EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL METABOLISMO HIDROSALINO EN RATAS

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

NORA HAYDEÉ BENSI

DIRECTOR: HÉCTOR F. GAUNA

JURADO

Dra. GLADYS MORI
Dr. EDUARDO RODRÍGUEZ ECHANDÍA
Dr. EDGARDO ÁLVAREZ

JUNIO DE 1999

T. 112

E.O. ALVAREZ

G. Mari

ERE Hernández

H. F. GAUNA

49814

NO SE PRESTA

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, porque sin ellos ningún logro tiene sentido.

- A mis amigos, " porque, sin palabras, en amistad, todos los pensamientos, todos los deseos, todas las esperanzas surgen y se comparten en espontánea alegría".

- A la Lic. Nancy Rodríguez por su amistad, además de la invalorable colaboración en las tareas de laboratorio

- A la Méd. Vet. Mabel Bertuzzi y a la Lic.Ana Niebylski, por su permanente apoyo y colaboración en la obtención de datos, discusión y análisis de los resultados.

- A los Med. Vet. Guillermo Ashworth y Luis Poloni, quienes con su tiempo y predisposición apoyaron a la realización de este trabajo.

- A mis compañeros de grupo, porque entre todos hicieron posible, de una o otra manera, la realización de este trabajo.

- AL Dr. Héctor F. Gauna, por su dirección y apoyo.

- A la Comisión Asesora de Tesis, por sus consejos y sugerencias.

- A los señores Miguel Bueno y Luis Fantuzzi, quienes, con su excelente predisposición, permitieron que las tareas en el bioterio pudieran realizarse.

- Al personal docente y no docente del Departamento de Biología Molecular.

- A la Profesora Susana Ferrero y a la Ms Elsa Moschetti, por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

- Al Ms. Héctor Agnelli, por haberme guiado en la comprensión de la Estadística.

- Al Dr. Antonio Armario, por su constante guía, consejos y sugerencias.

- A los animales, para que su sacrificio no sea en vano.

INDICE DE CONTENIDOS **Páginas**

RESUMEN

Numerosos factores ambientales parecen producir incrementos crónicos en la presión sanguínea. Dos de ellos, el estrés y dietas ricas en sodio interactúan con un fondo genético para favorecer el desarrollo de esta patología. Son bien conocidas las influencias de cada factor sobre el sistema cardiovascular, pero no está establecido si el estrés puede potenciar el incremento de la ingesta de sodio, dado que sería de fundamental importancia para evitar los efectos del estrés sobre la salud humana y animal. El objetivo de esta tesis fue evaluar las modificaciones en el consumo y excreción de sodio en animales expuestos a estrés agudo y crónico y su influencia sobre la presión arterial de estos animales, verificar la perdurabilidad en el tiempo de los cambios inducidos por el estrés y su grado de adaptación a la repetición del estímulo. Para ello se trabajó con ratas Wistar macho, que fueron dividas en grupos control o estrés. Además, cada grupo se dividió en dos subgrupos, uno de los cuales tenía como bebida agua corriente y el otro podría elegir entre agua corriente o solución de NaCl al 1,5 %. Los grupos controles permanecían en sus jaulas individuales y los grupos estresados fueron sometidos a una única sesión de inmovilización (IMO) en tabla (estrés agudo, EA) o una sesión diaria durante 14 días (estrés crónico, EC). Al cabo de la única sesión de estrés o luego de la ultima en el caso de EC, las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas y se recogió la orina para evaluar la diuresis, la natriuresis y caliuresis. Se determinó el volumen de agua y NaCl 1.5% ingeridos. En otro experimento de igual diseño se determinó la presión arterial de los animales en condiciones de EA y EC y en otro se evaluó el tiempo en el cual los parámetros retornaron a sus niveles basales, controlando la ingesta y la excreción en los días posteriores a las sesiones de estrés. Para evaluar la adaptación al estrés, animales EC fueron sometidos a una sesión de estrés aguda y se determinó la ingesta y excreción de sodio y agua, además de los parámetros sanguíneos. Tanto el estrés agudo como crónico disminuyó la ingesta de solución salina. Se observó retención renal de sodio y agua sólo en los animales estresados que tuvieron la opción de beber solución salina, aún cuando no se observaron modificaciones en la natremia, potasemia ni osmolaridad plasmática. Ni el estrés crónico ni agudo modificó la presión de los animales estresados, medida a las 24 hs post-estrés. Los niveles de corticosterona de las ratas IMO fue mayor que la de los animales controles no estresados. La supresión de estímulo estresante permitió el retorno de todos lo parámetros a sus niveles basales dentro de las 24-48 hs posteriores al estrés. El tratamiento de estrés crónico no protegió a los animales de los efectos de un estrés agudo. El estrés no incrementa la ingesta de sodio, por lo que estos dos factores no interactuarían para inducir hipertensión sostenida, datos que son apoyados por lo observado con los valores de presión arterial obtenidas en las ratas IMO. Los cambios inducidos por el estrés son reversibles y no son sensibles a los mecanismos de adaptación o reducción de la respuesta en exposiciones repetidas al mismo estímulo.

ABSTRACT

It is well accepted that sodium balance exert a mayor effects on long-lasting control of arterial blood pressure. In addition, although exposure to chronic stress has been found to cause hypertension, the effect appears to be potentiated by salt loading and genetic predisposition. Therefore, we could assume that chronic stress might cause hypertension, at least partially, by influencing sodium balance in the organism. Thus, the influence of a well-characterized chronic stress model (exposure to immobilization) on sodium intake and renal function in adult male Wistar rats was studied. In others experiments, the influence of hypertonic saline intake and stress on the arterial blood pressure and if the previous chronic stress alter the response at the same stressor was evaluated. Likewise, the perdurability of the effects of chronic IMO was evaluated. The animals were individually housed and all variables under observation were measured in metabolic cages the first, seventh, and thirteenth experimental days. Half of the rats had access to water, and the remainder rats had access simultaneously to water and saline solution (1.5% NaCl). Immobilization (IMO) in wooden boards, 2 h per day (10.00 to 12.00 hours) over 13 days was used as stressor. IMO reduced the intake of saline solution. We demonstrate that the renal water, sodium, and potassium excretion in IMO rats having access to saline solution was lower than in control rats. The effect of IMO was similar along all the observation days. The results indicate that the IMO stress reduced the sodium intake, probably as a secondary effect to the deficit in sodium renal excretion; IMO caused antidiuresis and antikaliuresis, only in those rats with simultaneous access to saline solution. The reduction of saline intake observed in stressed rats might be an homeostatic mechanism to maintain the sodium balance after impairment of renal sodium excretion caused by stress. The changes in the sodium balance had no effects on arterial blood pressure, probably as a consequence of compensatory poststress mechanisms. The effects of chronic stress were reversibles, since the variables returned to basal values in the 24-48 h period after the last IMO. The rats fail to adapt to continued stimulation. The previous chronic stress did not alter the physiological response to an acute stressor, at least in the measured variables. In conclusion, the present data indicate that exposure to stress reduced sodium intake as well as renal sodium and potassium excretion in rats with continuos access to hypertonic saline solution. Apparently, impaired sodium excretion had no effect on the arterial blood pressure, regardless the lack of adaptation of the changes observed in response to repeated stress.

ABREVIATURAS

A: Adrenalina.

ACTH: Hormona adrenocorticotrofina.

αMSH: Hormona melanocito estimulante.

Ang II: Angiotensina II.

ANOVA : Análisis de la varianza.

AVP: Argininvasopresina.

CRH: Hormona liberadora de la corticotrofina.

5-HT: 5-hidroxitirosina.

EA : Estrés agudo.

EC : Estrés crónico.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GR: Receptores glucocorticoides de baja afinidad.

HPA: Eje hipotálamo-hipofiso-adrenal.

icv: Intracerebroventricular.

IMO: Estrés por inmovilización.

LC: Locus coeruleus.

LCR : Líquido cefalorraquídeo.

LEC: Líquido extracelular.

LH: Hormona luteinizante.

LIC: Líquido intracelular.

MnPO : Núcleo preóptico mediano.

MR: Receptores mineralocorticoides de alta afinidad.

NA: Noradrenalina.

NO : Óxido nítrico.

OSF : Órgano subfornical.

OVLT: Órgano vasculoso de la lámina terminalis.

PA: Presión sanguínea arterial.

PNA: Péptido natriurético atrial.

POMC: Propiomelanocortina.

PRL: Hormona prolactina.

PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo.

RAS: Sistema Renina Angiotensina.

RIA : Radioinmunoensayo.

SAM: Sistema simpatoadrenomedular.

SHR: Ratas espontáneamente hipertensas.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNS : Sistema Nervioso Simpático.

TC : Túbulo colector.

TD : Túbulo distal.

TFG: Tasa de filtración glomerular.

WKY : Ratas Wistar Kyotto.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Todas las formas de vida poseen medios para preservar su integridad. La adaptabilidad de los organismos vivos y su capacidad para construir nuevas condiciones operativas en respuesta a estímulos impuestos externos o internos, permiten la continuación de la vida bajo condiciones hostiles **(Dallman, 1993)**.

La función de una célula depende, no solamente de la recepción de un continuo suministro de nutrientes y de la eliminación de sus productos metabólicos finales, sino también de la existencia de condiciones físicoquímicas estables en el líquido extracelular que las baña, al que Claude Bernard denominó *"medio interno"*. Uno de los requerimientos de la regulación del medio interno es el de conservar una cantidad adecuada de agua, siendo otro factor importante para la supervivencia de las células la presencia, en las concentraciones necesarias, de distintos solutos tales como sales y moléculas nutrientes **(Denton, 1982).**

En el organismo, las sustancias minerales se encuentran en el líquido intracelular (LIC) y extracelular (LEC), en proporciones muy constantes y reguladas. El sodio es el principal catión del LEC y sus funciones son muy importantes. Este ion regula la permeabilidad capilar, la permeabilidad 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 LIC y LEC. Las sales de sodio forman más de 90 % del soluto osmóticamente activo en el plasma y en el líquido intersticial, por lo que la cantidad de sodio es el determinante primario del volumen del líquido extracelular **(Schauf et al., 1990; Ganong,1996)** .

El sodio y sus aniones acompañantes, Cl^- y HCO_3^-, constituyen las principales fuerzas osmóticas en los líquidos corporales. Debido a que la osmolaridad del plasma y la concentración de sodio plasmático son reguladas dentro de límites muy estrechos, los cambios en el balance neto de sodio corporal total obligan a los líquidos acompañantes a mantener la osmolaridad de los líquidos corporales. El balance neto de sodio, por lo tanto, determina el nivel del líquido extracelular **(Schauf et al., 1990; Ganong,1996)** .

Los problemas en la homeostasis de los líquidos extracelulares (LEC) pueden ser reducidos a tres desafíos homeostáticos simples :

- Ganancia o pérdida de solución isotónica de NaCl.
- Ganancia o pérdida de agua pura
- Ganancia o pérdida de NaCl puro

La ganancia o pérdida de solución salina isotónica puede ocurrir de varias formas, una de ellas es el consumo de sal y agua en las proporciones en las que se encuentran en el LEC, provocando un incremento del mismo. La producción de orina isotónica podría ser un ejemplo simple de pérdida de solución isotónica.

El segundo desafío homeostático simple es la ganancia o pérdida de agua pura. La ganancia de agua pura resulta de la ingesta de agua u otro líquido diluido. La pérdida es causada por producción de orina diluida o pérdidas por evaporación. Si hay una pérdida neta de agua pura de los compartimentos líquidos extracelulares, la osmolaridad del LEC se incrementa. El gradiente osmótico resultante entre el líquido intra y extracelular causa movimiento de agua desde las células al LEC, para restablecer el equilibrio osmótico. Lo inverso ocurre cuando hay una ganancia neta de agua. Una diferencia fundamental entre el desafío de ganar o perder solución isotónica o

agua pura, es que el desafío del agua afecta tanto a los volúmenes intra como extracelular, mientras que el desafío isotónico afecta sólo al volumen del LEC.

El tercer desafío es la ganancia o pérdida de NaCl. Por ejemplo, si un hombre de 75 kg come 50 g de sal (aproximadamente 1,7 Osm) sin incorporar agua, la osmolaridad de su LEC puede incrementarse hasta 413 mOsm. En este caso, la elevada osmolaridad es el resultado de un incremento en la concentración de sodio en los compartimentos extracelulares. El aumento de la osmolaridad del LEC causa movimiento neto de agua desde los compartimentos intracelulares al extracelular, hasta que la osmolaridad de los dos compartimentos se desplace al equilibrio. La osmolaridad final podría ser de 338 mOsm. El volumen del LEC puede aumentar de 3,4 L a un total de 18,4 L, mientras que el líquido intracelular puede disminuir en la misma proporción. Las pérdidas de la misma cantidad de sal podría reducir el LEC en 4,3 L. Este ejemplo ilustra la importancia del contenido total de sodio en la determinación del volumen del LEC **(Schauf et al., 1990; Ganong,1996)** .

Un incremento en el volumen del plasma puede conducir a un aumento de la presión sanguínea. Si la resistencia periférica total no cambia, la presión arterial media puede aumentar. Probablemente, pocas personas podrían consumir voluntariamente 50 g de sal en una sola ingesta. Sin embargo, en individuos predispuestos a desarrollar hipertensión, un defecto en la homeostasis del sodio podría llevar a acumular una cantidad cercana a 50 g extra de sal, especialmente si los sistemas reguladores son desafiados por una ingesta rica en sodio. Por otra parte, la pérdida de sal no ocurre como tal, pero la deficiencia ocurre cuando la ingesta no alcanza a compensar la pérdida. El riñón normalmente responde a un incremento en el sodio corporal total y en el volumen del LEC con incremento en la natriuresis, un aumento en la cantidad de sodio y agua perdidos por orina **(Schauf et al., 1990; Ganong, 1996)**.

El balance neto de sodio y agua refleja la diferencia entre la ingesta y las pérdidas, siendo la ingesta una función de la dieta y la disponibilidad del ambiente, mientras que las pérdidas son determinadas primariamente por la excreción renal de sodio.

Aunque es posible controlar el balance de sodio regulando la ingesta, esto no es usual en la sociedad moderna, donde hay una gran abundancia de sal en los alimentos ingeridos, que constituye la vía principal de ingreso al organismo **(Navar, 1997; Mc Gregor, 1997).**

Una vez ingresado, el sodio se distribuye en el organismo de manera que aproximadamente un 45 % del depósito de sodio del cuerpo se encuentra en el LEC, otro 45 % se encuentra en el hueso y un 10 % en el compartimento intracelular. Aunque la mayor parte del sodio orgánico está en forma fácilmente intercambiable, casi la mitad del sodio del hueso no se recambia con los iones sodio de los compartimentos líquidos. El sodio no recambiable está absorbido a los cristales de hidroxiapatita, situados profundamente en los huesos largos. El sodio del hueso no es osmóticamente activo, pero parte de él puede ser asequible para mejorar los efectos osmóticos de la dilución del LEC **(Rocha et al., 1997)**.

La ingesta de sal o el consumo de sodio puede ocurrir como resultado de la deficiencia de sodio (ingesta de sal inducida por necesidad o apetito por sal) o puede ocurrir en animales sin necesidades endógenas. Estas dos conductas difieren en su frecuencia. Dado que la ingesta inducida por necesidad ocurre luego de pérdidas de sodio, ésta es episódica. La conducta libre de necesidad es una de las conductas ingestivas manifestadas libremente en las ratas.

Ambas ingestas dependen del gusto para la detección de la sal consumida, pero la evaluación de la tasa o grado de gusto es diferente en las

dos instancias de la ingesta. La ingesta libre de necesidad se basa en una evaluación hedónica del gusto de la sal y se denomina *"preferencia por sal"*, especialmente cuando el animal elige un líquido salino que es ofrecido simultáneamente con agua **(Epstein, 1991).**

En ratas, la manipulación del ofrecimiento de soluciones de NaCl de diferente concentración, permite observar que la ingesta es función de la concentración, obteniéndose una gráfica en forma de "U" invertida. Esta preferencia gustativa se manifiesta a partir de soluciones de NaCl 0,055 %. Por debajo de este valor, los animales no muestran ninguna preferencia entre soluciones salinas o agua pura. La concentración de máxima preferencia por este tipo de soluciones está alrededor de 0,9 % de NaCl. Con soluciones al 1,5 %, la ingesta de agua excede a la de sal **(Fitzsimmons, 1979).** La mayor respuesta obtenida con solución isotónica es la misma para animales con o sin deficiencias de sodio. Por lo tanto, podría decirse que la necesidad interna de sodio no determina la forma de la curva preferencia-aversión, sino que ésta estaría determinada, probablemente, por factores gustativos **(Breslin et al., 1993).**

En humanos, se han realizado estudios para tratar de establecer la posible asociación entre la preferencia por sal e la hipertensión, suponiendo que la respuesta hedónica a la sal estaría relacionada con la ingesta de sodio. Los resultados obtenidos son variables, ya que se ha encontrado que las manipulaciones de la ingesta pueden o no modificar la preferencia , pero la asociación no es fuerte bajo condiciones estables de ingesta **(Mattes, 1997).**

La ingesta que resulta de una deficiencia interna genera una mayor avidez por la sustancia salina, sumada a su evaluación hedónica. Como resultado de ello, la mayoría de las soluciones salinas son consumidas a todas las concentraciones que ellas pueden ser degustadas. Esto se denomina *"apetito por sal o hambre de sal "* **(Epstein, 1991).**

El apetito por sal es un ejemplo clásico de mecanismo regulatorio. La primera descripción experimental de su existencia fue hecha en los años 50 cuando Ritchter mostró que las ratas adrenalectomizadas bilateralmente incrementaban su ingesta de solución salina de NaCl en relación al agua. Se elaboraron varias teorías para explicar el apetito por sal en condiciones de deficiencia de sodio, entre ellas :

a- la existencia de incrementada sensibilidad de los receptores del gusto **(Ritchter, 1956).**

b- la existencia de receptores que responden a cambios en el contenido de sodio de la sangre arterial (dependencia del contenido de sodio de un reservorio de sodio corporal) **(Wolf and Stricker, 1967).**

c- disminución en la concentración de sodio intracelular en poblaciones de neuronas específicas **(Denton, 1982; Priehs et al., 1991).**

Más recientemente, se demostró que ambos tipos de ingestas podrían ser controladas por hormonas y péptidos de origen central, tales como la Angiotensina, la cual parece actuar sobre el órgano vasculoso de la lámina terminalis, OVLT **(Fitts and Thunhorst, 1996; Thunhorst, 1996; Moismann et al., 1996; Pereira da Silva et al., 1995; Lienard et al., 1996).**

Otras hormonas involucradas serían la hormona adenocorticotrofina (ACTH) y la prolactina (PRL) **(Denton, 1982).** Blaine et al., en 1975, mostró un efecto directo de ACTH sobre el apetito por sal en conejos adrenalectomizados. Las evidencias de la presencia de ACTH y otras hormonas hipofisarias en el líquido cefalorraquídeo (LCR), indicarían la producción de ACTH o péptidos semejantes a ACTH en el Sistema Nervioso Central (SNC) o el transporte de estas hormonas desde la hipófisis al cerebro **(Denton, 1982; Fitts and Thunhorst, 1996; Thunhorst, 1996).**

Con respecto a la prolactina, su acción sobre tejidos mamarios produce regulación de la diferenciación celular alveolar e inducción de las proteínas secretoras de leche después del parto. Diversos autores remarcan que la composición de la leche se asemeja a la composición del líquido intracelular, más que la del extracelular. La PRL rápidamente activa el contratransporte de sodio y potasio en corte de tejidos mamarios en lactación, lo cual resulta en elevado potasio y reducido sodio tisular; este efecto lo produciría a través de la estimulación de la bomba de Na^+ y K^+. La respuesta temprana de las células alveolares a la prolactina sería la activación de la bomba, lo cual llevaría a disminuir la concentración intracelular de sodio y a marcados cambios en la relación intracelular de estos iones. Hasta el presente no está claro si la prolactina actúa a través de transcripción génica, pero la hipótesis sobre la influencia de cambios en las concentraciones intracelulares de Na^+ es de interés en relación con la posibilidad de que éstos puedan ser los vectores de otros eventos químicos, incluyendo procesos transcripcionales y transduccionales que alterarían la actividad eléctrica de las neuronas que gobiernan el apetito por sodio **(Denton, 1982).**

Varios estudios sugieren que el cerebro produce péptidos que funcionan como supresores de la ingesta de sal y puede dar la posibilidad de que sustancias semejantes a ellos sean utilizados como quimioterapia para la excesiva ingesta de sodio que es una enfermedad de ocurrencia en humanos. Estos péptidos parecen ser las taquicininas **(Epstein, 1991)** y la oxitocina **(Stricker and Verbalis, 1996)**. Con respecto a la oxitocina, se postula que la estimulación del apetito por sal es consecuencia de una disminución en la secreción de la oxitocina a nivel central **(Stricker and Verbalis, 1996).**

El péptido natriurético atrial (PNA) es una hormona semejante a la oxitocina y sus efectos periféricos complementan su acción en el cerebro para disminuir la ingesta de NaCl y por lo tanto reducir la osmolaridad de los líquidos corporales. De hecho, la inhibición del apetito por ambos péptidos

parece ser parte de una sistema coordinado de mecanismos fisiológicos y conductuales que promueven osmorregulación después de una carga de sal, que incluyen excreción renal de sodio, antidiuresis y sed **(Stricker y Verbalis 1996)**

También existen evidencias de que los receptores de volumen o del sistema de baja presión podrían jugar un rol importante en el control de la ingesta de agua y sal y en la excreción de agua. Los mecanismos por los cuales se logra esta homeostasis no son claros, pero se podría postular que es, al menos parcialmente, mediado por el Sistema Renina Angiotensina (RAS), dado que la distensión atrial inhibe la liberación de renina en el perro y en la rata **(Toth et al., 1987).**

En general, el apetito por sal en humanos es raro y puede aparecer en condiciones extremas, por ejemplo cuando el individuo ha experimentado una marcada disminución del sodio corporal, tempranamente en su vida, por un largo período de tiempo **(Mattes, 1997).**

Debido al rol central del sodio en el mantenimiento de los volúmenes de los líquidos corporales, no es sorprendente que hayan surgido múltiples mecanismos para controlar su excreción. En condiciones fisiológicas, aproximadamente el 95 % del sodio que pierde el cuerpo se excreta por orina. Un pequeño porcentaje se pierde con las heces y la sudoración.

A nivel renal, las variaciones en la excreción de sodio dependen de los cambios en la cantidad filtrada y en la cantidad resorbida en los túbulos renales. Los riñones pueden modificar la excreción de sodio controlando cualquiera de estas dos variables, en distintas condiciones fisiológicas.

La filtración, el primer factor que determina la excreción renal, depende de la tasa de filtración glomerular (TFG), es decir, de la cantidad de filtrado

formado por minuto. Este parámetro está, a su vez, determinado por tres factores: la presión hidrostática en los capilares glomerulares, la presión hidrostática en la cápsula de Bowman y la concentración de proteínas plasmáticas, es decir la presión oncótica del plasma. La modificación de cualquiera de estos tres factores modifica la TFG, y en consecuencia la cantidad de sodio filtrado **(Kemppainen and Behrend, 1997).**

La evidencia actual indica que por lo menos en lo referente a la regulación a largo plazo en la excreción de sodio, el control de la resorción tubular es probablemente más importante que el de la TFG. La razón es que la resorción absoluta de líquidos en los túbulos proximales y probablemente en las asas de Henle y túbulos distales también varía directamente con la TFG. Este fenómeno se conoce como equilibrio glomérulo tubular. Este mecanismo actúa aumentando la cantidad total reabsorbida cuando se incrementa la TFG y viceversa. Los túbulos tienden a resorber una fracción constante de la cantidad filtrada, la cual parece depender de la presión oncótica de los capilares peritubulares. El equilibrio glomérulo tubular es una segunda línea de defensa que evita que los cambios en la hemodinamia produzcan por sí mismos cambios grandes en la excreción de sodio.

