

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Hiponatremia intermitente recurrente: un nuevo modelo
experimental. Estudio de su efecto sobre el balance
hidrosalino y el sistema nervioso central**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Tejedor Bravo

Directores

Alberto Lázaro Fernández
Luis Antonio Álvarez-Sala Walther

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Hiponatremia intermitente recurrente: un nuevo modelo experimental
Estudio de su efecto sobre el balance hidrosalino y el sistema nervioso central**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

Marta Tejedor Bravo

DIRECTORES

**Dr. Don Alberto Lázaro Fernández
Dr. Don Luis Antonio Álvarez-Sala Walther**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Hiponatremia intermitente recurrente: un nuevo modelo experimental
Estudio de su efecto sobre el balance hidrosalino y el sistema nervioso central**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

Marta Tejedor Bravo

DIRECTORES

**Dr. Don Alberto Lázaro Fernández
Dr. Don Luis Antonio Álvarez-Sala Walther**

**Programa de Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas
Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón**



Don Alberto Lázaro Fernández, Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina y

Don Luis Antonio Álvarez-Sala Walther, Doctor en Medicina y Cirugía

CERTIFICAN

Que Doña Marta Tejedor Bravo, Licenciada en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“Hiponatremia intermitente recurrente: un nuevo modelo experimental. Estudio de su efecto sobre el balance hidrosalino y el sistema nervioso central”*, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid a 6 de Diciembre de 2022.

Directores

Vº Bº del Tutor

Dr. Don Alberto Lázaro Fernández.

Dr. Don Luis Antonio Álvarez-Sala Walther.

Dr. Don Luis Antonio Álvarez-Sala Walther.

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar.*

Antonio Machado

A mi padre, Alberto Tejedor

Brilla en el cielo e ilumínanos con tu luz. Te quiero.

AGRADECIMIENTOS

Presento aquí el resultado de un viaje que comenzó hace siete años. Siete años de ilusión, descubrimiento, dolor, trabajo, sacrificio, perseverancia y agradecimiento.

Y no puedo sino estar increíblemente agradecida a tantas personas sin las que este proyecto jamás habría visto la luz.

En primer lugar quiero agradecer a mi padre, el Dr Alberto Tejedor, quien desafortunadamente hoy sólo nos puede acompañar desde el cielo, su apoyo constante durante toda mi vida. Él fue mi primer director de tesis, con quien concebí la idea de estos estudios y con quien comencé a desentrañar los resultados. De él he aprendido no sólo metodología investigadora, sino también integridad, el valor del esfuerzo, a no rendirme nunca y a dar siempre lo mejor de mí misma. Papá, allá donde te encuentres, espero que estés orgulloso de mí. Esta tesis es para ti.

Quiero agradecer al Dr Alberto Lázaro y al Dr Luis Álvarez-Sala que recogieran el testigo cuando mi padre falleció y me ayudaran a traer este proyecto a buen puerto en un momento muy difícil de mi vida. Sin ellos, este viaje no habría podido ser. Gracias por su dedicación, su comprensión y su guía en todo momento.

Gracias a todo el equipo de Fisiopatología del Fracaso Multiorgánico de la UCM, en especial a la directora del mismo, la Dra Meritxell López-Gallardo, quien me acogió en su grupo para terminar una parte importante de la experimentación, y puso a mi disposición su tiempo y recursos. Gracias a la Dra Eva Marco, por su paciencia para introducirme en los oscuros vericuetos del ANOVA y por encontrar siempre tiempo para sentarse conmigo a revisar resultados. Gracias al resto de miembros del equipo, muy especialmente a la Dra Marian González-Nicolás y al futuro Dr Diego San Felipe, que me han enseñado tanto de bondad y altruismo, y siempre han estado disponibles para ayudarme con los modelos animales y el procesamiento de las muestras, sin ellos no habría podido terminar la tesis.

Gracias a todo el equipo de la Unidad de Imagen Preclínica del IISGM, a sus responsables, los Dres Lorena Cussó y Manuel Desco, por sus comentarios y aportaciones al trabajo final. Me gustaría dedicar un agradecimiento especial a Alexandra de Francisco y al Dr Daniel Calle, quienes siempre han estado disponibles para ayudarme con las dudas que iban surgiendo.

Gracias a los estudiantes de Medicina, Ana, Teba, Carmen, Marga, Ángel, Giovanna, Clara, Javi y Baris, por haber elegido nuestro laboratorio para sus TFG y por haberme permitido dar con ellos sus primeros pasos en el camino de la investigación.

Gracias a todo el personal del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del IISGM.

Gracias a mis compañeros de trabajo, el equipo de Digestivo del Hospital Infanta Elena, por haber comprendido mi situación y haberme dado la flexibilidad para poder terminar este trabajo a tiempo.

Gracias a la Dra Inés Aragoncillo, compañera de fatigas y amiga del alma, quien siempre me ha prestado su hombro para llorar en los momentos de desaliento y ha sabido transmitirme energías cuando las mías flaqueaban.

Por último, pero no por ello menos importantes, gracias a mi familia. Gracias a mis niños, Adrián y Gloria, por su alegría infinita, por quererme tanto, por entender que mamá no haya podido estar con ellos durante tardes y fines de semana sin fin porque tenía que estudiar. Gracias a mi marido, Pedro, por estar siempre ahí, por ser un pilar inamovible en mi vida, sólido como una roca. Y gracias infinitas a mi madre, Amparo, por todo, por absolutamente todo. Referente sin parangón para mí por su bondad, por su paciencia, por su buena disposición y comprensión.

Lo hemos conseguido, gracias a todos de corazón.

Marta Tejedor

ÍNDICE

RESUMEN	19
SUMMARY	21
ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	29
1. RECUERDO ANATOMOFISIOLÓGICO	31
1.1. Composición y compartimentos líquidos del organismo	31
1.2. Fisiología tubular renal	32
1.3. Regulación de la excreción renal de agua	34
1.4. Estructura y función del sistema nervioso central	35
1.4.1. Organización celular del sistema nervioso central	35
1.4.2. Organización anatómica del sistema nervioso central	38
2. HIPONATREMIA	40
2.1. Definición y relevancia clínica	40
2.2. Edema cerebral secundario a hipoosmolalidad	41
2.3. Adaptación cerebral a la hiponatremia	42
3. MODELOS ANIMALES DE HIPONATREMIA	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
Hipótesis	49
Objetivos.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	53
1.1. Moduladores del balance hidrosalino.....	53
1.2. Dietas	54
1.3. Modelos en ratón.....	56
1.3.1. Estudio piloto del efecto de ddAVP sobre el comportamiento.....	56
1.3.2. Estudio final del efecto de ddAVP sobre el comportamiento	57
1.4. Modelos en rata	57
1.4.1. Modelo de hiponatremia aguda.....	57
1.4.2. Modelo de hiponatremia intermitente recurrente	58
1.4.3. Agudización de hiponatremia intermitente recurrente	58
1.4.4. Modelo del efecto precoz de suero salino hipertónico.....	59
2. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	61
2.1. Sacrificio de los animales.....	61
2.2. Obtención de muestras del sistema nervioso central	61

3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	63
4. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA INGESTA CALÓRICA E HÍDRICA	64
5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO.....	64
5.1. Análisis de comportamiento en condiciones no forzadas	64
5.2. Análisis de comportamiento en situaciones controladas.....	64
6. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE.....	66
6.1. Obtención de imágenes y coeficiente de difusión aparente.....	67
6.2. Espectroscopia in vivo de osmolitos	69
7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE ASTROCITOS Y OLIGODENDROCITOS	69
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
RESULTADOS	73
1. RESULTADOS INICIALES: ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO	75
2. MODELO DE HIPONATREMIA AGUDA.....	79
2.1. Análisis del balance hidrosalino.....	79
2.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	80
2.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	83
2.3.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos.....	83
2.3.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos	85
3. MODELO DE HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE	88
3.1. Análisis del balance hidrosalino.....	88
3.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	91
3.3. Análisis por espectroscopia del contenido de osmolitos in vivo.....	91
3.4. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	92
3.4.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos.....	92
3.4.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos	92
4. MODELO DE AGUDIZACIÓN DE LA HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE	93
4.1. Análisis del balance hidrosalino.....	93
4.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	93
4.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	94
4.3.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos.....	94
4.3.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos	94
5. MODELO DEL EFECTO PRECOZ DE SUERO SALINO HIPERTÓNICO	95
5.1. Análisis del balance hidrosalino.....	95
5.2. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	95
5.2.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos.....	95
5.2.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos	98

DISCUSIÓN	101
1. ALTERACIONES EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE	103
2. HIPONATREMIA AGUDA	104
2.1. Balance hidrosalino	104
2.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	104
2.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	106
3. HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE	106
3.1. Balance hidrosalino	106
3.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	108
3.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	109
4. AGUDIZACIÓN DE HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE	109
4.1. Balance hidrosalino	109
4.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)	109
4.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos	110
5. EFECTO PRECOZ DEL SUERO SALINO HIPERTÓNICO	111
LIMITACIONES	113
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO	135

RESUMEN

Introducción:

La hiponatremia es el trastorno hidroelectrolítico más frecuentemente encontrado en la práctica clínica humana. Incluso en formas leves, se asocia con peor pronóstico y mayor mortalidad global, a pesar de lo cual sigue existiendo una tendencia a minimizar la importancia de pequeñas alteraciones en la natremia, que tradicionalmente no se han asociado con consecuencias negativas, pese a la creciente evidencia en contra. En este sentido, no se ha estudiado hasta la fecha si presentar una hiponatremia intermitente, pero recurrente en el tiempo, es relevante. Existen situaciones en clínica humana donde esta condición podría ocurrir y pasar desapercibida, como en la cirrosis o en la insuficiencia cardíaca.

Material y métodos:

Para estudiar los efectos sobre el balance hidrosalino y el sistema nervioso central de diferentes situaciones de hipotonicidad, se utilizaron varios modelos animales, de hiponatremia aguda (administrando una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal por vía intraperitoneal (i.p.) a animales alimentados con pellet), de hiponatremia intermitente recurrente (dosis diaria i.p. de acetato de desmopresina (ddAVP) y agua equivalente al 2.5% del peso corporal a animales alimentados con dieta hiposódica) y de agudización de hiponatremia intermitente recurrente (sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal por vía i.p. a animales sometidos a hiponatremia intermitente recurrente). Además, se exploraron los efectos sobre la glía (astrocitos y oligodendrocitos) que la administración de un bolo i.p. de suero salino hipertónico tenía en animales alimentados con pellet y en animales sometidos a hiponatremia intermitente recurrente. Se utilizó el laberinto de agua de Morris para evaluar el aprendizaje y la memoria, el coeficiente de difusión aparente (ADC) obtenido a través de imágenes ponderadas en difusión adquiridas mediante resonancia magnética para valorar el contenido y distribución del agua cerebral, y técnicas de inmunohistoquímica para estudiar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador de astrocitos, y la proteína básica de la mielina (MBP), marcador de oligodendrocitos y mielina. Así mismo, se realizaron estudios analíticos de sangre y orina para la evaluación del balance hidrosalino.

Resultados:

En los estudios de comportamiento, la administración diaria repetida de ddAVP, con o sin una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal, era suficiente para alargar trayectorias y tiempo de resolución en el laberinto de Morris comparado con los controles, tanto al evaluar la memoria como el aprendizaje, aunque en los animales que recibían agua los cambios fueron más marcados.

La dieta pellet inducía por sí misma una situación de retención hídrica difícil de modificar con maniobras adicionales como la administración de ddAVP asociado con una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal. Sin embargo, la administración de ddAVP/agua sí logró inducir una retención hídrica en los animales alimentados con dieta hiposódica.

En el modelo de hiponatremia aguda se indujo una hiponatremia hipoosmolar y se observó un descenso progresivo de los valores de ADC al estudiar el encéfalo completo, sugiriendo un aumento en la proporción de agua intracelular con respecto a la extracelular tras la sobrecarga hídrica. El comportamiento del ADC fue diferente entre la sustancia gris (SG) y la sustancia blanca (SB), siendo llamativo que en SB aumenta su valor en el tiempo tras la sobrecarga hídrica, reflejando probablemente una reducción relativa del agua intracelular en esta región. La administración de la sobrecarga hídrica indujo un aumento en la expresión de GFAP y MBP en SB, pero no en SG.

En el modelo de hiponatremia intermitente recurrente, se indujo una hiponatremia leve y transitoria, que se recuperaba a las 24h de la administración del tratamiento, pero que se repetía a lo largo de 7 días consecutivos. Esto se tradujo en un valor de ADC en encéfalo global más bajo que el visto en animales alimentados con pellet, sugiriendo un acúmulo de agua cerebral en esta situación. Además, aumentó la expresión de GFAP en SG comparado con lo visto en animales alimentados con pellet, aunque no se apreciaron cambios significativos en la expresión de MBP.

La agudización de la hiponatremia intermitente recurrente también provocó una hiponatremia hiposmolar. En esta situación, también se observó un descenso progresivo de los valores de ADC en encéfalo completo. Dicho descenso fue menos pronunciado que en animales alimentados con pellet. Al analizar por separado la SG y la SB, ambas presentaron un ascenso progresivo en los valores de ADC, más marcado en la SB. La administración de la sobrecarga hídrica indujo un aumento en la expresión de GFAP y MBP en SB, pero sin que se observaran cambios en SG, resultados similares a los observados en el modelo de hiponatremia aguda.

Por último, se exploraron los efectos precoces de la administración de un bolo de suero salino hipertónico sobre la expresión de GFAP y MBP. Sólo se observó un aumento en la expresión de GFAP en SB central en animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua.

Discusión:

Los resultados apuntan a que existe un comportamiento diferencial entre la SG y la SB en respuesta a la hiponatremia aguda, tanto en términos de distribución de agua encefálica como en activación de las células gliales. La hiponatremia intermitente recurrente es un modelo animal nuevo que sugiere que se puede producir una retención hídrica significativa con tan solo unas horas de hiponatremia al día, siempre que esta situación se repita en el tiempo. Dicha retención hídrica se refleja en alteraciones conductuales y en un mayor grado de acúmulo de agua encefálica y activación astrogliar en SG. La respuesta de estos animales a una sobrecarga hídrica adicional no presenta grandes variaciones con respecto a lo observado en la hiponatremia aguda. El suero salino hipertónico parece afectar de forma precoz a los astrocitos en la SB, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura.

Este estudio pone de manifiesto la importancia de las pequeñas fluctuaciones en la natremia, que si se mantienen en el tiempo, pueden traducir una situación subyacente de retención hídrica con consecuencias a nivel del sistema nervioso central, que podría tener una repercusión sobre los síntomas cognitivos o la calidad de vida de los pacientes.

SUMMARY

Introduction:

Hyponatremia is the most common electrolyte disturbance in clinical care. Even mild presentations are associated with poor prognosis and an increased mortality, in spite of which there is a trend to minimize the importance of small variations in natremia, that have historically been dismissed as not having negative consequences despite growing evidence against it. In this regard, it has not been studied to date whether an intermittent but recurrent hyponatremia is relevant. There are clinical scenarios where this condition could occur and be overlooked, such as cirrhosis or heart failure.

Material and Methods:

The effects of different hypotonic situations were studied on the electrolyte balance and central nervous system by means of different animal models, acute hyponatremia (intraperitoneal (i.p.) administration of a 10% of the animal's body weight water overload in chow fed animals), intermittent recurrent hyponatremia (i.p. daily dose of desmopressin acetate (ddAVP) and a water dose equivalent to 2.5% of the animal's body weight in hyposodic diet fed animals) and acute on intermittent recurrent hyponatremia (i.p. water overload equivalent to 10% of the animal's body weight in animals subjected to intermittent recurrent hyponatremia). The effects of an i.p. hypertonic saline bolus had on glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) in chow fed animals and those submitted to intermittent recurrent hyponatremia were also explored. The Morris water maze was used to assess learning and memory, apparent diffusion coefficient (ADC) obtained from diffusion weighted images (DWI) acquired through magnetic resonance was used to study content and distribution of brain water, and immunohistochemistry was used to examine glial fibrillary acidic-protein (GFAP), astrocyte marker, and myelin basic protein (MBP), oligodendrocyte and myelin marker. Blood and urine analysis were performed as well to assess the water and electrolyte balance.

