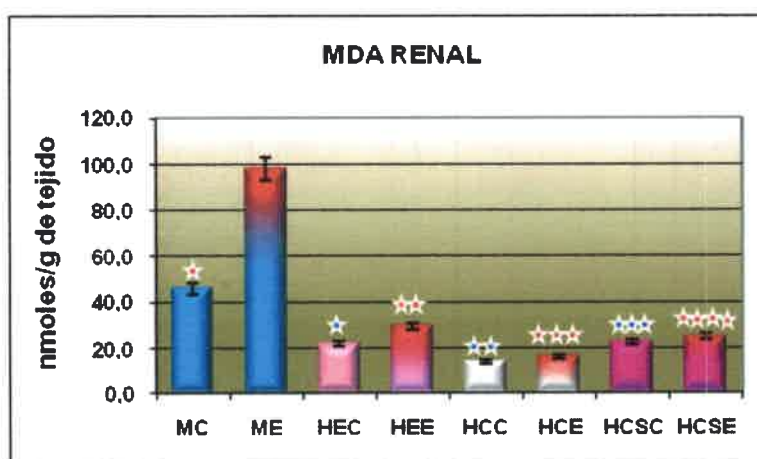


Gráfico 31: MDA renal (nmoles/g de tejido) en todos los grupos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM). HEC= Hembras Enteras Control, HEE= Hembras Enteras Estrés, HCC= Hembras Castradas Control, HCE= Hembras Castradas Estrés, MC= Machos Control, ME= Machos Estrés, HCSC= Hembras Castradas Suplementadas Control y HCSE= Hembras Castradas Suplementadas Estrés. ★ $p = 0,0001$ vs MC; ★★ $p = 0,00002$ vs HEC; ★★★ $p = 0,0002$ vs ME; ★★★★★ $p = 0,0005$ vs ME; ★ $p = 0,0002$ vs MC; ★★ $p = 0,0005$ vs MC.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo experimental nos hemos propuesto investigar la existencia de diferencias de género en la excreción renal de sodio, en el estrés oxidativo y en el sistema defensivo antioxidante frente a situaciones de estrés crónico, tratando de dilucidar el rol de los estrógenos en dichas diferencias.

Para ello, la primera parte de nuestro experimento realizado en hembras y machos enteros, nos ha servido para investigar si existen diferencias en respuesta al estrés según el sexo. De este modo, cada vez que hubo diferencias entre machos y hembras en alguno de los parámetros medidos, recurrimos a la segunda parte de nuestro estudio realizado en el grupo de hembras OVX con y sin suplemento de estradiol, de manera de corroborar la influencia de los estrógenos para el parámetro en cuestión.

Es ampliamente conocido que la activación del sistema Simpático Adreno Medular y del eje Hipotálamo Pituitario Adrenal constituyen los principales componentes de la respuesta neuroendocrina a situaciones de estrés, tanto agudo como crónico. La acción combinada de las hormonas (cortisol, adrenalina y noradrenalina) y del sistema nervioso autónomo, permite una serie de actividades vegetativas que involucran la activación de varios sistemas en forma simultánea entre los que se encuentran el sistema cardiovascular, muscular y digestivo, y de diversas vías metabólicas para proveer las demandas energéticas inmediatas del sistema motor (Joseph-Bravo, 2007). La adrenalina y la noradrenalina ejercen efectos metabólicos, entre ellos glucogenolisis hepática a través de la unión a los receptores adrenérgicos α_1 que induce al aumento del Ca_2^{++} intracelular y receptores β_2 ,

que incrementa el AMPc (3', 5' monofosfato de adenosina cíclico) activando a la fosforilasa en el hígado (Gannong, 2002). Es por ello que se relaciona a la hiperglucemia inducida por el estrés, con la liberación de adrenalina (Márquez y col, 2004). Además, el estrés pone en funcionamiento mecanismos secundarios que contribuyen al aumento de la glucemia ya que inducen gluconeogénesis (Sapolsky y col. 2000) y glucogenolisis hepática por acción de los glucocorticoides (Kannan y col. 2000).

En este trabajo se observó un aumento de la glucemia en respuesta al estrés, siendo este incremento de la misma magnitud en ambos sexos. Debido a que se considera a la glucemia como uno de los marcadores de la actividad simpática (Armario, 1988), nuestros resultados indicarían que la respuesta del SAM al estrés, no estaría influida por el sexo.

Por otra parte, en este trabajo se observaron diferencias en los niveles basales de corticosterona entre hembras enteras y machos. El valor basal en las hembras fue 3 veces mayor que el de los machos. Es probable que los estrógenos tengan algún rol sobre el mecanismo de retroalimentación del eje HHA, ya que se ha reportado una mayor resistencia de las hembras a inhibir el feed back del eje HHA en condiciones basales (Salomon y Herman, 2009).

Con respecto a la respuesta del eje HHA al estrés se ha observado un mayor incremento en los niveles de corticosterona plasmática en las ratas machos estresadas, con un incremento de 13 veces su nivel basal, en tanto que las hembras sólo duplicaron dicho valor. Numerosos estudios han

mostrado que la activación del eje HHA en respuesta al estrés, es un rasgo sexualmente divergente tanto en animales como en los seres humanos, aunque los resultados son contradictorios (Paris y col, 2008; Young y col, 2008). Algunos autores han observado una respuesta del eje HHA más potente en los roedores hembras que en los machos, debido a una rápida y mayor secreción de ACTH y corticosterona en respuesta a un estresor agudo (Young, 1988; Young y col, 2008). Además, numerosos estudios realizados en animales también han demostrado que los niveles de glucocorticoides son mayores en las hembras que en los machos después de la estimulación del eje HHA (Haleem y col, 1988; Heinsbroek y col, 1991; Yoshimura y col, 2003). En el mismo sentido, Spinedi y col (1994) han informado que las hembras de algunas cepas de ratas parecen liberar más ACTH en respuesta a CRH y AVP en comparación con los machos.

Los esteroides gonadales pueden influir en los mecanismos de regulación del eje HHA a través de sus efectos sobre los receptores de los glucocorticoides, sobre los sistemas cerebrales de la CRH, sobre la respuesta de la hipófisis y la respuesta adrenal a la ACTH (Young y col, 2008). Se ha observado que las ratas hembras en la fase de proestro, cuando los estrógenos presentan sus niveles más altos, incrementan su respuesta al estrés en comparación a las hembras en otras fases del ciclo estral, incremento que es abolido con la ovariectomía y que se reinstaura con la administración exógena de estradiol (Paris y col, 2008; Young y col, 2008). De hecho, se ha comprobado que el estradiol estimula directamente la expresión de ARNm de la CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo, provocando un incremento

mayor en la liberación de ACTH/corticosterona en respuesta a un estresor en las ratas hembras en la fase de proestro que en las ratas machos (Iwasaki-Sekino y col, 2009). Sin embargo, las hembras ovariectomizadas siguen mostrando una mayor hiperreactividad al estrés que los machos intactos, posiblemente debido a un efecto inhibitorio de la testosterona sobre la respuesta al estrés (Paris y col, 2008; Young y col, 2008). Además, el estradiol puede incrementar la sensibilidad de la glándula adrenal a la ACTH circulante, ofreciendo un mecanismo periférico adicional para la hipersecreción de glucocorticoides en las hembras (Young y col, 2008).