Otro mecanismo que opera sobre la TFG y asegura un aporte constante de sodio a los segmentos distales, amortiguando los cambios bruscos en el filtrado glomerular, es el de autorregulación túbulo glomerular. Este mecanismo incluiría un sensor del volumen de entrega de líquido tubular o alguno de sus componentes y ajustaría la cantidad de líquido ultrafiltrado a nivel glomerular. Es decir, que si el aporte de líquido a los segmentos distales disminuye, automáticamente se aumenta el filtrado. Por el contrario, el incremento en la oferta de sodio y cloruro al túbulo distal, reduciría la secreción de renina, lo cual produciría vasodilatación de la arteriola eferente, conduciendo a una disminución en el filtrado glomerular por reducción de la presión efectiva de filtración **(Kemppainen and Behrend, 1997).**

El segundo factor natriurético que regula la excreción de sodio es la secreción de aldosterona por la corteza adrenal. La aldosterona estimula la resorción de sodio en los túbulos distales (TD) y túbulos colectores (TC), regulando el ajuste fino de la excreción, ya que el 90 % del sodio filtrado ya ha sido resorbido . Esta hormona regula el 2 % del sodio filtrado (20 % del sodio que entra a los túbulos). La secreción de esta hormona depende de los niveles de Na^+ y K^+ plasmáticos, de la estimulación por la ACTH y por la angiotensina. De estos estímulos, los más importantes son los mediados por los niveles de potasio plasmático y por el sistema renina-angiotensina. El potasio tiene un efecto directo y potente sobre la liberación de aldosterona. Cambios en la concentración de este ión en el rango de $\pm$ 1 mEq/L puede alterar la secreción de esta hormona **(Kemppainen and Behrend, 1997).**

Por otro lado, la renina es liberada por las células yuxtaglomerulares. Por lo menos 5 factores reguladores diferentes parecen intervenir en la secreción de renina :

- Uno de ellos es un mecanismo barorreceptor intrarrenal que aumenta la secreción de renina cuando la presión sanguínea intraarteriolar disminuye a nivel de las células yuxtaglomerulares.

- Otro sensor que interviene en el proceso regulador es la mácula densa, la cual parece medir la velocidad de transporte de Cl^- o probablemente Na^+ a través de esta porción del túbulo distal.

- Las prostaglandinas también estimulan la secreción de renina .

- La secreción de renina, que varía en proporción inversa a la concentración plasmática de potasio.

- Finalmente, el incremento de la actividad del sistema nervioso simpático aumenta la secreción de renina. Este efecto parece ser mediado tanto por las catecolaminas circulantes como por vía de los nervios renales, con participación de receptores β_1.

El tercer factor natriurético que regula la excreción de sodio es el PNA. Este péptido se almacena en forma de gránulos secretores en los atrios y su secreción se incrementa cuando aumenta el volumen de LEC o se ingiere una dieta rica en sodio. Su principal efecto es el de producir natriuresis, que podría ser debido a un incremento de la TFG. En las células mesangiales existen receptores al PNA y la relajación de éstas aumenta el área efectiva de filtrado. Además, reduce la capacidad de respuesta de la glándula adrenal a estímulos que generalmente incrementan la secreción de aldosterona. Todo esto conduce a incrementar la pérdida de sodio y la correspondiente pérdida de líquido **(Bianchi, 1986; Ganong, 1996; Gyton, 1991; Navar, 1997; Schauf et al., 1990).**

En años recientes se han acumulado evidencias del importante rol de los nervios renales en la regulación de la excreción urinaria de sodio. La estimulación a baja frecuencia de los nervios renales afecta directamente tanto la reabsorción tubular proximal de sodio como la liberación de renina en ausencia de cambios en la hemodinamia renal. Además, varias investigaciones demuestran que la denervación renal resulta en un incremento en la tasa de flujo urinario, que es atribuido a una disminución en la reabsorción absoluta y fraccional de sodio en el túbulo proximal **(Greenberg et al.,1991).**

Como se indicó, la cantidad de sodio corporal depende, en gran medida, de la capacidad del riñón para excretarlo.

Muchos mecanismos fisiológicos llevan a responder a un aumento en la ingesta de sal (Figura 1). Un incremento en la ingesta resulta en una reducción

de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (hormonas que retienen sal) y un aumento en la liberación de PNA (hormona de la pérdida de sal). Cada uno de estos sistemas, a su vez, interactúan con otros sistemas paracrinos en el riñón, tales como el sistema calicreína, cininas y prostanglandinas, los cuales pueden tanto regular como mejorar la respuesta. Además, un incremento en la ingesta de sal resulta en una reducción de la actividad de los nervios simpáticos renales. El efecto neto de estas respuestas es un incremento en la excreción diaria de sodio **(Cowley, 1997).**

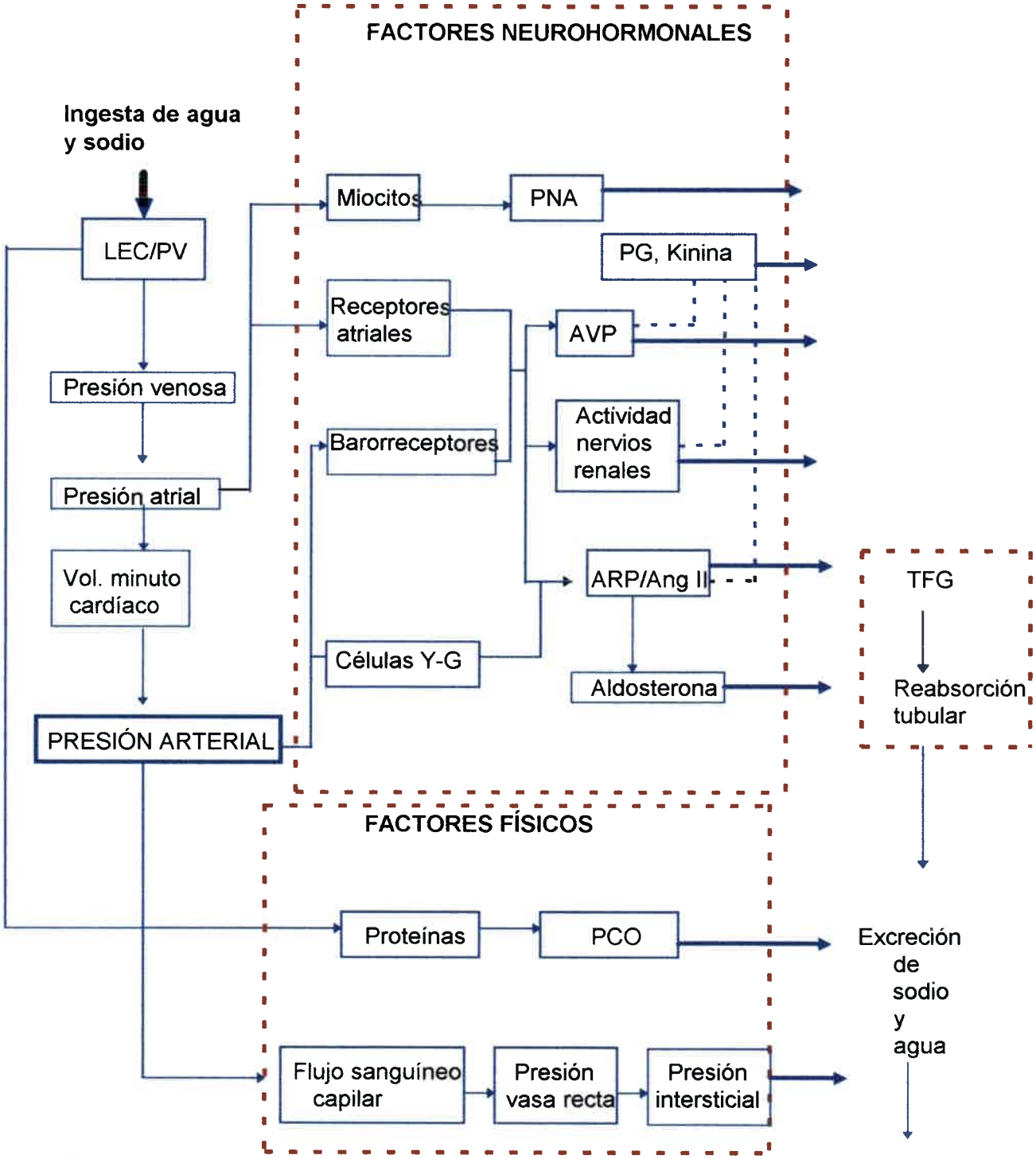


Figura1 : Representación esquemática de los mecanismos a través de los cuales los cambios en el volumen sanguíneo son detectados y estas señales son transmitidas vía factores neurohumorales y físicos para controlar la retención de sodio y agua. PNA, péptido natriurético atrial; Ang II, Angiotensina II; AVP, argininvasopresina; PCO, presión coloideosmótica; LEC, líquido extracelular; TFG, tasa de filtrado glomerular; Y-G, yuxtaglomerular ; PG, prostaglandinas ; ARP, actividad renina plasmática ; PV, presión-volumen (Cowley, 1997).

Como puede verse, cualquier factor que modifique la ingesta de sal o que altere el delicado equilibrio entre la carga filtrada y la tasa de reabsorción tubular puede llevar a una inapropiada retención de sodio y agua y, en consecuencia, incrementar el volumen sanguíneo y probablemente, la presión sanguínea **(Navar, 1997).**

Normalmente, un incremento en la ingesta diaria de sodio es excretado y provoca un riesgo mínimo en la presión sanguínea. Sin embargo, en algunos individuos, la elevada ingesta de sal está asociada con aumentos en la presión sanguínea arterial (PA), sugiriendo la existencia de algún tipo de susceptibilidad genética y/o adquirida **(Haythornthwaite, 1993; Cowley, 1997).**

Existen factores ambientales que pueden alterar el balance de sodio del organismo y producir cambios en la PA. Uno de estos factores es el estrés.

El término estrés ha sido muy usado por los científicos y constituye un vocablo común en el mundo civilizado. A pesar de la falta de un acuerdo general acerca de su significado, el término ha prevalecido ya que tiende a explicar un fenómeno básico de la naturaleza como es el mantenimiento del balance, equilibrio o armonía del ser vivo.

El término estrés fue acuñado por el investigador canadiense ***Hans Selye*** (1907-1982) quien definió el ***Síndrome General de Adaptación ó Síndrome de estrés*** **(Selye, 1936).** Selye, en su descripción inicial, incluyó estímulos tales como frío, injurias quirúrgicas, shock espinal, ejercicio muscular e intoxicaciones. Según este autor, el estrés sería "un síndrome producido por diversos agentes nocivos" y se desarrollaría en tres etapas :

a- "*una reacción de alarma*" inicial, caracterizada por una descarga simpatoadrenomedular inmediata; aparecería entre las 6-48 horas de la injuria inicial, involucrando una rápida disminución del tamaño del timo, bazo,

ganglios linfáticos e hígado, desaparición de tejido graso, formación de edema, transudado pleural y peritoneal y lesiones en el tracto digestivo.

b- una siguiente "*etapa de resistencia*" caracterizada por activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) y un síndrome de hipertrofia adrenal, desaparición del edema, incremento en el tamaño del timo y atrofia de las gonadas. Selye interpretó esta etapa como un reflejo de la pérdida de producción (por parte de la hipófisis anterior) de hormona del crecimiento, hormonas gonadotróficas y prolactina y un aumento de los "principios tirotróficos y adrenotróficos". La persistencia de cantidades relativamente pequeñas de injuria o injurias pequeñas podría llevar a la resistencia en esta segunda etapa y el organismo podría retornar a la normalidad. Sin embargo, si el estímulo continúa con la misma intensidad, el animal podría perder su resistencia en un par de meses y sucumbir con síntomas similares a los de la primera etapa, entrando en una tercera fase de "*agotamiento y muerte*". Selye sugirió que formas más o menos pronunciadas de esta reacción en tres fases representarían las respuestas más usuales del organismo a estímulos tales como cambios de temperatura, drogas y ejercicio **(Selye, 1936; Chrousos et al., 1988; Hursin and Olff, 1993).**

La respuesta al estrés persistió evolutivamente debido a que fue ventajosa en la selección natural. Este mecanismo podría proveer los medios necesarios para anticipar o responder rápidamente a amenazas de la supervivencia o bienestar del organismo y para preservar la constancia del medio interno por ajustes a corto plazo de la actividad de diversos sistemas. Cuando la respuesta no mantiene la homeostasis y la resistencia falla debido a una inadecuada o excesiva activación de los sistemas compensadores, se pueden producir daños físicos y psicológicos. Esta condición, asociada con experiencias perturbadoras tales como ansiedad, miedo o cólera se denomina distrés; la evitación o la anulación del distrés y sus consecuencias patológicas es uno de los objetivos principales de las ciencias.

La homeostasis y la respuesta al estrés difieren en varios aspectos. La respuesta homeostática es específica para el estímulo y produce cambios que son adecuados para lograr la adaptación al disturbio. La respuesta al estrés es usualmente más generalizada y puede ser precipitada cuando los mecanismos homeostáticos son sobrepasados. Las respuestas homeostáticas son relativamente predecibles con un margen estrecho de variaciones individuales, mientras que la respuesta al estrés puede diferir marcadamente entre individuos, dependiendo de factores constitucionales así como de la historia condicionante del organismo **(Kopin et al., 1988).**

La homeostasis es, en resumen, el estado armonioso entre la mente y el cuerpo; el estrés es el reconocimiento por el cuerpo de un agente real o potencialmente nocivo y por lo tanto del estado de amenaza de la homeostasis; el estresor es la amenaza y la respuesta adaptativa es la respuesta que el cuerpo ensaya para contrarrestar al estresor y restablecer la homeostasis y el equilibrio interno. Esta respuesta puede ser específica para el estresor o generalizada y no específica, dependiendo probablemente de la magnitud, más que del tipo de estrés.

La respuesta al estrés implica la participación de componentes endocrinos, conductuales y autónomos, coordinados de manera tal de movilizar al organismo para obtener la mejor respuesta ante el estímulo estresante y posteriormente retornar al estado homeostático **(Kopin et al., 1988).** Los cambios son coordinados por los componentes centrales y periféricos de los sistemas de respuesta al estrés (Figura 2).

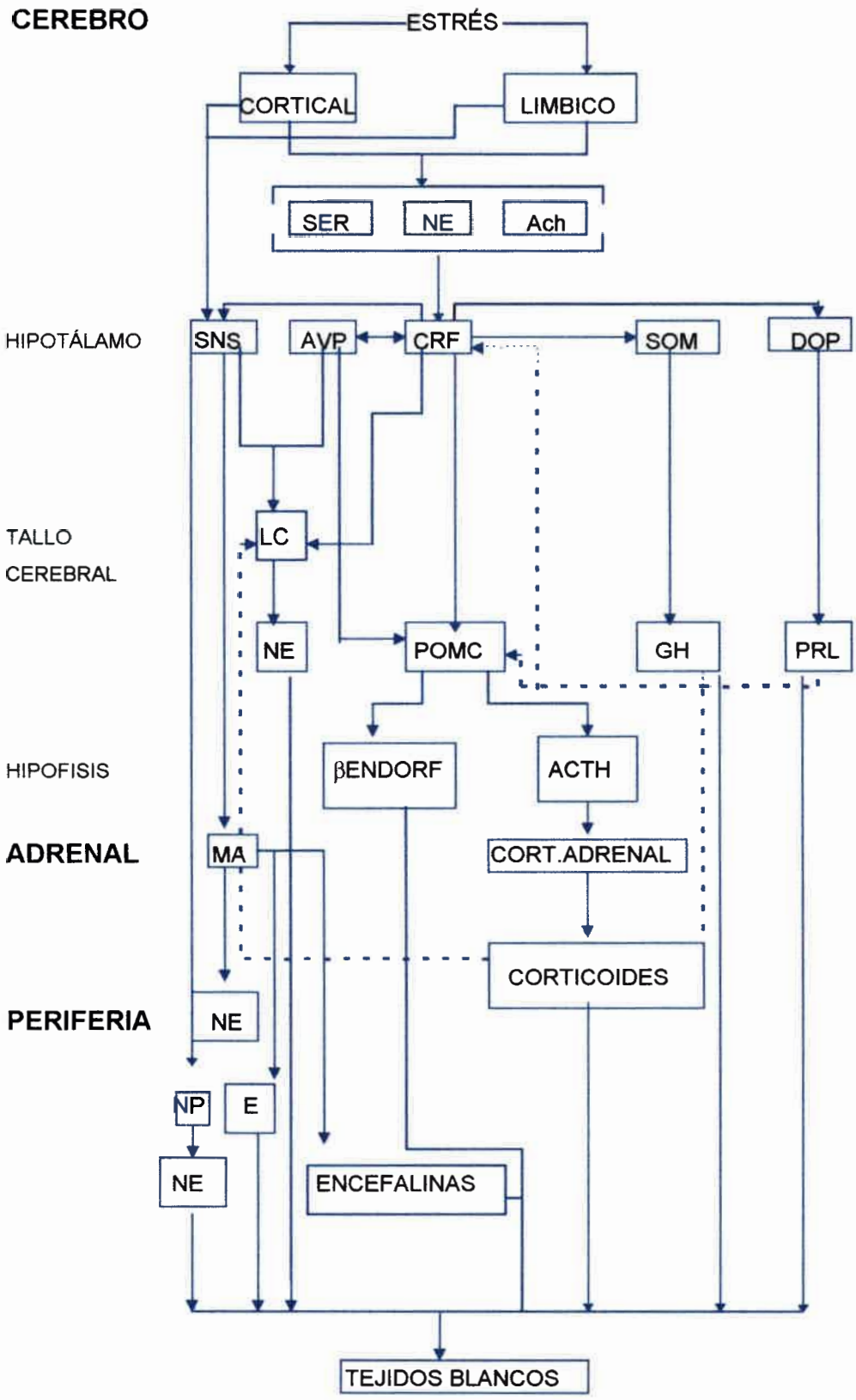


Figura 2 : Representación esquemática de la respuesta neuroendocrina al estrés. CRF: factor liberador de corticotrofina; SER: serotonina ; Ach: acetilcolina; POMC: propiomelanocortina; SNS: sistema nervioso simpático; NE: norepinefrina; E: epinefrina; LC: locus coeruleus; AVP: argininvasopresina; DOP: dopamina; SOM:

somatostatina; GH: hormona de crecimiento; PRL: prolactina; MA: médula adrenal; NP: nervios periféricos; βENDORF: betaendorfinas, ACTH; hormona corticotrófica (Modificado de Black, 1994).

----------Estimulación
- - - - - - - - -Inhibición

Los componentes centrales de estos sistemas están constantemente recibiendo información desde los centros superiores del sistema nervioso central, desde la periferia y el medio ambiente. Este sistema de respuesta al estrés comprende:

1. Neuronas parvicelulares productoras de la hormona liberadora de la corticotrofina (CRH) y de la argininvasopresina (AVP) del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo.

2. Neuronas CRH del núcleo paragigantocelular y otros núcleos de la médula oblonga.

3. Neuronas catecolaminérgicas del locus coeruleus y de otros grupos celulares de la médula y del puente ó protuberancia anular **(Stratakis et al., 1995).**

Se considera que la CRH es la coordinadora de la respuesta al estrés. Aunque neuronas que contienen este péptido se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro, la mayor proporción se encuentran en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Diversos estímulos parecen actuar sobre esta estructura para provocar la secreción de CRH **(Paulmyer-Lacroix et al., 1995).**

El PVN del hipotálamo recibe proyecciones de varias estructuras cerebrales:

a) El sistema límbico: el hipocampo y el núcleo amigdaloide envían fibras nerviosas al PVN. La estimulación eléctrica de cada una de estas estructuras ejerce una acción estimulatoria o inhibitoria sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA), uno de los eferentes de los sistemas de estrés, con resultados variables según el estado fisiológico del animal. No se conocen los neurotransmisores implicados en estas conexiones **(Paulmyer-Lacroix et al., 1995).**

b) Los núcleos catecolaminérgicos del tronco cerebral: las fibras adrenérgicas (cuyo origen son los grupos celulares C1, C2 y C3) y fibras noradrenérgicas (del núcleo caudal del tracto solitario, grupo celular A2 y en menor grado los grupos celulares A1 y A6) se reagrupan en el fascículo ventral noradrenérgico antes de proyectarse al PVN **(Paulmyer-Lacroix et al., 1995; Li et al., 1996; Aguilera, 1994; Dallman, 1993; Terrazino et al., 1995).**

c) Núcleo arcuato del hipotálamo: Este núcleo contiene un gran número de péptidos y neurotransmisores, entre ellos β endorfinas y neuropéptido Y, aunque el rol de estos factores como mediadores de la liberación de CRH durante la respuesta temprana al estrés y al estrés crónico permanecen sin ser determinados **(Paulmyer-Lacroix et al., 1995).**

d) Núcleo del rafe: la inervación serotoninérgica (proveniente de los grupos celulares B7, B8 y B9) del PVN es débil comparada con la inervación catecolaminérgica. El rol de serotonina en el control de eje HPA bajo condiciones fisiológicas permanece controvertido **(Armario et al., 1992; Paulmyer-Lacroix et al., 1995).**

e) Núcleo supraquiasmático del hipotálamo: que envía fibras serotoninérgicas al PVN **(Paulmyer-Lacroix et al., 1995).**

f) Otras influencias: El PVN también recibe abundante inervación angiotensinérgica y los receptores de Angiotensina II (Ang II) están presentes en el PVN, especialmente en células que contienen CRH. La Angiotensina podría contribuir al incremento, independiente de catecolaminas, en la expresión del CRH luego de un estrés agudo **(Aguilera, 1994 ; Aguilera et al., 1995).**

Los efectores periféricos de la respuesta al estrés comprenden al eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) y al sistema simpatoadrenomedular (SAM).

Con respecto al eje HPA, a los pocos minutos de producido un estrés, aumenta el mRNA de la CRH, entonces ésta aparece en el PVN. La CRH se mueve a lo largo de axones hacia la eminencia media y luego es secretada al sistema porta hipofisario, alcanzando así la hipófisis anterior. Allí, la CRH actúa sobre las células basófilas para producir la síntesis de propiomelanocortina (POMC), una proteína que luego es clivada para dar origen a adrenocorticotrofina (ACTH), β endorfina y αMSH (hormona melanocito estimulante) **(Kemppainen and Behrend, 1997)**.

Como se indicó, también la AVP promueve la liberación de ACTH, pero los dos péptidos parecen tener diferentes efectos sobre las células de la hipófisis. La CRH actúa estimulando tanto la síntesis del mRNA de la POMC como la secreción de ACTH; esta acción es sensible a la inhibición por glucocorticoides. En contraste, AVP no parece estimular la secreción de ACTH ; sin embargo, en combinación con la CRH, AVP potencia la liberación de ACTH y es menos sensible a la inhibición por glucocorticoides **(Dallman, 1993; Antoni, 1993; Black, 1994a; Fuchs and Flugge, 1995).**

La ACTH es liberada de manera pulsátil a la circulación, con dos ritmos independientes de secreción: uno de corta duración y a una frecuencia de 3

pulsos por hora (micropulsos) y otro de mayores elevaciones de ACTH cada dos horas (ritmo ultradiano mayor) **(Antoni, 1993; Sarnyai et al., 1995).**

El incremento de la secreción de la ACTH promueve la secreción de glucocorticoides desde la glándula adrenal. Los altos niveles de corticoides juegan un rol importante en el mantenimiento del aporte de energía y en la modulación de las respuestas de reconocimiento, inmunes y cardiovasculares. Los glucocorticoides también contribuyen a las respuestas viscerales al estrés ya que estimulan la síntesis de catecolaminas y modulan los efectos metabólicos y cardiovasculares de las catecolaminas **(Aguilera, 1994).**

Además, se ha postulado que los glucocorticoides tienen un importante efecto protector, debido a que modularían la respuesta normal del organismo al estrés, previniendo amenazas a la homeostasis por reacciones exageradas **(Munck et al., 1984).**

Los niveles basales de expresión de la CRH en el PVN están bajo el efecto negativo de los glucocorticoides. Estas hormonas inhiben al eje HPA directamente a nivel de los corticotrofos pituitarios y a distintos sitios en el cerebro incluyendo el PVN e hipocampo. El sitio primario para la retroalimentación bajo condiciones basales es el hipocampo, el cual contiene receptores de esteroides de alta afinidad sensibles a niveles de "no estrés" de glucocorticoides circulantes.

La acción central de la corticosterona, el principal glucocorticoide de la rata, es mediada por receptores mineralocorticoides (MR) de alta afinidad, tipo 1 (Kd=0.3 nM para Corticosterona) y receptores glucocorticoides (GR) de baja afinidad, tipo 2 (Kd=3 nM). La mayor expresión de MR y GR se encuentra en el hipocampo. Una alta densidad de GRs está presente en los sitios clásicos de retroalimentación del PVN e hipófisis. Los MRs prevalecen en neuronas límbicas. Los niveles basales de corticosterona predominantemente ocupan los

MR, mientras que durante el estrés y el pico circadiano progresivamente se ocupan ambos tipos de receptores **(De Kloet, 1995; Oitzl et al., 1995; Aguilera, 1994; Dallman, 1993; Young et al., 1995).**

El segundo de los sistemas periféricos de la respuesta al estrés es el sistema simpatoadrenomedular (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 aproximadamente 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 en la síntesis de NA, la NA es entonces sintetizada y secretada. La activación del sistema nervioso simpático por LA CRH resulta en liberación de NA desde las terminales nerviosas simpáticas periféricas. Además, NA, pero particularmente adrenalina (A), son secretadas en la médula adrenal. Elevados niveles de NA y A están invariablemente presentes durante el estrés y representan la segunda principal clase de hormona del estrés en orden de importancia. Los efectos más importantes de las hormonas de la médula adrenal comprenden estimulación de glucogenolisis, lipolisis, incremento en la fuerza y frecuencia de contracción miocárdica, incremento de la excitabilidad del corazón, aumento del estado de atención o alerta, vasoconstricción, vasodilatación en músculo, incremento de la tasa metabólica, etc. Todas estos efectos permiten al organismo prepararse para lo que Cannon denominó "reacción de lucha-huída" **(Black, 1994b; Kemppainen and Behrend, 1997; Paulmyer-Lacroix et al, 1995).**

La activación de los sistemas de respuesta al estrés provoca innumerables efectos que parecen depender de la duración y tipo de estresor utilizado. De acuerdo a la duración del estrés, éste se puede clasificar en

estrés agudo (cuando el organismo es expuesto una única vez al estresor) y estrés crónico (cuando el estresor se presenta más de una vez). Además, el estrés crónico puede ser de presentación continua o intermitente. Otra clasificación permite dividirlo en escapable o inescapable, según la oportunidad que tenga el animal de evitar la presentación del estímulo estresante.