Results:

Behavioural studies showed that daily administration of ddAVP, with or without a daily water dose equivalent to 2.5% of the animal's body weight, was enough to lengthen resolution trajectories and times in the Morris maze compared to controls, both when assessing memory and learning, although in animals receiving water the effects were more pronounced.

Chow diet per se induced water retention, difficult to modify with additional maneuvers such as the administration of i.p. daily ddAVP plus a water dose equivalent to 2.5% of the animal's body weight. However, ddAVP/water administration was able to induce water retention in hyposodic diet fed animals.

In the acute hyponatremia model, hypotonic hyponatremia was induced, and a progressive decrease in ADC values was observed in the whole brain, suggesting an intracellular water gain compared to extracellular water after the water overload. The ADC behaviour was different between white (WM) and grey (GM) matter. Interestingly, in GM ADC values increased over time, probably reflecting a relative reduction in intracellular water in this region. The i.p. water overload induced an increased GFAP expression in the WM, but not in the GM.

In the intermittent recurrent hyponatremia model, mild and transient hyponatremia was induced, which was recovered 24h after treatment, but that was repeated over a 7 day period. This translated into a lower ADC value in the whole brain, compared to chow fed animals, suggesting an increase in total brain water in this situation. There was also an increase in GFAP expression in the GM compared to chow fed animals, although no significant changes in MBP's expression were seen.

Acute on intermittent recurrent hyponatremia induced hypotonic hyponatremia as well. In this situation, a progressive decrease in ADC values in the whole brain was seen. Said decrease was less pronounced compared to chow fed animals. When GM and WM were analysed separately, they both showed a progressive increase in ADC values, more evident in the WM. The water overload increased GFAP and MBP's expression in the WM, but no changes were seen in the GM, similarly to what had been observed in the acute hyponatremia model.

Finally, the early effects of a hypertonic saline bolus administration on GFAP and MBP's expression were explored. Only an increase in GFAP's expression in the central WM of hyposodic diet fed + ddAVP/water was observed.

Discussion:

Results point towards a differential behaviour between the GM and WM in response to acute hyponatremia, both in terms of brain water distribution and glial cell activation. Intermittent recurrent hyponatremia is a novel animal model that suggests there can be significant water retention after only a few hours of hyponatremia a day, provided this situation is repeated over time. Such water retention translates into cognitive deficits and a greater brain water accumulation and astroglial activation in the GM. These animals's response to an additional water overload does not show big variations compared to what is observed in acute hyponatremia. Hypertonic saline seems to affect early astrocytes in the WM, which is consistent with the available literature.

This study highlights the importance of slight fluctuations in natremia, which, if maintained over time, can translate underlying water retention with consequences at the central nervous system level, including cognitive symptoms and quality of life impairment of patients.

ABREVIATURAS

A continuación se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

ADC	Coeficiente de Difusión Aparente (apparent diffusion coefficient)
ADH	Hormona antidiurética
AQP	Aquaporina
AUC	Área bajo la curva (area under the curve)
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca ⁺⁺	Catión calcio
cal	Calorías
Cl ⁻	Anión cloro
cm	Centímetros
d	Día
ddAVP	Acetato de desmopresina
ddAVP/agua	Administración diaria por vía intraperitoneal de ddAVP (0.4 mcg/kg/d) y una sobrecarga de agua equivalente al 2.5% del peso del animal
ddAVP/agua + sobrecarga 5%	Administración diaria por vía intraperitoneal de ddAVP (0.4 mcg/kg/d) y una sobrecarga de agua equivalente al 2.5% del peso del animal, con una dosis adicional de agua equivalente al 5% del peso del animal
DWI	Imágenes ponderadas en difusión (diffusion weighted images)
FC	Frecuencia cardiaca
FOV	Área de interés o campo de visión (field of view)
FR	Frecuencia respiratoria
g	Gramos
GABA	Ácido gamma aminobutírico (gamma aminobutyric acid)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic-Protein
H ⁺	Hidrogenión
HGUGM	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Hz	Herzios
IHQ	Inmunohistoquímica
IISGM	Instituto de investigación Sanitaria Gregorio Marañón

IRM	Imagen por resonancia magnética
K ⁺	Catión potasio
Kg	Kilogramo
L	Litro
MBP	Myelin Basic-Protein
mEq	Miliequivalentes
µg	Microgramos
Mg ⁺⁺	Catión magnesio
min	minutos
mL	Mililitro
µm	Micras
mm ²	Milímetros cuadrados
mm ³	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetros de mercurio
mmol	Milimoles
mOsm	Miliosmoles
ms	Milisegundos
Na ⁺	Catión sodio
NAA	N-acetil aspartato
NaCl3%	Suero salino hipertónico al 3%
Na _p	Sodio plasmático (mEq/L)
Osm _o	Osmolalidad urinaria (mOsm/kg)
Osm _p	Osmolalidad plasmática (mOsm/kg)
PB	Tampón fosfato (buffer phosphate)
pCO ₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PFA	Paraformaldehído
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
RM	Resonancia magnética

RMN	Resonancia magnética nuclear
ROI	Región de interés
RVD	Reducción de volumen reguladora (regulatory volume decrease)
SatO ₂	Saturación de oxígeno
SB	Sustancia blanca
seg	Segundos
SG	Sustancia gris
SIADH	Síndrome de secreción inadecuada de ADH
T ^a	Temperatura
TE	Tiempo de eco (echo time)
TR	Tiempo de repetición (repetition time)

INTRODUCCIÓN

1. RECUERDO ANATOMOFISIOLÓGICO

1.1. Composición y compartimentos líquidos del organismo

El cuerpo humano se compone principalmente de agua, grasa, proteínas y minerales, por orden decreciente de proporción (1). El equilibrio entre ellos es fundamental para garantizar la salud de los individuos. En condiciones normales, el organismo está compuesto en un 60% de agua. Este volumen está repartido en dos grandes compartimentos líquidos:

- **Compartimento extracelular:** supone el 35% del agua corporal total; a su vez está subdividido en el volumen plasmático, el líquido intersticial, el líquido transcelular, la linfa, y un pequeño porcentaje que se localiza en ciertos tejidos. En su composición predominan el Na^+ , el Cl^- y el bicarbonato. Dentro de este compartimento, los volúmenes más importantes son el plasmático y el intersticial, sumando entre los dos más del 85% del agua extracelular. Aunque las composiciones iónicas de ambos son ligeramente diferentes, se acepta que las concentraciones plasmáticas de los distintos electrolitos representan fielmente las concentraciones de éstos en el líquido extracelular.
- **Compartimento intracelular:** supone el 65% del agua corporal total, y es la suma de los volúmenes intracelulares de todas las células del cuerpo. En su composición predomina el K^+ , los fosfatos orgánicos y las proteínas.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio osmótico entre los compartimentos intra y extracelular. El agua puede atravesar las membranas semipermeables de las células a favor del gradiente osmótico generado por las concentraciones de solutos a cada lado de las mismas, hasta restablecer el equilibrio osmótico. En ocasiones se producen cambios patológicos en la composición iónica o el volumen extracelular que afectan secundariamente al volumen intracelular. Un aumento en los aportes de agua al compartimento extracelular supondrá un aumento de su volumen y una reducción de su presión osmótica, lo que se traducirá en un paso de agua hacia el interior de las células, con la consiguiente hiperhidratación celular. Por el contrario, una pérdida de agua del compartimento extracelular redundará en una mayor concentración de solutos a ese nivel, y en un paso de agua desde el espacio intracelular al extracelular, con la consiguiente deshidratación celular (Fig 1) (2).

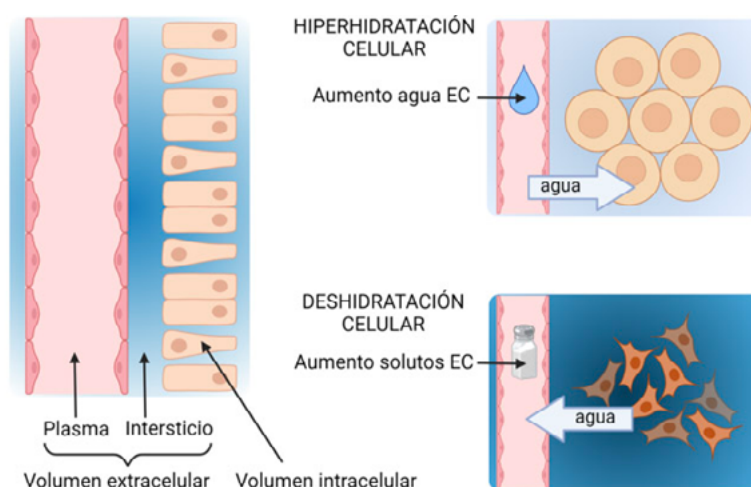


Figura 1. Principales compartimentos líquidos del organismo y regulación de los flujos de agua entre ellos. Un aumento en los aportes de agua al compartimento extracelular se traducirá en una hiperhidratación celular, mientras que un aumento en la concentración de solutos en el compartimento extracelular provocará una deshidratación celular. EC: extracelular. Figura creada con BioRender.com.

La mayoría de las células, cuando sufren un cambio de volumen suficiente secundario a cambios en la osmolalidad del medio extracelular, experimentan una respuesta adaptativa, llamada reducción del volumen reguladora (*regulatory volumen decrease*, RVD) en caso de hipotonicidad, o incremento del volumen regulador (*regulatory volumen increase*, RVI) en caso de hipertonicidad. Para ello, las células modifican la concentración intracelular de osmolitos, tanto inorgánicos (iones, principalmente K^+ y Cl^-) como orgánicos: los extruyen en el RVD, y los recaptan o sintetizan *de novo* en el RVI (3). Los osmolitos orgánicos son compuestos con capacidad osmótica que pertenecen a diferentes grupos químicos como las metil-aminas (glicerofosforilcolina, betaina), aminoácidos (taurina, glutamina, glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), prolina) y polioles (sorbitol, mioinositol). Su función principal, gracias a su poder osmótico, es estabilizar el volumen celular y la estructura proteica (4).

1.2. Fisiología tubular renal

Se define medio interno como el medio apropiado para el desarrollo de las funciones celulares. Básicamente está compuesto de agua y electrolitos. Para el correcto funcionamiento del organismo, debe mantenerse en un equilibrio dinámico, tanto en el volumen de agua como en su distribución relativa en los distintos compartimentos.

El principal responsable del mantenimiento de este balance hidrosalino en el organismo es el riñón, que se organiza en corteza y médula, y cuya unidad funcional es la nefrona, dividida a su vez en las siguientes estructuras (5)(Fig 2):

- **Glomérulo:** es la estructura encargada de la filtración. Se localiza en la corteza renal, tiene forma esférica y está formado por una red de capilares interconectados, entre los cuales se localizan las células mesangiales, con función de soporte, regulación del flujo sanguíneo intraglomerular y capacidad fagocítica. La cápsula de Bowman es una estructura epitelial que rodea el glomérulo y se invagina para englobarlo, dejando en su interior el espacio de Bowman o espacio urinario, donde se recoge el líquido filtrado en los glomérulos. La capa interna (visceral) de la cápsula está formada por células epiteliales modificadas, los podocitos, cuyas prolongaciones citoplásmicas rodean los capilares glomerulares. Las células endoteliales del ovillo capilar, los podocitos y la membrana basal glomerular que los separa constituyen los elementos principales de la barrera de filtración glomerular. El glomérulo produce cada día 180 litros de ultrafiltrado a partir del plasma que atraviesa la barrera de filtración. Dicho ultrafiltrado no contiene proteínas, pero tiene la misma composición hidroelectrolítica que el plasma (6,7).
- **Túbulo:** el sistema tubular se encuentra a continuación de la cápsula de Bowman. Es la estructura encargada de modificar la composición del líquido ultrafiltrado, que sufrirá procesos de reabsorción (devolución de sustancias filtradas al plasma) y de secreción (eliminación desde el plasma o desde las células renales a la luz tubular) hasta lograr la orina final. Por tanto, se ocupa del balance de agua y electrolitos. Para poder regular estas dos acciones, el túbulo de la nefrona está dividido en varios segmentos con características y funciones específicas (8–14):
 - **Túbulo contorneado proximal:** localizado en la corteza renal. A este nivel se produce la reabsorción de hasta el 80% del filtrado glomerular, recuperándose, además de agua, el 70% del Na^+ , el 80% del bicarbonato y el fosfato, y el 100% de la glucosa y los aminoácidos.
 - **Asa de Henle:** sigue al túbulo proximal, se hunde profundamente en la médula renal, hace un giro de 180° (horquilla del asa) y vuelve a subir hacia la corteza. Gracias al cotransportador $Na^+:K^+:2Cl^-$ presente en la rama ascendente del asa de Henle, el Na^+ es transportado desde la luz tubular al interior de la célula, junto con un K^+ y dos Cl^- . Parte del K^+ transportado es secretado nuevamente a la luz tubular a través del canal ROMK (15) localizado en la porción descendente, provocando una electropositividad en la luz tubular que favorece la reabsorción de Mg^{++} (16). Además, la porción descendente del asa de Henle reabsorbe agua a favor de un gradiente osmótico hacia la médula renal, lo que permite una concentración progresiva

del líquido intratubular. En la porción ascendente, impermeable al agua, continúa la reabsorción de Na^+ , K^+ y Cl^- y dicha reabsorción de solutos desde la luz tubular permite que el líquido intratubular se diluya hasta alcanzar una osmolalidad de aproximadamente 100 mosm/kg. Este mecanismo se conoce como contracorriente.

○ **Túbulo distal:** localizado en la corteza renal, a continuación del asa ascendente de Henle. Es impermeable al agua y a este nivel continúa la reabsorción de Na^+ y Cl^- a través del cotransportador apical $\text{Cl}^-:\text{Na}^+$, por lo que es también un segmento dilutor del líquido intratubular. Además, se produce el ajuste final del balance de Ca^{++} , regulado por la hormona paratiroidea y mediado por el canal apical de Ca^{++} y el antiportador basolateral $2 \text{Na}^+ \times \text{Ca}^{++}$.

○ **Túbulo colector:** en su porción cortical, los transportadores iónicos están regulados por la aldosterona que permite un ajuste preciso de la reabsorción de Na^+ y de la secreción de K^+ e hidrogeniones, influyendo de forma determinante en el volumen extracelular y el equilibrio ácido base del organismo. La aldosterona favorece el intercambio de Na^+ , que se reabsorbe generando un gradiente electronegativo en la luz tubular, por K^+ e hidrogeniones a través de la síntesis de novo e inserción de canales de Na^+ y K^+ en el polo apical, de Na^+/K^+ -ATPasa en el polo basolateral y de K^+/H^+ -ATPasa en el polo apical o en el basolateral (en función del estado ácido-base del sujeto). En ausencia de hormona antidiurética (*antidiuretic hormone*, ADH), el túbulo colector es impermeable al agua. La unión de ADH con su receptor V2 localizado en las células epiteliales tubulares desencadena una señal intracelular que culmina en la inserción del canal de agua acuaporina 2 (AQP2) en la membrana apical, lo que permite una reabsorción de agua a favor de gradiente osmótico, el generado por el mecanismo contracorriente, hacia la médula renal (17–19). Por lo tanto, este segmento regula el contenido en agua de la orina final, lo que va a determinar tanto el volumen de diuresis como su concentración. La porción final del túbulo colector (papilar) sí es permeable al agua y a la urea, aún en ausencia de ADH. El aporte de urea a la papila a este nivel es crítico para optimizar el fenómeno de contracorriente en el asa de Henle, al aumentar aún más el gradiente osmolar (6,8).