Por otra parte, las hembras castradas incrementaron los niveles de corticosterona en respuesta al estrés, efecto que no fue observado en las hembras castradas y suplementadas con estradiol, lo que indicaría un efecto protector de los estrógenos frente al estrés en este parámetro. Estudios en roedores han demostrado que el tratamiento con estradiol exógeno incrementa o disminuye la respuesta de estrés dependiendo de la dosis y/o el periodo de exposición a los estrógenos (Solomon y Herman, 2009).

Coincidentemente, se ha observado en humanos que los hombres adultos responden al estrés psicológico con mayores incrementos de cortisol en comparación con las mujeres. Otras investigaciones indican que los estrógenos pueden tener un papel neuroprotector sobre la secreción y acción de los glucocorticoides en el cerebro (McEwen, 2002). Kudielka y col (2004) han indicado que los hombres presentan una respuesta mayor del eje HHA ante un estrés agudo. En igual sentido, mujeres adultas entre la pubertad y la

menopausia, presentan una menor respuesta del eje HHA que los hombres de la misma edad y esta respuesta se incrementa acercándose a los niveles de los hombres, después de la menopausia y durante la fase luteínica del ciclo menstrual (Kudielka y Kirschbaum, 2005).

Por otra parte y como muestran varios estudios en animales, los andrógenos ejercen efectos contradictorios en la regulación a diferentes niveles del eje HHA (Handa y col, 1994; Viau y Meaney, 1996), pero debe tenerse en cuenta que la testosterona también puede ejercer efectos estrogénicos después de ser metabolizada a estrógeno por aromatización tanto en cerebro como en tejidos periféricos (Bagatell y col, 1994; Naftolin, 1994).

En el presente trabajo de tesis se encontró una menor respuesta al estrés en las hembras, coincidiendo con los resultados obtenidos por McEwen (2002) y Kudielka y col (2004), poniendo en evidencia el rol protector de los estrógenos en la respuesta del eje HHA al estrés.

La mayor reactividad al estrés observada en los machos se relacionaría con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes, asociadas con elevados niveles de cortisol, y podría ayudar a explicar la mayor prevalencia de estas enfermedades en los hombres. Por otro lado, la menor respuesta de cortisol observada en hembras podría estar relacionada con un hiporreactividad del eje HHA, que se asocia con un mayor riesgo para las enfermedades autoinmunes, una condición mucho más frecuente en las mujeres (Kudielka y col, 2005).

Por otra parte, se encontró correspondencia entre los niveles de corticosterona y el IAS en respuesta al estrés en ambos sexos, reflejando un aumento en la función de la glándula adrenal. Estos resultados son coincidentes con los de otros investigadores (McEwen, 2000; Brotto, 2003; Wright y col, 2006) quienes encuentran que el estrés crónico incrementa los niveles de corticosterona y el peso de la glándula adrenal en las ratas. Además, Ricart-Jané y col (2002) encontraron que el estrés crónico a través de la liberación de la hormona adrenocorticotrófica, estimularía constantemente a la glándula adrenal, produciendo su hipertrofia con modificaciones ultraestructurales.

La homeostasis energética es un proceso que también se ve comprometido frente al estrés y comprende diferentes mecanismos de control que permiten ajustes para responder adecuadamente a las demandas de energía. Numerosas investigaciones han explorado la relación entre el estrés y la alimentación, las cuales han demostrado en modelos humanos y animales, que el estrés puede contribuir al incremento en la incidencia de obesidad (Epel y col 1999; Wilson y Cantor, 1986), anorexia (Joseph–Bravo y de Gortari, 2007) y pérdida de peso corporal (Harris y col, 1998). Estados de balance energético negativo como ocurre durante el ayuno, la desnutrición, las dietas de restricción de alimentos, el estrés, las enfermedades y en la lactancia, inducen a una serie de alteraciones neuroendocrinas. Situaciones de deficiencia energética (a partir de un 10% de pérdida de peso corporal) inducen una reducción de hasta 40% del gasto energético, permitiendo al organismo adaptar el gasto metabólico y

cubrir sus demandas metabólicas más esenciales (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007).

Diversos experimentos sugieren que el estrés produce dos fenómenos generales. Por una parte puede inducir anorexia y reducción en la ingesta de alimento (Harris y col, 1998; Rybkyn y col, 1997; Vallés y col, 2000). Por la otra, puede propiciar obesidad a partir de la sobre-ingesta o "grandes comilonas" (Boggiano y col, 2005; Corwin y Buda-Levin, 2004; Hagan y col, 2003; Pecoraro y col, 2004). Esta divergencia de efectos parece estar relacionada con las diferentes variables que interactúan con la situación de estrés, tales como la propia naturaleza de los estímulos utilizados como estresores, el tipo de alimento disponible, el tiempo de exposición al estímulo y las diferencias de género.

En nuestro trabajo observamos que los machos controles ganaron menos peso corporal que las hembras controles. Por otra parte, todos los animales estresados ganaron menos peso que sus controles y sólo el grupo de hembras castradas estresadas perdió peso durante el experimento. Como es conocido, la ganancia de peso corporal depende de la ingesta y del gasto metabólico. Se ha sugerido que un estrés fuerte tiene efectos anoréxicos (García y Armario, 2000), por lo que la menor ganancia de peso en los animales estresados podría ser consecuencia de una menor ingesta. Sin embargo, este parámetro no ha sido determinado en el presente trabajo. Por otra parte, la menor ganancia de peso corporal se corresponde con una mayor actividad del eje HHA, medida a través de los niveles de corticosterona

plasmática. Se ha indicado que el efecto catabólico de los glucocorticoides junto con la activación del sistema nervioso simpático, jugarían un rol muy importante en los cambios metabólicos observados durante el estrés (Buwalda y col, 1997; Kemppainen y Behrend, 1997; Dallman y col, 2003), y podrían ser la causa de la menor ganancia de peso en las ratas sometidas a estrés crónico.

En síntesis, del análisis de los indicadores de la activación de los ejes HHA y SAM en respuesta al estrés en ambos sexos podemos concluir que los machos tendrían una mayor respuesta corticoadrenal que las hembras, mientras que la respuesta méduloadrenal fue de una magnitud similar en ambos sexos. Además, el estrés parece afectar la ganancia de peso corporal de manera más significativa en los machos.

Con respecto a la excreción renal de sodio, se encontraron diferencias entre los animales controles. Las ratas hembras excretaron menos sodio que los machos. La ovariectomía aumentó la excreción de sodio, alcanzando valores similares a los excretados por los machos, y la suplementación con estradiol redujo la excreción a niveles similares a la de las hembras enteras. Estos resultados sugieren una posible participación de los estrógenos en esta variable. Se ha señalado el efecto de los estrógenos sobre el equilibrio electrolítico dada la similitud química entre las hormonas estrogénicas y las hormonas suprarrenales. Tanto los estrógenos como la aldosterona y otras hormonas de la corteza suprarrenal provocan retención de sodio y agua por parte de los túbulos renales (Guyton y Hall, 2006). Además, los estrógenos tienen acción estimulante en la síntesis de proteínas hepáticas que favorecen

el incremento plasmático del angiotensinógeno (sustrato de la renina) y, en consecuencia, facilitan la acción del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Por lo expresado anteriormente se explica la retención hidrosalina que caracteriza a los estados fisiológicos en los cuales los estrógenos se encuentran elevados como en la fase ovulatoria de algunas especies, tratamientos con estrógenos, etc.