Se observan diferencias en las respuestas de algunas variables, dependiendo de la duración del estímulo. Por ejemplo, la propiomelanocortina modifica sus niveles en condiciones de estrés agudo y crónico **(Aguilera, 1994).** Con respecto a la ACTH, se observan variaciones, ya que en un estrés agudo sus niveles ser encuentran elevados, mientras que en condiciones de estrés crónico pueden se normales o ligeramente incrementados **(Aguilera, 1994; Tizabi and Aguilera, 1992; Bhatnagar et al., 1995).**

Los niveles de glucocorticoides se incrementan tanto en el estrés agudo como crónico **(Aguilera, 1994).** Por otro lado, el estrés altera la utilización de los neurotransmisores centrales noradrenalina y 5-HT y modifica la conducta. El contenido de NA y A de la glándula adrenal se afectan, dependiendo de la duración del estímulo **(Adell et al., 1988; Terrazino et al., 1995; Kvetnansky and Mikulaj, 1970).**

Otras de las variables afectadas son el peso corporal y la ingesta de alimentos, dependiendo de la intensidad y duración del estímulo estresante **(Martí et al., 1994b).**

El sistema inmune modifica su actividad en situaciones de estrés. En general, los efectos del estrés provocan inmunosupresión (**Stratakis et al., 1995; Black, 1994a; Hagan et al., 1993; Jain et al., 1991).**

El crecimiento y el eje reproductivo son inhibidos durante el estrés **(Stratakis et al., 1995).** Hay modificaciones en los niveles de testosterona, se afectan la espermatogénesis y la libido, disminuyen los niveles de PRL y FSH, además de observarse modificaciones en los niveles de LH **(Armario et al., 1993; Briski, 1995; Marti et al., 1993; Tsuchiya and Horii, 1995; Retana-Marquez et al., 1996).**

Los sistemas de estrés suprimen el eje tiroideo, además de inducir osteoporosis, hipercortisolemia, resistencia a la insulina, incrementos en los niveles de triglicéridos e hipertensión **(Stratakis et al., 1995; Ruiz de Gordoa et al., 1994).**

Las evidencias más fuertes acerca de que el estrés induce hipertensión provienen de estudios en animales. Estresores tales como inmovilización, estímulos auditivos, visuales y eléctricos provocan incrementos significativos de la presión sanguínea arterial en ratas **(Lawler et al., 1993).**

Otros estresores que inducen hipertensión son el ruido, el frío, el estrés mental y psicológico y el estrés por aire **(Sawada, 1993; Martin et al., 1996; Yhoshida et al., 1994).**

Los mecanismos a través de los cuales el estrés puede inducir aumentos en la presión sanguínea son múltiples.

Durante el estrés agudo, la secuencia de eventos que podrían llevar al aumento en los valores de la presión sanguínea son los siguientes:

- Los primeros efectos pueden ser atribuidos a la respuesta neurogénica (10 segundos de tiempo de latencia desde el inicio del estrés).

- Después, se produce un pico de secreción de catecolaminas (entre el primer y tercer minuto desde el comienzo del estrés).

- Esta respuesta neuroendócrina es seguida por la respuesta adrenal. El pico máximo de secreción de la ACTH se observa a los 5 minutos y el de la corticosterona a los 10-15 minutos de comenzado el estrés **(Gamallo et al, 1992).**

El desarrollo y mantenimiento de la hipertensión luego de estrés agudo o crónico podría deberse a varios factores. La hipersecreción de glucocorticoides podría jugar un rol importante en el mantenimiento a largo plazo de la hipertensión, cuando la respuesta neurogénica no puede ser mantenida por el alto costo energético. El mecanismo a través del cual los glucocorticoides participarían en el mantenimiento de la hipertensión, podría ser por efectos relacionados al control de la volemia **(Gamallo et al., 1992).**

Por otra parte, el control de la volemia está estrechamente relacionado con el nivel de sodio corporal. Esto permite suponer que si un factor tal como el estrés alterara los mecanismos que regulan la homeostasis del sodio, entonces podría inducir incrementos en la presión arterial, modificando el balance del ion.

Tanto el estrés como una dieta rica en sal parecen interactuar con un fondo genético en ciertos individuos para incrementar el riesgo de desarrollar hipertensión. La superposición de estos dos factores con la predisposición genética podrían actuar sinérgicamente para producir hipertensión.

Este sinergismo se evidencia por la observación del desarrollo de hipertensión solamente cuando ambos factores de riesgo están presentes o por un incremento en la rapidez con la cual se aumenta la presión arterial.. El estrés y las dietas ricas en sal podrían actuar sobre un sistema de control

común para causar elevaciones de la presión arterial **(Bhomann et al., 1994; Lawler et al., 1985; Ely et al., 1987; Huang and Leenen, 1995).**

En la cepa SHR (ratas espontáneamente hipertensas), el estrés puede acelerar el desarrollo de hipertensión, pero la combinación de los dos factores, estrés e ingesta alta de sodio, parece producir mayores presiones arteriales que cada condición por separado **(Bhomann et al., 1994; Lawler et al., 1985; Ely et al., 1987; Huang and Leenen, 1995).**

Además, se ha demostrado en perros que la exposición a un estrés crónico en combinación con una carga de sal incrementa la presión sanguínea durante los 12 días que dura el tratamiento. Ni el estrés solo, ni la ingesta de sal sola fue suficiente para incrementar la PA, lo cual provee evidencias del sinergismo entre estrés y dietas ricas en sodio para producir hipertensión **(Tucker and Hunt, 1993; Light et al., 1983).**

Otros autores encuentran que los conejos salvajes responden con una alta ingesta de sodio cuando son estresados con un estímulo de tipo psicológico y esto parece ser mediado vía liberación de ACTH. La presencia de mayores depósitos de sodio podría ser una ventaja considerable en la mayoría de las situaciones de estrés ambiental, dado que esto puede proteger la función cardiovascular y también mejoraría los mecanismos de control neuroendócrinos. Por ejemplo, una alta ingesta de sodio parece reforzar el poder simpático para aumentar los niveles de transmisor liberado por cada impulso o descarga nerviosa **(Ely et al., 1987).**

Un aspecto interesante de los efectos del estrés es la determinación de la perdurabilidad de los cambios producidos, una vez suprimido el agente estresante y el grado de adaptación del organismo a la presentación repetida del estímulo.

Selye, en 1937, fue el primero en indicar que la actividad visceral, indicativa del estrés, frecuentemente disminuía después de la exposición repetida al estresor. Se ha propuesto que esa disminución en la respuesta sería consecuencia de procesos de aprendizaje no asociativos conocidos como *adaptación* **(Pitman et al, 1995).**

El proceso de adaptación (también conocido como habituación) durante las exposiciones crónicas, se encontró en varios modelos de estrés, pero no en todos. También se ha indicado sensibilización adrenal por estrés crónico en algunos, pero no en todos los estudios realizados. Pitman et al (1995) encuentran que la estimulación repetida con shock en la cola puede producir tanto adaptación como sensibilización, dependiendo de la intensidad del estrés. El proceso de adaptación parece producirse en el inicio de la exposición crónica, mientras que la sensibilización depende del tiempo y puede ser observada hacia el final de la presentación del estímulo. Con un estresor de moderada intensidad, ambos procesos pueden ser observados en función del tiempo, pero la adaptación es capaz de contrarrestar a la sensibilización. Sin embargo, con una alta intensidad de estrés, el proceso de adaptación puede ser contrarrestado por la respuesta de sensibilización. Groves y Tompson (1970) sugirieron que el nivel y duración de la sensibilización están directamente relacionados con la intensidad del estímulo. Además, Tompson y Spencer (1966) establecieron que la respuesta de adaptación sería una función inversa de la intensidad del estímulo **(Gamallo et al., 1992).**

Diferentes medidas de la actividad del eje HPA han mostrado que ésta aumenta, no cambia o incluso disminuye por exposición a estrés crónico en diferentes experimentos. Aunque las discrepancias pueden ser debidas a diferencias en el sexo, razas o estados reproductivos de los animales y métodos de muestreo, así como en la cantidad y calidad de las propiedades

del estrés, la influencia de estos factores y la interacción entre ellos no es clara **(Tizabi and Aguilera, 1992; Bhatnagar et al.,1995).**

Por otra parte, se ha demostrado que la exposición prolongada a algunos tipos de estrés resulta en hiperactividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal a un nuevo estímulo, a pesar de la desensibilización de la respuesta de ACTH hipofisiaria al estresor primario **(Tizabi and Aguilera, 1992; Curtis et al., 1995).**

La exposición crónica a un estrés intermitente resulta en un aumento significativo en la biosíntesis de catecolaminas y en la capacidad de depósito en los tejidos periféricos comparado con los niveles de ratas no estresadas. Sin embargo, otros estudios muestran que la respuesta de catecolaminas en plasma de animales expuestos repetidamente al mismo estresor es reducida en relación a la respuesta de los animales expuestos al mismo estresor por primera vez. Se ha sugerido que la atenuada respuesta del sistema adrenomedular de animales crónicamente estresados refleja una experiencia de los sistemas fisiológicos de activarse lo mínimo necesario para mantener el balance homeostático durante la exposición a un estresor. Este proceso de habituación lleva a la conservación de energía por amortiguación de la respuesta fisiológica del animal a un estresor familiar. En contraste, cuando los animales crónicamente estresados son sometidos a un nuevo estresor, hay un dramático aumento en la respuesta del SAM comparada con animales expuestos al estresor por primera vez. Esto demostraría que, aunque el ambiente del animal crónicamente estresado es altamente adverso, también es de cierta manera, predecible. Como resultado, la introducción de un nuevo estresor podría despertar más desafíos homeostáticos en un animal crónicamente estresado que en un animal sin experiencia previa de estrés **(Mabry et al., 1995).**

Cuando se expone al animal crónicamente estresado a un estímulo nuevo o heterotípico, se observa una hiperrespuesta tanto del HPA como del SAM, en comparación con los animales controles expuestos al mismo estresor por primera vez. La presentación del estresor heterotípico produce un mayor incremento en la corticosterona, NA y A que en animales sin una presentación previa al estresor crónico. Por lo tanto, el HPA y el SAM son activados por el mismo estímulo y su activación sirve para orquestar la conducta del organismo y las respuestas fisiológicas al estresor **(Bhatnagar et al., 1995).**

Otras variables en las que se ha estudiado el fenómeno de adaptación son: variaciones en el peso corporal e ingesta de alimentos **(Martí et al., 1994a; Campmany et al., 1996; Mabry et al., 1995; Ortiz et al., 1985)**, número de receptores a la CRH **(Aguilera, 1994)**, activación del LC **(Curtis et al., 1995)**, niveles plasmáticos de transcortinas **(Fleshner et al., 1995)**, utilización de neurotransmisores centrales **(Adell et al., 1995)** y muchas otras. El fenómeno de adaptación parece depender de la variable estudiada y del estresor utilizado.

De los antecedentes expuestos, puede observarse que los mecanismos que gobiernan la ingesta y excreción de sodio están relacionados directa o indirectamente con los efectores de las respuestas al estrés. Por lo tanto, podría pensarse que la exposición de los animales a una situación de estrés provocaría alteraciones en el balance de sodio corporal. En general, los efectos del estrés sobre el balance de sodio han sido poco estudiados y los experimentos han tendido a analizar los efectos a corto plazo. No han sido exhaustivamente estudiados los efectos de un estrés fuerte, aplicado crónicamente, sobre la ingesta y excreción de sodio en ratas. Además, la perdurabilidad de los efectos y la sensibilidad del los mecanismos involucrados para desarrollar habituación no han sido establecidos.

En base a estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

OBJETIVOS

- Evaluar las modificaciones en el consumo y excreción de sodio y agua en animales estresados de forma aguda y crónica y relacionarlas con las variaciones en la presión arterial.

- Determinar la perdurabilidad en el tiempo y la adaptabilidad de los cambios provocados por el estrés crónico sobre el balance hidrosalino.

HIPÓTESIS

Los cambios observados en la presión arterial durante el estrés crónico se deben a un incremento de la volemia provocado por una mayor ingesta de sal y una retención renal de sodio y agua. Estas modificaciones en el balance hidrosalino son reversibles y no son sensibles a adaptación.

Predicciones:

- Si el estrés modifica la ingesta de sodio, entonces los animales sometidos a inmovilización (IMO) crónica mostrarán un incremento en la ingesta de NaCl 1.5 % respecto de sus controles no estresados.

- Si el estrés produce retención renal de sodio y agua, entonces la IMO crónica provocará antidiuresis y antinatriuresis.

- Si los cambios en la presión arterial son provocados por las modificaciones en la ingesta y la excreción de sodio, entonces los animales estresados que

ingieren NaCl mostrarán un incremento más significativo en la presión sanguínea arterial que sus controles no estresados.

- Si los cambios inducidos por el estrés son reversibles, entonces la supresión del agente estresante permitirá el retorno de las variables a sus valores de pre-estrés.

- Si las modificaciones de la ingesta y excreción no son sensibles a adaptación, la presentación del estímulo en forma crónica producirá la misma intensidad de respuesta que una única sesión de IMO.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

EXPERIMENTO 1:

EFECTOS DEL ESTRES CRÓNICO SOBRE EL BALANCE HIDROSALINO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200-250 g de peso corporal, las cuales fueron alojadas en cajas individuales en condiciones estándares de bioterio (temperatura de 20 ± 2 °C), período de luz-oscuridad de 7.30 AM a 7.30 PM, con agua y alimento "ad-libitum").

Previo a la realización de los experimentos, los animales fueron sometidos a un período de entrenamiento (reconocimiento de jaulas metabólicas durante 24 hs). Posteriormente, los animales fueron asignados a dos grupos experimentales de acuerdo con dos diferentes condiciones: Grupo A, el cual recibió como bebida agua corriente "ad-libitum" y Grupo B, el cual tuvo la opción de elegir, también "ad-libitum", entre dos botellas que contenían, una de ellas agua corriente y la otra solución salina ligeramente hipertónica y por ello, aversiva (NaCl al 1,5%).

En cada grupo se determinó el peso corporal de los animales al inicio y al final del período experimental. Al mismo tiempo, se controló la ingesta de solución salina, agua y alimento mientras las ratas permanecían en las jaulas individuales.

La mitad de los animales de cada grupo permanecieron como animales controles y la otra mitad fue sometida al agente estresante. La sesión de estrés consistió en dos horas diarias de inmovilización en plancha (IMO), entre las 10 y 12 AM) durante 13 días (período experimental) según el método descrito por **Michajloskij et al. (1988)**. La plancha es una tabla de madera de 20 x 20 cm,

con cuatro soportes metálicos apoya-miembros en sus ángulos, donde se sujetan las patas del animal con cinta hospitalaria.

Entre cada sesión de estrés las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales, con acceso libre al alimento y a la bebida.

Los días 1, 7 y 13 después de las dos horas de IMO, todos los animales se colocaron durante 22 hs en jaulas metabólicas de acero inoxidable, en las cuales podían beber agua y/o solución salina. Durante este período, los animales no tuvieron acceso al alimento, para evitar la influencia de la anorexia causada por el estrés sobre las variables medidas. En este tiempo se recolectó la orina y se determinó la ingesta de agua y solución salina. La ingesta de líquido se midió por diferencia de peso de las botellas utilizadas como bebederos. En la orina recolectada se procedió a determinar la diuresis, natriuresis, caliuresis y osmolaridad urinaria.

Posteriormente, los animales fueron decapitados y la sangre se recogió con heparina para la determinación de los niveles de corticosterona plasmática por radioinmunoanálisis (RIA), la osmolaridad, el sodio y el potasio plasmáticos.

Determinación de la natriuresis y caliuresis :

La natriuresis y la caliuresis se determinaron mediante un Analizador de iones Tecnolab modelo T410, el cual emplea electrodos ion selectivos. Estos electrodos se basan en las propiedades especiales de ciertas membranas y vidrios, de desarrollar un potencial eléctrico según la ecuación de Nernst-Peter para un ion específico en solución.

Determinación de la osmolaridad :

La osmolaridad fue determinada en un Wescor Pressure Osmometer. La presión de vapor y el punto de congelación son propiedades coligativas de una solución. Comparadas con el solvente puro, estas propiedades son alteradas en proporción al número de partículas de soluto disueltas por cada kilogramo de solvente (agua en el caso de las soluciones biológicas). Por lo tanto, una medida de estas propiedades constituye una forma indirecta de determinar la concentración de las soluciones, su osmolaridad.

Determinación de la corticosterona :

La determinación de la corticosterona plasmática se realizó siguiendo el protocolo que se detalla:

Reactivos del análisis

- -Etanol absoluto
- -Fosfato monosódico y Fosfato disódico
- -Gelatina
- -Cloruro sódico

Reactivos del líquido de centelleo

- -Tolueno
- -PPO
- -POPOP
- -Tritón X-100

Reactivos específicos

- -Tampón fostato 0.01 M, pH=8.2, conteniendo 0.9% NaCl y 0.1% gelatina. Se conserva 1-2 semanas a 4 °C.
- -Corticosterona tritiada con una actividad específica de 70-80 Ci/mmol

- -Antisuero contra corticosterona, obtenido de conejo, procedente de Bioclin (UK).
- -Patrón: corticosterona fría procedente de Sigma. De esta corticosterona se preparó una solución original de 10 mg/ml en etanol absoluto (solución madre) y a continuación una de 10 ug/ml (primera hija). Ambas se mantuvieron a 4 °C y son estables por 1 año y 1-2 meses respectivamente.
- -Carbón activado.

Procedimiento

- Curva patrón: El día del análisis se preparó una solución de trabajo tomando 16 µl de la solución hija y diluyéndola en 984 µl de tampón de RIA (se obtiene una solución de una concentración de 1600 pg/10 µl). A partir de ésta, se prepararon diluciones a la mitad hasta una concentración de 25 pg/µl. En los tubos correspondientes a la curva patrón en el análisis, se pusieron 10 µl de tampón (ceros y unión no específica = NSB) o 10 µl de los patrones correspondientes.

- Antisuero: Se tomaron las alícuotas necesarias del antisuero y se disolvieron en el tampón del RIA en la proporción determinada por la valoración del antisuero (presumiblemente 7,5 ml por alícuotas de 100 µl) y de la solución obtenida se colocó 100 µl en cada tubo de RIA (excepto a los no específicos que en lugar de antisuero llevaron 100 µl de tampón).

- Hormona marcada: Se preparó una solución intermedia a partir de la solución original suministrada por la casa comercial, exactamente en los mismos disolventes que la solución original y mantenida como ésta a -20 °C. A partir de la solución hija se preparó la solución de trabajo disolviendo la hormona marcada en el tampón del RIA. Esta dilución contenía siempre unas 8000 cpm/100 µl de tampón.

Los reactivos se añadieron a los tubos en el siguiente orden:

- 10 μl de patrón o tampón o muestra.
- 200 μl de tampón y luego se agitó en un vortex.
- Se colocaron los tubos durante 30 min a 70 °C en un baño y luego se enfriaron en hielo.
- Se colocó 100 μl de la hormona marcada.
- Se agregó 100 μl del antisuero (excepto a los no específicos).
- Se agitaron los tubos en un vortex y se incubó a 4 °C durante 18-24 h.

Al día siguiente, se preparó una suspensión de carbón activado en tampón (1%), manteniendo la suspensión en agitación constante y a 4 °C durante 15 min. antes de añadirlo a los tubos (0.5 ml). Una vez añadido el carbón a los tubos, se agitaron y se centrifugaron (4000 rpm, 15 min, 4 °C). En esta fase los tubos permanecieron siempre a 4 °C, con la gradilla en una cubeta con agua-hielo. Cuando se sacaron de la centrífuga inmediatamente se decantó el sobrenadante en los viales de centelleo. Esta fase se debe realizar lo más rápidamente posible, dado que se puede resuspender parcialmente el carbón. Una vez que los viales contenían el sobrenadante se añadió el líquido de centelleo. Se agitaron bien los viales y se determinó la radioactividad del sobrenadante en un contador beta. Se confeccionó una curva en papel logi-log, graficando en el eje *x* las concentraciones de los estándares y en el eje y el porcentaje de unión. El porcentaje de unión se calculó por la siguiente ecuación :

$$\% \text{ de unión} : \frac{\text{cpm de la muestra o estándar - cpm de tubo NSB}}{\text{cpm del tubo cero - cpm del tubo NSB}}$$

cpm : cuentas por min.

NSB : unión no específica.

Para cada una de las muestras se calculó el porcentaje de unión y se extrapoló en la curva de manera de obtener la concentración de corticosterona correspondiente.

Análisis estadístico :

La significación estadística de los datos fue evaluada por un ANOVA de 3 vías (factor 1: disponibilidad de solución salina, factor 2 : tratamiento, control o estrés, factor 3 : tiempo, días de tratamiento) con medidas repetidas de uno de los factores (días) . Se utilizó un ANOVA de dos vías para el análisis de los datos totales obtenidos del período experimental (ingesta de alimentos, ganancia de peso corporal). Como test *a posteriori* se utilizó el test de Student-Newman-Keuls (NSK) cuando fueron apropiadas las comparaciones *post-hoc.* Cuando fue necesario, se utilizó la transformación logarítmica para obtener homogeneidad de varianza. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como la media ± SEM (error estándar del término medio). El procesamiento de los datos se realizó con el software Statistica.

EXPERIMENTO 2 :

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RECUPERACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL METABOLISMO HIDROSALINO

Se utilizaron ratas macho de aproximadamente 250 g de peso corporal, las cuales fueron mantenidas en jaulas individuales y en condiciones estándar de bioterio durante 28 días con comida "ad-libitum" y libre acceso a agua corriente y solución salina de NaCl al 1,5 % como agua de bebida.

El día 1 del período experimental, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 22 hs, con el fin de realizar el registro basal (B) de las variables estudiadas. Un día después, todos los animales fueron sometidos a estrés por IMO durante 2 hs por día por el término de 13 días, al cabo de los cuales se suspendió el estrés y se continuó con el registro de los parámetros durante 14 días más.

Los días 1 (B), 3 (E1), 9 (E2), 15 (E3), 17 (R1), 21(R2), 25 (R3) y 28 (R4) las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas durante 22 hs. En este período se midió el volumen urinario, la ingesta de agua y solución salina, la excreción urinaria de sodio y potasio y la osmolaridad urinaria.

La determinación de la ingesta de agua, solución salina y orina se realizó por diferencia de peso de los contenedores y el Na^+ y K^+ de la orina por un Analizador de iones Tecnolab t410. La osmolaridad urinaria se determinó en un Wescor Pressure Osmometer.

Análisis estadístico :

El análisis estadístico de los datos se realizó por un ANOVA de una vía de medidas repetidas (factor tiempo) y se utilizaron dos test *a posteriori*: el test

de Dunnet para comparar el valor control versus cualquier otro tratamiento y el test de Tukey que se utilizó para realizar comparaciones entre tratamientos. Cuando fue necesario, se utilizó la transformación logarítmica para obtener homogeneidad de varianza. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como la media ± SEM. El procesamiento de los datos se realizó con el software Statistica.

EXPERIMENTO 3 :

DETERMINACIÓN DE LA ADAPTACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL METABOLISMO HIDROSALINO.

Se utilizaron ratas Wistar macho de aproximadamente 270 g de peso corporal al comienzo del experimento. Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado (luz de 7.30 AM a 7.30 PM, temperatura de 20 ± 2 °C) con libre acceso a comida y bebida (agua corriente y solución de NaCl al 1,5 %). Los animales fueron alojados individualmente una semana antes de comenzar el período experimental.

Posteriormente, ellos fueron aleatoriamente asignados a los grupos control (n=14) o inmovilizados crónicamente (n=14). Estos últimos animales fueron sometidos a 2 hs de estrés por IMO cada mañana durante 13 días. Veinticuatro horas después de la última sesión de estrés de las ratas estresadas, los animales fueron divididos y asignados a dos diferentes tratamientos, resultando 4 grupos experimentales:

a) ratas controles sin posterior exposición a estrés agudo, **CC** (n=7);
b) ratas controles sujetas a IMO agudo (2 hs), **CI** (n=7);
c) ratas IMO crónicas sin estrés agudo, **IC** (n=7) y
d) ratas IMO crónicas con estrés agudo por IMO, **II** (n=7).