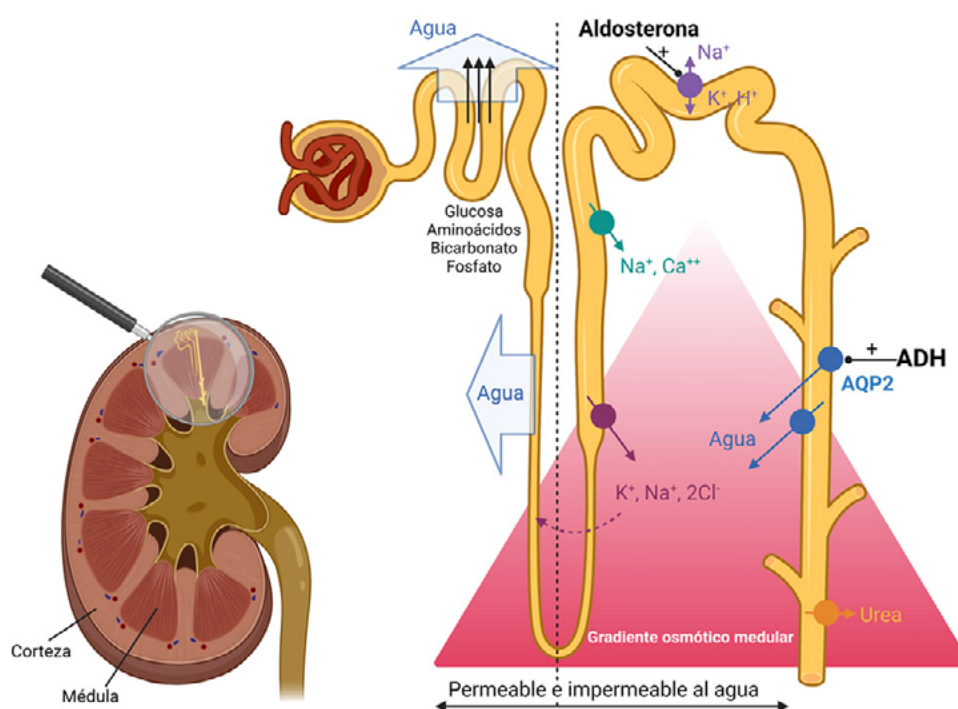


Figura 2. Esquema simplificado del funcionamiento del túbulo renal. Na^+ : catión sodio. K^+ : catión potasio. Cl^- : anión cloro. Ca^{++} : catión calcio. H^+ : hidrogenión. ADH: hormona antidiurética. AQP2: acuaporina 2. Figura creada con BioRender.com.

1.3. Regulación de la excreción renal de agua

La concentración urinaria se define en el túbulo colector medular y está regulada por la acción de la ADH. La ADH se sintetiza en las neuronas magnocelulares localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y es transportada a través de sus axones hasta la neurohipófisis, donde se almacena a la espera de ser secretada.

La secreción de la ADH está fundamentalmente regulada por la presión osmótica y la presión arterial (Fig 3). En este sentido, los osmorreceptores se sitúan por fuera de la barrera hematoencefálica (BHE), en la *lamina terminalis* y zonas adyacentes al área hipotalámica anterior, cerca de la pared anterior del tercer ventrículo. Pequeños cambios en la osmolalidad plasmática (de incluso un 1%) son detectados por dichos osmorreceptores, capaces de variar su volumen celular al expresar AQP4, la cual permite un flujo de agua transmembrana a favor del gradiente osmótico, de manera que un aumento en la osmolalidad plasmática provocará la deshidratación de estos osmorreceptores y un aumento secundario en la secreción de ADH, y viceversa. Es llamativo que funcionan como osmorreceptores perfectos, es decir, mantienen el cambio de volumen mientras dure la situación de anisotonicidad, y no presentan ningún tipo de adaptación volumétrica a los cambios de osmolalidad extracelular como ocurre en otras células (20). Por otro lado, los barorreceptores se localizan en el seno carotídeo y arco aórtico (detectan modificaciones de la presión arterial), y en las aurículas y sistema venoso pulmonar (detectan descensos de la misma). En condiciones fisiológicas, los barorreceptores mantienen un tono inhibitorio sobre la secreción de ADH, que se ve abolido por descensos de la presión arterial del 10-20%, facilitándose la secreción de ADH para aumentar la reabsorción de agua en el túbulo colector y, por tanto, aumentar el volumen circulante y restablecer la presión arterial.

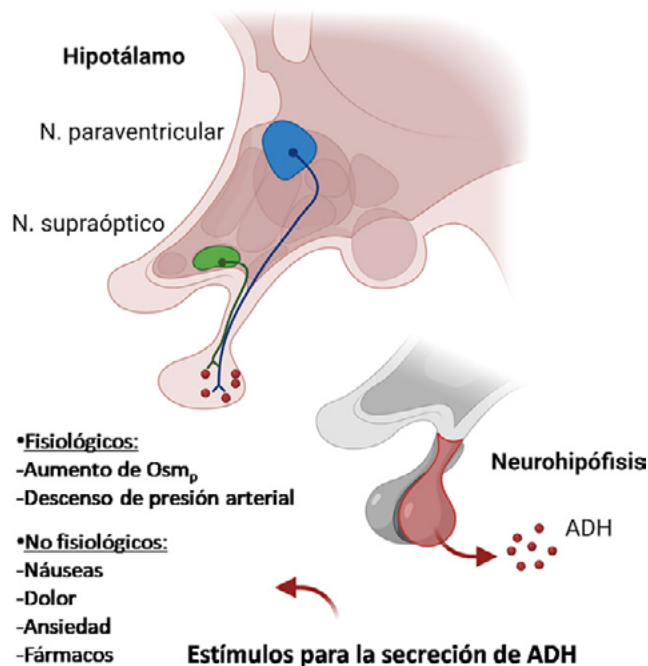


Figura 3. Síntesis, almacenamiento y regulación de la secreción de ADH. Osm_p : osmolalidad plasmática. N: núcleo. ADH: hormona antidiurética. Figura creada con BioRender.com.

Finalmente, los mismos mecanismos implicados en la secreción de ADH (hiperosmolalidad, hipotensión arterial) estimulan también el mecanismo de la sed, pero los umbrales que desencadenan dicha respuesta son más altos, por ejemplo, el osmostato de la sed se regula un 5% más alto que el de la ADH para garantizar que no se ponga en marcha hasta que se sobrepase el

mecanismo regulador de la ADH. El objetivo de la activación de la sed es el mismo que el de la estimulación de ADH: favorecer la retención hídrica para la corrección del desequilibrio en el medio interno (9,21–24).

1.4. Estructura y función del sistema nervioso central

1.4.1. Organización celular del sistema nervioso central

En el sistema nervioso central (SNC) hay dos tipos principales de células, las neuronas, unidad funcional del cerebro, y las células gliales (Fig. 4):

- **Neuronas:** son las unidades de señalización del sistema nervioso, responsables de las funciones de recepción, integración y motoras. La característica principal de las neuronas es su especialización en la comunicación intercelular, y a esto responde su morfología, en la que generalmente se distinguen cuatro regiones principales: el soma o cuerpo neuronal (centro metabólico que contiene el núcleo), las dendritas (encargadas de recibir las señales procedentes de otras células nerviosas), el axón (terminación más larga que conduce señales nerviosas a otras células) y las terminaciones presinápticas (ensanchamientos de las ramas terminales del axón que liberan neurotransmisores a la unión sináptica). Las neuronas son unidades morfológica y tróficamente independientes, que se interrelacionan a nivel de las sinapsis, o zonas de aproximación especializada en las que una neurona contacta y transmite información a la zona receptiva de otra neurona o de una célula efectora. La función de las neuronas es la generación de señales nerviosas, que son impulsos eléctricos que viajan a lo largo de los axones, algunos de los cuales están cubiertos por una envuelta lipídica aislante llamada vaina de mielina, producida por los oligodendrocitos en el SNC y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico. La vaina de mielina que rodea los axones mielinizados se encuentra interrumpida en los denominados nódulos de Ranvier, los cuales favorecen la conducción del impulso nervioso. La velocidad de conducción del impulso nervioso depende del grosor de los axones, de la existencia o no de envuelta mielínica y de la distancia internodal.
- **Células gliales:** se encuentran en el espacio que rodea a las neuronas, siendo mucho más numerosas que estas. Realizan una serie de funciones esenciales para el correcto funcionamiento del SNC: son el soporte estructural de las neuronas, eliminan de restos metabólicos y celulares, producen mielina, mejoran la eficiencia de la señalización interneuronal regulando las propiedades de las terminaciones presinápticas, forman parte de la BHE, guían el crecimiento y migración neural durante desarrollo y liberan factores de crecimiento neuronal, entre otros. Existen cuatro tipos de células gliales en el SNC: oligodendrocitos, macroglía, microglía y células ependimarias.

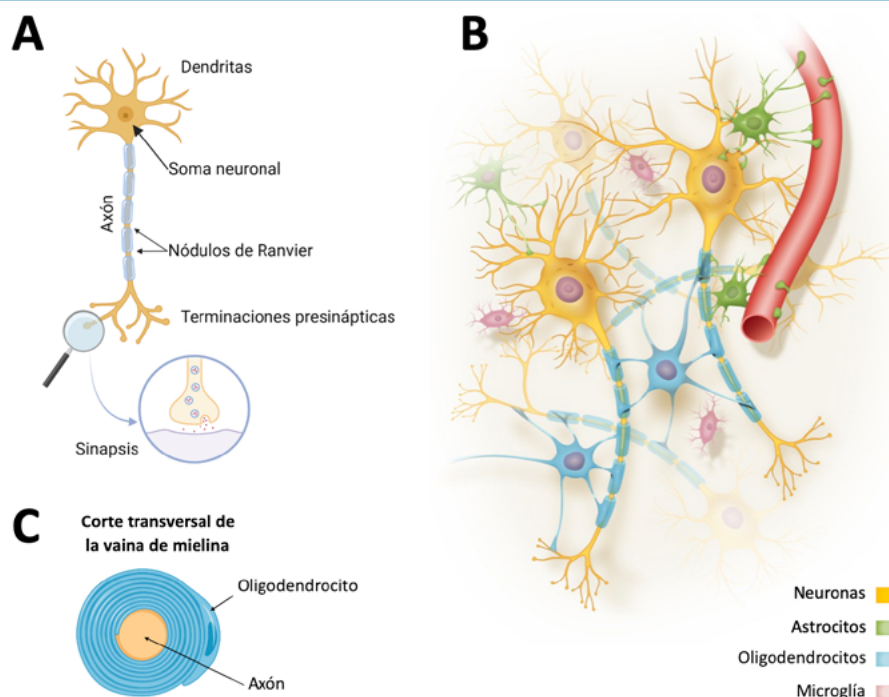


Figura 4. Organización celular del sistema nervioso central (SNC). Panel A: Estructura neuronal. Del soma parten diferentes prolongaciones, las más cortas son las dendritas, que reciben estímulos de otras células, y la más larga es el axón, que transmite señales hacia otras células y, en ocasiones, está recubierto por vainas de mielina. Panel B: Interacción entre los distintos tipos celulares en el SNC. Los procesos axonales están envueltos por las vainas de mielina producidas por los oligodendrocitos. Los astrocitos forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE) al rodear los capilares cerebrales y contactan con las demás células presentes en el SNC, neuronas y oligodendrocitos. La microglía tiene una función de vigilancia inmune. Panel C: Estructura de la vaina de mielina, formada por capas concéntricas compactadas de la membrana del oligodendrocito. Figura creada con BioRender.com y iStock by Getty Images (<https://www.istockphoto.com/es/about-us>).

Oligodendrocitos: son las células encargadas de la formación de la vaina de mielina de los axones mielínicos del SNC. Los oligodendrocitos se encuentran principalmente en la sustancia blanca (SB), aunque en la sustancia gris (SG) también aparecen algunos, rodeando y dando soporte estructural a los somas neuronales. Cada oligodendrocito puede extender múltiples procesos, cada uno de los cuales envuelve un tramo axonal de forma espiral (25). Posteriormente dicha espiral se compactará, uniéndose las capas concéntricas del citoplasma del oligodendrocito, confiriendo a la vaina de mielina un aspecto en capas electrón-densas y electrón-claras alternas al observarla al microscopio electrónico en un corte transversal (Fig 4 C) (26). En el mismo axón, cada segmento de mielina pertenece a diferentes oligodendrocitos. El número de procesos emitidos por cada oligodendrocito varía en función del área del SNC y la especie. La función principal de la mielina es el aislamiento de los axones para aumentar la velocidad de transmisión del impulso nervioso, pero además permite el agrupamiento de los canales de Na^+ en los nódulos de Ranvier durante la axogénesis y participa en el desarrollo y regulación del calibre axonal, modulando el crecimiento y generación de los mismos. La mielina tiene una composición única, con un escaso contenido de agua, apenas un 40% (comparado con un 80% en la SG), y un predominio del contenido de lípidos sobre las proteínas de la fracción restante (proporción 7:3), esto le confiere las propiedades ideales como aislante eléctrico. Los componentes principales de la mielina incluyen colesterol, fosfolípidos y glicoesfingolípidos, en particular galactocerebrósidos, y proteínas como la proteína básica de la mielina (*myelin basic protein*, MBP), y la proteína proteolípida (*proteolipid protein*, PLP) (25). MBP juega un papel esencial en la compactación de la vaina de mielina y su función se ve influida por las concentraciones intra y extracelulares de diferentes iones y agua derivadas de la actividad neuronal (27–29). Existen diversas afecciones con distintas etiologías (genética, inflamatoria, infecciosa) que afectan directamente a la mielina causando enfermedad en el ser humano, un ejemplo bien estudiado es la esclerosis múltiple (30), por tanto, MBP se puede usar para la localización de oligodendrocitos y valorar cambios en la formación de la mielina.

- **Macroglía:** En el SNC encontramos dos tipos de células microgliales, los astrocitos, y las células de Müller, estas últimas exclusivas de la retina. Los astrocitos son el tipo celular más abundante en el cerebro de los mamíferos. Presentan una gran heterogeneidad morfológica y funcional dependiente de la región del SNC en la que se encuentren, y además poseen una gran plasticidad adaptativa, muy importante para el mantenimiento funcional del SNC tanto durante el desarrollo como en el envejecimiento (31–33). Los astrocitos desempeñan muchas funciones implicadas en el mantenimiento de la homeostasia del SNC, como el transporte de los principales iones y protones, el metabolismo de neurotransmisores (glutamato, GABA, noradrenalina y adenosina), la liberación de precursores de los neurotransmisores, síntesis de glucógeno o suministro de sustratos energéticos a las neuronas, y eliminación de especies reactivas de oxígeno. También intervienen en el mantenimiento estructural del SNC, formando parte de la piamadre (34). Sus procesos, también llamados podocitos, pueden terminar en la superficie de las células nerviosas, o en los capilares sanguíneos, formando *tight-junctions* con las células endoteliales, contribuyendo a la formación de la BHE. El líquido extracelular en el encéfalo es el principal componente del microambiente neuronal donde interaccionan las células nerviosas entre sí. Su composición varía con la actividad neuronal y sus cambios pueden afectar a la misma, de lo que se deriva la importancia de que se mantenga estable, lo que se logra a través de las funciones de la glía, la BHE y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Los astrocitos están conectados entre sí y con los oligodendrocitos por conexinas y funcionan como un sincitio glial cuya integridad es crucial para las funciones del SNC y para el mantenimiento de la vaina de mielina (35–40). Los astrocitos desempeñan un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso al regular la formación, maduración, estabilidad, mantenimiento, plasticidad y eliminación de las sinapsis, regulando la arquitectura y la actividad general de los circuitos neuronales. Los astrocitos regulan la estructura y función de las sinapsis, tanto excitatorias como inhibitorias, mediante el contacto directo y la secreción de factores solubles que se dirigen a los sitios presinápticos y postsinápticos (33,41,42). Los astrocitos responden a la mayoría de estímulos que ponen en peligro la homeostasis cerebral activándose, mediante una respuesta conocida como astrogliosis, que implica importantes cambios tanto morfológicos como funcionales en estas células. Una característica que define a los astrocitos reactivos es la sobreexpresión de proteínas de filamentos intermedios o proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) o de vimentina. Además, la activación de los astrocitos implica una hipertrofia del soma y de sus prolongaciones principales. Al volverse reactivos, los astrocitos experimentan notables cambios en la expresión de genes que codifican para la síntesis de citocinas, entre otros. Los astrocitos detectan, producen e integran las señales inflamatorias entre las células inmunitarias y las del parénquima cerebral, regulando de esta forma la respuesta inmunitaria del SNC. Los astrocitos reactivos pueden persistir durante meses, e incluso años en las enfermedades cerebrales crónicas, y aunque se trata de una respuesta defensiva destinada a la neuroprotección y a limitar los daños en el tejido nervioso, en determinadas condiciones patológicas, la astrogliosis mantenida puede resultar potencialmente neurotóxica e inducir neurodegeneración (34).
- **Microglía:** las células microgliales son fagocitos derivados de los macrófagos, perteneciendo por tanto al sistema retículo endotelial, que se activan durante la infección, el daño cerebral en general y las convulsiones. La microglía es una población celular heterogénea, en constante movimiento, que se encarga de vigilar el microambiente que las rodea, cumpliendo con funciones de vigilancia inmune y presentación de antígenos en el SNC (43). Además de la función inmune, desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis del SNC, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (44); y pueden secretar al medio factores neurotróficos, los cuales intervienen tanto en la plasticidad como en la supervivencia neuronal (45,46).
- **Células endimarias:** las células endimarias revisten los ventrículos y el canal central de la médula espinal, siendo especialmente importantes durante el desarrollo del SNC. Algu-

nas de estas células endimarias modificadas forman parte del plexo coroideo y expresan AQP1, estando implicadas en la producción del LCR a este nivel. El LCR circula por el espacio subaracnoideo, los ventrículos cerebrales y el conducto endimario sumando un volumen de entre 100 y 150 mL, en condiciones normales, y sus principales funciones incluyen entre otras, servir de soporte y amortiguación hidroneumática al encéfalo, regular el contenido intracraneal y contribuir en la eliminación de metabolitos del SNC (47). Los tanacitos son células endimarias especializadas que tapizan el suelo del tercer ventrículo. Poseen un proceso alargado que se extiende hasta la eminencia media del hipotálamo basal, y contribuyen a la regulación de distintas funciones hipotalámicas (48,49).