En contrapartida, la progesterona (con niveles altos después de la ovulación) disminuye dicha retención hidrosalina por su conocido efecto natriurético antagonista de la aldosterona (Guyton, 2009).

Por otra parte, una menor excreción renal de sodio se observó en respuesta al estrés en ambos sexos, aunque la magnitud de la respuesta fue menor en las hembras enteras.

Es conocido que la excreción renal de sodio está determinada por la tasa de filtración glomerular y la reabsorción tubular, ambos procesos regulados de manera precisa (Guyton, 2009). Con respecto al filtrado glomerular, la DCE (medida indirecta de la TFG) fue mayor en los animales estresados de ambos sexos, lo que indicaría que la menor excreción de sodio observada en los animales estresados no sería consecuencia de una modificación en la tasa de filtrado sino que se debería a cambios en la reabsorción tubular.

La respuesta antinatriurética al estrés por IMO se ha observado en varios experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio en ratas Wistar macho (Bensi, 1999; Niebylski y col, 2000; Niebylski y col, 2008; Niebylski y col, 2011). En dichos trabajos se encontró que la antinatriuresis estaría mediada a nivel proximal por un incremento de la actividad del SNS a través de los receptores α_2 adrenérgicos y a nivel de la nefrona distal por acción hormonal mediada por el SRAA. Es conocida la participación del SNS renal en la reabsorción tubular de sodio. En este sentido, Koepke (1985) observó antinatriuresis inducida por el estrés en ratas con predisposición genética a la HTA, respuesta que fue eliminada cuando se les practicó denervación renal o bloqueo de los receptores α -adrenérgicos. Varios autores explican la acción de los nervios simpáticos renales sobre la reabsorción tubular de sodio, algunos postulan la acción directa de la noradrenalina liberada sobre los receptores β_1 -adrenérgicos en las células yuxtaglomerulares, aumentando la liberación de renina (Gannong, 2002); mientras que otros involucran la activación de receptores α -adrenérgicos de las células del túbulo proximal (Bertuzzi y col, 2003) y la rama ascendente del asa de Henle (Greenberg y col, 1995).

Como se expresó anteriormente, la estimulación del SNS renal aumenta la síntesis y la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares renales aumentando de esta manera la Ang II y la aldosterona en el plasma. Tanto la Ang II como la aldosterona participan en la reabsorción tubular de Na^+ . La aldosterona promueve el transporte de sodio y potasio en las células del túbulo contorneado distal y colector del riñón, a través del incremento del número de

canales epiteliales de sodio (ENaC) abiertos en sus membranas apicales. También se presenta un incremento en el número de moléculas de Na⁺/K⁺-ATPasa en la membrana basolateral que bombean sodio fuera de las células. Niebylski y col (2008) encontraron un incremento en los niveles plasmáticos de aldosterona en respuesta a la IMO en ratas machos Wistar, indicando que esta hormona podría ser un factor que influye sobre la reabsorción de sodio en condiciones de estrés. Es conocido además, que altos niveles plasmáticos de glucocorticoides intervienen en la reabsorción renal de sodio, mediado por los receptores de mineralocorticoides y de glucocorticoides (Clare y col, 1988).

En síntesis, la antinatriuresis en respuesta a la IMO observada en el presente trabajo sería consecuencia de un efecto tubular más que hemodinámico. Además, la mayor reabsorción tubular sería consecuencia de la estimulación del SNS renal, del SRAA y del aumento en los niveles plasmáticos de aldosterona y corticosterona.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se encontró una respuesta antinatriurética menor en las ratas hembras que en los machos sometidos a estrés. Coincidentemente, Harshfield y col (2009) mostraron diferencias en la excreción renal de sodio entre mujeres y varones afroamericanos sometidos a estrés, probablemente debidas a una menor natriuresis en respuesta al aumento de presión en los varones (presión-natriuresis). Este investigador mantiene la hipótesis de esa menor respuesta antinatriurética de las mujeres respecto de los hombres debido a una menor respuesta renal al aumento de la presión arterial y también postula que las

mujeres tendrían una menor respuesta a la Ang II. En este sentido, se ha reportado que las hembras tienen una mayor expresión de los receptores de angiotensina Tipo 2 (AT₂R). La Ang II puede unirse a 2 tipos de receptores, los AT₁R y AT₂R. Los AT₁R están ampliamente distribuidos en el organismo y son responsables de los efectos clásicos de la Ang II. Los AT₂R son menos numerosos y se hallan circunscriptos en algunos órganos y en general tienen efectos opuestos a los AT₁R. La mayor proporción de AT₂R presentes en las hembras modula la curva de presión-natriuresis y lleva a una mayor excreción de sodio que los machos para una misma presión de perfusión (Hilliard y col 2011; Khraibi, 2002).

Se ha indicado además, que existen diferencias en la expresión de genes que regulan la fisiología renal entre machos y hembras. La expresión de estos genes es estimulada por las hormonas masculinas, produciendo alteraciones en el Asa de Henle y/o en los vasos sanguíneos de la médula externa renal, lo que disminuiría la natriuresis por presión en los machos. Estos efectos son suprimidos por las hormonas femeninas. En el presente trabajo de tesis se observó que las hembras OVX responden al estrés de manera similar a los machos, en cambio las hembras OVX y suplementadas con estradiol, no presentaron antinatriuresis en respuesta al estrés, reforzando la hipótesis de la participación de los estrógenos sobre este parámetro. Cabe aclarar que la dosis de estrógenos utilizada en la suplementación de los animales en el presente trabajo, fue mayor a los niveles fisiológicos de esta hormona, lo que podría explicar la ausencia de cambios en la excreción de sodio inducido por el estrés en las ratas suplementadas. Por otra parte, se ha informado que existen

diferencias histológicas en las células del túbulo contorneado proximal entre sexos, aunque el significado de estas diferencias no es del todo claro (Gerhold y col, 2007).

Por último, los estrógenos, con sus efectos neuroprotectores, podrían contribuir a la resistencia de las hembras al estrés lo que llevaría a una menor respuesta renal. Se ha demostrado en animales con terapia hormonal sustitutiva, que estas hormonas modulan, en función de la dosis administrada, la actividad del eje HHA y del sistema nervioso autónomo (Altemus, 2009; Horst y col, 2009). En este trabajo se encontró un menor incremento en los niveles de corticosterona en respuesta al estrés en las hembras que en los machos, lo que estaría reflejando una menor activación de este eje. La menor respuesta a la IMO en las ratas hembras podría estar influyendo en la menor respuesta renal.

En síntesis, en nuestro experimento la menor antinatriuresis en respuesta al estrés observada en las ratas hembras, podría deberse a una menor respuesta al estrés (evidenciada por un menor nivel plasmático de corticosterona), al aumento de la natriuresis en respuesta al aumento de la presión arterial y a una menor reactividad del SRAA debido a la mayor expresión de los AT_2R en las hembras. Es importante destacar que las hembras excretan menos Na^+ basal que los machos, debido a la acción retensora de los estrógenos. Sin embargo, estas hormonas femeninas actúan regulando la respuesta renal al estrés. Los machos estarían más desprotegidos en este aspecto ya que las hormonas masculinas, además de disminuir la natriuresis por presión (explicado

anteriormente), producen una activación del SRAA intrarrenal. Es conocido que este sistema influye en la reabsorción de Na^+ y agua en la nefrona. La mayor actividad del SRAA en los machos contribuiría a explicar la mayor incidencia de HTA y la progresión del daño renal en este sexo (Rands y col, 2012).