Después de la sesión de IMO aguda, todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 22 hs, para evaluar la ingesta de solución salina y agua y el volumen de orina.

Todos los animales fueron privados de alimentos durante el período de permanencia en las jaulas metabólicas, con el fin de reducir la influencia del consumo de alimentos sobre la ingesta de líquidos y electrolitos.

Después de las 22 hs, todos los animales fueron muertos por decapitación en una habitación separada. La sangre fue recolectada en tubos, mantenida y centrifugada a 4 °C. La corticosterona plasmática fue evaluada mediante la técnica de RIA. Se analizó además el Na^+, el K^+ y la osmolaridad plasmática. Se registró también la natriuresis, caliuresis y osmolaridad urinaria.

Tanto el sodio y el potasio urinarios como sus valores plasmáticos fueron determinados en un Analizador de iones T-410 Tecnolab y la osmolaridad en un osmómetro, como se indicó anteriormente. Se controló además, la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento durante todo el período experimental. La ingesta de alimento se determinó por diferencia de pesada entre el alimento aportado y lo remanente en cada jaula individual cada 24-48 hs.

Análisis estadístico :

La significación estadística de los datos fue analizada por un test de Student para la ingesta de alimentos y peso corporal mediante un ANOVA de 2 vías con el tratamiento previo y el tratamiento agudo como los factores principales, seguido por un test de comparación múltiple de Duncan. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados en logaritmo para obtener homogeneidad de varianza. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como la media ± el error standard de la media (SEM). El procesamiento de los datos se realizó con el software Statistica.

EXPERIMENTO 4 :

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL EN RATAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 200-250 g de peso corporal, las cuales fueron alojadas en cajas individuales en condiciones estándares de bioterio (temperatura de 20 ± 2 °C, período de luz-oscuridad de 7.30 AM a 7.30 PM, con agua y alimento "ad-libitum").

Previo a la realización del experimento, los animales fueron sometidos a un período de entrenamiento (reconocimiento de jaulas metabólicas durante 24 hs). Posteriormente, los animales fueron asignados a dos grupos experimentales, de acuerdo a dos diferentes condiciones: Grupo A, el cual recibió como bebida agua corriente "ad libitum" y Grupo B, el cual tuvo la opción de elegir, también "ad-libitum", entre dos botellas que contenían, una de ellas agua corriente y la otra solución salina (NaCl 1,5 %).

Luego de tres días de permanecer en sus jaulas individuales, la mitad de los animales de cada grupo permanecieron como animales controles y la otra mitad fue sometida al agente estresante. La sesión de estrés consistió en dos horas de IMO, entre las 10 y 12 AM. En el experimento de estrés agudo los animales fueron expuestos a una única sesión de IMO y en caso de estrés crónico, a dos horas de estrés por día durante 14 días.

Luego de la sesión de IMO (o de la última sesión de estrés en los animales estresados crónicamente), todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 24 hs. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral al 12 % (400 $mg.kg^{-1}$, **Baubet et al., 1996)** para la determinación de la presión sanguínea arterial. Para ello se procedió a realizar una incisión por la línea media del cuello, de 2 cm de longitud. Se

procedió de igual manera con el tejido subcutáneo y después se localizó el paquete vasculonervioso, a lateral izquierdo de la tráquea. Se aisló de dicho paquete la arteria carótida y se procedió a introducir un catéter que se conectó a un transductor de presión de un polígrafo Hewlett Packard.

Análisis estadístico :

La significación estadística de los datos fue analizada mediante un ANOVA de 2 vías con el tratamiento (estrés vs no estrés) y el tipo de bebida (sal más agua vs agua solamente) como los factores principales, seguido por un test de comparación múltiple de Duncan. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados en logaritmo para obtener homogeneidad de varianza. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como la media $\pm$ el error standard de la media (SEM). El procesamiento de los datos se realizó con el software Statistica.

RESULTADOS

RESULTADOS

Experimento 1: EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL BALANCE HIDROSALINO

a) Efectos del estrés crónico sobre la ingesta de alimentos y ganancia de peso corporal.

Las ratas sometidas a estrés por inmovilización crónica mostraron una disminución significativa de peso corporal al final del período experimental, así como una menor ingesta de alimentos (Tabla 1).

TABLA 1: Efectos del estrés crónico sobre la ingesta de alimentos y la ganancia de peso corporal. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=9), A= agua-no estrés; A-IMO: agua-estrés; B= agua + salina-no estrés; B-IMO: agua + salina-estrés, * p= 0,001 vs su respectivo grupo no estresado.

GRUPO	INGESTA ALIMENTO (g/rata/día)	GANANCIA DE PESO CORPORAL (g/13 días)
A	26,4 ± 1,5	28,1 ± 5,4
A-IMO	21,4 ± 0,7 *	-5,0 ± 4,7 *
B	28,5 ± 1,2	35,4 ± 5,3
B-IMO	21,5 ± 0,9 *	-9,5 ± 3,9 *

b) Efectos del estrés crónico sobre la ingesta de agua y solución salina en condiciones de bioterio

En condiciones de bioterio, cuando los animales permanecen en sus jaulas individuales, las ratas sometidas a estrés consumen menos solución salina que sus controles (Tabla 2).

TABLA 2: Efectos del estrés crónico sobre la sumatoria del consumo de NaCl 1,5% en condiciones de bioterio. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=9); B= agua + salina-no estrés; B-IMO: agua + salina-estrés. * p= 0,013 vs su respectivo grupo no estresado.

GRUPO	INGESTA DE NaCl 1,5 %
	(ml/13 días)
B	163,7 ± 38
B-IMO	66,3 ± 17,3 *

El estrés por IMO no modificó significativamente la ingesta de agua en condiciones de bioterio en ninguno de los grupos experimentales con respecto a sus controles (Tabla 3).

TABLA 3: Efectos del estrés crónico sobre la sumatoria del consumo de agua en condiciones de bioterio. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=9), A= agua-no estrés; A-IMO: agua-estrés; B= agua + salina-no estrés; B-IMO: agua + salina-estrés.

GRUPO	INGESTA DE AGUA (ml/13 días)
A	299,2 ± 18,3
A-IMO	293,2 ± 22,9
B	265,8 ± 14,4
B-IMO	266,2 ± 28,8

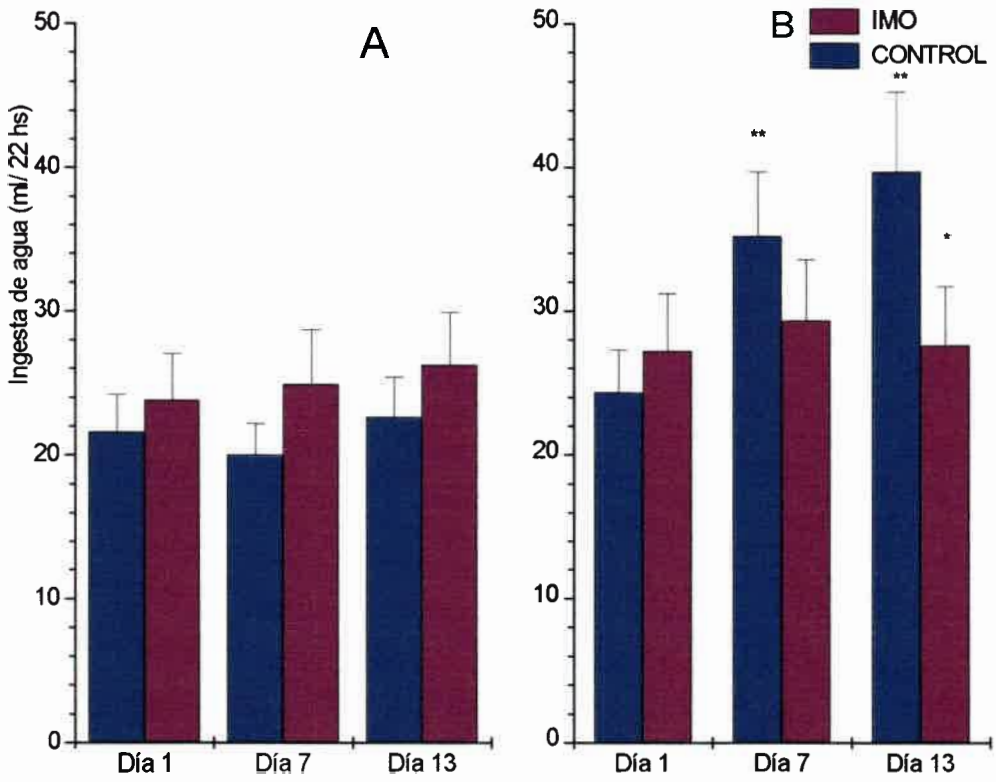
DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS LOS DÍAS 1, 7 Y 13 DEL PERÍODO EXPERIMENTAL.

c) Efectos del estrés crónico sobre la ingesta de agua.

Cuando se analizaron los efectos del estrés sobre la ingesta de agua en los tres tiempos considerados (días 1, 7 y 13 de IMO), el ANOVA reveló efectos significativos de la disponibilidad de solución salina (p= 0,05), pero no de la IMO, sobre la ingesta de agua. Sin embargo, la interacción de segundo orden, disponibilidad de solución salina por IMO, fue significativa (p= 0,03) y las condiciones de estrés por tiempo fue marginalmente significativa (p=0,075).

Las comparaciones "a posteriori" revelaron que la ingesta de agua no difirió entre las ratas controles y las ratas estresadas que no tuvieron disponibilidad de salina (Gráfico 1, A). En aquellas ratas que tuvieron la opción de beber NaCl al 1,5%, (Gráfico 1, B), la ingesta de agua se incrementó con los d ías en los animales controles pero no en las IMO crónicas, lo que resulta en una reducida ingesta de agua en las ratas estresadas con respecto a sus controles en el día 13 del período experimental (Gráfico 1).

Gráfico 1: Efectos del estrés sobre la ingesta de agua en ratas que no tuvieron acceso a solución de NaCl 1,5 % (A) y ratas que tuvieron acceso a solución salina (B) y agua. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,01 vs su respectivo grupo no estresado, ** p= 0,02 vs el grupo control al día 1.

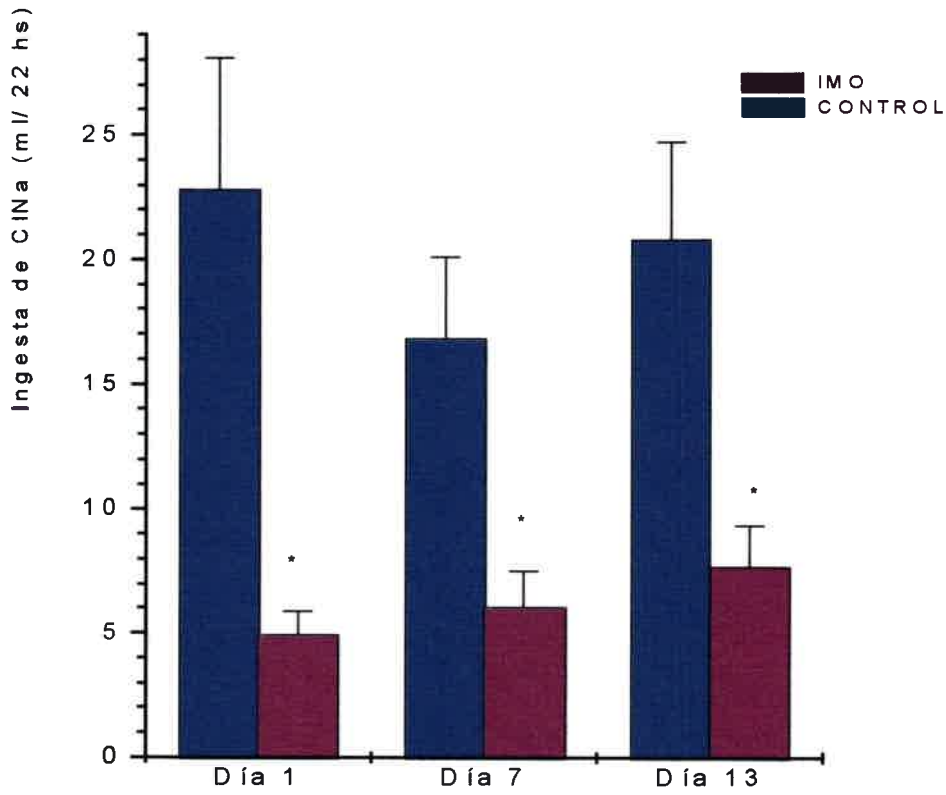


d) Efectos del estrés crónico sobre la ingesta de solución de NaCl 1,5 %.

El análisis estadístico de la ingesta de solución salina indicó efecto significativo de las condiciones de estrés (p= 0,001). No se observó efectos significativos del factor días de tratamiento y la interacción condiciones de estrés por días fue no significativa.

Las comparaciones a posteriori revelaron un reducción de la ingesta de NaCl 1,5 % en las ratas IMO durante los tres días analizados (Gráfico 2).

Gráfico 2: Efecto del estrés sobre la ingesta de solución de NaCl 1,5 %. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9, * p=0,001 vs su respectivo control no estresado.



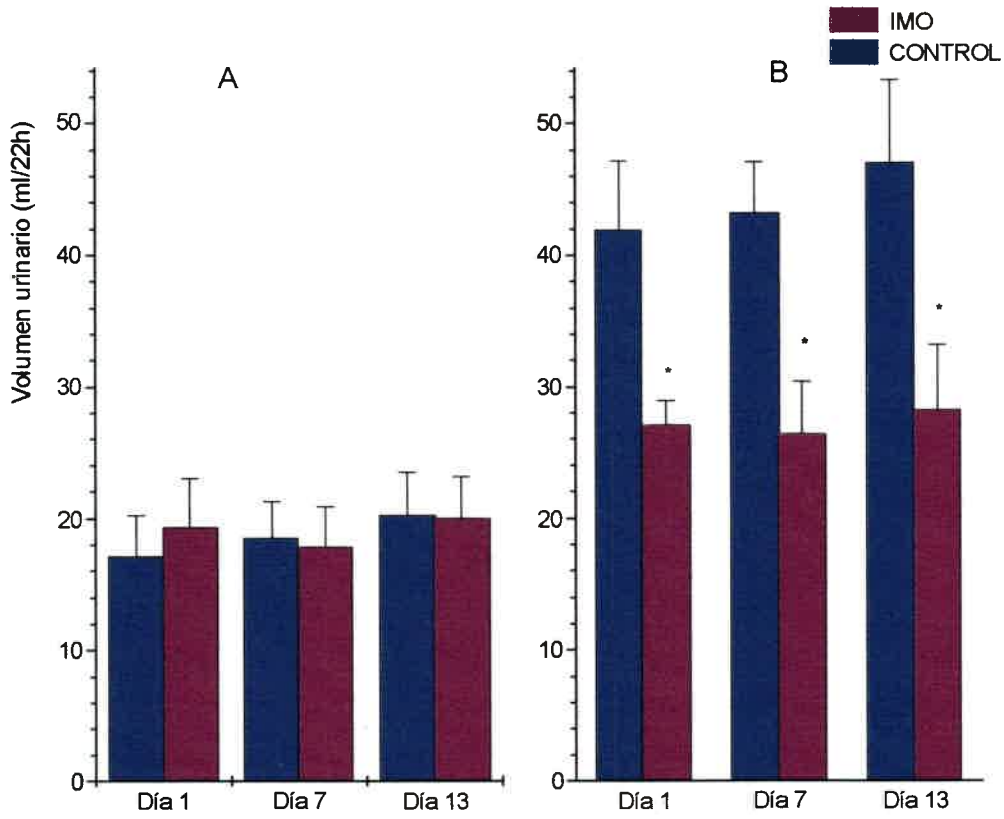
e) Efectos del estrés crónico sobre la excreción urinaria de agua.

El análisis del volumen urinario mostró un efecto significativo debido a la disponibilidad de solución salina (p= 0,001) y las condiciones de estrés (p= 0,02).

El volumen urinario fue significativamente reducido en las ratas con inmovilización crónica que tuvieron opción a beber NaCl (p=0,001), (Gráfico 3, B). En aquellos animales que bebían agua corriente solamente, la IMO no modificó el volumen urinario, (Gráfico 3, A). La interacción de la disponibilidad de solución salina por condiciones de estrés también fue significativa (p=0,002).

La disponibilidad de solución salina incrementó el volumen urinario en una mayor extensión en las ratas control que en las IMO crónicas (p=0,001 en los tres días medidos).

Gráfico 3: Efectos del estrés sobre la excreción de orina en ratas que no tuvieron acceso a solución de NaCl 1,5 % (A) y ratas que tuvieron acceso a solución salina y agua (B). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,01 vs su respectivo grupo no estresado.



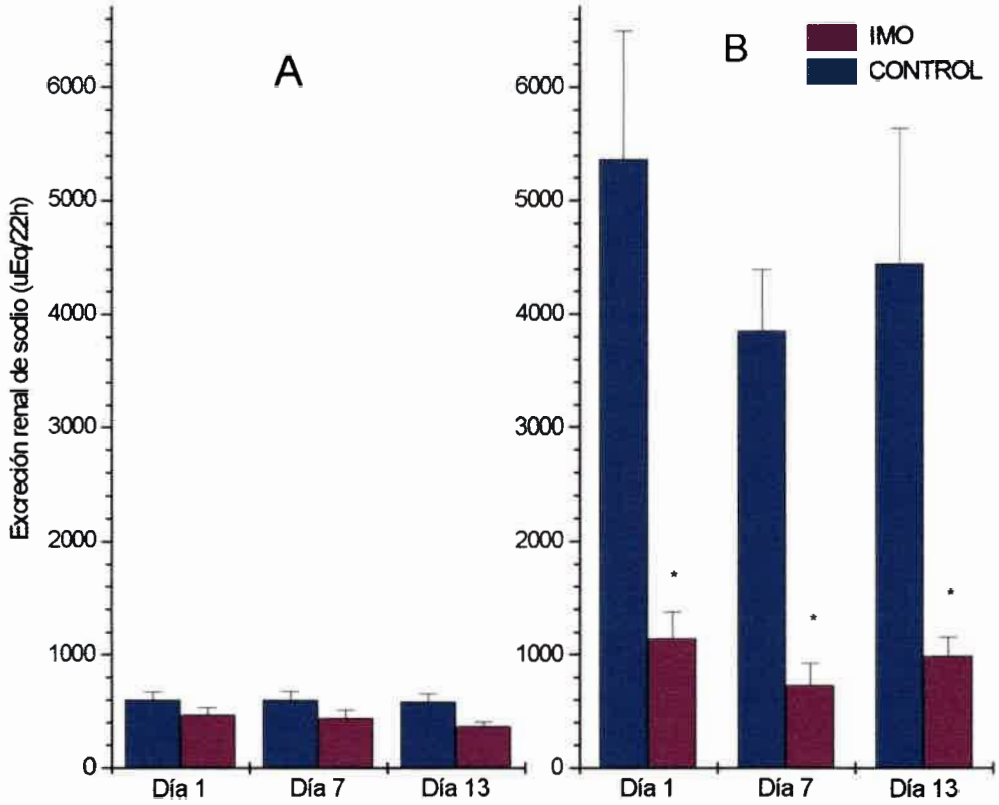
f) Efectos del estrés crónico sobre la excreción urinaria de sodio

Tanto la disponibilidad de solución salina como las condiciones de estrés ejercieron un efecto significativo sobre la excreción urinaria de sodio (p= 0,001 en los dos casos). El efecto general fue un incremento en la excreción en las ratas que ingirieron solución salina.

La interacción entre la disponibilidad de sal por las condiciones de estrés fue también significativa (p= 0,001). Las ratas crónicamente estresadas que tuvieron acceso a solución salina redujeron significativamente la excreción urinaria de sodio en los tres días analizados (p= 0,001), comparadas con las ratas controles con la misma bebida (Gráfico 4, B).

La excreción de sodio no fue modificada por las condiciones de estrés en las ratas que solamente bebían agua corriente (Gráfico 4, A).

Gráfico 4: Efectos del estrés sobre la excreción urinaria de sodio en ratas que no tuvieron acceso a solución de NaCl 1,5 % (A) y ratas que tuvieron acceso a solución salina y agua (B). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,01 vs su respectivo grupo no estresado.



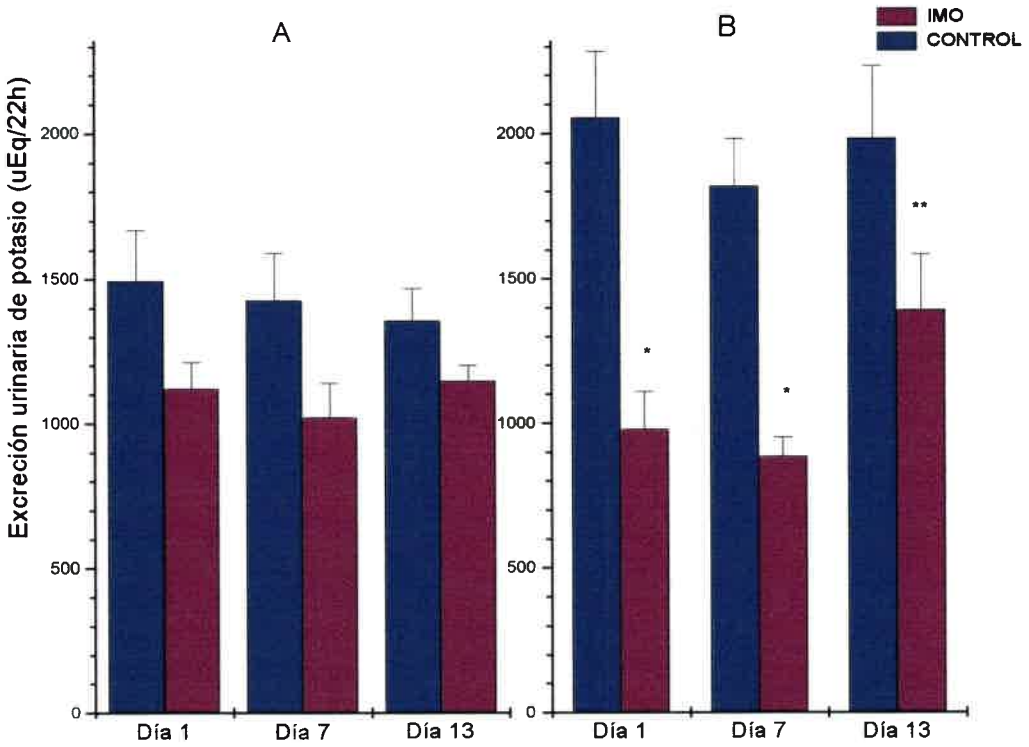
g) Efectos del estrés crónico sobre la excreción urinaria de potasio.

El análisis de la excreción urinaria de potasio indicó un efecto altamente significativo de las condiciones de estrés (p=0,001) y un efecto marginalmente significativo de la disponibilidad de salina (p=0,065) y días (p=0,053).

La interacción de las disponibilidad de solución salina por condiciones de estrés fue significativa (p= 0,03).

No se observaron diferencias entre las ratas controles y las IMO crónicas cuando la solución salina no estuvo disponible (Gráfico 5, A). Al contrario, la excreción de potasio fue reducida en las ratas IMO que tuvieron acceso a la solución salina (p= 0,01 en el día 1 y 7; p=0,06 en el día 13), (Gráfico 5, B).

Gráfico 5: Efectos del estrés sobre la excreción urinaria de potasio en ratas que no tuvieron acceso a solución de NaCl 1,5 % (A) y ratas que tuvieron acceso a solución salina y agua (B). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,01 vs su respectivo grupo no estresado.



h) Expresión de la ingesta y excreción de sodio en función al peso corporal de los animales.

Para corregir la posibilidad de que la menor ingesta de sal o la menor excreción de Na^+ fuera debida al menor tamaño del animal estresado, se expresó la excreción y la ingesta de Na^+ por cada 100 g de peso corporal en el día 13 del período experimental (Tabla 4).