1.4.2. Organización anatómica del sistema nervioso central

El SNC se puede dividir en las siguientes zonas morfofuncionales en el ser humano adulto (Fig 5) (50,51):

- **Telencéfalo:** los hemisferios cerebrales comprenden la corteza cerebral, los ganglios basales, la amígdala y la formación hipocampal. Las funciones de las distintas regiones corticales, de forma muy abreviada, incluyen la percepción de estímulos sensoriales y las funciones motoras. Los ganglios basales están implicados en el control del movimiento fino, en el aprendizaje de nuevas habilidades y en el procesamiento de las emociones. La amígdala se ocupa del comportamiento social y la expresión de emociones, modulando la respuesta somática y visceral ante distintas situaciones. El hipocampo está implicado en la memoria a largo plazo y el procesamiento espacial. El aprendizaje es el proceso durante el que se desarrolla la memoria (52). La memoria es la función cerebral encargada de clasificar, codificar, almacenar y recuperar la información (53–56). Puede clasificarse en memoria a corto plazo, que retiene la información para su uso en los siguientes segundos o minutos, y a largo plazo, capaz de retener más información durante periodos prolongados de tiempo. A su vez, la memoria a largo plazo incluye la memoria episódica, que codifica la información espacio-temporal relacionada con determinadas experiencias (57). Se ha demostrado que las neuronas del hipocampo conforman un mapa espacial del entorno del individuo y su posición relativa en él (58–63).
- **Diencefalo:** está formado por el tálamo y el hipotálamo. El tálamo determina si la información recibida desde los órganos de los sentidos alcanza el “umbral consciente” para alcanzar la corteza, y participa en la integración de la información motora proveniente del cerebelo y los ganglios basales, transmitiéndola a la corteza. El hipotálamo integra la respuesta autónoma y la función endocrina con el comportamiento; está implicado, entre otros, en la homeostasis y la regulación hormonal, así como con los circuitos de recompensa y motivación.
- **Mesencéfalo:** integra las funciones de diferentes componentes del sistema motor voluntario, como el cerebelo, los ganglios basales y la corteza motora.
- **Metencéfalo:** formado por el puente o protuberancia y el cerebelo. Es un centro relé para información transferida entre encéfalo y cerebelo, posee motoneuronas implicadas en la masticación, movimientos oculares y faciales entre otros, coordina el control respiratorio junto con bulbo. El cerebelo recibe información somato-sensorial de la médula espinal, información motora de la corteza cerebral e información sobre equilibrio del oído interno. Mantiene la postura y coordina los movimientos de la cabeza y los ojos, además de las habilidades motoras finas. Así mismo, está involucrado en lenguaje y otras funciones cognitivas.
- **Mielencéfalo:** formado por el bulbo raquídeo. Regula funciones involuntarias como el mantenimiento de la tensión arterial y la respiración. Incluye núcleos de recambio de las vías del gusto, el oído, el equilibrio, y el control de los músculos de la cara y el cuello.
- **Médula espinal:** se localiza dentro del canal espinal formado por las vértebras. Recibe informa-

ción sensorial del tronco y las extremidades, y contiene las neuronas motoras responsables de los movimientos voluntarios y reflejos. A lo largo de su trayecto se disponen haces de fibras mielinizadas que conducen la información sensorial y motora de forma ascendente y descendente respectivamente.

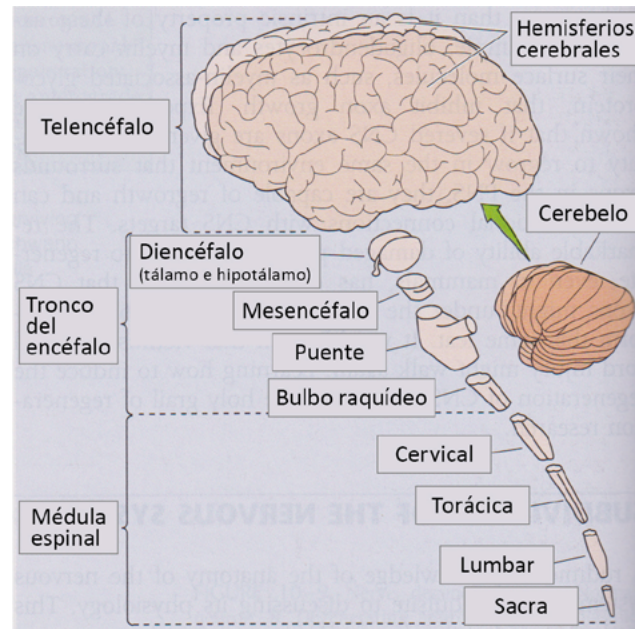


Figura 5. Organización anatómica del sistema nervioso central (SNC) humano. El encéfalo está contenido en el cráneo y agrupa el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo. Dentro del SNC también se incluye la médula espinal, situada en el canal espinal formado por las vértebras. Figura modificada de Ransom BR (50).

2. HIPONATREMIA

2.1. Definición y relevancia clínica

La hiponatremia se define como una concentración de sodio sérico inferior a 135 mEq/L. La gran mayoría de las hiponatremias son hipoosmolares, es decir, aparecen asociadas a osmolalidades plasmáticas menores de 275 mOsm/kg, y se producen como consecuencia de una alteración en el balance de agua (retención hídrica), y no por un déficit de sodio *per se*. Se pueden clasificar atendiendo a su mecanismo patogénico, aunque en ocasiones pueden coexistir varias etiologías (Fig 6).

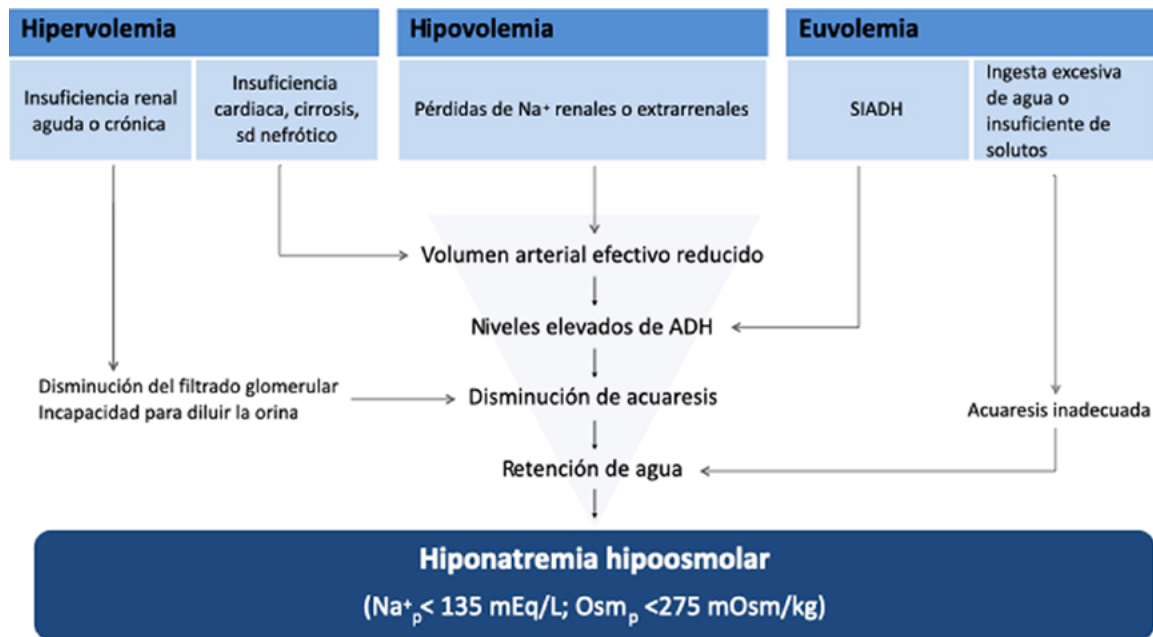


Figura 6. Patogenia de la hiponatremia hipoosmolar. En la mayoría de los casos se debe a una disminución en la eliminación de agua libre, secundaria a un exceso de hormona antidiurética (ADH) (sea por descenso de la volemia efectiva o por secreción inadecuada) o a una insuficiencia renal. En raras ocasiones se produce por un exceso en la ingesta de agua, si esta supera la capacidad renal máxima de dilución de la orina. Na⁺: catión sodio. SIADH: síndrome de secreción inadecuada de ADH. Osm_p: osmolalidad plasmática. Figura modificada de Adrogué et al (64).

La hiponatremia es el trastorno hidroelectrolítico más frecuentemente encontrado en la práctica clínica habitual, afectando hasta al 5% de los adultos en la población general. La prevalencia aumenta con la edad, alcanzando el 20% entre los mayores de 65 años. Entre los pacientes ingresados, del 20 al 40% desarrollan esta condición, que ya está presente al ingreso en el 15-20% de los casos. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con ciertas enfermedades, como insuficiencia cardíaca, cáncer o cirrosis, también presentan hiponatremia. La mayoría de los casos son leves, con natremias entre 130 y 135 mEq/L, menos del 5% de los casos presentan natremias inferiores a 130 mEq/L, y menos del 0.5% son graves (Na⁺_p < 120 mEq/L) (65–67).

La hiponatremia, incluso en formas leves, se asocia con peor pronóstico y mayor mortalidad global que la normonatremia, estando aumentado el riesgo de muerte en 2.6 veces. La mortalidad aumenta en un 2.3% por cada 1 mEq/L que desciende la natremia (68-71). Un meta-análisis reciente asocia la presencia de hiponatremia con una mayor estancia media hospitalaria (+3.2 días), con un aumento del 32% en el riesgo de reingreso tras el alta hospitalaria, y con un aumento de los gastos sanitarios asociados a ella, comparado con pacientes sin hiponatremia (72,73). No está claro si el peor pronóstico asociado a la hiponatremia se debe a la hiponatremia en sí misma, o si ésta es sólo un marcador de la gravedad del proceso etiológico subyacente, pero sí se ha demostrado que su corrección mejora la supervivencia (74-77).

Las manifestaciones clínicas van a depender no sólo de la magnitud del descenso en la concentración sérica de sodio, sino también de la rapidez de su instauración, siendo más probable la aparición de síntomas graves en la hiponatremia aguda (Fig 7). Se ha demostrado que la hiponatremia crónica leve se asocia con déficits de atención, inestabilidad de la marcha y déficits motores, aumento de los tiempos de latencia en la resolución de tareas y aumento en la tasa de error, y aumento del riesgo de fracturas (78–80). Las manifestaciones moderadas-graves incluyen somnolencia, convulsiones, compromiso cardiorrespiratorio, e incluso pueden poner en riesgo la vida si se produce herniación del tronco del encéfalo o parada respiratoria (64,70,81).



Figura 7. Manifestaciones clínicas de la hiponatremia. La gravedad de los síntomas depende de la rapidez de la instauración y la magnitud del descenso en la concentración de sodio sérico.

Las mujeres menstruantes tienen un mayor riesgo de presentar síntomas graves al desarrollar hiponatremia aguda (67–69). Algunos de los mecanismos que parecen implicados en esta mayor susceptibilidad de las mujeres a la hiponatremia incluyen el efecto inhibitor de los estrógenos en la Na^+/K^+ -ATPasa astrocitaria y la expresión de AQP4, lo que dificulta la regulación del volumen celular (85,86). Así mismo, los niveles de interleucina-6 (IL-6) son mayores en mujeres, y parecen mediar la expresión de ADH y AQP2, favoreciendo la retención hídrica (87), ya que se sabe que la IL-6 puede estimular directamente la liberación de ADH (88).

2.2. Edema cerebral secundario a hipoosmolalidad

La BHE permite aislar el intersticio cerebral del espacio intravascular, manteniendo la homeostasis del mismo, necesaria para la adecuada actividad neuronal (89). Está formada por las células endoteliales, unidas entre sí en el SNC por *tight-junctions*, los pericitos y los podocitos astrocitarios. Las células endoteliales y los pericitos comparten membrana basal, que también contribuye a esta unidad funcional (Fig 8 A). Los podocitos contienen un gran número de transportadores y canales implicados en la homeostasis del espacio extracelular cerebral (89). En particular, la AQP4 se expresa en los podocitos y presenta una distribución perivascular. En condiciones de hiponatremia, la concentración de sodio en el plasma es inferior a la intracelular, por lo que se produce una entrada neta de agua al interior de los astrocitos a favor de gradiente osmótico a través de AQP4, con una ganancia neta de agua en el encéfalo, y sin disrupción de la BHE (Fig 8 B).

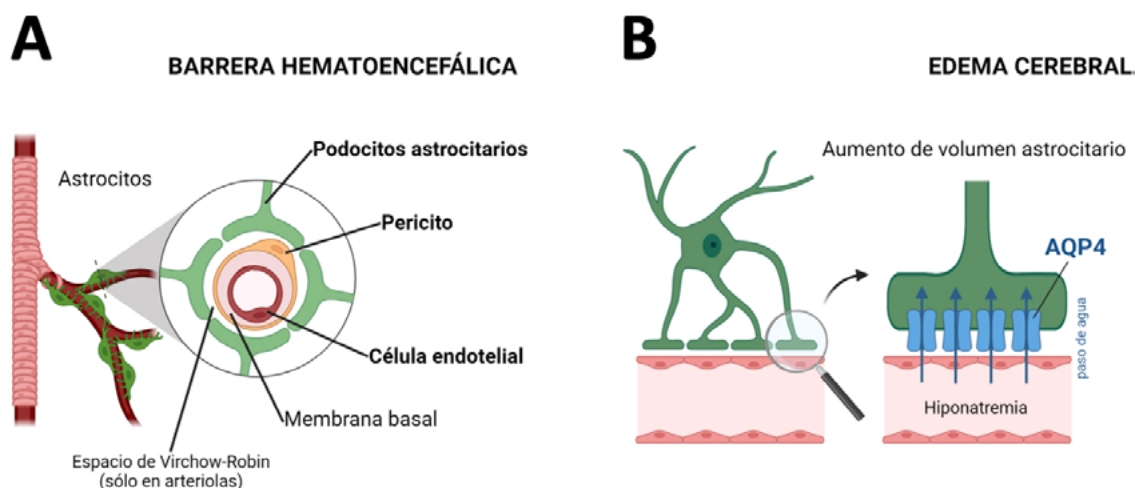


Figura 8. Barrera hematoencefálica (BHE). Panel A: componentes de la BHE. Panel B: aumento del volumen astrocitario en condiciones de hipoosmolaridad mediado por la entrada de agua a través de AQP4 en los podocitos. Figura creada con BioRender.com.