La menor capacidad renal para excretar sodio en situaciones de estrés es un factor de riesgo en la inducción de la hipertensión arterial debido al posible aumento del volumen plasmático (Bensi y col, 1997; Niebylski y col, 2000; Niebylski y col, 2008; Niebylski y col 2011). En efecto, se ha hipotetizado que una ineficaz regulación renal del sodio, puede convertirse en la base del desarrollo y mantenimiento de la HTA, sobre todo cuando existe predisposición genética a esta patología (Zheng y col, 2010). En este trabajo se ha observado un efecto antidiurético en respuesta al estrés. La antidiuresis podría ser consecuencia del efecto osmótico creado por la reabsorción de sodio y podría llevar a un aumento lento y progresivo del volumen plasmático.

Varios estudios relacionan a la retención de sodio en respuesta al estrés, con cambios en órganos blancos tales como el corazón, riñones y los vasos sanguíneos. El aumento en la reabsorción renal de sodio y el aumento en la natriemia se relacionan con el aumento de la presión arterial no sólo porque llevan a un aumento en el volumen del LEC, sino que el aumento en el Na^+ plasmático puede producir rigidez vascular, disminución de la disponibilidad de NO y disfunción endotelial (Harshfield, 2009).

Por otra parte, los radicales libres (RL) podrían estar involucrados en la antinatriuresis inducida por el estrés. En condiciones normales, las células de un organismo son capaces de mantener un equilibrio adecuado entre oxidantes y antioxidantes. Cuando este equilibrio se perturba, se establece un cambio en la ecuación que tiende al desorden oxidativo; y se desarrolla un proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares, volviendo a las células y los tejidos más susceptibles a lesiones (Sies, 1997). Uno de los tejidos más sensibles es el nervioso; y es conocido que el estrés oxidativo está implicado en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Richardson, 1993; Ben-Sachar y Riederer, 1991).

En el riñón las ROS están involucradas en la eritropoyesis, en el manejo del sodio y en la homeostasis de los fluidos corporales. Aunque la nefrona es una unidad estructural continua, su funcionalidad depende del segmento o sector referido. La especialización de la función se debe a la expresión de diferentes genes que activan vías específicas, entre ellas la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa en diferentes segmentos de la nefrona. Cuando el equilibrio se ve alterado predominando el estado oxidativo, las ROS originan lesiones morfológicas y modificaciones en la permeabilidad y filtración glomerular y en el flujo sanguíneo, debido a daños directos o indirectos a las células de la membrana basal o del mesangio. También originan alteraciones tanto en la liberación como en la unión de sustancias vasoactivas tales como prostaglandina E₂, prostaciclina, tromboxanos, citoquinas y NO (Nistala y col, 2008).

En este trabajo los niveles de MDA renal, utilizados como indicadores de estrés oxidativo, fueron más altos en los machos controles que en las hembras. En respuesta al estrés, si bien ambos sexos mostraron incremento en el MDA renal, este incremento fue mayor en los machos. En cuanto al incremento de MDA en respuesta al estrés, los resultados son coincidentes con aquellos obtenidos por varios autores (McIntosh y col, 1996; Liu y col, 1994; Sosnovsky y Kozlov, 1992), quienes encontraron un incremento en el estrés oxidativo, particularmente en la peroxidación lipídica, en respuesta a la IMO. Este incremento podría estar mediado por el aumento de los glucocorticoides ya que se ha demostrado un incremento en la generación de ROS en cultivos celulares (McIntosh y col 1996; Liu y col, 1994). Además, se ha demostrado una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GSPx en el cerebro de ratas tratadas con glucocorticoides (McIntosh y col, 1996). Esto indicaría que el estrés disminuiría también la defensa antioxidante llevando a daño oxidativo.

En cuanto a las diferencias de respuesta según el sexo, Sartori-Valinotti y col (2007), reportan que los hombres muestran mayores niveles de marcadores de estrés oxidativo, medidos por los elevados niveles de 15-F₂-isoprostanos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (como el malonildialdehído) en el plasma. Además, se han observado diferencias de género en los niveles de producción de peróxido de hidrógeno en el plasma de los hombres en comparación con las mujeres (Lacy y col, 2000).

Otras evidencias experimentales sugieren diferencias de género en los efectos oxidativos del estrés crónico en varios tejidos y que los estrógenos tienen propiedades antioxidantes, al inhibir la peroxidación lipídica (Sawada y col, 1998), lo que explicaría en parte los menores niveles de MDA encontrados en las hembras.

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar el efecto del estradiol sobre el estrés oxidativo, algunos mediados por los receptores de estrógenos y otros que involucran una vía antioxidante independiente de receptores. En la vía mediada por receptores, la acción del estradiol sobre la lipoperoxidación podría estar relacionada con una disminución en el Ca^{++} libre intracelular inducido por estímulos tóxicos, metabólicos u oxidativos (Brooke y col, 1997; Goodman y col, 1996). La vía antioxidante independiente de receptores indicaría que la capacidad antioxidante del estradiol estaría mediada por el anillo fenólico del esteroide, el cual es un potente dador de electrones y por ello previene el daño producido por la lipoperoxidación. Se ha sugerido además que los estrógenos incrementan la expresión de la SOD y suprimen la actividad de la NADPH oxidasa (Ji y col, 2007). Como se mencionó anteriormente, en nuestro trabajo encontramos que todas las hembras tienen menor lipoperoxidación que los machos en el tejido renal. Además, la respuesta al estrés fue menor e incluso se suprime el incremento en el MDA renal en respuesta al estrés en las hembras suplementadas. Esta menor reactividad de las hembras al estrés oxidativo podría asociarse con la distinta respuesta en la excreción renal de sodio observada entre ambos sexos. Con respecto a la lipoperoxidación hepática se observó un aumento en el MDA en

respuesta al estrés sólo en los machos, lo que refuerza la idea de la acción protectora del sexo femenino en el aumento de las especies reactivas del oxígeno.

Por otra parte, el estrés aumentó la actividad de la SOD renal en las hembras y no produjo cambios en los machos. Se ha demostrado que los estrógenos y fitoestrógenos aumentan la expresión de enzimas antioxidantes vía receptores de estrógenos y activación de la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Vina y col, 2011). En este sentido también se encontró una mayor actividad en la CAT renal en hembras tanto controles como en las sometidas a IMO. El incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes podría ser la causa de la menor lipoperoxidación observada en el tejido renal de las hembras. A pesar de lo expresado en la bibliografía, se observó en el presente trabajo, que tanto las hembras castradas como las suplementadas también mostraron un aumento en la actividad de la SOD. Estos resultados relativizarían la acción de los estrógenos como mejoradores de la capacidad antioxidante. Sin embargo, como la suplementación utilizada ha provocado una concentración hormonal suprafisiológica, se estarían aportando antioxidantes directos, evitando así la necesidad de expresar la vía antioxidante enzimática. El aumento en la actividad de la SOD en las hembras OVX indicaría la existencia de otras vías, independientes de los estrógenos, para incrementar la actividad de esta enzima. Estos resultados indicarían que los estrógenos no serían los únicos actores involucrados en la menor respuesta al estrés oxidativo en las hembras.