TABLA 4: Excreción renal de sodio, expresado como μEq/22 hs por cada 100 g de peso corporal. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=9), A= agua-no estrés; A-IMO: agua-estrés; B=agua + salina-no estrés; B-IMO: agua + salina -estrés. * p= 0,05 B-IMO vs B

	A	A-IMO	B	B-IMO
uEq/22 h/100 g PC	183 ± 22,6	125,7 ± 15,5	1364,6 ± 358,2	353,9 ± 63,2 *

Cuando se analizaron los μEq de sodio totales incorporados en la bebida el día 13 del experimento por cada 100 g de peso corporal se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5):

TABLA 5: Ingesta de sodio, expresado como μEq/22 hs cada 100 g de peso corporal. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=9), B= agua + salina-no estrés; B-IMO: agua + salina-estrés. *p= 0,014

	B	B-IMO
μEq/22 hs/ 100 g PC	1722,5 ± 307	549,6 ± 149 *

Al estimar la excreción de Na^+ por cada 100 g de peso corporal el día 1 del período experimental, en el grupo con sobrecarga, se observó inicialmente una disminución en la excreción (B: 1984 ± 510 vs B-IMO: 409 ± 93, p= 0,05) aún cuando el animal no había perdido peso.

i) Efectos del estrés crónico sobre los niveles de sodio y potasio plasmáticos

El análisis estadístico de los valores de sodio y potasio plasmáticos no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos. No se observaron efectos ni del tratamiento, ni de la bebida ni de la duración del estrés (agudo o crónico (Tabla 6 y 7)

TABLA 6: Niveles de sodio y potasio plasmáticos en condiciones de estrés agudo. Los valores se expresan como la media ± SEM en mEq/L, n = 9.

.

	Control		Estrés	
	Agua	Salina	Agua	Salina
Sodio	143,0 ± 1,7	142,2 ± 1,7	141,8 ± 0,6	138,8 ± 4,1
Potasio	6,3 ± 0,09	6,3 ± 0,17	6,4 ± 0,12	6,3 ± 0,24

TABLA 7: Niveles de sodio y potasio plasmáticos en condiciones de estrés crónico. Los valores se expresan como la media ± SEM en mEq/L, n = 9.

	Control		Estrés	
	Agua	Salina	Agua	Salina
Sodio	141,0 ± 0,8	142,5 ± 1,6	143,0 ± 1,0	145,7 ± 0,6
Potasio	6,7 ± 0,1	6,2 ± 0,2	6,4 ± 0,18	5,8 ± 0,3

j) Efectos del estrés crónico sobre la osmolaridad plasmática

El ANOVA de la osmolaridad plasmática indica efectos marcadamente significativos del tratamiento (p=0,0002).

Las ratas estresadas crónicamente muestran una mayor osmolaridad plasmática que las ratas con estrés agudo (Gráfico 6)

Gráfico 6: Valores de osmolaridad plasmática en animales con estrés agudo y crónico. Los resultados se expresan como la media ± SEM, * p= 0,0002, n= 9.

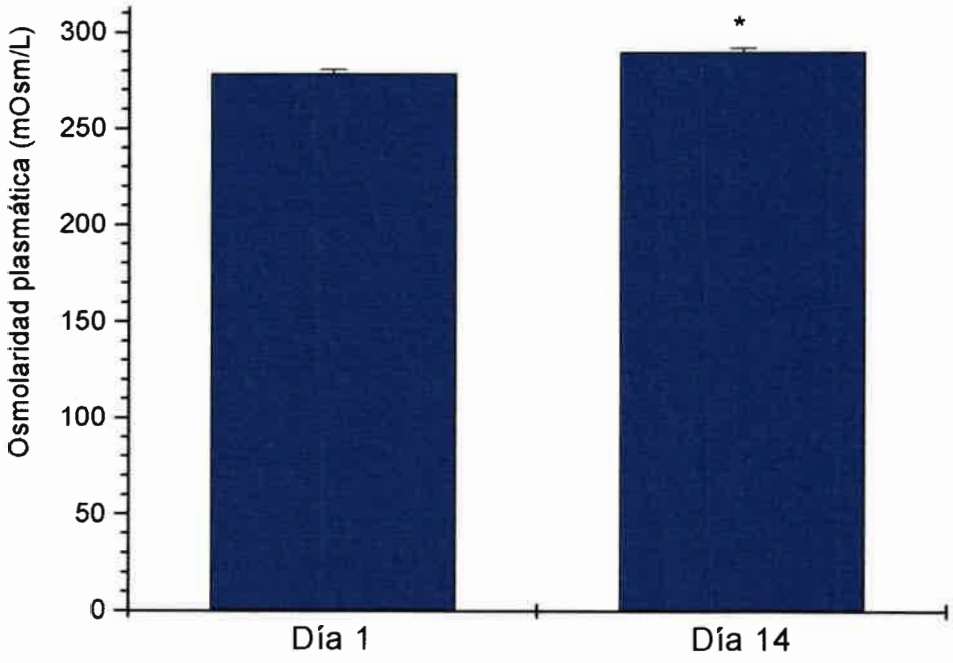


TABLA 8 : Valores de osmolaridad plasmática (mOsm/L) de ratas sometidas a estrés agudo con disponibilidad de agua y solución salina. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n= 9.

Control		Estrés agudo	
Agua	Salina	Agua	Salina
277,7 ± 2,3	282 ± 2,5	279,5 ± 2,9	276,5 ± 3,4

TABLA 9 : Valores de osmolaridad plasmática (mOsm/L) de ratas sometidas a estrés crónico con disponibilidad de agua y solución salina. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n= 9.

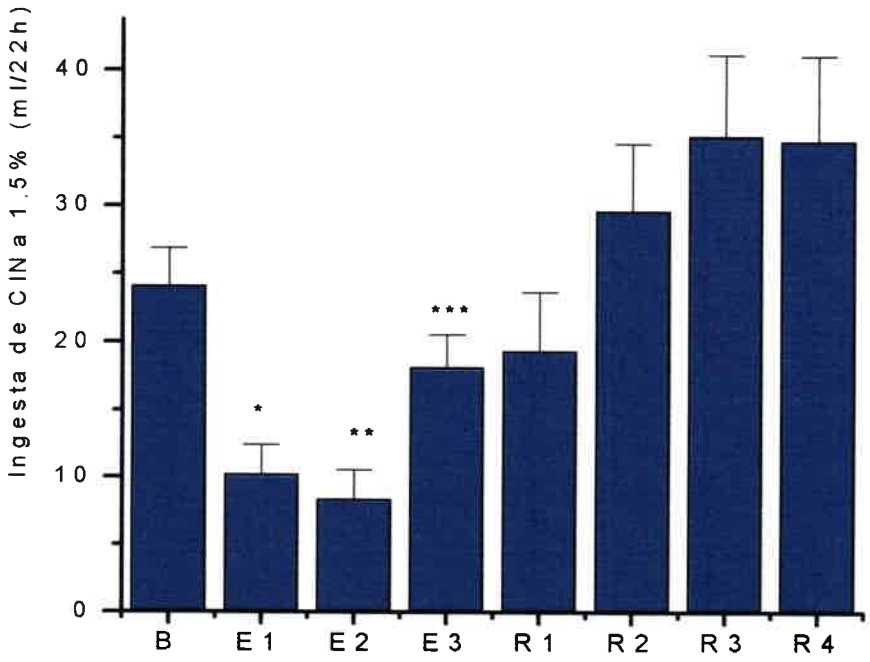
Control		Estrés crónico	
Agua	Salina	Agua	Salina
286,5 ± 4,0	288,7 ± 4,5	287,6 ± 2,8	287,5 ± 2,3

Experimento 2 : DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RECUPERACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL METABOLISMO HIDROSALINO

k) Recuperación de los efectos del estrés crónico sobre la ingesta de solución de NaCl 1,5 %.

Se observó efecto significativo del factor tiempo (p=0,0001). La disminución estadísticamente significativa en la ingesta de solución salina observada durante el período de estrés, se revirtió en las primeras 24-48 hs de suspendido el mismo. Si bien se observó un aumento significativo de la ingesta en los tiempos R3 y R4 con respecto al período de estrés (p= 0,029 para R3 y p= 0,029 para R4), no hubo diferencias con respecto a los niveles basales (Gráfico 7).

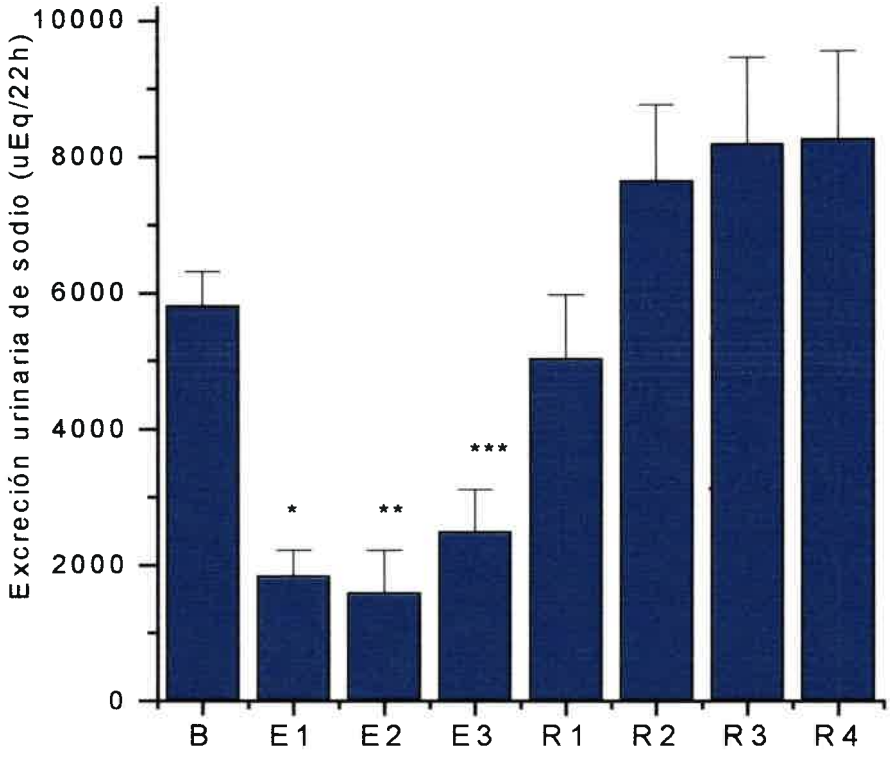
Gráfico 7: Ingesta de solución salina en los períodos de estrés y etapas de recuperación. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,005, ** p= 0,02 y *** p=0,06 vs su valor basal.



l) Recuperación de los efectos del estrés crónico sobre la excreción renal de sodio.

La excreción renal de sodio disminuyó significativamente durante los tres períodos de estrés considerados con respecto a los niveles basales. Esta disminución en la excreción se revirtió rápidamente en el período R1; en los períodos R2, R3 y R4 hubo un aumento significativo de la excreción con respecto a los niveles de estrés (Gráfico 8).

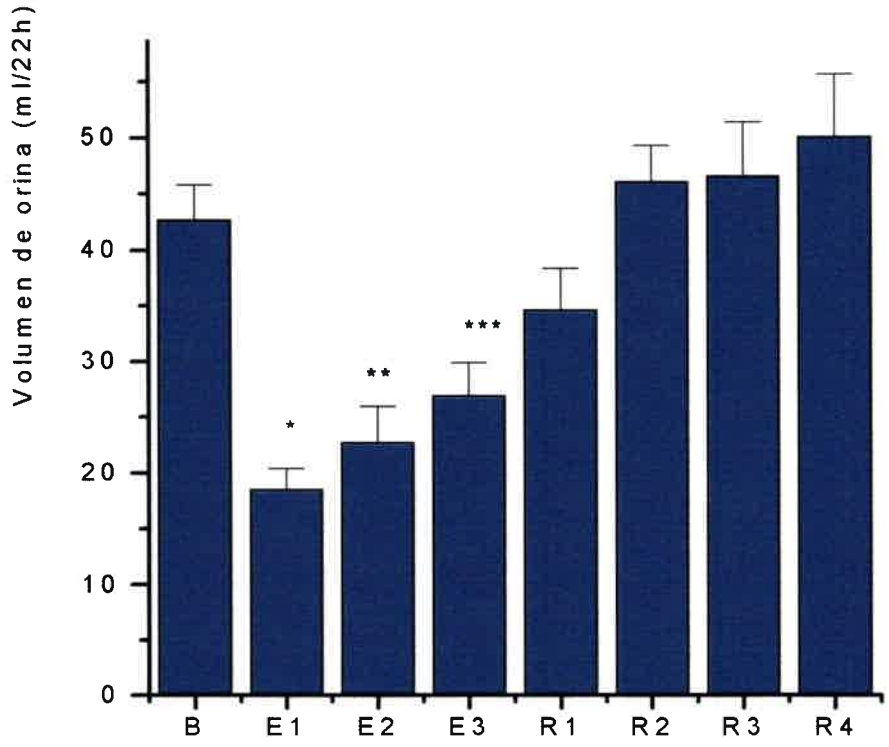
Gráfico 8: Excreción urinaria de sodio en los períodos de estrés y etapas de recuperación. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,0007, ** p= 0,0004 y *** p= 0,0037 vs su valor basal.



m) Recuperación de los efectos del estrés crónico sobre la excreción de orina

El volumen de orina, que disminuyó significativamente durante los períodos de estrés con respecto a sus niveles basales, alcanzó los niveles controles en el primer período post-estrés, siguiendo el mismo comportamiento que la ingesta de solución salina e independientemente de la ingesta de agua, ya que ésta no se modificó en ninguno de los tiempos observados (Gráfico 9).

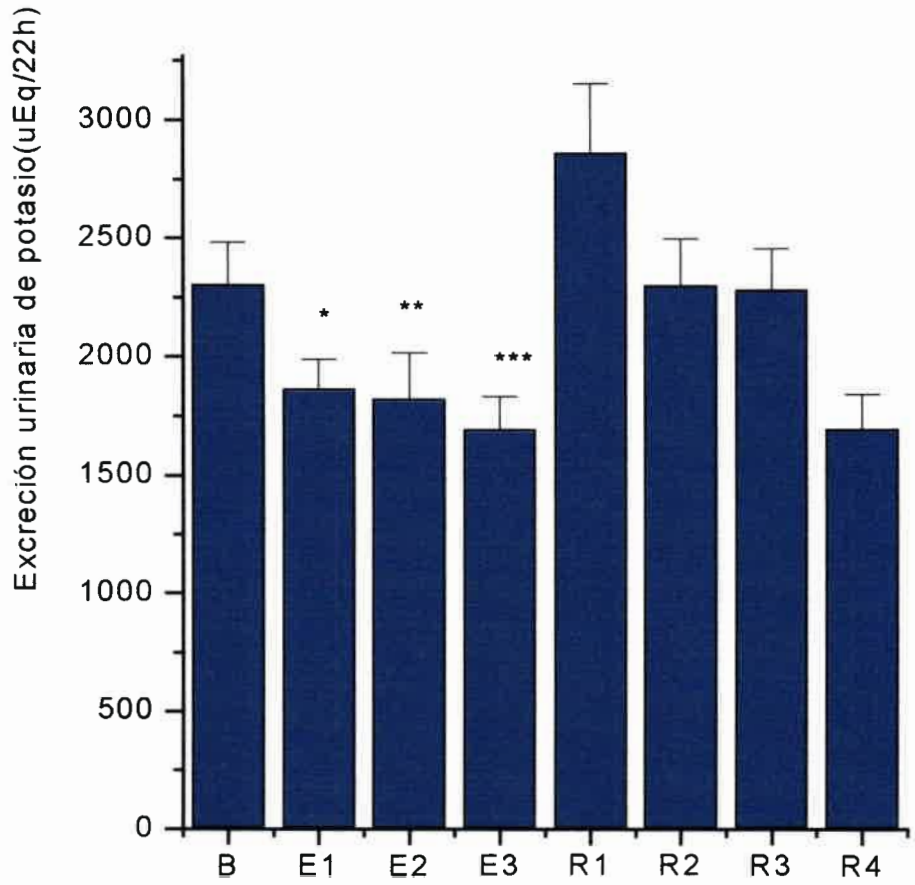
Gráfico 9: Excreción de orina en los períodos de estrés y etapas de recuperación. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,00003, ** p= 0,0001 y *** p= 0,0015 vs su valor basal.



n) Recuperación de los efectos del estrés crónico sobre la excreción urinaria de potasio

La excreción urinaria de potasio (Gráfico 10) fue significativamente menor en el período de E1 con respecto al basal, notándose una tendencia similar durante los tiempos E2 y E3. Se observó una recuperación en el tiempo R1 y una disminución significativa durante el período R4 con respecto a los niveles basales.

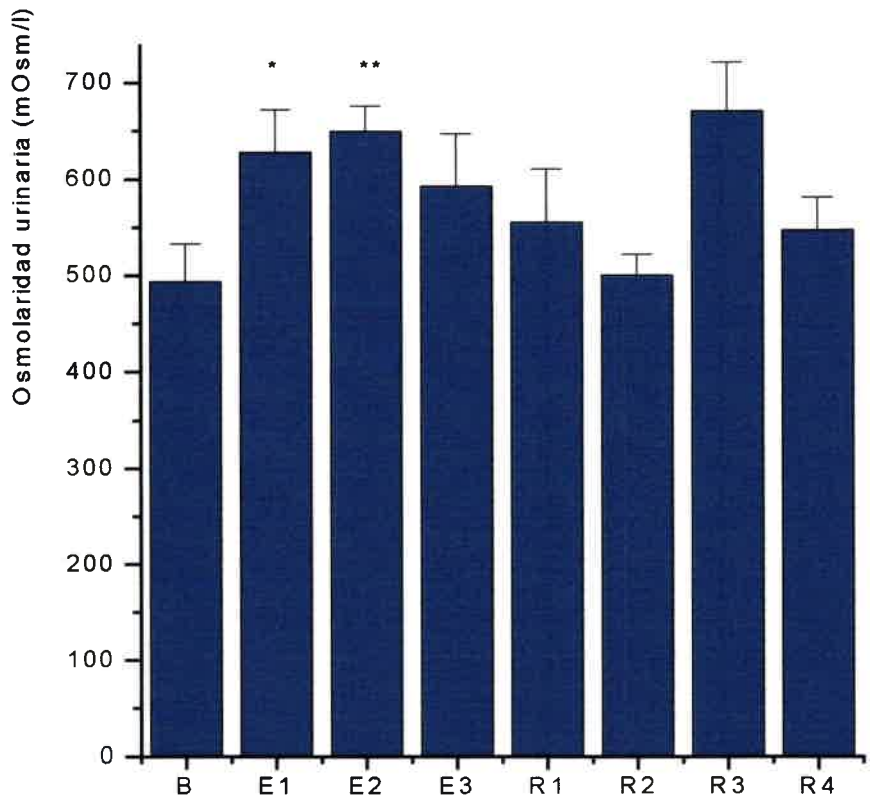
Gráfico 10: Excreción urinaria de potasio en los períodos de estrés y etapas de recuperación. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. * p= 0,034, ** p=0,07 y *** p= 0,059 vs su valor basal.



ñ) Recuperación de los efectos del estrés crónico sobre osmolaridad urinaria

El análisis de la osmolaridad urinaria (Gráfico 11) mostró un incremento de la misma durante el período de estrés, coincidente con la antidiuresis observada en el mismo período, notándose una recuperación en el tiempo R1.

Gráfico 11: Osmolaridad urinaria en los períodos de estrés y etapas de recuperación. Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=9. *p=0,028, ** p=0,011 y *** p= 0,08 vs su valor basal.



Experimento 3 : DETERMINACIÓN DE LA ADAPTACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL METABOLISMO HIDROSALINO.

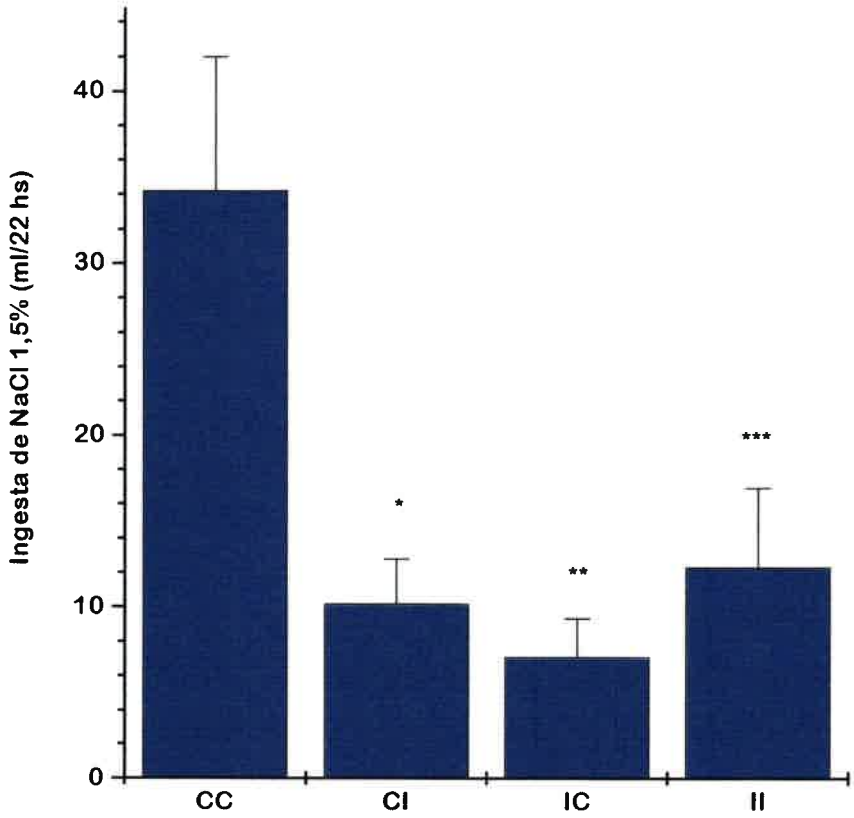
o) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la ingesta de agua y solución salina.

Ni el estrés crónico ni el agudo modificaron la ingesta de agua en ninguno de los grupos experimentales.

Con respecto a la ingesta de solución salina, el ANOVA de dos vías reveló efecto significativo del tratamiento crónico previo ($p= 0,01$) pero no del tratamiento agudo ; la interacción entre ambos factores fue significativa ($p= 0,04$).

Todos los animales estresados (crónicos o agudos) ingirieron un volumen menor de sal que el grupo control, no observándose diferencias significativas entre el resto de los grupos (Gráfico 12).

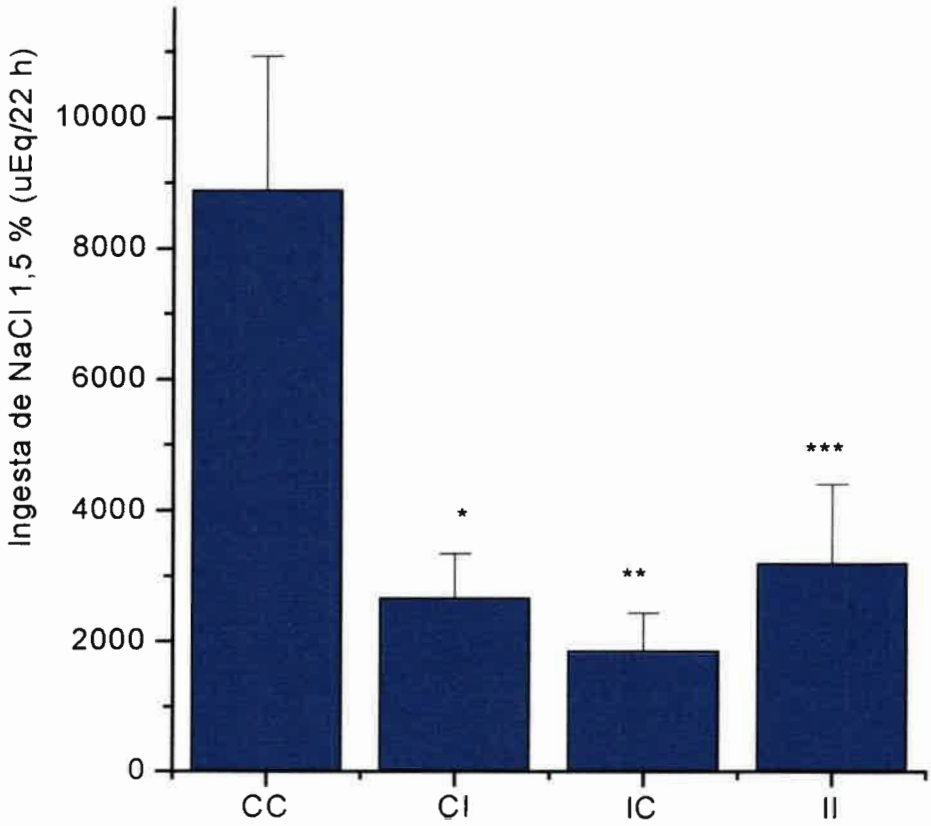
Gráfico 12: Efectos del estrés sobre la ingesta de NaCl 1,5 % en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *CC vs CI p= 0,04, **CC vs IC p= 0,004 y ***CC vs II p= 0,026.



p) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la ingesta de sodio, expresada como µEq totales.

Cuando se analizó la ingesta de sodio, considerando los µEq del ión ofrecido en la solución de bebida, se observó el mismo comportamiento encontrado en el análisis del volumen de sal ingerida (Gráfico 13).