El agua puede entrar en el astrocito también por difusión simple o a través de canales iónicos (transporte secundario) (75–79). Esta situación en la que se produce un aumento volumétrico del tejido encefálico a expensas del aumento del volumen intracelular representa el edema cerebral en situaciones de hipoosmolaridad. Dicho aumento de volumen, al producirse dentro de una estructura rígida como es el cráneo, se puede acompañar de un aumento de la presión intracraneal y una reducción del flujo sanguíneo cerebral, que en los casos más graves puede conducir a la herniación del tronco encefálico y la muerte.

2.3. Adaptación cerebral a la hiponatremia

Los cambios de volumen celular afectan de forma importante a la excitabilidad y el metabolismo de las neuronas, pudiendo incluso inducir su apoptosis (95). Para defenderse de esta situación, el encéfalo pone en marcha una serie de mecanismos adaptativos, correlativos en el tiempo (Fig 9). En los primeros minutos, el exceso de agua en el espacio extracelular encefálico se trasloca al LCR a favor de gradiente hidrostático para reducir la presión intracraneal (96,97). A continuación se produce una RVD para restablecer el volumen intracelular. Los astrocitos son especialmente sensibles al estrés osmótico y se defienden del mismo extruyendo sustancias osmóticamente activas que arrastran agua al espacio extracelular, disminuyendo su volumen celular y, en consecuencia, el volumen encefálico global. En las primeras 3-24 horas se produce la salida de electrolitos (Na^+ , K^+ , Cl^-) y agua, en la llamada adaptación rápida. Pasado este tiempo, se alcanza una fase estable cuando las células han perdido el 18% de su contenido iónico (98,99). Esto logra limitar el aumento del volumen encefálico a tan sólo el 40% de lo que sería esperable para la situación de hipotonicidad. Si persiste la hiponatremia en el tiempo, se producirá una adaptación lenta con extrusión de osmolitos orgánicos, de modo que al cabo de 4 días, el volumen encefálico es tan solo el 0.6% de lo esperado para la hipotonicidad del medio (100). Se han demostrado diferencias temporales y topográficas en la regulación de la concentración intracelular de osmolitos en respuesta a los cambios de tonicidad extracelular en el encéfalo (101–103). Algunos de ellos funcionan como neurotransmisores, por lo que algunos de los síntomas de la hiponatremia crónica podrían estar justificados por su déficit intracelular.

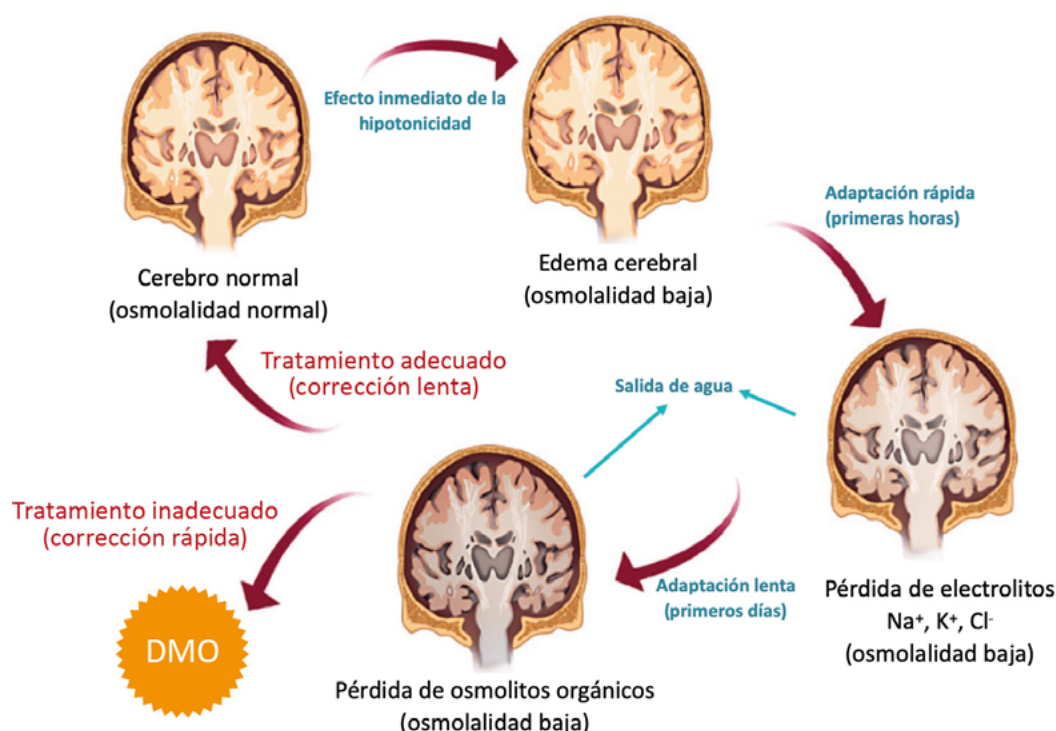


Figura 9. Adaptación cerebral a la hiponatremia. En los momentos iniciales tras el desarrollo de una hiponatremia, se producirá un edema cerebral. El volumen cerebral se restaura en las primeras horas gracias a una extrusión de electrolitos desde el interior de la célula al medio extracelular. A continuación se producirá una adaptación lenta, con extrusión de osmolitos orgánicos en los siguientes días. Aunque el encéfalo recupera prácticamente su volumen inicial, persiste un déficit intracelular de osmolitos mientras dura la situación de hipotonicidad, lo que supone un riesgo para las células en caso de corrección brusca de la hiponatremia, puesto que serán incapaces de adaptarse a la deshidratación inducida, ya que para ello deben re-sintetizar los osmolitos orgánicos, proceso que puede durar días. DMO: desmielinización osmótica. Figura modificada de Adrogué (104).

2.4. Hiponatremia aguda y crónica

Se define la hiponatremia aguda como aquella que se produce en menos de 24-48h, y como crónica aquella que dura más. Aunque esta definición es arbitraria, parece coincidir con el tiempo que tardan los astrocitos en completar la extrusión de osmolitos orgánicos, es decir, 48h. Con frecuencia no es posible determinar la duración de la hiponatremia, y en estos casos se ha de considerar la situación como crónica de cara a prevenir las potenciales complicaciones de una corrección demasiado rápida (70). La diferenciación entre hiponatremia aguda y crónica es importante, ya que los riesgos asociados a cada una de ellas son diferentes. En la hiponatremia aguda, y de forma directamente proporcional a la magnitud del descenso en la natremia, el principal peligro es el edema cerebral grave cuando se sobrepasa la velocidad de adaptación, asociado a herniación, enclavamiento del tronco del encéfalo y muerte. Por el contrario, en la hiponatremia crónica, la adaptación lenta resulta en una depleción de osmolitos orgánicos, que han de sintetizarse *de novo* durante la corrección de la misma para restaurar el volumen celular original. Si la corrección de la situación hipotónica del medio es demasiado rápida, sobrepasando la capacidad de re-acumulación de osmolitos, se producirá una deshidratación celular intensa, que en última instancia puede causar una desmielinización osmótica (DMO). Está bien establecido que el riesgo de DMO se incrementa sustancialmente cuando se superan ciertos umbrales de corrección: 4-6 mEq/L cada 2h y un máximo total de 8-10 mEq/L en las primeras 24h o 18 mEq/L en las primeras 48h (64). Sin embargo, existe evidencia de que la desmielinización se puede inducir por el desarrollo de una hipernatremia, sin necesidad de que exista una hiponatremia basal, lo que sugiere que la respuesta celular ante la deshidratación producida puede ser clave (105-109). Lien et al (102) demostraron que la infusión de una solución hipertónica para la corrección de hiponatremia crónica en un modelo murino provocaba un

aumento por encima de los valores normales del contenido cerebral de sodio y cloro, lo que en un primer momento obligaba a la salida de agua intracelular, seguida por una re-captación activa de Na^+ , K^+ , Cl^- y aminoácidos por parte de las células. Este aumento de la fuerza iónica citoplásmica altera el plegamiento proteico y la actividad enzimática, y afecta a la capacidad de los astrocitos de estabilizar las sinapsis (3,95,110,111). Para corregir esta situación, se activa la ATPasa de sodio/potasio, se activa la recaptación de aminoácidos y se inicia la síntesis de osmolitos, con el fin último de restaurar el volumen celular (95). El daño inicial de la corrección rápida de una hiponatremia crónica se produce precozmente (a las 6h de la corrección) a nivel de los astrocitos. Esto se traduce en un desacoplamiento de las gap-junctions con los oligodendrocitos y la disfunción del sincitio glial (112). A las 12 horas de la corrección rápida se produce la muerte de los astrocitos seguido de disrupción de la BHE a las 48 horas, y a partir de las 48-72 horas desmielinización y activación de la microglía (113-115). La desmielinización clásicamente se localiza a nivel del puente, pero también puede ser extrapontina (ganglios basales, corteza, cuerpo geniculado lateral, cápsula interna), siempre en áreas donde se imbrican SG y SB, y donde la síntesis de osmolitos es más lenta (103,116,117). Los síntomas aparecen entre 1 y 7 días tras la corrección rápida de una hiponatremia crónica y abarcan desde disartria, disfagia, hiperreflexia, parálisis pseudobulbar y parkinsonismo, hasta síndrome del cautiverio, cuadriparesia y muerte. Los síntomas en ocasiones son progresivos o irreversibles (64).

Por lo tanto, el tratamiento de la hiponatremia, tanto aguda como crónica, con síntomas graves (vómitos, confusión, disminución del nivel de conciencia, convulsiones, compromiso cardio-respiratorio), debe ser cuidadoso, tanto para evitar las consecuencias negativas del edema cerebral grave que está condicionando los síntomas como para prevenir la aparición de DMO. Las guías de práctica clínica recomiendan la administración de suero salino hipertónico hasta la mejoría sintomática (64). Existen dos posibles estrategias para su administración, en bolos repetidos cada 10-20 minutos de 100-150ml de suero salino al 3% (corrección rápida intermitente) o en infusión continua a una velocidad de 0.5-2ml/kg/h (corrección lenta continua), si bien ambas requieren monitorización estrecha de la natremia y la evolución sintomática para prevenir la DMO derivada de una corrección demasiado rápida de la hiponatremia (64). Tres estudios han comparado ambas estrategias en humanos, concluyendo que la corrección con bolos corrige más rápidamente la natremia, pero se asocia con una mayor tasa de sobrecorrección y necesidad de administración de soluciones hipotónicas para prevenir DMO en caso de sobrecorrección (118-120).

3. MODELOS ANIMALES DE HIPONATREMIA

Aunque el conocimiento de las manifestaciones clínicas, la epidemiología y el pronóstico de la hiponatremia en humanos es amplio, es necesario continuar profundizando en los mecanismos fisiopatológicos implicados en la adaptación cerebral y la respuesta a diferentes maniobras nosológicas o terapéuticas, para lo que se requiere del uso de modelos animales, que permiten estudiar el tejido cerebral *ex-vivo* y correlacionar dichos hallazgos con los ofrecidos por pruebas dinámicas *in-vivo*.

La intoxicación acuosa permite modelizar fácilmente la hiponatremia aguda. Se ha empleado la administración de soluciones hipotónicas, principalmente agua destilada o suero glucosado, por vía intraperitoneal en volúmenes equivalentes al 10-40% del peso corporal de los animales a lo largo de periodos variables de tiempo (en bolo o a lo largo de varias horas), y asociado o no la administración de una dosis puntual de acetato de desmopresina (ddAVP), un análogo estructural de la ADH que favorece la retención hídrica a nivel renal. Este modelo es el más ampliamente utilizado para roedores (68,75,77,78,82,83,96–106). Se ha desarrollado así mismo un modelo de administración intravenosa de grandes volúmenes de soluciones glucosadas en infusión continua a lo largo de varias horas, de nuevo asociadas o no a la administración de ddAVP, en animales de mayor tamaño (cerdos) (107–109). Gracias a estos modelos conocemos el proceso de adaptación cerebral a la hiponatremia aguda y cómo se produce una pérdida de iones intracelulares como respuesta inicial al aumento de volumen inducido por la hipoosmolalidad.

El desarrollo de modelos animales para el estudio de la hiponatremia crónica ha sido más complejo. Los primeros modelos murinos de hiponatremia crónica mantenían a los animales en ayunas, y asociaban inyecciones diarias de un derivado artificial de la ADH, el tanato de pitresina, que ya no está comercializado, cuyas acciones son análogas a las de la ADH y por tanto induce una retención hídrica a nivel renal (135). Poco tiempo después, se extendió el empleo de la restricción hídrica en roedores combinada con la infusión continua de ddAVP mediante bombas subcutáneas, como un modelo animal para el estudio de una hiponatremia moderada-grave mantenida en el tiempo; este modelo fue propuesto por primera vez por Verbalis *et al* (136,137). Sin embargo, es poco frecuente en la clínica humana encontrar situaciones mantenidas con hiponatremias tan graves como las reproducidas con estos modelos.

Como se acaba de exponer, la hiponatremia se ha dividido clásicamente en aguda y crónica. Sin embargo, no se ha estudiado hasta la fecha si el hecho de presentar una hiponatremia intermitente, pero recurrente en el tiempo, es relevante. Existen situaciones en la clínica humana donde esta situación podría ocurrir y pasar desapercibida, como por ejemplo en la cirrosis o en la insuficiencia cardíaca, donde los pacientes, por su enfermedad, presentan sobreexpresión de ADH y reciben con frecuencia tratamiento diurético, lo que hace que su natremia basal esté en el límite bajo de la normalidad (138,139). En esta situación, cualquier exceso en la ingesta hídrica, por ejemplo, podría inducir una hiponatremia de horas de duración que se recuperase antes de la siguiente determinación analítica. La trascendencia clínica de este teórico fenómeno no ha sido estudiada. Por ello quisimos profundizar en este trabajo en los cambios que dicha situación podría inducir a nivel de cambios comportamentales, del balance hidrosalino, la distribución del agua cerebral y la activación glial. Para ello, hemos recurrido a estudios del aprendizaje y la memoria, estudios analíticos de sangre y orina, y estudios de imagen con resonancia magnética (RM) para valorar la distribución encefálica del agua por regiones. Puesto que los estudios de imagen no pueden dilucidar los tipos celulares implicados en los cambios observados, hemos recurrido a estudios de microscopía óptica con técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para valorar los posibles cambios en astrocitos y oligodendrocitos, células particularmente relevantes tanto en la adaptación a la hipoosmolalidad como en las fases precoces de la DMO. Las lesiones en las que se ha descrito astrogliosis son múltiples, pero no hemos encontrado estudios específicos en hiponatremia (140). Los síntomas neurológicos presentados por los pacientes son compatibles con alteraciones en zonas del SNC como la corteza

motora, los ganglios basales, el hipocampo y distintas zonas de la SB, y por eso éstas fueron las áreas en las que decidimos centrar los estudios de comportamiento, de imagen y morfológicos del SNC. Algunos estudios han demostrado diferencias regionales en el comportamiento del cerebro ante un estrés hipotónico agudo (132,134), pero ninguno ha realizado una valoración tan exhaustiva por regiones como la planteada en este trabajo. Existen pocos estudios que ofrezcan una visión global e integradora de lo que ocurre en diferentes situaciones de hipotonicidad, y ese ha sido uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La inducción de una hiponatremia intermitente recurrente leve es suficiente para inducir una retención hídrica capaz de provocar cambios objetivables en el comportamiento y en el SNC.

OBJETIVOS

Principal:

Explorar los efectos de una administración intermitente de ddAVP, asociada o no a una administración concomitante de agua, sobre el comportamiento, el medio interno y el SNC.

Secundarios:

Validar el laberinto de Morris como herramienta para el estudio del aprendizaje y la memoria en condiciones de hipotonicidad.

Estudiar el efecto de distintas dietas, con distinto contenido en sodio, sobre el balance hidrosalino.

Estudiar el efecto de la administración intermitente de ddAVP asociado a una dosis diaria de agua intraperitoneal sobre el balance hidrosalino.