Con respecto a la actividad de la CAT renal, las ratas OVX presentaron niveles similares a los de los machos, lo que indicaría un efecto estimulador de los estrógenos en la actividad de esta enzima. Nuevamente el exceso de estradiol en las hembras suplementadas estaría ejerciendo un efecto antioxidante *per se*, provocando una menor activación del sistema de defensa antioxidante endógeno, lo que se evidenció en una menor actividad de esta enzima en las ratas suplementadas.

En cuanto a los NOx, medidos como un indicador indirecto de los niveles de NO, no se observaron diferencias en los animales controles de ambos sexos, sin embargo la IMO produjo una disminución en estos niveles tanto en machos como en hembras. Numerosos datos bibliográficos muestran un efecto protector de los estrógenos en el sistema cardiovascular en respuesta al estrés. Algunos trabajos muestran que la estimulación del endotelio vascular con concentraciones fisiológicas de estradiol lleva a un rápido incremento en la activación de la nNOS además de la eNOS, ambas presentes en el endotelio, llevando a un incremento en el NO. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que esta activación es dependiente de la dosis de estrógeno utilizada (Lekonsteva y col, 2011).

Es conocido que los estrógenos utilizan el sistema de señalización del óxido nítrico del endotelio vascular por el cual se genera óxido nítrico, lo que causa un aumento en las concentraciones de GMP cíclico en las células del músculo liso vascular adyacente (CMLV), que conduce a la activación de la proteína cinasa tipo I dependiente de GMP cíclico, el principal efector de la

dilatación de las CMLV y la inhibición de la proliferación de las mismas (Mendelshon y Karas 1994; 2005). Ésta rápida producción celular de óxido nítrico endotelial está mediada por los receptores de estrógenos. Existen dos tipos de receptores de estrógenos, ER- α y ER- β , descubiertos en 1987 y 1996, respectivamente. El ER- α media la protección estrogénica contra la lesión vascular y la proliferación de las células del musculo liso vascular y el ER- β es necesario para mantener la presión arterial normal y de alguna manera controla los genes que codifican las proteínas que regulan el tono de las células del musculo liso vascular (Mendelshon, 2010).

Coincidente con numerosos datos existentes en la bibliografía acerca del rol potenciador de los estrógenos en la generación de NO vascular, en el presente trabajo se observó que los NOx fueron menores en los animales OVX, valores que aumentaron al recibir la terapia estrogénica. Por otra parte, la disminución en los NOx en los animales estresados podría ser consecuencia del aumento en las ROS. En condiciones de estrés oxidativo, los niveles de especies reactivas del oxígeno, tales como O_2^- , H_2O_2 y OH^- se encuentran elevados e inactivan al NO reduciendo su biodisponibilidad, y por lo tanto sus metabolitos. En nuestro trabajo se encontró un incremento en los niveles de MDA en respuesta al estrés, indicativo que hay una mayor producción de radicales libres y esto podría estar afectando los niveles de NOXs plasmáticos en las ratas estresadas.

En un riñón normal, el óxido nítrico juega un papel fundamental en la regulación homeostática de la función vascular, glomerular y tubular,

manteniendo normales la presión de perfusión renal, la velocidad de filtrado glomerular y la resistencia vascular renal. Además, se ha demostrado que una reducida biodisponibilidad del NO altera el manejo renal del sodio, reduce el flujo sanguíneo medular y contribuye al desarrollo de falla renal (Masnatta y col, 2003; Beltowski y col, 2004; Bianchi y col, 2005). Por ello, la disminución en la biodisponibilidad del NO en los animales estresados constituye un importante factor de riesgo. Esta menor biodisponibilidad del NO observada en las ratas estresadas podría relacionarse también con la menor excreción de sodio observada en estos animales. En este sentido, Jackson y col (2001) informaron una correlación significativa entre la excreción de sodio y la excreción de nitratos/nitritos. El NO y los estrógenos comparten también varias funciones potencialmente ateroprotectoras tales como inhibición de la adhesión leucocitaria, proliferación de las células del músculo liso vascular y agregación plaquetaria (Hodgin y col, 2013). Por otra parte, es conocido que el status premenopáusico está asociado con una incrementada actividad del NO vascular comparado con hembras postmenopáusicas y machos (Majmudar y col, 1999). Algunos estudios sugieren que la terapia estrogénica puede estimular la liberación de NO en la vasculatura arterial de la mujer postmenopáusica.

La expectativa de vida es mayor en las hembras que en los machos y los eventos cardiovasculares ocurren con menor frecuencia y a mayor edad en las hembras respecto de los machos. Las diferencias de género han sido encontradas en varios estudios, aunque se han reportado algunos efectos

opuestos por lo que ésta es un área de una activa investigación (Doumas y col, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permiten concluir que la menor retención de sodio, el menor incremento en la lipoperoxidación y el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes encontradas en las ratas hembras sugerirían un rol protector del sexo femenino en la respuesta renal a un estrés crónico. Sin embargo, se debe seguir profundizando en la investigación de la participación de los estrógenos y/o progesterona en la respuesta oxidativa/antioxidante al estrés, ya que los resultados obtenidos al realizar la OVX y la terapia sustitutiva con estrógenos, no permiten obtener conclusiones definitivas.

CONCLUSIONES

- El sexo no influyó en la magnitud de la respuesta del Simpático Adreno Medular frente al estrés.
- Las ratas hembras tienen mayores niveles basales de corticosterona que los machos pero la respuesta frente al estrés es menor que en ellos. Esto indicaría que la activación del eje Hipotálamo Hipofisario Adrenal en respuesta al estrés, es un rasgo sexualmente divergente.
- La menor respuesta de las hembras frente al estrés indicaría un rol protector de los estrógenos en la respuesta del eje Hipotálamo Hipofisario Adrenal, dado que la falta de estrógenos en el grupo de hembras ovariectomizadas produjo un incremento de la corticosterona en respuesta al estrés similar a los machos.
- Se encontró correspondencia entre los niveles de corticosterona y el Índice Adreno Somático en respuesta al estrés en ambos sexos, reflejando un aumento en la función de la glándula adrenal.
- Todos los animales estresados ganaron menos peso pero este efecto fue más significativo en los machos.
- La excreción renal de sodio basal en las ratas hembras fue menor que en los machos. La ovariectomía aumentó la excreción de sodio y la suplementación con estradiol la redujo a niveles similares a los de las hembras enteras. Esto indicaría la participación de los estrógenos en la excreción de sodio en las hembras.