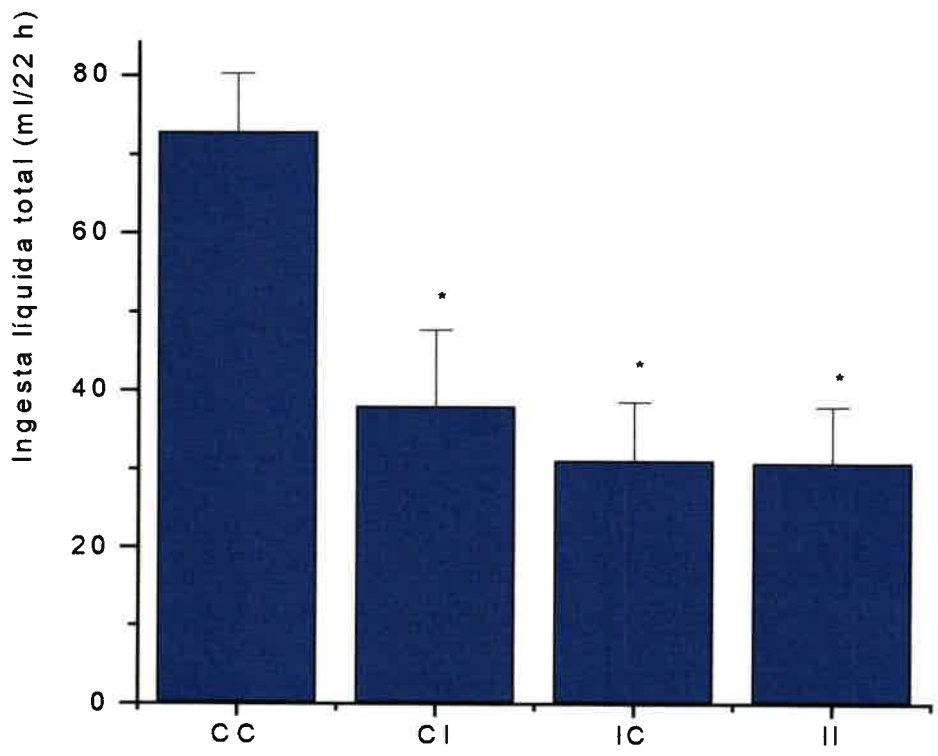
Gráfico 13: Efectos del estrés sobre la ingesta de NaCl 1,5 % en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,04 CC vs CI, ** p= 0,004 CC vs IC y *** p= 0,026 CC vs II.



q) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la ingesta total de líquidos.

Cuando se analizó la ingesta total de líquido, considerando la ingesta de agua más la ingesta de solución salina, se observaron diferencias entre los grupos, que se deben al tratamiento crónico (p= 0,005), al tratamiento agudo (p=0.037) e interacción entre ambos tratamientos (p= 0,039). El grupo CC tuvo una mayor ingesta líquida que los otros grupos. Esta diferencia en la ingesta se debería a la menor ingesta de solución salina de los otros grupos considerados, ya que no se observaron diferencias en la ingesta de agua (gráfico 14).

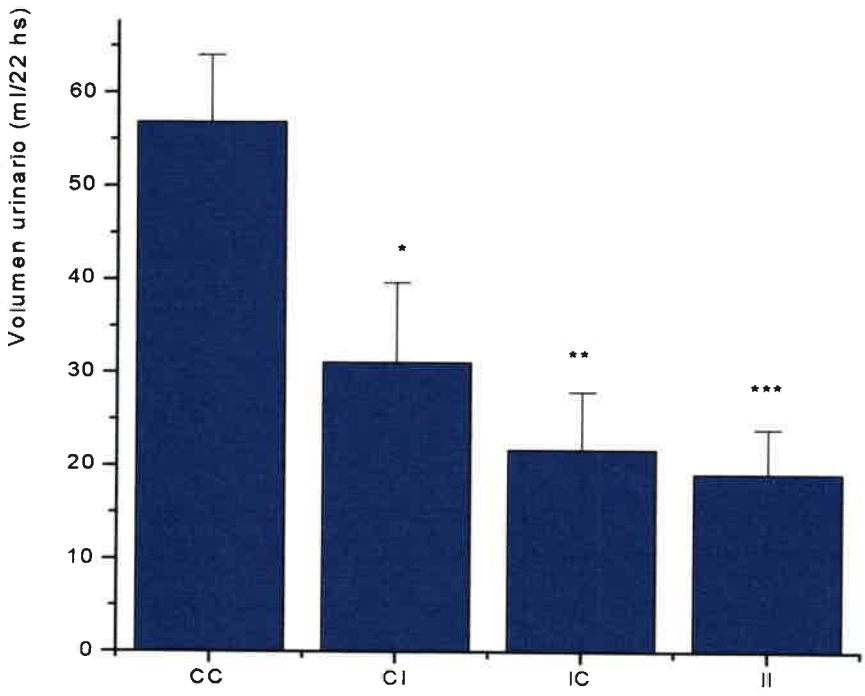
Gráfico 14: Efectos del estrés sobre la ingesta total de líquidos en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,04 CC vs CI, ** p= 0,04 CC vs IC y *** p= 0,026 CC vs II.



r) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la excreción urinaria.

El análisis estadístico de la excreción urinaria reveló efectos significativos del tratamiento crónico (p= 0,001) y del tratamiento agudo (p= 0,036), siendo marginalmente significativa la interacción entre ambos factores (p= 0,08). El test a posteriori indicó que los grupos CI, IC e II excretaron un volumen urinario menor que el grupo CC, no existiendo diferencias significativas entre los grupos sometidos a estrés (Gráfico 15). El menor volumen de orina se correlacionó con un aumento no significativo de la osmolaridad urinaria .

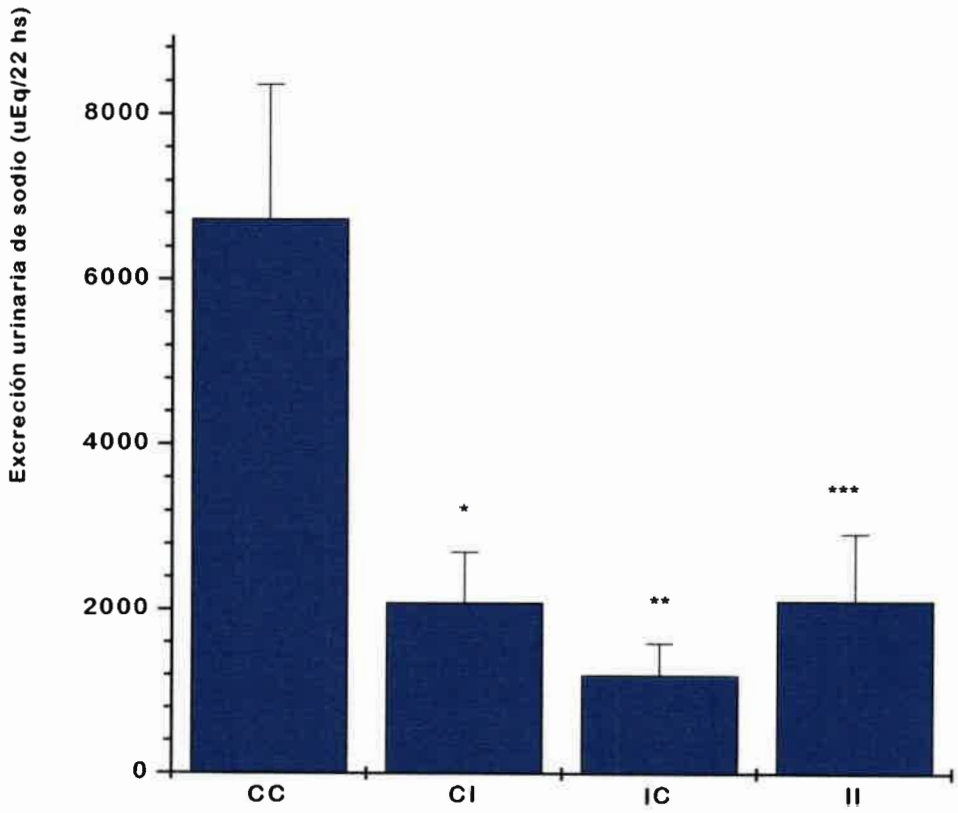
Gráfico 15: Efectos del estrés sobre la excreción urinaria en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,009 CC vs CI, ** p= 0,001 CC vs IC y *** p= 0,0006 CC vs II.



s) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la excreción urinaria de sodio.

En cuanto a la excreción urinaria de sodio, hubo efectos significativos del tratamiento previo (p=0,008) pero no del tratamiento agudo; la interacción entre ambos factores fue marginalmente significativa (p=0,06). El análisis de los grupos indicó que hubo una menor excreción renal de sodio en los animales sometidos a IMO crónica o aguda (Gráfico 16).

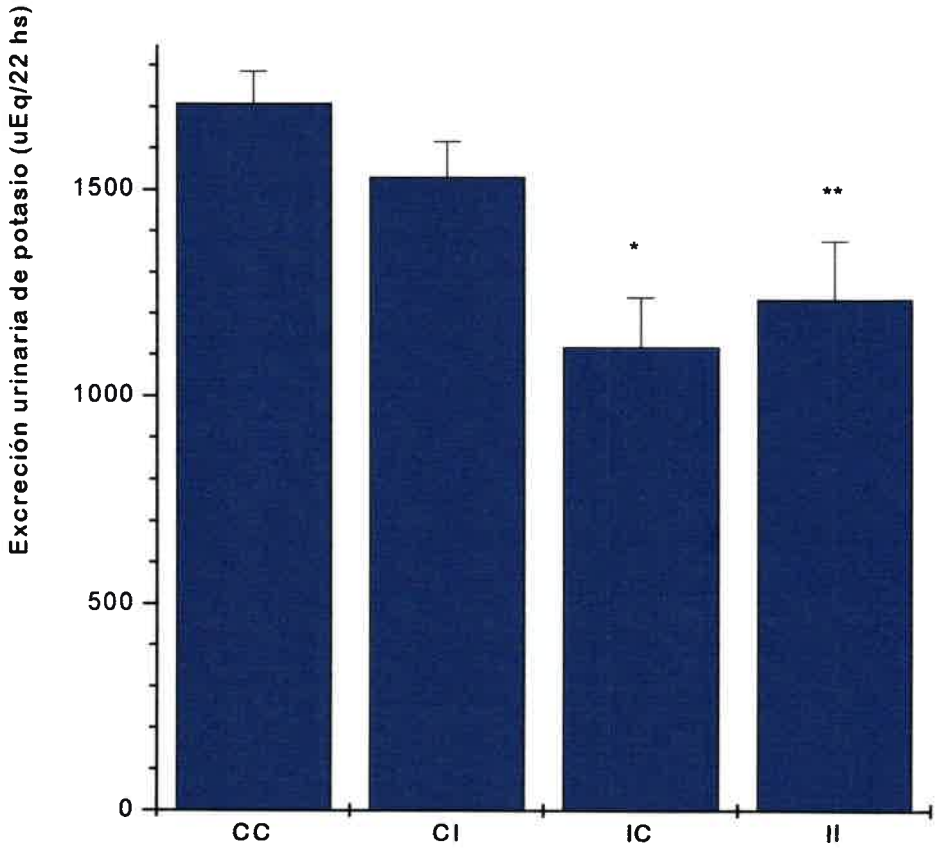
Gráfico 16: Efectos del estrés sobre la excreción urinaria de sodio en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, CC vs CI: * p= 0,049; CC vs IC:** p= 0,004 y CC vs II: *** p= 0,015.



t) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la excreción urinaria de potasio.

El mismo comportamiento se observó con la caliuresis (efecto del factor tratamiento previo: p= 0,0004), siendo diferente la excreción entre los grupos CC y IC y entre los grupos CC y II (Gráfico 17).

Gráfico 17: Efectos del estrés sobre la excreción urinaria de potasio en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,0013 CC vs IC y ** p= 0,0067 CC vs II.



u) Determinación de la influencia del peso corporal sobre la ingesta y excreción de sodio .

Con el fin de probar si la disminución en la ingesta y excreción de sodio era consecuencia del menor tamaño o peso de los animales estresados, se calculó la ingesta como μEq de sodio (en el volumen de NaCl 1,5% ingerido) y la excreción del catión referidas a 100 g de peso corporal (Gráficos 18 y 19 respectivamente).

El ANOVA de dos vías aplicado a los μEq de Na^+ en la ingesta reveló efectos significativos del tratamiento previo (p= 0,019), pero no del tratamiento agudo, siendo la interacción entre ambos factores estadísticamente significativa (p= 0,009). El análisis de los grupos mostró que se mantienen las diferencias respecto a la ingesta de sodio entre el grupo CC y los animales estresados crónicos o agudos.

La excreción de sodio referida a 100 g de PC mostró el mismo comportamiento (efecto del tratamiento previo, p= 0,014) pero no del tratamiento agudo, siendo la interacción entre ambos factores significativa (p= 0,003); la natriuresis es significativamente menor en los animales sometidos a IMO crónico o agudo con respecto al grupo CC, no existiendo diferencias entre los animales estresados e incluso cuando se refieren al peso corporal.

Gráfico 18: Efectos del estrés sobre la ingesta de sodio, expresada como uEq/22 hs/100 g de peso corporal, en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,035 CC vs CI, ** p= 0,004 CC vs IC y *** p= 0,037 CC vs II.

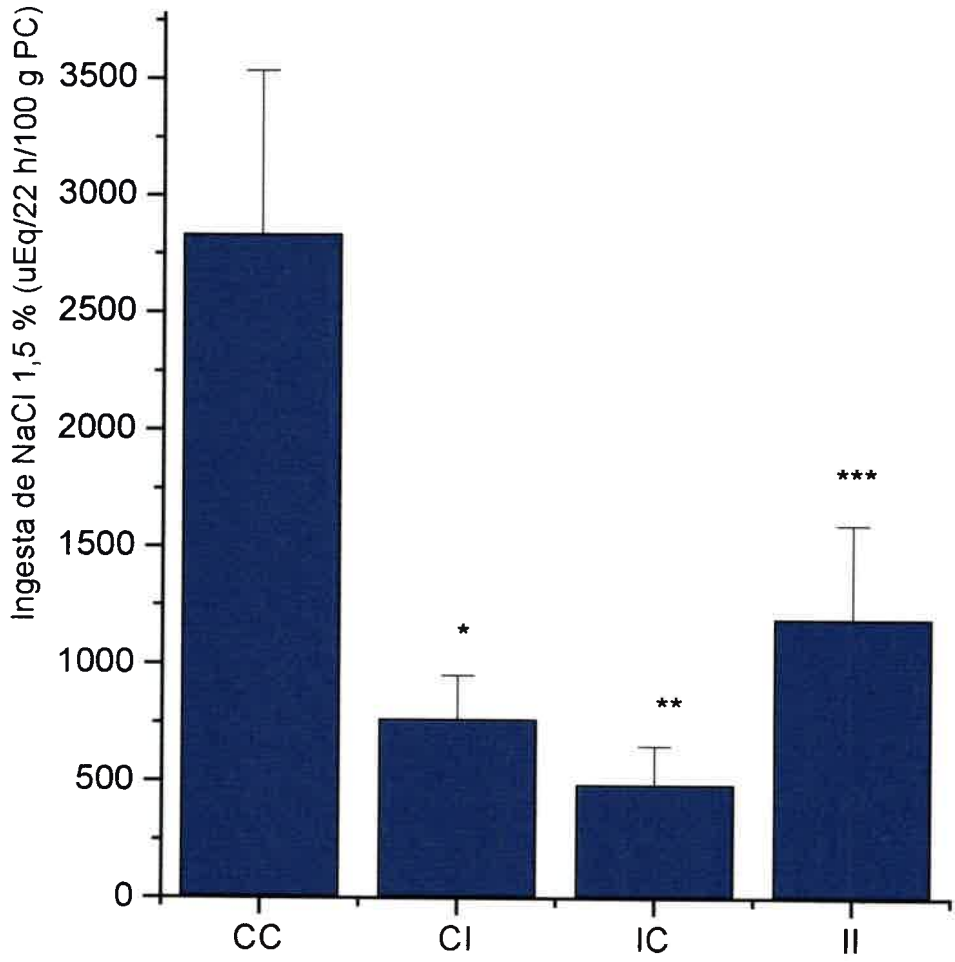
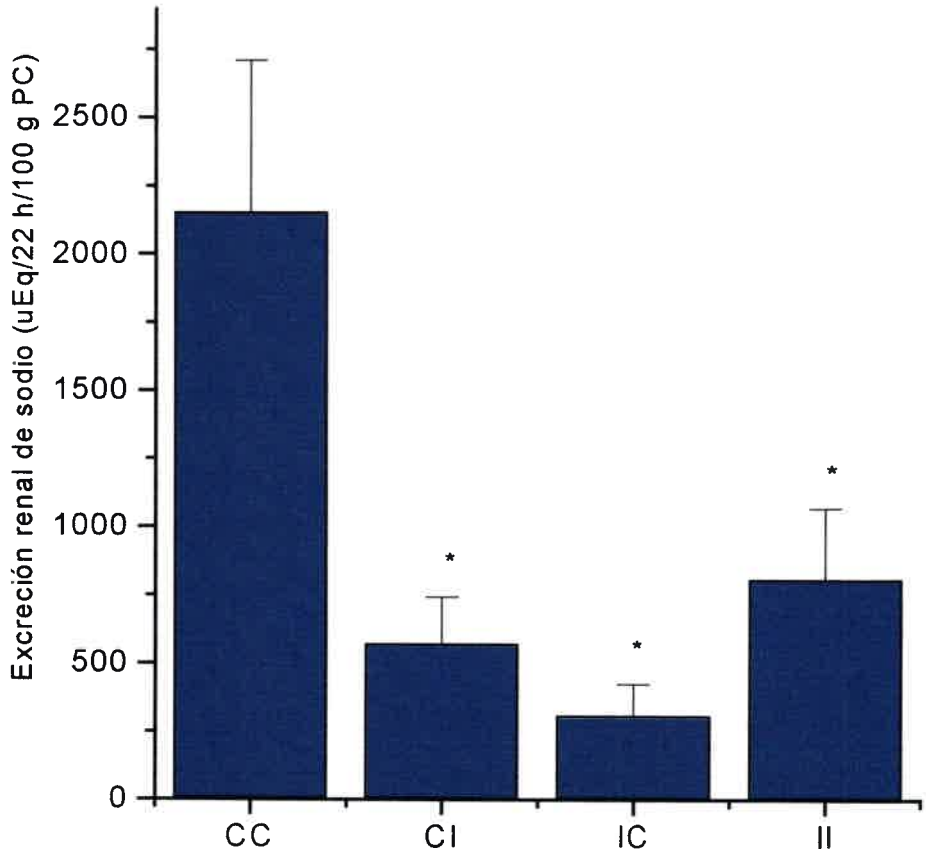


Gráfico 19: Efectos del estrés sobre la excreción renal de sodio, expresada como uEq/22 hs/100 g de peso corporal, en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,026 CC vs CI, ** p= 0,003 CC vs IC y *** p= 0,03 CC vs II.



v) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en algunos parámetros sanguíneos

Por último, ni el estrés crónico ni el estrés agudo modifican ninguno de los parámetros sanguíneos estudiados (Tabla 10)

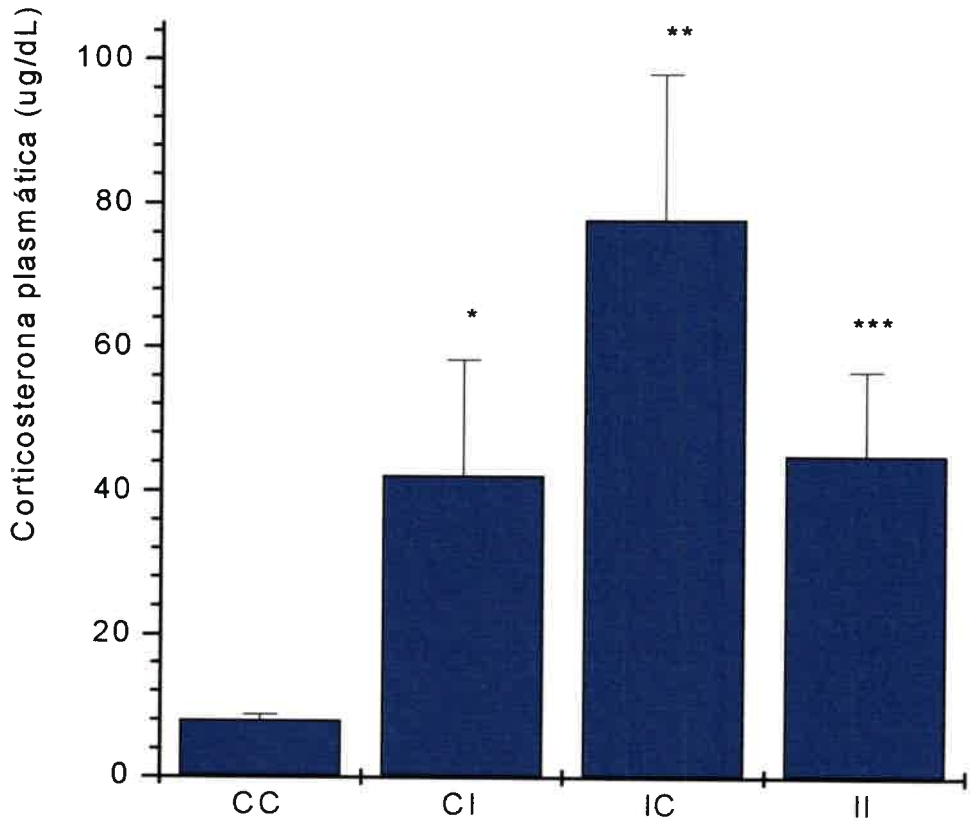
TABLA 10 : Niveles de sodio, potasio y osmolaridad plasmática en ratas controles o IMO crónica expuesta a un estrés agudo y sus respectivos controles. Los valores se expresan como la media ± SEM, n = 7.

	CC	CI	IC	II
Na^+ plasmático mEq/ L	131 ± 5,3	123,9 ± 1,3	126,8 ± 5,2	126,4 ± 3,2
K^+ plasmático mEq/ L	5,9 ± 0,12	5,7 ± 0,17	5,5 ± 0,16	5,7 ± 0,20
Osmolaridad mOsm/ L	298,4 ± 3,6	302,6 ± 5,2	312,1 ± 3,5	303,3 ± 5,4

w) Efectos del estrés crónico sobre la respuesta a estrés agudo en la secreción de corticosterona.

Los niveles plasmáticos de corticosterona siguieron el mismo comportamiento que el resto de las variables estudiadas. Se observó efecto del tratamiento crónico (p= 0,001), observándose diferencias entre el grupo CC y el resto de los grupos estudiados (Gráfico 20).

Gráfico 20: Efectos del estrés sobre los niveles plasmáticos de corticosterona, en animales controles (CC), animales controles + estrés agudo (CI), animales IMO crónico sin estrés agudo (IC) y animales IMO crónico con IMO agudo (II). Los resultados se expresan como la media ± SEM, n=7, *p= 0,0046 CC vs CI, ** p= 0,0007 CC vs IC y *** p= 0,007 CC vs II.



Experimento 4 : DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

x) Efectos del estrés por IMO sobre la presión sanguínea arterial en ratas.

No se observaron efectos del estrés agudo o crónico sobre la presión sanguínea arterial de ratas expuestas a IMO. El análisis estadístico no revela efectos significativos de la ingesta de solución salina sobre los valores de presión sanguínea ni interacción entre ambos factores (Tabla 11 y 12)

Tabla 11 : Valores de presión arterial de ratas con acceso a agua (A) o agua corriente y solución salina al 1.5% (B), en condiciones de estrés agudo a las 24 horas postestrés. Los resultados se expresan como las medias ± SEM.

Control (mmHg)		Estrés (mmHg)	
A	B	A	B
78,4 ± 9,4	77,1 ± 3,9	74,2 ± 5,3	76,2 ± 6,6

Tabla 12 : Valores de presión arterial de ratas con acceso a agua (A) o agua corriente y solución salina al 1.5% (B), en condiciones de estrés crónico a las 24 horas postestrés. Los resultados se expresan como las medias ± SEM.

Control (mmHg)		Estrés (mmHg)	
A	B	A	B
66,7 ± 6,1	52,4 ± 4,7	68,3 ± 5,1	58,6 ± 4,3

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de este trabajo de tesis fue estudiar la influencia del estrés crónico sobre ingesta y el balance de sodio en las ratas albinas. La importancia de estos datos deriva de las evidencias acerca de la existencia de un efecto sinérgico entre el estrés crónico y la ingesta de sodio sobre el desarrollo de hipertensión **(Tucker and Hunt, 1993; Kotchen and Kotchen, 1997; Mc Gregor, 1997; Campese et al., 1993).**

Los resultados obtenidos acerca del consumo de agua, durante el período experimental (13 días), demuestran que éste fue ligeramente aumentado por la disponibilidad de solución salina y esto ocurrió solamente en las ratas controles, particularmente en el día 7 y 13 del período experimental. Este comportamiento podría ser consecuencia de una respuesta homeostática osmorreguladora, tendiente a mejorar el manejo de sodio del organismo. La ausencia de cambios en las ratas IMO se debería, probablemente, a la reducida ingesta de sal observada en estos animales.