Estudiar la distribución de agua en diferentes regiones cerebrales y en el encéfalo completo mediante técnicas de imagen (RM) en diferentes condiciones de anisotonicidad.

Estudiar la posible afectación de los astrocitos y oligodendrocitos mediante técnicas de inmunohistoquímica en diferentes condiciones de anisotonicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS EXPERIMENTALES

Todos los animales empleados se compraron a Charles River Laboratorios (Les Oncins, Francia), y tras su recepción se estabularon en el animalario del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), en jaulas de policarbonato ventiladas con 12/12 horas de luz/oscuridad (luz blanca encendida a las 8:00 am), a 24°C y con 5-6 renovaciones de aire por hora. Los procedimientos fueron llevados a cabo en las instalaciones de dicha institución y contaron con la supervisión directa del veterinario responsable. Dichos procedimientos se adaptaron a la legislación vigente en España a través de los RD 53/2013, de 23 de febrero y RD 118/2021 sobre manejo de animales en experimentación animal.

Los protocolos llevados a cabo fueron evaluados por el Comité de Ética del IISGM en el manejo de animales de experimentación. Se solicitó y obtuvo de la Comunidad de Madrid la autorización para la realización de los estudios (PROEX 059/15 y 129.2/21).

Las dosis de fármacos se calcularon por unidad de peso extrapolándose de las dosis usadas en clínica humana. El tamaño muestral se adaptó a las necesidades del diseño de los estudios, que fueron de prueba de concepto, tras revisión de la literatura.

1.1. Moduladores del balance hidrosalino

Para estudiar las modificaciones en el balance hidrosalino en diferentes situaciones se emplearon las siguientes sustancias:

- **Acetato de desmopresina (ddAVP)** (Minurin®, Ferring, Madrid, España), a dosis de 0.4 µg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) una vez al día. La desmopresina es un análogo estructural de la hormona natural arginina-vasopresina o ADH. Se han realizado dos cambios químicos en la hormona natural, una desaminación de la 1-cisteína y una sustitución de la 8-L-arginina por la 8-D-arginina (Fig 10). Esto produce una prolongación considerable en la duración de su acción y una ausencia de la actividad presora a dosis terapéuticas. La duración de la actividad antidiurética es de entre 8 y 12 horas (141).

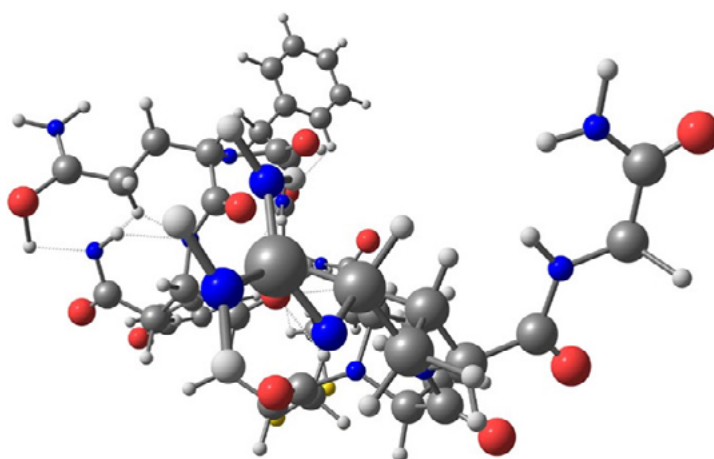


Figura 10. Estructura química de la desmopresina. Tomada de iStock by Getty Images (<https://www.istockphoto.com/es/about-us>).

- **Sobrecarga de agua (B. Braun Medical SA, Barcelona, España).** Se administró de forma diaria a una dosis equivalente al 2.5% del peso corporal del animal por vía i.p. o a una dosis equivalente al 10% del peso corporal i.p. en bolo único, dependiendo del experimento.

- **Solución salina hipertónica (NaCl3%).** Para prepararla, se añadieron 1.2 ml de solución salina hipertónica al 20% (B. Braun Medical SA) a 10 ml de suero salino fisiológico al 0.9% (B. Braun Medical SA). Se administraron 2ml por cada 100g de peso corporal por vía i.p. en bolo (142).

1.2. Dietas

Todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua de bebida y a las diferentes dietas empleadas, según el modelo experimental:

- **Dieta pellet:** EU Rodent Pellet Diet 14% 5LF2 (LabDiet, Richmond, USA). La composición de esta dieta está disponible en la figura 11.

[illegible]

Figura 11. Composición de dieta pellet EU Rodent Pellet Diet 14% 5LF2 LabDiet.

- **Dieta hiposódica:** RodentLiquidDiet F 1268SP (BioServ, New Jersey, USA). La composición de esta dieta está disponible en la figura 12. Fue necesario gelificar la dieta para asegurar la ingestión de la misma por parte de los animales de experimentación. Se realizaron múltiples pruebas de palatabilidad de la dieta hiposódica a diferentes concentraciones, obteniéndose los mejores resultados con una dilución en agua de 4 veces con respecto a las recomendaciones del fabricante.



Nutritional Profile

Product# F1268 - Rodent Liquid Diet, AIN-76, Control, 4 Liters/Bag

Proximate Profile

Protein	%	17.5
Fat	%	5.4
Fiber	%	4.8
Ash	%	2.8
Moisture	%	<10
Carbohydrate	%	67.7

Caloric Profile

Protein	kcal/Liter	180
Fat	kcal/Liter	125
Carbohydrate	kcal/Liter	695
Total	kcal/Liter	1000

Amino Acids

Alanine	gm/Liter	1.1
Arginine	gm/Liter	1.5
Aspartic Acid	gm/Liter	2.7
Cystine	gm/Liter	0.1
Glutamic Acid	gm/Liter	8.5
Glycine	gm/Liter	1.0
Histidine	gm/Liter	1.2
Isoleucine	gm/Liter	2.3
Leucine	gm/Liter	3.5
Lysine	gm/Liter	3.1
Methionine	gm/Liter	1.8
Phenylalanine	gm/Liter	1.9
Proline	gm/Liter	4.3
Serine	gm/Liter	2.4
Threonine	gm/Liter	1.8
Tryptophan	gm/Liter	0.5
Tyrosine	gm/Liter	2.4
Valine	gm/Liter	2.7

Carbohydrates

Monosaccharides	gm/Liter	29.0
Disaccharides	gm/Liter	25.0
Polysaccharides	gm/Liter	102

Fatty Acids

C18:2 Linoleic	gm/Liter	7.2
C18:3 Linolenic	gm/Liter	0.2
Total Saturated	gm/Liter	1.7
Total Monounsaturated	gm/Liter	3.7
Total Polyunsaturated	gm/Liter	7.4

Minerals

Calcium	gm/Liter	1.3
Chloride	gm/Liter	0.40
Copper	mg/Liter	1.5
Chromium	mg/Liter	0.50
Fluoride	mg/Liter	0.25
Iodine	mg/Liter	0.05
Iron	mg/Liter	9.2
Magnesium	gm/Liter	0.13
Manganese	mg/Liter	14.7
Phosphorus	gm/Liter	1.3
Potassium	gm/Liter	0.91
Selenium	mg/Liter	0.05
Sodium	mg/Liter	389
Sulfur	mg/Liter	84.8
Zinc	mg/Liter	9.2

Vitamins

Ascorbic Acid	mg/Liter	0.0
Biotin	mg/Liter	0.05
Choline	mg/Liter	206
Folic Acid	mg/Liter	0.50
Niacin	mg/Liter	7.5
Pantothenic Acid	mg/Liter	3.7
Pyridoxine	mg/Liter	1.4
Riboflavin	mg/Liter	1.5
Thiamin	mg/Liter	1.5
Vitamin A	IU/Liter	6034
Vitamin B ₁₂	mcg/Liter	30
Vitamin D ₃	IU/Liter	400
Vitamin E	IU/Liter	32.9
Vitamin K ₃ (Menadione)	mg/Liter	0.13

Ingredients

Corn Syrup Solids, Casein, Maltodextrin, Corn Oil, Cellulose, Mineral Mix, Suspending Aid, Vitamin Mix, DL-Methionine, Choline Bitartrate

These are typical amounts of nutrients calculated from available information. Actual assay results may vary. For more information contact Jaime Lecker, Ph.D. Phone: 800-996-9908 ext. 112 (U.S. and Canada) 908-996-2155 (International) Email: jlecker@bio-serv.com.

Revised Date: 1/11

ISO 9001:2008 Certified
One 8th Street, Suite 1, Frenchtown, NJ 08828 • Toll-Free: 800-996-9908 (U.S. & Canada)
Phone: 908-996-2155 • Fax: 908-996-4123 • Web: www.bio-serv.com

Copyright© 2011 Bio-Serv
All Rights Reserved

Figura 12. Composición de dieta hiposódica RodentLiquidDiet F 1268SP BioServ.

Para su elaboración, se añadió a cada litro de agua en ebullición 20 g de gelatina sabor neutro (Gelatina Royal, Madrid, España), 60g de dieta liofilizada y 1 g de colorante blanco a base de dióxido de titanio (E171, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Se añadió colorante blanco como control de la ingesta, ya que tiñe las heces de los animales. La mezcla se removió hasta la completa disolución de los

componentes y se dejó reposar a 4°C durante 24h en recipientes metálicos de 150-180 ml cada uno previo a su uso (Fig 13).



Figura 13. Gelificación de dieta líquida hiposódica según el protocolo experimental.

1.3. Modelos en ratón

Se utilizaron ratones BALBc machos con un peso medio al inicio de los experimentos de 24.08 ± 3.42 g para realizar estudios de comportamiento. Todos los ratones recibieron una dieta pellet y se establecieron por parejas. En total se utilizaron 18 animales, que fueron distribuidos aleatoriamente para la realización de los siguientes experimentos:

1.3.1. Estudio piloto del efecto de ddAVP sobre el comportamiento

- **Grupo control:** animales que no recibieron ningún tipo de intervención (n=3).
- **Grupo ddAVP:** animales que recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP durante 5 días (n=3).
- **Grupo ddAVP/agua:** animales que recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP junto con una dosis i.p. diaria de agua equivalente al 2.5% de su peso corporal durante 5 días (n=3) (Fig 14 A).

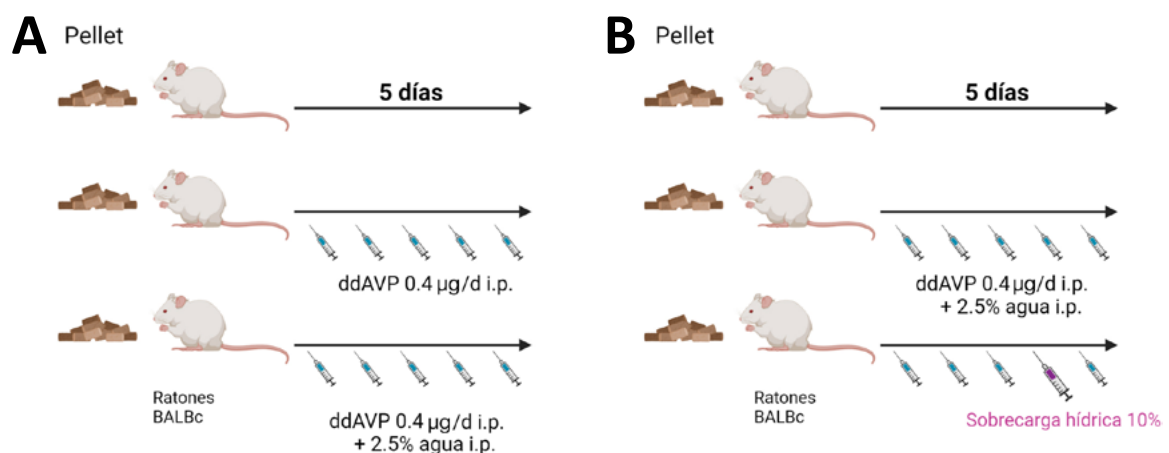


Figura 14. Estudios del efecto de ddAVP sobre el comportamiento. Panel A: Grupos experimentales empleados en el estudio piloto del efecto de ddAVP sobre el comportamiento (n=3 por grupo). Panel B: Grupos experimentales empleados en el estudio final del efecto de ddAVP sobre el comportamiento (n=3 por grupo). Figura creada con Bio-Render.com.

1.3.2. Estudio final del efecto de ddAVP sobre el comportamiento

- **Grupo control:** animales que no recibieron ningún tipo de intervención (n=3).
- **Grupo ddAVP/agua:** animales que recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP junto con una dosis i.p. diaria de agua equivalente al 2.5% de su peso corporal durante 5 días (n=3).
- **Grupo ddAVP/agua + sobrecarga 10%:** animales que recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP junto con una dosis i.p. diaria de agua equivalente al 2.5% de su peso corporal durante 5 días. El cuarto día del experimento, este grupo recibió una sobrecarga de agua i.p. equivalente al 10% de su peso corporal junto con la dosis de ddAVP, en lugar del 2.5% habitual (n=3) (Fig 14 B).

Los animales se sacrificaron el día 5, inmediatamente después de finalizar los estudios de comportamiento programados para ese día (ver apartado **2.1 Sacrificio de los animales**).

1.4. Modelos en rata

Se utilizaron ratas Wistar hembra con un peso medio al inicio de los experimentos de 182.01 ± 34.51 g para realizar estudios de balance hidrosalino, edema cerebral y cambios en el sistema nervioso central (astrocitos y oligodendrocitos). Las ratas se estabularon en jaulas individuales.

1.4.1. Modelo de hiponatremia aguda

Se utilizaron 4 ratas alimentadas durante dos semanas con una dieta pellet, que recibieron en el día 15 una sobrecarga única de agua i.p. equivalente al 10% del peso del animal. Previamente a la administración de la sobrecarga hídrica se tomó una muestra de sangre retro-orbital bajo sedación profunda con ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L., grupo Pfizer, Madrid, España) y xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A., grupo Alivira, Barcelona, España), y 2h después se tomó una segunda muestra de sangre inmediatamente antes del sacrificio (ver apartado **2.1. Sacrificio de los animales**), momento en el que se recogió también una muestra de orina por punción vesical y se extrajeron los encéfalos (Fig 15).

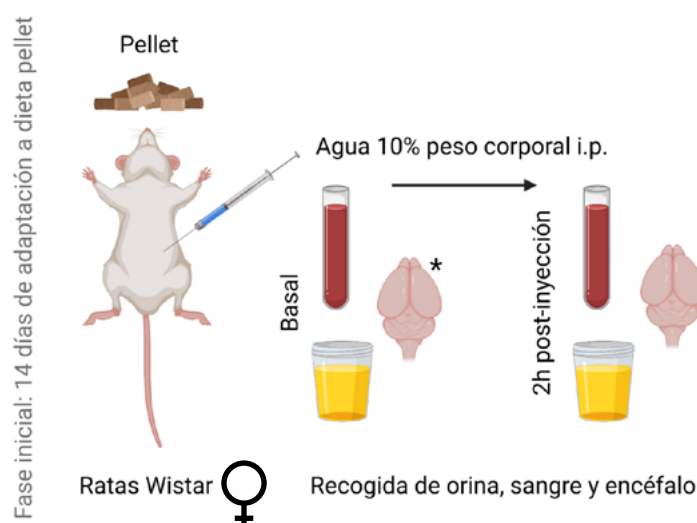


Figura 15. Diseño experimental del modelo de hiponatremia aguda (n=4). *Los encéfalos usados como comparador de la situación previa a la sobrecarga hídrica del 10% provienen de los animales alimentados con pellet (grupo dieta pellet, apartado **1.4.4. Modelo del efecto precoz de suero salino hipertónico**). Figura creada con BioRender.com.

1.4.2. Modelo de hiponatremia intermitente recurrente

Se utilizaron 8 ratas que se distribuyeron de forma aleatoria en los siguientes grupos experimentales:

- **Dieta pellet:** animales alimentados durante 15 días con una dieta pellet. Durante los últimos 7 días, recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP y agua (equivalente al 2.5% de su peso corporal) (n=4).
- **Dieta hiposódica:** animales alimentados durante 15 días con una dieta hiposódica gelificada. Durante los últimos 7 días, recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP y agua (equivalente al 2.5% de su peso corporal) (n=4).