- Los animales estresados de ambos sexos mostraron antinatriuresis frente al estrés aunque la magnitud de la respuesta fue menor en las hembras enteras. La menor antinatriuresis observada en las hembras podría ser consecuencia de la menor respuesta al estrés, del aumento de la natriuresis en respuesta al aumento de la presión arterial y a una menor reactividad del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.
- La antinatriuresis observada en los animales estresados no se debería a cambios en la Tasa Filtración Glomerular sino a modificaciones en la reabsorción tubular, probablemente como consecuencia de la estimulación del Sistema Nervioso Simpático renal, del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y del aumento de los niveles plasmáticos de aldosterona y corticosterona.
- Las ratas machos controles presentan mayor peroxidación lipídica renal que las hembras, lo que provocaría una mayor susceptibilidad a cambios en la funcionalidad renal que podrían derivar en hipertensión arterial.
- Ambos sexos presentan incrementos en la lipoperoxidación renal en respuesta al estrés pero este incremento fue mayor en los machos.
- La menor peroxidación lipídica observada en las hembras estresadas pondría en evidencia las propiedades antioxidantes de los estrógenos. Esto se corrobora por la supresión del efecto del estrés en las ratas suplementadas.
- El estrés aumentó la actividad de la Super Óxido Dismutasa y Catalasa renales en las hembras y no produjo cambios en los machos. El

incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes podría ser la causa de la menor lipoperoxidación observada en el tejido renal de las hembras.

- El aumento en la actividad de la Super Óxido Dismutasa en las hembras Ovariectomizadas indicaría la existencia de otras vías independientes de los estrógenos, para incrementar la actividad de esta enzima.
- La Inmovilización en tabla produjo disminución en los niveles de Nitritos tanto en machos como en hembras.
- La disminución en los niveles de los Nitritos en los animales estresados podría ser consecuencia del aumento en las Especies Reactivas del Oxígeno evidenciado por el incremento del Malonildialdehído en respuesta a la Inmovilización en tabla.
- La menor biodisponibilidad del NO observada en las ratas estresadas podría relacionarse con la menor excreción de sodio observada en estos animales y podría afectar también la resistencia vascular constituyendo un importante factor de riesgo cardiovascular en ambos sexos.
- La menor retención de sodio, el menor incremento en la lipoperoxidación y el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes encontradas en las ratas hembras, sugerirían un rol protector del sexo femenino en la respuesta renal a un estrés crónico.

BIBLIOGRAFÍA

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods enzymol* 105: 121-126.

Aguilera G, Nikodemovaa M, Wynn P, Catt K. 2004. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*, Volume 25, Issue 3, Pages 319–329.

Altemus, M. 2009. Neurobiología, sexo y género. En WE Narrow, MB First, PJ Sirovatka, DA Regier (Eds). *Agenda de investigación para el DSM-V. Consideraciones sobre la edad y el género en el diagnóstico psiquiátrico*, (pp. 47-62) Barcelona: Elsevier Masson.

Armario A, Hidalgo J, Giralt M. 1988. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressor: comparison to other physiological variables. *J. Neuroendocrinol.* 47:263-267.

Armario A. 2006 The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: What can it Tell us About Stressors? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders)*, Volume 5, Number 5, pp. 485-501(17).

Armario A, Castellanos M. 1984. A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev Esp. Fisiol.*; 40: 437-441.

Bagatell CJ, Heiman JR, Rivier JE, Bremner WJ. 1994. Effects of endogenous testosterone and estradiol on sexual behavior in normal young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 711–716.

Baylis C. 2008. Sexual dimorphism, aging kidney and involvement of nitric oxide deficiency. *Semin Nephrol* 29(6): 569-578.

Beltowski J, Jamroz A. 2004. Adrenomedullin – What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol*; 56: 5 – 27.

Ben-Sachar D, Riederer P. 1991. Iron-Melanin Interaction and Lipid Peroxidation: Implications for Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*; 57 :1609–1614.

Bendersky M. 2004. De la hipertension arterial a la atherosclerosis.reunión de expertos. *Rev Fed Arg Cardiol* 33: 243-249.

Bensi N, Bertuzzi M, Armario a, Gauna H, 1997. Chronic immobilization stress reduces sodium appetite and renal excretion in the rats. *Physiology & Behavior* 62 (6):1391-1396.

Bertuzzi ML, Bensi N, Mayer N, Niebylski A, Armario A, Gauna HF. 2003. Renal Mechanisms Involved in Stress-induced Antinatriuresis and Antidiuresis in Rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. Vol. 111 (3): 259-264.

Bianchi G, Ferrari P, Staessen JA. 2005. Adducin polymorphism: decretion and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension*; 45(3): 331-340.

Binotti S, Niebylski A, Gauna H, 2012. Cambios cardiovasculares relacionados con el envejecimiento y el estrés oxidativo en ratas sometidas a estrés crónico. Tesis doctoral UNRC.

Boggiano M, Chandler P, Viana J, Oswald K, Maldonado C, Wauford P. 2005. Combined dieting and stress evoke exaggerated responses to opioids in binge-eating rats. *Behavioral neuroscience* 119: 1207-1214.

Brooke S, Chan R, Howard S, Sapolsky R. 1997. Endocrine modulation of the neurotoxicity of gp 120: implications for AIDS-related dementia complex. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:9457-9462.

Brotto M. 2003. Chronic stress by immobilization and sensitivity of the isolated rat pacemaker to isoproterenol: roles of corticosterone, neuronal uptake and β -adrenergic homogeneity. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(3):1152-1158

Bumke-Vogt C, Bahr V, Diederich S, Hermann SM, Anagnostopoulos I, Oelkers W y Quinkler M. 2002. Expression of the progesterone receptor and progesterone-metabolising enzymes in the female y male human kidney. *J Endocrinol* 175:349-364.

Buwalda B, De Boer S, Van Kalkeren A, Colas J. 1997. Physiological and behavioral effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotrophin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinol.* 22 (5): 297-309.

Chakraborti A, Gulati K y Ray A. 2008. Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: modulation by antioxidants and nitrenergic agents. *Behavioral Brain Research* 194: 86-91.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 259-284.

Clore J, Estep H, Ros-Clunis H, Watlington C.1988. adrenocorticotripin and cortisol-induced changes in urinary sodium and potassium excretion in man: effects os spironolactone and RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 67 (4): 824-831.

Cooper SA, Whalley–Connell A, Habibi J. 2004. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:09-23.

Corwin LR, Buda-Levin A. 2004. Behavioral models of binge-type eating. *Physiology and Behavior*, 82, 123-130.

Dallman M, Pecoraro N, Akana S, Fleur S, Gomez F, Houshyar H, Bell M, Bathnagar S, Laugero K, Manalo S. 2003. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *PNAS* 100 (20): 11696-11701.

de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt M. 2005. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 29 (2): 271–281.

de la Serna F, Peral de Bruno M. 2000. Fisiopatología de la Insuficiencia Cardíaca: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. *Insuficiencia Cardíaca Crónica* Capítulo 4: 49-77.

DeVries AC, Glasper ER, Detillion CE. 2003. Social modulation of stress responses. *Physiol. Behav.* 79: 399-407.

Dobson H., Smith R. 2000. Stress and reproduction in farm animals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49: 451-461.

Dobson H, Tebble JE, Smith RF Ward WR. 2001. Is stress really all that important? *Theriogenology*, 55: 65-73.

Doumas M, Papademetriov V, Faselis C, Kokkinos P. 2013. Gender differences in hypertension: myths and reality. *Current hypertension reports* 15 (4): 324-330.

Dubey RK, Jackson E. 2001. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol* 280:365-88.

Epel E, Moyer A, Martín C, Macary B, Cummings N, Rodin J, Rebuffe-Scrive M. 1999. Stress-induced cortisol, mood and fat distribution in men. *Obesity Research*, 7, 9-15.