Con respecto a la ingesta de sodio, en contraste con la hipótesis inicial, se observó que la IMO crónica redujo la ingesta de NaCl 1.5%. Esto no sería debido a un efecto inespecífico del estrés sobre el consumo de líquidos, dado que estos cambios no fueron observados en la ingesta de agua en aquellos animales que no tuvieron acceso a solución salina. Podría pensarse entonces que la causa de este diferente comportamiento sería, probablemente, un efecto regulador sobre el balance o metabolismo salino.

Debido a que los cambios en el peso corporal e ingesta de alimento inducidos por el estrés podrían generar consecuencias secundarias en lo que se refiere al balance de sodio y agua en el organismo, se hizo necesario evaluar la influencia del estresor utilizado sobre estas variables. En nuestros

primer día de IMO, cuando los animales aún no han perdido peso. Por lo tanto se podría inferir que la menor ingesta de sodio debido al estrés en los animales con sobrecarga de sal, no sería afectada por el menor tamaño del animal estresado. Esto se corroboró cuando se estimó la ingesta de sal en relación al peso corporal.

Estos resultados son opuestos a los encontrados en conejos sujetos a restricción de movimientos **(Tarjan and Denton, 1991)**, donde se observa una mayor ingesta de NaCl 0,5 M . En ratones sometidos a IMO por 15 minutos o privación de alimentos por 24 hs, se evidenció el mismo efecto, cuando los animales tenían la opción de beber agua corriente y solución salina **(Kuta et al., 1984).** Además, con un estrés suave se observó un incremento en la ingesta de sal en ratas de la cepa WKY **(Ely et al., 1987).**

Al menos tres factores podrían estar involucrados en estas discrepancias :

- la existencia de posibles diferencias entre especies,

- el hecho de que la ingesta en aquellos experimentos sólo fue controlada durante el período de exposición al estrés o unas pocas horas después, pero no sobre un período de 24 horas posteriores a la sesión de estrés.

De acuerdo con nuestros resultados, se podría pensar que la reducción de la ingesta de solución salina podría ser una respuesta homeostática para compensar la antinatriuresis inducida por el estrés, en vez de ser una retención conducente a incrementar la volemia y en consecuencia la presión sanguínea arterial.

Por otro lado, la reducción en la ingesta de solución salina observada en las ratas IMO, comparadas con sus controles, coincidió con una

experimentos, el estrés crónico por IMO redujo la ingesta de alimentos y la ganancia de peso corporal.

Numerosos estudios han demostrado que la disminución en el consumo de alimentos y la pérdida de peso corporal que se observa durante el estrés podría ser mediado por las neuronas que contienen CRH. La inyección intracerebroventricular (icv) de CRH lleva a una disminución en la ingesta de alimentos. En otros estudios, sólo la inyección en el PVN llevó a una disminución en la ingesta, pero no la inyección en el hipotálamo lateral, hipotálamo ventromedial o en el núcleo caudatus de la rata **(Lehnert et al., 1993).**

Con respecto al peso corporal, se ha indicado que los cambios en el metabolismo durante el estrés contribuyen a la disminución del crecimiento. La activación del sistema simpático junto con los efectos catabólicos de los glucocorticoides jugaría un rol importante en los cambios metabólicos observados durante el estrés **(Buwalda et al., 1997; Kemppainen and Behrend, 1997).**

Además, se ha observado que factores tales como la severidad y la duración diaria del estresor son muy importantes para determinar la magnitud de los efectos del estrés sobre estas variables. Cuanto más severas y más duraderas sean las sesiones de estrés, más marcada es la reducción en el peso corporal, no así la anorexia **(Martí et al., 1994b; Campmany et al., 1996; Armario et al., 1983).**

Dado que el estrés por inmovilización redujo tanto la ingesta de alimento como la ganancia de peso corporal, se podría pensar que la ingesta alterada de sodio podría estar relacionada a la reducción del volumen de los compartimentos líquidos extracelulares causada por la IMO. Sin embargo, esto no explicaría la reducción de la ingesta de solución salina observada en el

disminución en la excreción renal de sodio y potasio. Sería dificultoso establecer a partir de estos resultados, si los cambios primarios producidos por el estrés se localizan a nivel renal o sobre la regulación de la ingesta de sodio.

Varios estudios han indicado que el riñón podría ser el blanco primario de los cambios sobre el metabolismo del sodio, dado que se observó que la antinatriuresis inducida por el estrés en experimentos realizados en perros fue eliminada cuando se practicó denervación renal o bloqueo de receptores α-adrenérgicos **(Koepke, 1985; Koepke and Di Bona, 1985; Koepke et al., 1984).**

Además, en años recientes se han acumulado evidencias del importante rol de los nervios renales en la regulación de la excreción urinaria de sodio. Se ha comprobado que la estimulación a baja frecuencia de los nervios renales afecta directamente tanto la reabsorción tubular proximal de sodio como la liberación de renina en ausencia de cambios en la hemodinamia renal. Además, varias investigaciones demuestran que la denervación renal resulta en un aumento del volumen urinario, que es atribuido a una disminución en la reabsorción absoluta y fraccional de sodio en el túbulo proximal. Este incremento en la reabsorción de sodio mediado por vía nerviosa parece involucrar la activación de receptores α adrenérgicos de las células del túbulo proximal y la rama ascendente del asa de Henle. Estudios con radioligandos aplicados a las membranas del riñón indican la presencia de receptores adrenérgicos α_1 y α_2 en la corteza renal de la rata y casi exclusivamente receptores α_2 en la corteza del riñón del cobayo **(Greenberg et al., 1991).**

El incremento en la secreción de renina involucraría la activación de receptores adrenérgicos β, los cuales se ubican en las células del aparato yuxtaglomerular y pertenecen al subtipo β_1. Estas respuestas de la funcionalidad renal mediadas adrenérgicamente han sido halladas también después de la administración de NA directamente en la arteria renal del perro

a dosis tales que no producen cambios en la hemodinamia renal **(Hesse and Jhons, 1985; Navar, 1997).**

Se ha demostrado también que los incrementos en los niveles de NA circulante tienen un efecto antinatriurético dosis-dependiente en el hombre. Los efectos antinatriuréticos pueden ser parcialmente explicados por una disminución en el flujo sanguíneo renal, con un incremento en la fracción de filtración glomerular y un mejoramiento en la reabsorción en el túbulo proximal. El mejoramiento de la reabsorción tubular puede ser debida a una modificación de la presión hidrostática del capilar peritubular, consecuencia de los cambios en la fracción de filtración, pero también puede ser importante una estimulación de la reabsorción tubular proximal **(Lang et al., 1993).**

También se ha sugerido la participación de Angiotensina II en la respuesta excretora en condiciones aversivas dado que se ha encontrado que :

1) el estrés conductual incrementa la liberación de renina,

2) Angiotensina II disminuye la excreción de sodio y agua,

3) los nervios renales regulan tanto la respuesta excretora al estrés como la liberación de renina y

4) los receptores β adrenérgicos median la antinatriuresis resultante de estrés ambiental y el incremento en la liberación de renina de origen neural.

La inhibición del sistema renina angiotensina (SRA) atenúa los efectos sobre la excreción de sodio resultante del estrés, sin afectar variables como el volumen del filtrado glomerular, el flujo sanguíneo renal efectivo y la presión arterial media. Hay varios mecanismos posibles a través de los cuales Ang II

puede contribuir a la respuesta excretora renal al estrés. Primero, Ang II puede alterar la excreción renal modificando la reabsorción tubular de sodio y agua o diminuyendo el volumen del filtrado glomerular y el flujo sanguíneo renal. A este respecto, las evidencias indican que Ang II tendría efectos más importante sobre la excreción fraccional de sodio y agua que sobre los demás parámetros, indicando que afectaría más fuertemente los procesos tubulares. Otra posibilidad es que Ang II pueda facilitar la neurotransmisión simpática central o periférica. Estos efectos incluyen incremento en la descarga de los nervios simpáticos o facilitación de la liberación de catecolaminas desde las terminaciones nerviosas y médula adrenal **(Koepke and Obrist, 1983).**

El estrés por aire reduce la excreción de sodio en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), con una mayor extensión en aquellos animales que están bajo una dieta con alta carga de sodio que en los que estaban con una dieta normal. Estos datos son compatibles con los resultados de este estudio **(Koepke and Di Bona, 1985).**

Otros factores humorales tales como la aldosterona, no parecen estar involucrados en esta respuesta antinatriurética, ya que no se observan incrementos en la excreción urinaria de potasio en las ratas sometidas a estrés agudo o crónico.

Debido a que el estrés provoca una reducción en la excreción de sodio, la menor ingesta voluntaria de solución salina observada en las ratas con inmovilización crónica podría ser una respuesta secundaria del organismo para mantener el balance de sodio cuando la capacidad del riñón para eliminar este ion podría estar comprometida.

En este sentido, se ha postulado que una elevada ingesta de sal podría llevar a una modificación en la relación de los receptores adrenérgicos α/β, con una *up regulation* (desenmascaramiento) de los α_2 y una *down regulation*

(enmascaramiento) de los β_2 en sujetos normotensos. Un incremento en la relación de los receptores α/β, con una ingesta de sal incrementada resultaría en una vasoconstricción periférica y aumento en la reabsorción tubular proximal de sodio **(Skrabal et al., 1989).** Un mecanismo de este tipo podría explicar las diferencias encontradas entre las ratas estresadas con y sin ofrecimiento de sal.

El volumen urinario de las ratas controles que tuvieron acceso a solución salina fue mayor al de las ratas controles que tomaron solamente agua corriente. Sin embargo, no se observó un aumento similar en las ratas IMO. Esto podría deberse al menos a dos razones :

- la disminución en la ingesta de solución salina y en la ingesta líquida total causada por el estrés por inmovilización.

- un posible efecto antidiurético del estrés **(Koepke and Di Bona., 1985, Koepke, 1985; Koepke and Obrist, 1983; Light et al., 1983).**

Algunos autores han demostrado, en perros, un efecto antidiurético del estrés que podría involucrar activación de los nervios renales y receptores α-adrenérgicos **(Koepke, 1985; Koepke and Di Bona, 1985).**

En ese sentido, resultados obtenidos en nuestro laboratorio (datos no publicados) mostraron que, ratas denervadas bilateralmente y sometidas a estrés por IMO, excretaban volúmenes urinarios similares a los de las ratas controles no estresadas. Además, datos semejantes se obtuvieron con el uso de bloqueantes adrenérgicos. Esto indicaría un grado importante de participación de la inervación simpática renal en la antidiuresis inducida por estrés.

En nuestro trabajo, se observó antidiuresis solamente en las ratas IMO que consumieron solución salina, lo que sugeriría que los perros podrían ser más sensibles al estrés que las ratas, al menos en términos de la función renal.

Por otra parte, no parece posible que la vasopresina sea el principal factor que controla la antidiuresis inducida por estrés, dado que la secreción de la vasopresina parece ser estimulada por algunos estresores particulares. Sin embargo, en la mayoría de ellos, incluyendo la IMO, no se observa incrementos en su liberación **(Gibbs, 1984; Husain et al., 1979; Lang et al., 1983).** Por lo tanto, sobre la base de los resultados obtenidos en perros, la antidiuresis inducida por el estrés por IMO podría estar más relacionada a la inervación renal.

Además, la disponibilidad de solución salina incrementó la excreción de potasio en las ratas controles pero no en las ratas IMO. La aumentada excreción de potasio posiblemente sea una consecuencia directa del incremento en la excreción de agua, dado que la secreción tubular renal de potasio es proporcional a la velocidad del flujo en el túbulo distal de la nefrona y el volumen urinario fue afectado en el mismo sentido que la excreción de potasio **(Ganong, 1996)**. Coincidentemente, se observó una correlación positiva y significativa entre estas dos variables.

Ni el estrés agudo ni el crónico modificaron los niveles plasmáticos de sodio y potasio en ninguno de los grupos estudiados. Esto podría ser resultado de la retención conjunta de los iones y agua a nivel renal, con la consiguiente compensación sanguínea o con los otros líquidos corporales.

No se observaron diferencias en la presión arterial de los animales sometidos a estrés crónico o agudo con respecto a sus controles ; la disponibilidad de solución salina tampoco tuvo influencias sobre esta variable.

Numerosos estudios indican que el estrés agudo provoca incrementos en la presión arterial, fundamentalmente a través de mecanismos relacionados con la activación del Sistema Nervioso Simpático **(Gaudet et al., 1996; Gamallo et al., 1992; Yoshida et al., 1994; Bohmann et al., 1994; Bohus and Koolhaas, 1993).** Dado el origen de este incremento, se observa un rápido retorno de la presión arterial a los valores basales, una vez finalizada la presentación del estímulo. Debido a que la determinación de la presión sanguínea en nuestros experimentos se realizó 24 horas después de la sesión de IMO, parece razonable pensar que, si hubo cambios inmediatos en esta variable, los mecanismos homeostáticos provocaron el retorno de la presión sanguínea a los niveles basales.

Con respecto al estrés crónico, se ha indicado que el desarrollo de hipertensión podría deberse a la hipersecreción de glucocorticoides. El mecanismo propuesto implica efectos relacionados con la volemia. Gamallo et al (1992) demostró una reducción significativa en el hematocrito en ratas expuestas a estrés por ruido agudo. En el estrés crónico no se observa este efecto, pero se producen incrementos en la actividad de la renina plasmática y secreción de aldosterona **(Gamallo et al., 1992)**. En nuestros animales sometidos a IMO, no parece haber un incremento en la volemia, dado que no se modificaron los parámetros sanguíneos en las condiciones de estrés agudo o crónico. Las discrepancias entre estos resultados podrían deberse al momento en el que se determina la presión arterial y los cambios sanguíneos, dado que en el experimento de Gamallo et al., las variables son determinadas inmediatamente después de la sesión de estrés y no al cabo de las 24 hs del mismo.

Otros autores indican un efecto sinérgico de dos factores ambientales, estrés y dietas ricas en sal sobre la presión arterial **(Bohmann et al., 1994; Ely et al., 1987; Huang and Leenen, 1996).** El desarrollo de hipertensión sostenida en presencia de estos dos factores parece producirse

fundamentalmente, cuando existe una predisposición genética para adquirirla. En las ratas de la cepa SHR se han estudiado extensamente sinérgicos del estrés asociado con una dieta rica en sodio. En esta cepa, el desarrollo de hipertensión estaría asociado a una retención renal de sodio incrementada, indicando que una alteración en la función renal contribuiría al desarrollo o exacerbación de la hipertensión. Estos efectos no se observan en ratas de la cepa WKY, normotensas **(Koepke et al., 1986)**. Por lo tanto, no parece sorprendente que los animales expuestos a IMO crónica que tienen la opción de beber solución de NaCl 1.5 % no desarrollen hipertensión sostenida, dado que la mayoría de los estudios demuestran que es importante cierta predisposición genética para que las ratas muestren incrementos en la presión sanguínea. No obstante, **Takita et al. (1995)** informaron que el estrés por inmovilización (2 hs diarias durante dos semanas) induce una moderada elevación de la presión sanguínea en ratas Wistar, sin predisposición genética a hipertensión. La discrepancia entre estos hallazgos y nuestros experimentos podría deberse fundamentalmente, al método utilizado para la determinación de la presión sanguínea arterial.

Se ha indicado que otros factores que parecen afectar la respuesta hipertensiva son la naturaleza del estímulo estresante y la estrategia de enfrentamiento (coping) adoptada. Por ejemplo, se ha visto que una derrota social en ratas macho produce un incremento más pronunciado de la presión arterial que aquella de una victoria social. El mayor esfuerzo físico no necesariamente lleva a una mayor respuesta hipertensora. Además, el "control" de la situación puede ser la variable que determine la magnitud de la respuesta **(Bohus and Koolhaas, 1993).**

En ratas WKY se ha obtenido hipertensión por estrés de aislamiento durante 7 días. La hipertensión inducida por aislamiento depende de otros factores: todas las ratas alojadas en cajas metabólicas de vidrio transparentes desarrollan hipertensión, mientras que si se las aloja convencionalmente, pero

aisladas, solamente el 50% de los animales la desarrollan **(Bohus and Koolhaas, 1993)**.

Otros datos sugieren que el desarrollo de hipertensión durante el estrés crónico requiere un complejo conjunto de estímulos sociales y ambientales. Por ejemplo, estudios de Kokkema y Koolhaas (1985) sugieren que el esfuerzo por mantener una posición social podría ser de importancia etiológica en el desarrollo de hipertensión sostenida **(Bohus and Koolhaas, 1993).**

Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles de corticosterona de los animales con IMO aguda o crónica. La activación del eje PA es común a todas las situaciones de estrés y está caracterizado por la liberación rápida de ACTH. Esta liberación multiplica entre 5-100 veces los niveles basales de ACTH, alcanzando un máximo a los 10-30 minutos, dependiendo de si el estímulo estresante es de muy breve duración (segundos o minutos) o se mantiene la situación por más tiempo. La ACTH estimula la síntesis de glucocorticoides de la corteza adrenal, alcanzándose un máximo de secreción entre los 15-45 minutos cuando persiste el estímulo por más de una hora, incluso si es de alta intensidad. Luego, los niveles de hormonas PA regresan paulatinamente a los valores basales Sin embargo, esta vuelta a la normalidad afecta a la ACTH pero no a los glucocorticoides, que pueden permanecer elevados tras 8-48 horas de exposición crónica **(Hauger et al., 1988; Rivier and Vale, 1987).**

Cuando los animales son expuestos diariamente, de forma intermitente, a un mismo estímulo estresante, tan sólo unas pocas variables fisiológicas retornan a sus valores basales, entre ellas catecolaminas, ACTH y glucosa **(Armario et al., 1988; Armario et al., 1989; Armario et al., 1990; De Boer et al., 1989; Kant et al., 1985).** Mientras que estas variables reflejan el proceso de habituación, es frecuente que los glucocorticoides no lo hagan **(Armario et al., 1988)**.

Existen al menos dos explicaciones para este comportamiento :

a) El estrés crónico, si es de cierta intensidad, incrementa proporcionalmente el tamaño de la glándula adrenal y la respuesta de la adrenal a la ACTH circulante, razón por la cual los niveles de glucocorticoides no son un reflejo de los niveles de ACTH **(Armario et al., 1988)**.

b) La secreción de la adrenal se satura para niveles de ACTH relativamente bajos y es posible que una reducción en la secreción de ACTH no se refleje en una reducción en la corticosterona **(Armario et al., 1988).**

En los experimentos tendientes a evaluar el fenómeno de adaptación, los mismos resultados se presentan cuando ratas crónicamente estresadas son sometidas a una sesión de IMO aguda. El comportamiento de las variables estudiadas en animales crónicamente estresados no parece indicar signos de habituación o disminución de la respuesta como consecuencia de la exposición al mismo estímulo. Se observaron algunas diferencias en los niveles basales de animales controles y crónicamente estresados, probablemente debido a que, en los animales IMO crónico, persisten los efectos de la última sesión de estrés.

Los procesos de habituación parecen seguir tres leyes clásicas :

i) Relación directamente proporcional al grado de repetición de la situación.

ii) Relación inversamente proporcional al intervalo entre estímulos y la intensidad del mismo.

iii) Especificidad con respecto al tipo de estímulo.

Este último punto sugiere que el mecanismo determinante de la reducción de la respuesta es, fundamentalmente, la familiarización con el estímulo y la consiguiente reducción de la respuesta emocional asociada al mismo y no los posibles cambios bioquímicos en el control de los sistemas endocrinos **(Kant et al., 1985).**

De los resultados obtenidos en el balance de sodio deberían excluirse como posibles mecanismos involucrados aquellos sistemas hormonales que son sensibles a adaptación, tales como el eje HPA. Como se indicó previamente, podría pensarse entonces que los efectos antidiuréticos y antinatriuréticos del estrés por IMO se deberían fundamentalmente a la actividad de los nervios simpáticos renales, como así también a incrementos en los niveles de NA circulante.

Se ha demostrado que los niveles plasmáticos basales de catecolaminas no se modifican de manera significativa tras la exposición a un estrés crónico intermitente, pero se ha indicado un incremento en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas en la médula adrenal, principalmente de la tirosin-hidroxilasa, la enzima cuya actividad constituye el paso limitante de la síntesis de estos compuestos. Por lo tanto el estrés crónico provocaría una mayor capacidad potencial de respuesta de la médula adrenal a las situaciones de estrés, aunque esta potencialidad no se refleje en los niveles basales **(Campmany et al., 1996; Adell et al., 1988; Bhatnagar et al., 1995; De Boer et al., 1989).** Esto podría reforzar la hipótesis de que los cambios renales inducidos por el estrés, tendrían un origen nervioso o por catecolaminas circulantes.

De nuestros experimentos surge además, que los efectos del estrés crónico por IMO sobre el balance hidrosalino son reversibles, tal como se observa analizando el retorno de las variables a sus valores basales poco tiempo después de retirado el estímulo.

CONCLUSIONES

Experimento 1

- El consumo de agua fue ligeramente mayor en los animales controles con disponibilidad de solución salina, probablemente como consecuencia de una respuesta homeostática osmorreguladora para mejorar el manejo del sodio corporal.

- La IMO redujo la ingesta de solución salina, tanto en condiciones de estrés agudo como crónico.

- El estrés crónico por IMO redujo la ingesta de alimentos y la ganancia de peso corporal en ratas.

- El efecto de la IMO sobre el consumo de NaCl 1,5 % no sería consecuencia del menor tamaño del animal estresado ni de la anorexia, ya que este efecto se evidenció desde la presentación del estímulo en forma aguda.

- La IMO redujo la excreción renal de sodio y potasio solo en los animales que tenían acceso a la solución salina.

- Tanto el estrés agudo como crónico produjo un efecto antidiurético, solamente en los animales con opción a beber solución de NaCl 1,5 %.

- No se observaron modificaciones en los niveles de sodio, potasio u osmolaridad plasmáticos bajo condiciones de estrés agudo o crónico.

- Los efectos del estrés sobre el balance hidrosalino no fueron observados en los animales que carecieron del ofrecimiento de solución salina, lo que hace presuponer que la sobrecarga de sal modificaría la respuesta de la homeostasis hidrosalina en condiciones de estrés.

Experimento 2

- La disminución en la ingesta de solución salina observada durante los períodos de IMO se revirtió en las primeras 24 hs de suspendido el estrés. Si bien se observa un aumento en la ingesta en los períodos R3 y R4 (días 4° y 5° postestrés) con respecto a los niveles de estrés, no hubo diferencias con respecto a los niveles basales.

- La excreción renal de sodio se recuperó inmediatamente. En los períodos R2, R3 y R4 (días 3°, 4° y 5° postestrés) hubo un incremento significativo de la excreción sólo con respecto a los niveles de estrés, lo que podría indicar que en estos períodos el animal estaría eliminando la sobrecarga de sal.

- El volumen de orina alcanzó los niveles basales en el primer período post-estrés, siguiendo el mismo comportamiento que la ingesta de solución salina e independientemente de la ingesta de agua, ya que ésta no se modificó en ninguno de los tiempos observados.

- La excreción de potasio fue significativamente menor en el período de estrés. Además, se observó una reducción significativa, con respecto a los niveles basales, durante el período R4 (día 5° postestrés). Esta reducción en la excreción podría ser secundaria a la mayor excreción de sodio observada en este período, posiblemente debido a una inhibición en la secreción de aldosterona.

- La osmolaridad urinaria mostró un incremento durante el período de estrés, coincidente con la antidiuresis observada en el mismo período, notándose una recuperación en el tiempo R1(día 2° postestrés).

- El retorno a los niveles de pre-estrés en todas las variables indicaría, además, que los efectos del estrés sobre el balance hidrosalino son pasajeros y completamente reversibles.

Experimento 3

- Tanto el estrés agudo como crónico produjeron una disminución en la ingesta de solución salina, antidiuresis, antinatriuresis, anticaliuresis y aumento de la osmolaridad urinaria.

- Se observaron diferencias en los niveles basales de animales controles y crónicamente estresados.

- Cuando los animales controles e IMO crónicos fueron sometidos a IMO aguda, no se observaron diferencias en la respuesta entre ambos grupos.

- La repetida exposición al mismo estresor no resultó en adaptación, es decir, los animales mostraron la misma respuesta con o sin experiencia previa a la exposición a la IMO.

Experimento 4

- No se observaron diferencias en la presión sanguínea arterial de animales estresados en forma aguda o crónica a las 24 hs posteriores al estrés.

- La ingesta de solución salina no modificó los niveles de presión sanguínea en animales controles o sometidos a IMO aguda o crónica.

CONCLUSIONES GENERALES

- Tanto el estrés agudo (2 horas) como el crónico (2 horas por día, durante 13 días) produce una disminución en la ingesta de solución de NaCl 1,5 %, una disminución en la excreción renal de sodio y potasio y una disminución en la excreción de orina. Estos efectos fueron observados a las 24 horas posteriores a la/las sesión/es de estrés, sólo en animales que tuvieron la opción de beber solución salina.