Inicialmente se evaluaron las diferencias en el medio interno inducidas por las diferentes dietas, pareando las calorías ofrecidas limitando la cantidad de pellet administrada al grupo alimentado con dicha dieta. Tras una primera semana de adaptación, todos los animales pasaron 24h en jaula metabólica para la recogida y análisis de la orina. Tras dicho periodo, y antes de cualquier otra manipulación, se extrajo una muestra de sangre de la vena de la cola para el análisis del balance hidrosalino.

Durante los siguientes siete días, todos los animales recibieron una inyección i.p. diaria de ddAVP junto con una dosis de agua equivalente al 2.5% del peso del animal para evaluar el efecto conjunto de ambas intervenciones en función de la dieta. Se obtuvo una muestra de sangre de la vena de la cola a diario 4:30h tras la administración del tratamiento. El día en que se administró la última dosis, todos los animales pasaron de nuevo 24h en jaula metabólica para la recogida de la orina, y a la mañana siguiente se procedió bajo sedación con ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) y xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.) al sacrificio por punción cardiaca para la obtención de una muestra de sangre (Fig 16) (ver apartado 2.1 Sacrificio de los animales).

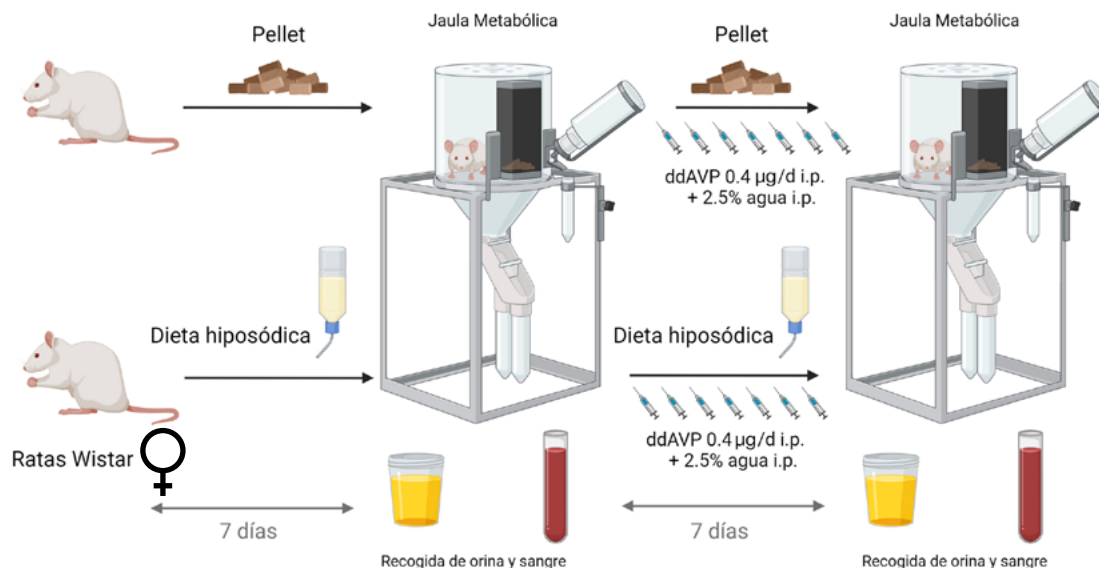


Figura 16. Diseño experimental del modelo de hiponatremia intermitente recurrente, en el que se estudió el balance hidrosalino en función de la dieta y la administración de ddAVP y agua i.p. a diario (n=4 por grupo). Figura creada con BioRender.com.

1.4.3. Agudización de hiponatremia intermitente recurrente

En esta fase del estudio se utilizaron 4 ratas que tras una semana de adaptación a la dieta hiposódica gelificada recibieron tratamiento diario por vía i.p. con ddAVP y agua (equivalente al 2.5% de su peso corporal) durante 7 días. Como en el modelo anterior, el día 15 recibieron una sobrecarga única adicional de agua equivalente al 10% del peso del animal y fueron sacrificados a las 2h de dicha intervención. Previamente a la administración de la sobrecarga hídrica se tomó una muestra de sangre

retro-orbital bajo sedación profunda con ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) y xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.) y 2h después se tomó una segunda muestra de sangre inmediatamente antes del sacrificio (ver apartado **2.1. Sacrificio de los animales**), momento en el que se recogió también una muestra de orina por punción vesical y se extrajeron los encéfalos (Fig 17) (ver apartado **2.1 Sacrificio de los animales**).

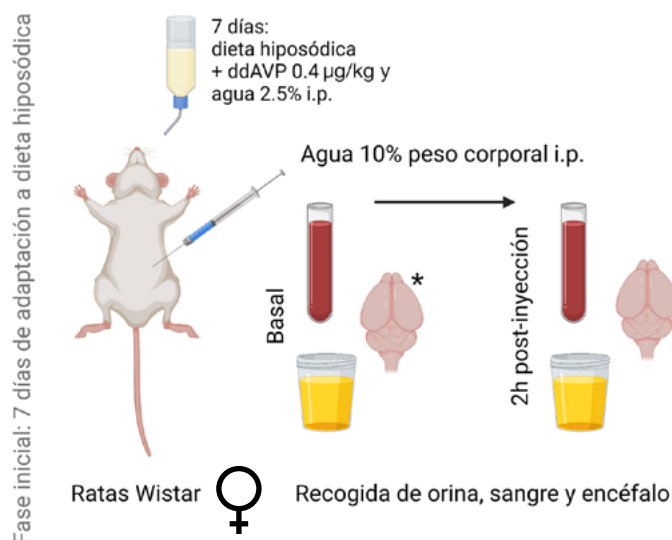


Figura 17. Modelo de agudización de hiponatremia intermitente recurrente (n=4). *Los encéfalos usados como comparador de la situación previa a la sobrecarga hídrica del 10% provienen de los animales alimentados con hiposódica + ddAVP/agua (grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua, apartado **1.4.4. Modelo del efecto precoz de suero salino hipertónico**). Figura creada con BioRender.com.

1.4.4. Modelo del efecto precoz de suero salino hipertónico

Se utilizaron en total 16 ratas, que se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos de experimentación:

- **Dieta pellet:** animales alimentados durante 15 días con dieta pellet (n=4).
- **Dieta pellet + hipertónico:** animales alimentados durante 15 días con dieta pellet; en el día 15, se administró una dosis de suero salino hipertónico (n=4).
- **Dieta hiposódica + ddAVP/agua:** tras una semana de adaptación a la dieta hiposódica gelificada, los animales recibieron inyecciones diarias i.p. de ddAVP y agua (equivalente al 2.5% de su peso corporal) durante 7 días (n=4).
- **Dieta hiposódica + ddAVP/agua + Hipertónico:** tras una semana de adaptación a la dieta hiposódica gelificada, los animales recibieron inyecciones diarias i.p. de ddAVP y agua (equivalente al 2.5% de su peso corporal) durante 7 días; en el día 15, se administró una dosis de suero salino hipertónico (n=4).

En todos los animales se extrajo el encéfalo y se obtuvo una muestra de sangre retro-orbital bajo sedación profunda en el momento del sacrificio, que se realizó en todos los animales en el mismo momento temporal, es decir, a los 45 minutos de la administración del suero salino hipertónico en los grupos correspondientes. A los 45 minutos de la administración de suero salino hipertónico, se realizó una toma de sangre retro-orbital de los animales del grupo correspondiente bajo sedación con ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) y xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.), e inmediatamente después se sacrificó a los animales (ver apartado **2.1. Sacrificio de los animales**) y se extrajeron los encéfalos (Fig 18). Los cerebros de los grupos dieta pellet y

dieta hiposódica + ddAVP/agua se usaron como comparadores basales para los experimentos de hiponatremia aguda (ver **apartado 1.4.1. Modelo de hiponatremia aguda**) y de agudización de la hiponatremia intermitente recurrente (ver apartado **1.4.3. Agudización de hiponatremia intermitente recurrente**).

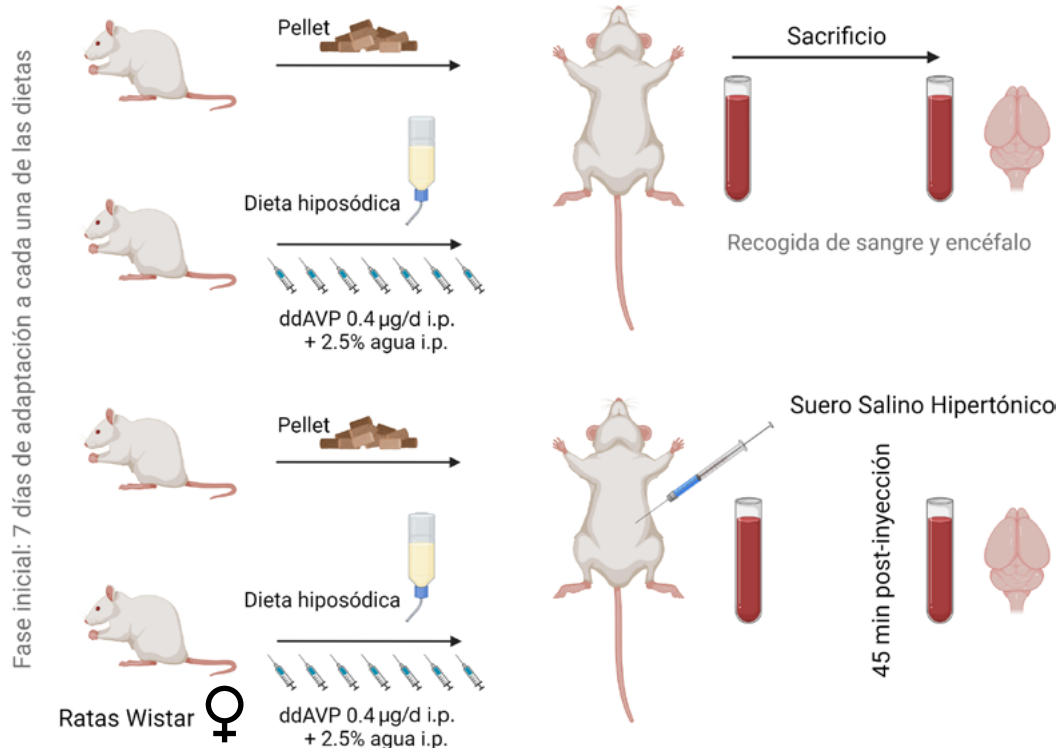


Figura 18. Diseño experimental del estudio del efecto precoz de suero salino hipertónico (n=4 por grupo). Figura creada con BioRender.com.

2. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1. Sacrificio de los animales

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical bajo sedación profunda con 100 mg/kg de ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) más 10 mg/kg de xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.).

En los modelos de rata de hiponatremia aguda, agudización de hiponatremia intermitente recurrente y efecto precoz de suero salino hipertónico, se obtuvo, bajo sedación profunda con 80 mg/kg de ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) y 10 mg/kg de xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.), una muestra de sangre retro-orbital inmediatamente antes del sacrificio, que tuvo lugar por apertura de la cavidad torácica para la perfusión y extracción de los encéfalos (ver apartado **2.2. Obtención de muestras del sistema nervioso central**). En los modelos de hiponatremia aguda y agudización de hiponatremia intermitente recurrente se obtuvo una muestra de orina por punción vesical directa en el momento del sacrificio.

En el modelo de rata de hiponatremia intermitente recurrente, el sacrificio se realizó bajo sedación profunda con Sevoflurano (Sevorane®, Abbvie, España) 300 cc/min/O₂ 2.5-3%; y exanguinación por punción directa del ventrículo izquierdo.

2.2. Obtención de muestras del sistema nervioso central

Bajo sedación profunda con 80 mg/kg de ketamina (Ketolar® 50 mg/mL, Parke-Davis S.L.) y 10 mg/kg de xilacina (Xylasol® 20 mg/mL, Laboratorios Karizoo S.A.), se procedió a la apertura de la cavidad torácica de las ratas. Se realizó una canulación del cayado aórtico a través del ápex del ventrículo izquierdo, y se clampó la aorta descendente. A través de dicho catéter (cánula Introcan Safety 24G, Brown), se perfundió el hemicuerpo superior de los animales con suero salino (NaCl 0.9%, B. Braun Medical SA) y heparina al 0.001% a 4°C durante 20 minutos con un volumen de 120-150ml, seguido de paraformaldehído al 4% (PFA, Merck) en Tampón Fosfato (*Phosphate Buffer*, PB) 0.1M y pH 7.4 a 4°C como solución fijadora (mismo volumen y tiempo que con la primera solución). Tras la perfusión, los encéfalos fueron rápidamente extraídos y preservados en una solución de PFA al 4% durante 48h a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados con PB 0.1M (pH 7.4) de 30 minutos cada uno y se procedió a la crioprotección del tejido en sacarosa al 11% en PB 0.1M a 4°C durante 24h, y seguidamente en sacarosa al 33% en PB 0.1M durante 48h más. Posteriormente, los encéfalos fueron incluidos en Tissue-Tek® (O.C.T. Optimal cutting temperatura, Sakura®, Finetek USA Inc, Torrance, CA, USA), y posteriormente conservados a -80°C hasta su utilización. Los encéfalos se cortaron en secciones coronales de 20 µm en un criostato (LEICA biosystems CM3050, Deer Park, IL, USA). Las secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados (4 secciones por portaobjeto) de forma seriada (en series de 4 portaobjetos) que fueron congelados y almacenados hasta su uso a -30°C (Fig 19).

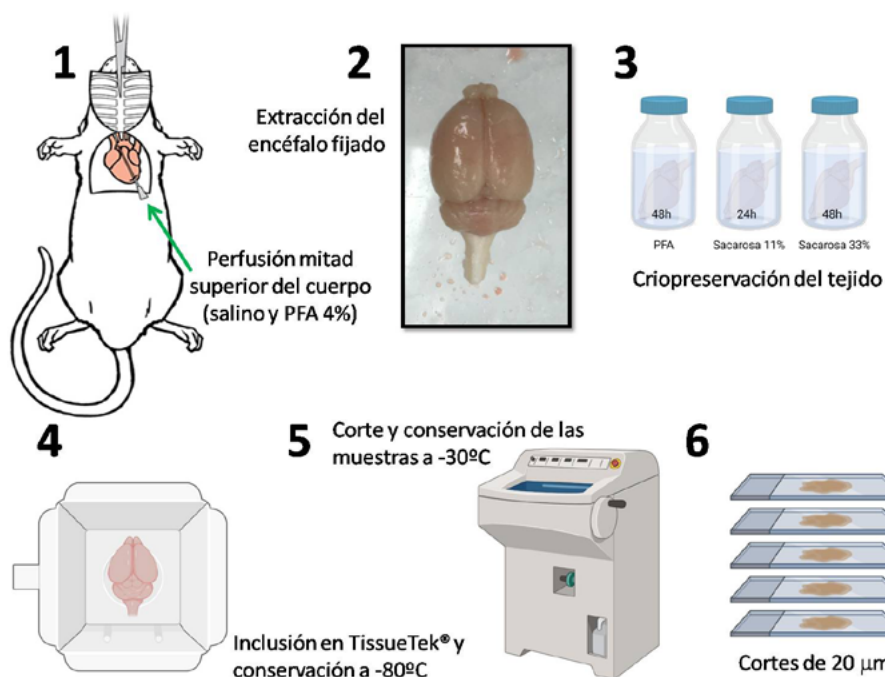


Figura 19. Obtención y preparación de las muestras de cerebro para su posterior análisis. Figura creada con BioRender.com.

3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

En los modelos experimentales en rata se midieron de forma directa en las muestras de sangre venosa y orina las concentraciones de Na^+ , K^+ , glucosa y urea, y la osmolalidad, así como el hematocrito en sangre. A partir de los valores obtenidos se calcularon una serie de parámetros mediante las fórmulas detalladas en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros calculados a partir de valores analíticos medidos.