Evans J, Golfine I, Madux B y Grodsky G. 2003. Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, 52(1): 1-8.

Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. 2006. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 16 (3): 222-233.

Forstermann U, 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv – European journal of Physiology* 459 (6): 923-939.

Gamboa R. 2006. Physiopatología of essential arterial hypertension. *Acta Méd Peruana* 23 (2).

Gannong W, 2002. *Fisiología Médica*. 18 Edición. Editorial El Manual Moderno. México.

Ge D, Su S, Zhu H, Dong Y, Wang X, Harshfield G, Treber F, Snieder H. 2009. Stress induced sodium excretion: a new intermediate phenotype to study the early genetic etiology of hypertension? *AHA Hypertension* 53: 262.

Gerhold RW, Allison AB, Temple DL, Chamberlain MJ, Strait KR, Keel MK. 2007. Infectious canine hepatitis in a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*). *Journal of Wildlife Diseases* 43, 734-736.

Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. 1996. Estrogens attenuate and corticosterona exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66:1836-1844.

Greenberg B, Quinones MA, Koilpillal C. 1995. Effects of long term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction: results of the SOLVD echocardiography study. *Circulation* ;91:2573-81.

Guyton y Hall, 2006. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Elsevier. España.

Hagan M, Chandler P, Waufordd P, Rybak R, & Oswald K. 2003. The role of palatable food and hunger as trigger factors in an animal model of stress induced binge eating. *International Journal of Eating disorders* 34: 183-197.

Haleem, D.J., Kennett, G., Curzon, G., 1988. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.* 458, 339–347.

Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141: 312-322.

Handa RJ, McGivern RF. 1999. Gender and stress. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress*. Academic Press, San Diego: 196–204.

Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF, Bollnow MR. 1994. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.* 55, 117–124.

Harris R, Zhou J, Youngblood B, Rybkyn I, Smagin G, Ryan DH. 1998. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low and high fat diets. *American Physiology Society* 44: 1928-1938.

Harshfield GA, Dong Y, Kapuku GK, Zhu H, Hanevold CD. 2009. Stress-induced sodium retention and hypertension: a review and hypothesis. *Current hypertension reports*, 11:29-34.

Heinsbroek RP, Van Haaren F, Feenstra MG, Endert E, Van de Poll NE. 1991. Sex- and time-dependent changes in neurochemical and hormonal variables induced by predictable and unpredictable footshock. *Physiol. Behav.* 49, 1251–1256.

Herman JP, Figueiredo H, Muellera NK, Ulrich-Laia Y, Ostrandera MM, Choia DC, Cullinanc WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24 (3): 151–180.

Hilliard LM, Nematbakhsh M, Kett MM, Teichman E, Sampson AK, Widdop RE, Evans RG, Denton KM. 2011. Gender Differences in Pressure-Natriuresis and Renal Autoregulation: Role of the Angiotensin Type 2 Receptor DOI: 10.1161/Hypertension.AHA.110.166827.

Hodgin JB, Knowles JW, Kim HS, Smithies O y Maeda N, 2013. Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *The journal of clinical investigation*. Vol 109. N°4:541-548.

Horst, GJ, Wichmann R, Gerrits M, Westenbroek C, Lin Y. 2009. Sex differences in stress responses: Focus on ovarian hormones. *Physiology and Behavior*, 97, 239-249.

Iwasaki-Sekino A, Mano-Otagiri A, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. 2009. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 226-237.

Jackson RW, Treiber FA, Harshfield GA. 2001. Urinary excretion of vasoactive factors are correlated to sodium excretion. *Am J Hypertens* 14:1003-1006

Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim J, Wu X, Mulrone S, Sandberg K. 2007. Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gender medicine* Vol 4, N°1: 56-71.

Joseph-Bravo P, de Gortari P. 2007. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología V14 CS3.indd 65*.

Kannan GJL, Terrill TH, Kouakou B, Gazal OS, Gelaye S, Amoah EA, Samaké S. 2000. Transportation of goats: Effects on physiological stress responses and live weight loss. *J. Anim. Sci.* 78:1450-1457.

Kelly S, Hertzman C, Daniels M. 1997. Searching for the biological pathways between stress and health. *Annual Review of Public Health.* 18: 437-462.

Kemppainen R, Behrend E. 1997. Adrenal Physiology. *Adrenal disorders* 7 (2): 173-186.

Khraibi AA. 2002. Renal interstitial hydrostatic pressure and sodium excretion in hypertension and pregnancy. *J Hypertens*; 20 (3):S21-S27.

Krishnan V, Nestler EJ. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894-902.

Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C. 2004. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, youngsters adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29 (1): 83-98.

Kudielka B, Kirschbaum C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological Psychology* 69: 113–132

Lacy F, Kaislaman MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parner RJ. 2000. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender and ethnicity. *Hypertenssionnn* 36: 878-884.

Lekonesteva O, Chakrabarti S, Jiang Y, Cheung CC y Davidge ST, 2011. Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance

arteries. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. Vol 339. N°2:367-375

Liu J, Wang X, Morris A. 1994. Immobilization stress-induced antioxidant defences changes in rats plasma: effect to treatment with reduced glutathione.int J. biochem. 26:511-517.

McIntosh LJ, Cortopassi KM, Sapolsky RM. 1996. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. Neurotoxicol.17:873-882.

Majmudar NG, Robson SC y Ford GA, 1999. Effects of menopause, gender, and strogen repalcement therapy on vacular nitric oxide activity. The journal of clinical endocrinology & metabolism. Vol 85, N°4:1577-1583.

Marcincak S, Sokol J, Turek P, Rozanska H, Dicakova Z, Mate D, Popelka P, Korim P. 2003. Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. Bull. Vet. Inst. Pulawy 47: 491-496.

Marquez C, Nadal R, Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilization stress in rats: individual differences. Neuroscience, 123 (3): 601-612.

Masnatta LD, Fischer PA, Dominguez G, Cabrera Fischer EI, Ramirez AJ, Sanchez RA. 2003. Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el Hospital de Día. Rev Fed Arg Cardiol; 32: 177-183

Mc Ewen B. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain research 886 (1-2) 172-189.

Mc Ewen B. 2002. Strogen actions show throughout the brain. Endocrine reviews 57 (1): 357-384.

Mendelshon ME, Karas RH. 1994. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardio*;9:619:-626

Mendelshon ME, Karas RH. 2005. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*; 308: 1583-1587.

Mendelshon 2010. Efectos de los estrógenos en el sistema cardiovascular. *Revista del climaterio* 13 (74): 56-60.

Miczek KA, Yap JJ, Covington Tercero HE. 2008. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology and therapeutics* 120 (2): 102-128.

Michajloskij N, Lichardus B, Kvetnasnsky R, Ponrc J. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake urine output and vasopressine changes in rats. *Endocrinol Exp* 22 (3): 143-157.

Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH y Rodilla V.2000. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 35: 35-70.

Miller AA, DeSilva TM, Jackman KA, Sobey CG. 2007. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology* 34 (10): 1037-1043.

Möstl E y Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrin.* 23: 67-74.

Nadal R, Armario A. 2010. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertensión* 27 (3): 117-124.

Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Le J, Silbiger S. 1997. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 8: 1240-1246.

Niebylski A, Bensi N, Bertuzzi M, Armario A; Gauna H, 2000. Renal excretion and saline intake during post-stress immobilization period in rats. *Physiol. Biochem* 108: 268-274.

Niebylski A, Bensi N, Gauna H, 2008. Role of aldosterone in stress-induced antinatriuresis in normotensive saline overload rats. *Stress and health* 24(2): 91-98.

Niebylski A, Boccolini L, Bensi N, Binotti S, Hansen C, Yasiuk R, Gauna H. 2011. Neuroendocrine changes and natriuresis in response to social stress. *Stress and health* DOI: 10.1002/smi 1411

Nistala R, Whaley-Connell a, Sowers J, 2008. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxidants and Redox Signaling* 12(10): 2047-2090.

Norman RL, Smith CJ, Pappas JD, Hall J. 1992. Exposure to ovarian steroids elicits a female pattern of plasma cortisol levels in castrated male macaques. *Steroids* 57, 37–43.

Naftolin F. 1994. Brain aromatization of androgens. *J. Reprod. Med.* 39, 257–261.

O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. 2000. The stress response and the hypothalamic- pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q.J.M. Mon. J. Assoc. Phys.*, 93: 323-333.

Pacak K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-548.

Pajović SB, Pejić S, Stojiljković V, Gavrilović L, Dronjak S, Kanazir DT. 2006. Alterations in hippocampal antioxidant enzyme activities and sympatho adrenomedullary system of rats in response to different stress models. *Physiol Res* 55(4):453–460.

Paris JJ, Franco C, Sodano R, Frye CA, Wulfert E. 2009. Gambling pathology is associated with dampened cortisol response among men and women. *Physiol Behav* 99 (2): 230-233.

Pechere-Bertschi A, Maillard M, Stalder H, Brunner HR, Burnier M. 2002. Renal segmental tubular response to salt during the normal menstrual cycle. *Kidney Int* ; 61: 425-31.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman M. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: Feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145: 3754-3762.

Pelletier G. 2000. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histology and histopathology* 15: 1261-1270.

Rahmann K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2 (2): 219-236.

Rands V, Seth D, Kobori H, Prieto M. 2012. Sexual dimorphism in urinary angiotensinogen excretion during chronic angiotensin II-salt hypertension. *Gender medicine* 9 (4): 207-218.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. 1998. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31 (1pt2): 435-439.

Rybkin I, Zhou Y, Volaufova J, Smagin G, Ryan D, Harris R. 1997. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by the time of day. *American Journal of Physiology, regulatory, integrative and comparative Physiology*, 263, 1612-1622.

Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavidez A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero M, Llobera M. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51(7): 925-931.

Richardson JS. 1993. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*;695:73–76.

Rivier C, Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.*, 45: 523-532.

Rivest S, Rivier C. 1995. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocr. Rev.* 16: 177-199.

Sabolić I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G. 2007. Gender differences in kidney function. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 455(3): 397-420.

Sapolsky R, Romero M, Munck A. 2000. How do glucocorticoids influence stress response? Integating permissive, supressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 21 (1): 55-89.

Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Fortepiani LA, Yanes LL, Reckelhoff JF. 2007. Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34:938-945.

Sawada M, Carlson J. 1998. Studies on the mechanism controlling generation of superoxide radical in luteinized rat ovaries during regresión. *Endocrinology* 135, 1645-1650.

Seeliger E, Lunneburg T, Ladwing M, Reinhardt H. 2010. Rol of the rennin-angiotensin-aldosterone system for control of arterial blood pressure following moderate deficit in totalbody sodium: balance studies in freely moving dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37 (2):43-51.

Selemedis S, Sobey C, Wingler K, Schmidt H, Drummond G. 2008. NADPH oxidase in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibitions. *Pharmacology and therapeutics* 120 (3): 254-291.

Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138: 32-34.

Selye H. 1976. *The stress of life*. New York: McGraw-Hill.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295.

Sirera R, Sánchez PT, Camps C. 2006. Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Psicooncología* 3: 35 – 48

Slipak O. 2003. Estrés y perfiles de personalidad. Historia concepto del estrés. *Alcemos* 38 (1): 25-35.

Smith R, Ghuman S, Evans N, Karsch F, Dobson H. 2003. Stress and the control of LH secretion in the ewe. *Reprod. Suppl.*, 61: 267- 282.

Solomon MB, Herman JP. 2009. Sex differences in psychopathology: of gonad, adrenals and mental illness. *Physiol and Behavior* 97 (2): 250-258.

Sosnovsky AS, Kozlov AV. 1992. Enhancement of lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress. *bull.exp.biol.med.* 113:653-655.

Spinedi E, Salas M, Chisari A, Perone M, Carino M, Gaillard RC. 1994. Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to inflammatory and neuroendocrine stressors. Evidence for a pituitary defect in the autoimmune disease-susceptible female Lewis rat. *Neuroendocrinology* 60:609-617.

Stefanska J, Pawliczak R. 2008. Apocynin: molecular aptitudes. mediators of inflammation. articleID 106507, 10 pages. Doi: 10.115/2008.

Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod.*, 5: 105-113.

Torok J. 2008. Participation of nitric oxide in different model of experimental hypertension. *Physiol Res.* 57: 813-825.

Touyz R, 2005. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension* 44 (3): 248-252.

Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology* 7: 65-74.

Vallés A, Martí O, García A y Armario A, 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting stress-dependent reduction of food intake in rats. *AmJ Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: 1138-1144.

Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. 1993. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J. Clin. Invest.* 92, 1896–1902

Viau V, Meaney MJ. 1996. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J. Neurosci.* 16: 1866–1876.

Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Adelaziz K, Jove M, Borras C. 2011. Female live longer than male. *Curr Pharm Des* 1;17(36): 3959-3965.

Wilcox CS. 2005. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension. *Am J Physiol. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289: R913-R935.

Wilson J, Cantor M. 1986. Noise induced eating in rats facilitated by prior tail pinch experience. *Physiology and Behavior*, 37: 523-526.

Wright R, Lightner E, Harman J, Meijer O, Conrad C. 2006. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci* 24(2): 595-605.

Xiao E, Xia L, Shanen D, Khabele D, Ferin M, 1994. Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology* 135, 2093–2098.

Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., Okamoto, R., 2003. Sex-differences in adreno-cortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 68, 439–445.

Young EA. 1995a. Glucocorticoid cascade hypothesis revisited: role of gonadal steroids. *Depression* 3, 20–27.

Young EA. 1995b. The role of gonadal steroids in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 371–381.

Young EA, Altemus M, Parkinson V, Shastry S. 2001. Effect of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology*, 25, 881-891.

Young EA, Korszun A, Figueiredo HF, Banks-Solomon M, Herman JP. 2008. Sex differences in HPA Axis regulation. En J.B. Becker, K.J. Berkley, N. Geary, E. Hampson, J.P. Herman y E.A. Young. *Sex differences in the brain: from genes to behaviour* (pp. 95-105). Oxford University Press.

Zheng L, Sun Z, Zhang X, Xu C, Li J, Li M. 2010. Risk of progression to hypertension across baseline blood pressure in nonhypertensive participants among rural Chinese adults: a prospective study. *J Hypertens*. 28(6):1158-65.