- Los cambios en el balance hidrosalino no se manifiestan en la natremia, potasemia o la osmolaridad plasmáticas.

- Los efectos de estrés por IMO son reversibles y las variables retornan rápidamente a sus valores basales, una vez suprimido el estímulo estresante.

- La experiencia previa con el estresor no modifica la respuesta del animal a la presentación en forma aguda del mismo estímulo, sugiriendo que los mecanismos involucrados en los efectos de la IMO no son sensibles a la adaptación.

- La presentación simultánea de dos factores hipertensores, tales como el estrés y dietas altas en sodio, no inducen incrementos sostenidos en la presión arterial en ratas de la cepa Wistar a las 24 hs posteriores a la última sesión de IMO.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos, surgen varias posibles líneas a investigar, fundamentalmente destinadas a dilucidar los mecanismos involucrados en la disminución de la ingesta y excreción de sodio inducidas por el estrés por IMO.

Con respecto a la ingesta de sodio, las alternativas de estudio son variadas. No ha sido determinada la participación hormonal en esta respuesta, por lo que sería de gran importancia la valoración de los niveles plasmáticos de Angiotensina II en condiciones de estrés agudo y crónico. Además, sería de interés la valoración, en nuestras condiciones experimentales, de algunos péptidos de origen cerebral que se conocen actúan como inhibidores de la ingesta de sal, tales como las taquicininas (sustancia P, neurocininas α y β) y oxitocina.

Respecto a la localización anatómica, existen evidencias de la participación de varias estructuras nerviosas en la conducta de ingesta de sodio. Las estructuras de la lámina terminalis, tales como el órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT), el núcleo preóptico mediano (MnPO) y el órgano subfornical (OSF) parecen ser esenciales en la transducción e integración de señales relacionadas con el mantenimiento de los líquidos corporales. Varios estudios han implicado al OVLT, a la región AV3V y al MnPO como los más importantes determinantes del apetito por sal en la rata. Podría plantearse la posibilidad de determinar, por ejemplo, la inmunoreactividad *c-fos* en estas regiones, debido a la propiedad del c-fos como marcador de la actividad neural en el SNC de la rata, comparando su actividad entre animales estresados y sus controles no estresados.

Otra de las probables líneas de investigación se relaciona con el estudio de los factores que participan en la retención renal de sodio inducida por el

estrés. Una posibilidad es evaluar la participación del Sistema nervioso en esta respuesta, a través de varias vías. Se sabe que el Sistema Nervioso Simpático puede inducir retención de sodio de varias maneras. Una de ellas es directamente a través de la inervación renal. El aumento de la reabsorción de sodio involucra la activación de receptores adrenérgicos α en las células del túbulo proximal y la rama ascendente del asa de Henle **(Greenberg et al., 1991)**. Los mismos resultados se han obtenido con altos niveles de NA circulante. Por lo tanto, este mecanismo podría ser evaluado, por ejemplo, utilizando bloqueantes adrenérgicos o practicando denervación renal, tema que ha comenzado ha ser investigado por algunos miembros de nuestro grupo de investigación.

Un aspecto importante a determinar es la participación de Angiotensina en esta respuesta al estrés, ya que se conoce que Ang podría modificar la reabsorción tubular de sodio y agua o disminuir el volumen del filtrado glomerular y el flujo sanguíneo renal **(Koepke et al., 1983).** Tampoco se podría descartar la participación de aldosterona en esta respuesta, por lo que se deberían determinar los niveles plasmáticos de estas hormonas.

Por otra parte, creemos que es de fundamental importancia la evaluación de la funcionalidad renal bajo condiciones de estrés agudo y crónico. Durante la estimulación simpática se produciría una disminución en el flujo sanguíneo renal, con un incremento en la fracción de filtración glomerular y un mejoramiento en la reabsorción proximal **(Lang et al., 1993).** La NA circulante también estimula la secreción de renina y esto está asociado con una disminución del flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y la excreción de sodio **(Hesse and Johns, 1985)**. Existen pocos estudios acerca de los efectos de la estimulación crónica del SNS sobre la funcionalidad renal, por lo que sería de importancia establecer si la IMO crónica induce algún tipo de alteración en la capacidad del riñón para manejar una carga de sal.

Se conoce que otra sustancia producida por el riñón, el oxido nítrico (NO), parece jugar un rol central en el control de varios procesos intrarrenales que regulan la respuesta renal a cambios en la presión de perfusión y por lo tanto pueden determinar el volumen sanguíneo. Estudios recientes han mostrado que ciertas formas de hipertensión están asociadas con disminución de la síntesis de NO. Reducciones en la síntesis de esta molécula se relaciona con una disminución de la excreción de sodio, no sólo a través de un efecto directo sobre la vasculatura renal sino también a través de modulación de otros procesos vasoconstrictores y a través de alteraciones directas o indirectas del transporte tubular de sodio **(Schnackemberg et al., 1997).** Queda por determinar si el estrés tiene algún efecto sobre los niveles de síntesis de NO de origen renal.

La realización de estos estudios permitirá ampliar los conocimientos de los mecanismos a través de los cuales el estrés modifica la actividad de distintos sistemas homeostáticos. En base a estos conocimientos, se podrán determinar además, los medios adecuados para evitar las posibles consecuencias patológicas de la activación crónica de los sistemas de respuesta al estrés.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

-Adell, A.; García-Marquez, C.; Armario, A.; Gelpi, E. **1988**. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J. Neurochem.* 50 (6): 1678-1681.

-Aguilera, G. **1994**. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* , 15: 321-350.

-Aguilera, G.; Young, W. S.; Kiss, A.; Bathia, A. **1995**. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by Angiotensin II. *Neuroendocrinology*, 61: 437-444.

-Antoni, F. A. **1993**. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Frontiers in Neuroendocrinology,* 14 (2): 76-122.

-Armario, A.; Montero, J. L.; Pla-Giribert, T.; Vivas, C.; Balasch, J. **1983**. Effect of chronic noise or water restriction on weight of body and organs in the rat. *Revista Española de Fisiología*, 39: 267-270.

-Armario, A.; Hidalgo, J.; Giralt, M. **1988**. Evidence that the Pituitary-Adrenal Axis does not cross-adapt to stressors: Comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology.*, 47: 263-267.

-Armario, A., Jolin, J. **1989**. Influence of intensity and duration of exposure to various stressors on serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Science*, 44: 215-218.

-Armario, A., Martí, J., Gil, M. **1990**. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*, 15: 341-345.

-Armario, A.; Martí, O.; Gavalda, A. **1992**. Negative feedback of corticosterone on the Pituitary-Adrenal Axis is maintained after inhibition of serotonin synthesis with parachlorophenylalanine. *Brain Res. Bull.* 28: 915-918.

-Armario, A.; Martí, O.; Gavalda, A.; López-Calderón, A. **1993.** Evidence for the involvement of serotonin in acute stress-induced release of luteinizing hormone in the male rat. *Brain Res. Bull.* 31: 29-31.

-Baubet, V.; Grange, E.; Sermet, E.; Giaume, M., Gay, N.; Bobillier, P. **1996**. Widespread increase in brain protein synthesis following acute immobilization stress in adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 219: 187-190.

-Bhatnagar, S.; Mitchell, J. B.; Betito, K.; Boksa, P.; Meaney, M. J. **1995.** Effects of chronic intermittent cold stress on pituitary adrenocortical and sympathetic adrenomedullary functioning. *Physiol Behav.* 57 (4): 633-639.

-Bohmann, C.; Schaible, U.; Schollmeyer, P.; Rump, L. C. **1994.** α_{2D} Adrenoceptors modulate renal noradrenaline release in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 271: 283-292.

-Bianchi, G. **1986**. Sodium excretion and its role in blood pressure regulation. *Handboock of Hypertension,* Vol. 8: Pathophysiology of Hypertension-Regulatory mechanisms. A. Zanchetti and R. C. Tarazi, editors. Elsevier Science Publishers B. V.: 276-294.

-Black, P. H. **1994a**. Immune system-central nervous system interactions: effects and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38 (1): 7-12.

-Black, P.H. **1994b**. Central nervous system-immune system interactions: Psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38 (1): 1-6.

-Bohus, B., Koolhaas, J. **1993.** Stress and the cardiovascular system: central and peripheral physiological mechanims. In: *Stress: from synapse to syndrome*. Edited by S. Stanford and P. Salomon. Academic Press.

-Breslin, P., Kaplan, J., Spector, A., Zambito, C., Grill, H. **1993**. Lick rate analysis of sodium taste-state combinations. *Am. J. Physiol. 264 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 33):* R312-R318.

-Briski, K. P. **1995**. Effects of peripheral versus central administration of the endogenous glucocorticoid, corticosterone, and the glucocorticoid receptor agonist, RU 28362, on LH release in male rats. *Brain Research*, 670: 66-74.

-Buwalda, B.; de Boer, S. F.; Van Kalkeren, A. A.; Koolhaas, J. M. **1997**. Physiological and behavioral effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 22 (5): 297-309.

-Campese, V. M.; Karubian, F.; Chervu, I.; Parise, M.; Sarkies, N.; Bigazzi, R. **1993**. Pressor reactivity to norepinephrine and Angiotensin in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension*, 21(3): 301-307.

-Campmany, L.; Pol, O.; Armario, A. **1996.** The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol. Biochem Behav*, 53 (3): 517-523.

-Chrousos, G., Loriaux, D., Gold, P. **1988**. Mechanisms of physical and emotional stress. In : *Advances in experimental medicine and biology*. Edited by Chrousos, G., Loriaux, D.and Gold, P. Plenum Press, New York and London.

-Cowley, A. W. **1997**. Genetic and nongenetic determinants of salt sensivity and blood pressure. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 587S-593S.

-Curtis, A. L.; Pavcovich, L. A.; Grigoriadis, D. E.; Valentino, R. J. **1995**. Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience*, 65 (2): 541-550.

-Dallman, M. F. **1993**. Hipothalamic-Pituitary-Adrenal Axis adaptation to chronic stress. *Trends in Endocrinology and Metabolism.*, 4 (2): 62-69.

-De Boer, S. F.; Van der Gugten, J.; Slangen, J. L. **1989**. Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in ratas. *Physiol. Behav.* 45: 789-793.

-De Kloet, E. R. **1995**. Steroids, stability and stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16: 416-425.

-Denton, D. **1982**. Theories on genesis and satiation of salt appetite. In: *The hunger for salt*. Eds. Springer Verlaj, Heidelberg: 451-514.

-Ely, D. E.; Thoren, P.; Wiegand, J.; Folkow, B. **1987.** Sodium appetite as well as 24-h variations of fluid balance, mean arterial pressure and heart rate in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats, when on various sodium diets. *Acta Physiol. Scand*, 129: 81-91.

-Epstein, A. N. **1991**. Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Res. Bull.* 27 (3/4): 315-320.

-Fitts, D. A.; Thunhorst, R. L. **1996**. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II in rats. *Am. J. Physiol. 270 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R1092-R1098.

-Fitzsimmons, J. T. **1979**. The physiology of thirst and sodium appetite. *Cambridge University Press*. Cambridge.

-Fleshner, M.; Deak, T.; Spencer, R. L.; Laudenslager, M. L.; Watkins, L. R.; Maier, S. F. **1995**. A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology.* 136 (12): 5336-5342.

-Fuchs, E.; Flugge, G. **1995**. Modulation of binding sites for corticotropin-releasing hormone by chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 20 (1): 33-51.

-Gamallo, A.; Alario, P.; Gonzalez-Abad, M. J.; Villanua, M. A. **1992.** Acute noise stress, ACTH administration, and blood pressure alteration. *Physiol. Behav.* 51 (6): 1201-1205.

-Ganong, W. F. **1996**. Fisiología Médica. Eds. El Manual Moderno, México.

-Gaudet, E.; Blanc, J.; Elghozi, J. L. **1996**. Role of angiotensin II and catecholamines in blood pressure variability responses to stress in SHR. *Am. J. Physiol. 270* (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R1265-R1271.

-Gibbs, D. M. **1984**. Dissociation of oxcytocin, vasopressin and corticotropin function during different types of stress. *Life Science*, 35: 487-491.

-Goldstein, D. **1987.** Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Bailliere´s Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1 (2): 322-331.

-Greenberg, S. G.; Tershner, S.; Osborn, J. L. **1991.** Neurogenic regulation of rate of achieving sodium balance after increasing sodium intake. *Am. J. Physiol.* 261 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 30): F300-F307.

-Gyton, A. C. **1991**. Tratado de Fisiología Médica, Eds. McGarw-Hill-Interamericana, España.

-Hagan, P. M.; Poole, S.; Bristow, A. F. **1993**. Corticotrophin-releasing factor as a mediator of the acute-phase response in rats, mice and rabbits. *Journal of Endocrinology*, 136: 207-216.

-Haythornthwaite, J. A. **1993.** Behavioral stress, sodium intake and blood pressure. *Homeostasis*, 34 (5-6): 302-312.

-Hesse, I. F. A.; Johns, E. J. **1985.** The role of α-adrenoceptors in the regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion in the rabbit. *Br. J. Pharmac.,* 84: 715-724.

-Huang, B. S.; Leenen, F. H. H. **1995**. Dietary Na^+ and cardiopulmonary baroreflex control of renal symphatetic nerve activity in SHR. *Am. J. Physiol.* 268 (Heart Circ. Physiol. 37): H61-H67.

-Hursin, H.; Olff, M. **1993.** The stress response. In: *Stress: from synapse to syndrome*. Edited by S. Stanford and P. Salomon. Academic Press.

-Husain, M. K.; Manger, W. M.; Rock, T. W.; Frantz, A. G. **1979**. Vasopressin release due to manual restraint in the rat: Role of body compression and comparison with other stressful stimuli. *Endocrinology,* 104: 641-644.

-Jain, R.; Zwickler, D.; Hollander, C. S.; Brand, H.; Saperstein, A.; Hutchinson, B.; Brown, C.; Audhya, T. **1991**. Corticotrophin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology*, 128 (3): 1329-1336.

-Kant, G., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C., Driver, G., Meyeroff, J. **1985**. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 22: 631-635.

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

-Koepke, J. P.; Obrist, P. A. **1983**. Angiotensin II in the renal excretory responses to behavioral stress in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 245(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 14): R259-R264.

-Koepke, J. P.; Light, K. C.; Obrist, P. A.; Morris, M. **1984**. Vasopressin and urine flow rate responses to stress in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 247(Renal Fluid Electrolyte Physiol.16): F213-F218.

-Koepke, J. P. **1985**. Renal responses to stressful environmental stimuli. *Fed. Proc.*, 44: 2823-2827.

-Koepke, J. P.; DiBona, G. P. **1985**. Central β-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during stress in conscious Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, 7: 350-356.

-Koepke, J. P.; Jones, S.; DiBona, G. F. **1986.** Renal nerve activity and renal function during environmental stress in DOCA-ClNa rats. *Am. J. Physiol.* 251 (Renal Fluid Electrolyte Physiol.20): R289-R294.

-Kopin, I. J.; Eisenhofer, G.; Golstein, D. **1988**. Basic mechanism of the stress response.In: *Mechanisms of Physical and Emotional Stress*. G. P. Chrousos, D. L. Loriaux and P. W. Gold eds.;.Plenum Press, New York and London: 11-22

-Kotchen, T. A.; Kotchen, J. M. **1997.** Dietary sodium and blood pressure: Interaction with other nutrients. *Am. J. Clin. Nut.*, 65 (supply 2): S708-S711.

-Kuta, C., Bryant, H., Zabic, J., Yim, G. **1984**. Stress, endogenous opioids and salt intake. *Appetite*, 5: 53-60.

-Kvetnansky, R.; Mikulaj, L. **1970**. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, 87: 738-747.

-Lang, C. C.; Rahman, A. R.; Balfour, D. J. K.; Struthers, A. D. **1993**. Effect of noradrenaline on renal sodium and water handling in euhydrated and overhydrate man. *Clinical Science*, 85: 487-494.

-Lawler, J. E.; Cox, R. H.; Hubbard, J. W.; Mitchell, V. P.; Barker, G. F.; Trainor, W. P.; Sanders, B. J. **1985**. Blood pressure and heart rate responses to environmental stress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol. Behav.* 34 (6): 973-976.

-Lawler, J. E.; Abel, M. M.; Naylor, S. K. **1993.** Effects of salt intake on blood pressure and heart rate responses to footshock stress in SHR, BHR and WKY rats. *Physiol. Behav*, 53: 97-102.

-Lehnert, H.; Nink, M.; Mann, K.; Roschke, J.; Hellhammer, D. H. **1993**. Extrapituitary effects of corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Neuropsychobiology*, 28: 54-61.

-Li, H. L.; Ericsson, A.; Sawchenko, P.E. **1996**. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93: 2359-2364.

-Lienard, F.; Thornton, S. N.; Martial, F. P.; Mousseau, M. C.; Nicolaidis, S. **1996**. Angiotensin II receptor subtype antagonist can both stimulate and inhibit salt appetite in rats. *Regulatory Peptides*, 66: 87-94.

-Light, K. C.; Koepke, J. P.; Obrist, P. A.; Willis, P. W. **1983.** Psychological stress induces sodium and fluid retention in men at high risk for hypertension. *Science,* 22: 429-431.

-Mabry, T. R.; Gold, P. E.; McCarty, R. **1995.** Age-related changes in plasma catecholamine responses to chronic intermittent stress. *Physiol. Behav.* 58 (1): pp. 49-56.

-Martí, O.; Gavalda, A.; Martí, J.; Gil, M.; Giralt, M.; López-Calderón, A.; Armario, A. **1993**. Chronic stress induced changes in LH secretion: the contribution of anorexia associated to stress. *Life Science*, 52: 1187-1194.

-Martí, O.; Gavalda, A.; Gómez, F.; Armario, A. **1994a**. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology*, 60: 1-7.

-Martí, O.; Martí, J.; Armario, A. **1994b**. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol. Behav.* 55 (4): 747-753.

-Martin, D. S.; Appelt, C.; Rodrigo, M. C.; Egland, M. C. **1996**. Acute stress increases venomotor tone in conscious rats. *American Physiological Society* : H1375-H1383.

-Mattes, R. D. **1997**. The taste for salt in humans. *Am. J. Clin. Nut.* 65 (supply 2): 692s-697s.

-McGregor, G.A. **1997.** Salt- more adverse effects. *Am. J. Hypertension*, 10: S37-S41.

-Michajlovskij, N.; Lichardus, B.; Kvetňasnsky, R., Ponec, J. 1988. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinologia Experimentalis*, 22: 143-157.

-Moissmann, R.; Imboden, H.; Felix, D. **1996**. The neuronal role of angiotensin II in thirst, sodium appetite, cognition and memory. *Biol. Rev.* 71: 545-559.

-Munck, A.; Guyre, P. M.; Holbrook, N. J. **1984**. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5: 25-51.

-Navar, L. G. **1997**. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Essential Hypertension*, Part 1, 81 (5): 1165-1198.

-Oitzl, M. S.; van Haarts, A. D.; Sutanto, W.; de Kloet, E. R. **1995.** Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (Mrs) and the activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis: the Lewis rats as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA Axis. *Psychoneuroendocrinology*, 20 (6): 655-675.

-Ortiz, R.; Armario, A.; Castellanos, J. M.; Balasch, J. **1985.** Post-weaning crowding induces corticoadrenal hyperreactivity in male mice. *Physiol. Behav.* 43: 857-860.

-Paulmyer-Lacroix, O.; Guillaume, V.; Anglade, G.; Grino, M.; Oliver, C. **1995.** Regulation de la fonction corticotrope dans les situations de stress. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*, 56: 245-251.

-Pereira da Silva, R. K.; Saad, W. A.; Renzi, A.; Menani, J. V.; de Arruda Camargo, L. A. **1995**. Effect of lateral hypothalamic lesions on the water and salt intake, and sodium and urine excretion induced by activation of the mediam preoptic nucleus in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 53: 195-204.

-Pitman, D., Natelson, B., Ottenweller, J., McCarty, R., Pritzel, T., Tapp, W. **1995**. Effects of exposure to stressors of varying predictability on adrenal function in rats. *Behav. Neurosc.* 109 (4): 767-776.

-Priehs, T. W.; Mooney, K. J.; Bernard, R. A. **1991**. High dietary sodium enhances gustatory nerve activity and behavioral responses to NaCl. *Am. J. Physiol. 261* (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 30): R52-R58.

-Retana-Marquez, S.; Domínguez Salazar, E.; Velazquez-Moctezuma, J. **1996.** Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology,* 21 (1): 39-50.

-Richter, C. P. **1956.** Salt appetite of mammals, its dependence on instinct and metabolism. In: *L'instinct dans le comportement des animaux et de l'homme.* Eds. Masson et Cie, París.

-Rivier, C.; Vale, W. **1987**. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary mediated mechanisms. *Endocrinology*, 121: 1320-1326.

-Rocha, M. J. A.; Callahan, M. F.; Morris, M. **1997**. Baroreceptor regulation of salt intake. Brain Res. Bull. 42 (2): 147-151.

-Ruiz de Gordoa, J. C.; Santafé, J.; Segarra Domenech, J.; Santisteban, A. **1994**. Modification of rat plasma lipoproteins induced by acute immobilization stress. *Psychosomatic Medicine*, 56: 486-492.

-Sarnyai, Z., Veldhuis, J., Mello, N., Mendelson, J., Eros-Sarnyai, M., Mercer, G., Gelles, H., Kelly, M. **1995**. The concordance of pulsatile ultradian release of adrenocorticotropin and cortisol in male Rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 80 (1): 54-59.

-Sawada, Y. **1993**. Reproducible increases in blood pressure during intermittent noise exposure: underlying haemodinamic mechanisms specific to passive coping. *Eur. J. Appl. Physiol*. 67: 367-374.

-Schauf, C., Moffett, D., Moffett, S. **1990**. Human Physiology. Edit by D. Allen. Times Mirror/Mosby College Publishing, Missouri.

-Schnackenberg, C.,Patel, A. R., Kirchner, K. A., Granger, J. P. **1997**. Nitric oxide, the kidney and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*: 24 (8): 600-606.

-Selye, H. **1936**. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138: 32-52.

-Skrabal, F.; Kotanko, P.; Luft, F. C. **1989**. Inverse regulation of α-2 and β-2 adrenoceptors in salt-sensitive hypertension: an hypothesis. *Life Science*, 45: 2061-2076.

-Stratakis, C.A.; Gold, P.W.; Chrousos, G.P. **1995**. Neuroendocrinology of stress: implications for growth and development. *Horm. Res*, 43: 162-167.

-Stricker, E. M.; Verbalis, J. G. **1996**. Central inhibition of salt appetite by oxitocin in rats. *Regulatory Peptides*, 66: 83-85.

-Tarjan, E.; Denton, D. E. **1991**. Sodium/water intake of rabbits following administration of hormones of stress. *Brain Res. Bull.* 26: 133-136.

-Takita, M., Oda, Y., Kigoshi, S., Muramatsu, I. **1995**. Effects of propranolol and atenolol on immobilization stress-induced hypertension and down regulation of central β-adrenoceptors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 (2): 225-232.

-Terrazino, S.; Perego, C.; De Simoni, M. G. **1995**. Effect of development of habituation to restraint stress on hypothalamic noradrenaline release and adrenocorticotropin secretion. *J. Neurochem,* 65 (1): 263-267.

-Thunhorst, R. L. **1996.** Role of peripheral angiotensin in salt appetite of the sodium-depleted rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20 (1): 101-106.

-Tizabi, Y.; Aguilera, G. **1992.** Desensitization of the Hipothalamic-Pituitary-Adrenal Axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology*, 56: 611-618.

-Toth, E.; Stelfox, J.; Kaufman, S. **1987**. Cardiac control of salt appetite. *Am. J. Physiol. 252* (Regulatory Integrative Comp. Physiol.21): R925-R929

-Tsuchiya, T.; Horii, I. **1995.** Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology,* 20 (1): 95-102.

-Tucker, D. C.; Hunt, R. A. **1993.** Effects of long-term air jet noise and dietary sodium chloride in Bordeline Hypertensive Rats. *Hypertension*, 22 (4): 527-534.

-Wolf, G.; Stricker, E. M. **1967**. Sodium appetite elicited by hypovolaemia in adrenalectomized rats: Re-evaluation of the reservoir hypothesis. *J. Physiol. Psychol.* 63: 252-260.

-Yoshida, T.; Okuno, T.; Kawabata, T.; Morimoto, T. **1994**. Salt consumption and body fluid balance during cold exposure in rats. *Physiol. Behav.* 55 (1): 163-167.

-Young, E. A.; Kwak, S. P.; Kottak, J. **1995**. Negative feedback regulation following administration of chronic exogenous corticosterone. *J. Neuroendocrinol.* 7: 37-45.