PARÁMETRO	FÓRMULA	UNIDADES
Excreción urinaria de sodio	$\text{Vol}_o \cdot \text{Na}_o / 1000$	mEq/d
Excreción urinaria de potasio	$\text{Vol}_o \cdot \text{K}_o / 1000$	mEq/d
Aclaramiento de agua libre	$\text{Vol}_o \cdot (1 - \text{Osm}_o / \text{Osm}_p)$	mL/d
Osmolalidad urinaria calculada	$\text{Gluc}_o / 18 + \text{Urea}_o / 6 + (\text{Na}_o + \text{K}_o) \cdot 2$	mOsm/kg
Osmoles urinarios atribuibles a iones	$(\text{Na}_o + \text{K}_o) \cdot 2$	mOsm/kg
Osmoles urinarios atribuibles a urea	$\text{Urea}_o / 6$	mOsm/kg
Osmoles urinarios atribuibles a glucosa	$\text{Gluc}_o / 18$	mOsm/kg
Osmol gap urinario	$\text{Osm}_o \text{ medida} - \text{Osm}_o \text{ calculada}$	mOsm/kg

Vol_o : diuresis en 24h; Na_o : concentración urinaria de sodio; K_o : concentración urinaria de potasio; Osm_o : osmolalidad urinaria; Osm_p : osmolalidad plasmática; Gluc_o : concentración urinaria de glucosa; Urea_o : concentración urinaria de urea (143).

Los parámetros analíticos se determinaron utilizando un analizador de gases GEM premier 3000 (Werfen, Barcelona, España) y un osmómetro (Fiske one-ten osmometer, Fiske associates, Massachusetts, USA). El análisis bioquímico de la orina se realizó con un autoanalizador COBAS 711 (Roche Farma, Madrid, España) disponible en el Servicio de Bioquímica del HGUGM. En todos los casos las medidas fueron realizadas siguiendo las indicaciones de los fabricantes de los analizadores, y en su caso, del personal responsable de los mismos. La recogida de la orina en la jaula metabólica permitió medir la diuresis de 24h en determinados momentos de la experimentación.

4. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA INGESTA CALÓRICA E HÍDRICA

Se observó la evolución ponderal durante la semana de adaptación a las diferentes dietas, y posteriormente durante la semana de administración de ddAVP/agua. Se midió durante el mismo periodo de tiempo la ingesta diaria de agua y calorías, a partir de las cuales se calculó la ingesta de sodio y potasio usando como referencia la composición de las dietas (Figs 11 y 12).

5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO

Los estudios de comportamiento se llevaron a cabo en ratones (ver apartado 1.3. Modelos en ratón).

5.1. Análisis de comportamiento en condiciones no forzadas

Se procedió a la grabación diaria del comportamiento espontáneo de los animales en su jaula de estabulación, a primera hora de la mañana y antes de someter a los ratones a cualquier manipulación, durante 120 segundos a lo largo de tres días consecutivos. Se dividió la jaula en cuatro cuadrantes imaginarios y se cuantificó el número de cambios de cuadrante cuando el animal cruzaba la línea imaginaria con al menos tres patas, así mismo, se cuantificó el número de bipedestaciones por minuto (Fig 20 A).

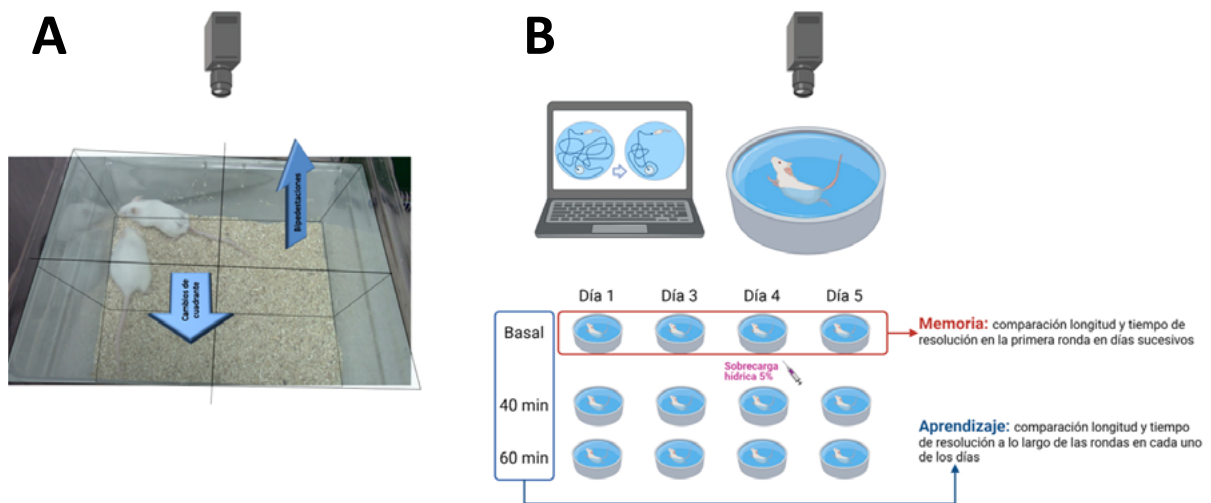


Figura 20. Tests empleados en la evaluación del comportamiento. Panel A: evaluación en condiciones no forzadas mediante filmación en las jaulas de estabulación. Panel B: evaluación condiciones controladas mediante el laberinto de agua de Morris. Figura creada con BioRender.com.

5.2. Análisis de comportamiento en situaciones controladas

Existen múltiples tipos de laberintos destinados a evaluar el comportamiento, pero el más popular para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependientes del hipocampo fue desarrollado por Morris en 1981 (57,144–146). Consiste en un tanque cilíndrico de agua opaca con una plataforma de salvamento oculta, en el que los animales nadan hasta encontrar la plataforma. El incentivo en este tipo de laberinto es aversivo (escapar del mismo), y por lo tanto independiente de otros condicionantes como el hambre o la motivación. Presenta el inconveniente de someter a los animales a estrés y riesgo de hipotermia. El protocolo básico, que se puede modificar en función de los

objetivos del estudio, consiste en la realización de 4 ensayos al día durante un número variable de días de entrenamiento, evaluándose la memoria al día siguiente de la última sesión. Las principales variables a evaluar incluyen el tiempo empleado y la longitud de la trayectoria hasta alcanzar la plataforma de salvamento, reflejando la reducción en los mismos con el entrenamiento el desarrollo de aprendizaje y memoria espacial (57). Se pueden evaluar otras como el tiempo en el cuadrante de salvamento, la longitud o el tiempo hasta entrar en cuadrante de salvamento, el número de cruces de la plataforma de salvamento o diferentes estrategias de nado. Si bien se desarrolló inicialmente para ratas, múltiples estudios han reproducido su validez también en ratones (147–149).

El laberinto de Morris utilizado en nuestros experimentos medía un metro de diámetro, 15 cm de profundidad, y contenía una plataforma de salvamento de 5x5 cm fabricada en metacrilato transparente. La posición de la piscina no se modificó a lo largo de todo el estudio, ni tampoco la posición relativa de la plataforma. El nivel del agua se mantuvo a ras de la plataforma. El agua se mantuvo blanca y opaca mediante la adición de 1g de colorante E171 (Sigma) por cada litro de agua, a una temperatura de 20°C (Fig 20 B).

Los animales eran siempre introducidos en la piscina por el mismo punto. Se les dejaba nadar libremente hasta alcanzar la plataforma de salvamento o hasta un máximo de 120 segundos, tiempo establecido como límite para la finalización de la prueba para evitar hipotermia y cansancio. Una vez finalizada la prueba, los animales eran secados y calentados hasta el ensayo siguiente.

El entrenamiento de los animales se llevó a cabo a lo largo de 5 días mediante 3 sesiones de entrenamiento los días 1, 3 y 5. Cada uno de estos días el animal se sometió a la prueba del laberinto de agua en 4 ocasiones, con intervalos de 20-40 minutos. La administración de la dosis diaria de ddAVP y agua i.p. se administró cada día al final de la última sesión de entrenamiento, y en los días en los que no había entrenamiento a primera hora de la mañana. Se calculó la media ponderada de los tiempos y longitud de las trayectorias de los 3 animales incluidos en cada grupo experimental. El aprendizaje se evaluó comparando las medias de los tiempos y trayectorias entre los grupos experimentales en los distintos intentos, realizados cada 20-40 minutos, en un mismo día. La memoria se evaluó comparando los tiempos y trayectorias entre los grupos experimentales en el primer intento de días consecutivos. En el segundo estudio (ver apartado **1.3.2. Estudio confirmatorio del efecto de ddAVP sobre el comportamiento**), se realizó una sesión de entrenamiento extraordinaria en el día 4 para evaluar el efecto de una sobrecarga de agua equivalente al 10% del peso del animal sobre la memoria y el aprendizaje. La sobrecarga hídrica se administró tras la primera prueba de la mañana, y se evaluó su efecto en la última prueba de ese día (aprendizaje) y en la primera del día siguiente (memoria).

Cada prueba fue filmada con una cámara de vídeo conectada a un transformador ACDC, conectado a su vez a un ordenador portátil. La posición de la cámara se mantuvo fija 50 cm por encima de la piscina y centrada con la misma. Los programas utilizados fueron iGrabber (versión 1.0.0 for Windows, descarga libre disponible en <https://igrabber.updatestar.com/es>) para las capturas, y Quicktime (versión 7.7.9 for Windows, descarga libre disponible en <https://quicktime.softonic.com/descargar>) para la reproducción. El tiempo de resolución de la prueba quedaba registrado en el vídeo. Para la medición de la longitud de la trayectoria recorrida se utilizó un curvímetro digital con el que se repasaba la trayectoria trazada por los animales durante la prueba, con la escala ajustada para obtener el resultado en centímetros. La escala se confirmó utilizando como referencia el diámetro del laberinto. Se evaluó el tiempo empleado por los animales hasta alcanzar la plataforma (con un máximo establecido de 120 segundos) y la longitud de la trayectoria recorrida hasta alcanzarla.

6. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN APARENTE

Los estudios de edema cerebral se llevaron a cabo en ratas en los modelos de hiponatremia aguda (ver apartado **1.4.1. Modelo de hiponatremia aguda**) y de agudización de hiponatremia intermitente recurrente (ver apartado **1.4.3. Agudización de hiponatremia intermitente recurrente**). Dichos estudios se llevaron a cabo mediante RM para lo cual se preparó a los animales como se detalla a continuación.

Se rasuró el abdomen de los animales para la colocación de un catéter peritoneal (cánula Introcan Safety 24G, Brown) y se sujetó con Tegaderm Film 3M. Los animales se mantuvieron anestesiados con sevoflurano (5% para la inducción y 2% para el mantenimiento, en oxígeno al 100%). Los animales se colocaron sobre una manta térmica de agua caliente Gaymar a 38°C. Se empleó la vía i.p. para la administración de la sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso corporal (Fig 21). Se extrajo una muestra de sangre retro-orbital pre y post evaluación para la medición de parámetros gasométricos venosos, como se comentó en el apartado **2.1 Sacrificio de los animales**. Al término del periodo de adquisición de imágenes, y aún bajo sedación profunda, se procedió al sacrificio de los animales y a la extracción del encéfalo (ver apartados **2.1. Sacrificio de los animales** y **2.2. Perfusión y extracción de los encéfalos**).

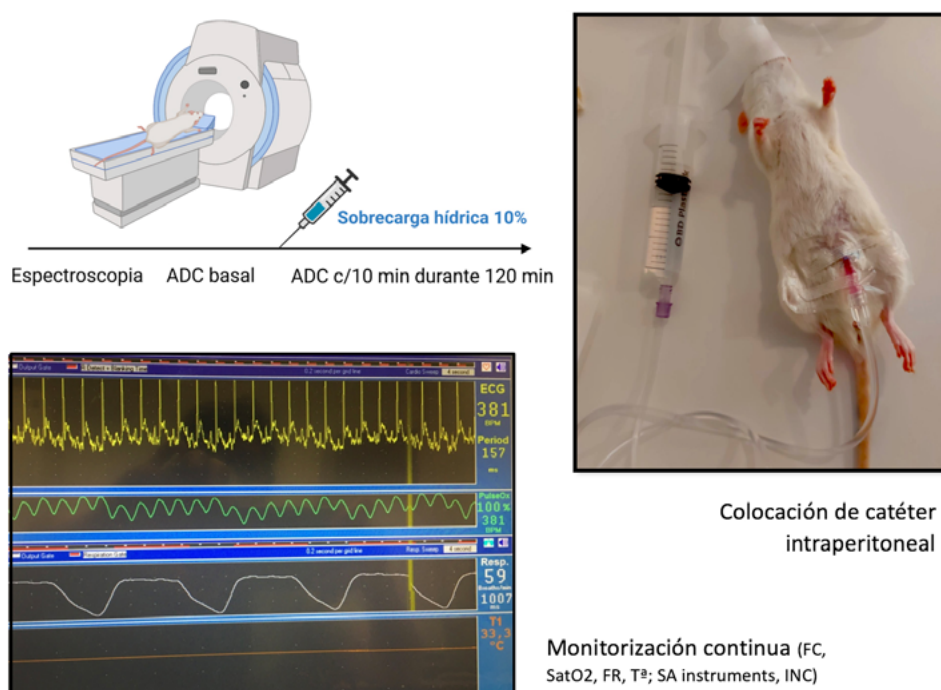


Figura 21. Preparación y monitorización de los animales para la resonancia magnética. Figura creada con BioRender.com.

Con el fin de descartar posibles efectos de la anestesia y/o la duración de la misma sobre nuestros resultados (150), se llevó a cabo un estudio piloto con dos animales sometidos al mismo esquema de sedación profunda que aquellos en los que se realizaron estudios de RM, en los que se registraron diversos parámetros fisiológicos: frecuencia cardíaca (FC), saturación de oxígeno (SatO₂), frecuencia respiratoria (FR) y temperatura (T_a) cada 10 minutos durante 120 minutos, duración de los estudios de RM. Para la monitorización se utilizó un módulo de FC, FR y pulsioximetría (S.A. instruments, INC).

6.1. Obtención de imágenes y coeficiente de difusión aparente

Existen diversos métodos de adquisición de imágenes de RM que permiten estudiar la información estructural o química de una muestra. Entre ellas, las imágenes ponderadas en difusión (*Diffusion Weighted Images*, DWI) miden el desplazamiento de las moléculas de agua en los tejidos, las cuales se mueven de forma relativamente libre y homogénea en estructuras ricas en agua. En los tejidos, como el parénquima cerebral, la movilidad de las moléculas de agua se ve restringida por la presencia de estructuras celulares, que dificultan su libre difusión. En las técnicas convencionales de RM, la difusión de las moléculas de agua en los tejidos apenas contribuye a la señal. Con la tecnología DWI, la difusión de las moléculas de agua se convierte en el mecanismo principal para generar el contraste en las imágenes. La representación cuantitativa de estos cambios en la movilidad del agua se realiza calculando el coeficiente de difusión aparente (apparent diffusion coefficient, ADC) a partir de los píxeles en cada vóxel, lo que permite crear mapas de ADC (151). Puesto que el agua presenta un coeficiente de difusión más alto en el compartimento extracelular comparado con el intracelular, y puesto que su permeabilidad transmembrana es suficiente como para asegurar un intercambio libre para tiempos mayores a 20 ms (los comúnmente usados en DWI), el valor resultante de ADC representa una media ponderada de los coeficientes de difusión extra e intracelulares (152,153). Este valor desciende cuando se produce un movimiento neto de agua desde el espacio extra al intracelular (154). El edema celular se traduce en una restricción de la difusión asociado a un descenso en el ADC (155,156).

Las imágenes de RM se obtuvieron con un escáner BioSpec 70/20 de 7 Tesla (Bruker, Ettlingen, Germany). La adquisición de imágenes se realizó usando una antena de volumen como transmisora y una antena de superficie de cerebro de rata de 4 elementos como receptora. Bajo sedación con sevofluorano como se ha indicado más arriba, se adquirieron un total de trece imágenes ponderadas en difusión (DWI), adquiridas cada 10 minutos durante 120 minutos. Tras la obtención de la imagen basal (tiempo 0), todos los animales recibieron un bolo i.p. de agua equivalente al 10% del peso del animal, con el objetivo de inducir una hiponatremia aguda (dieta pellet) o una agudización de hiponatremia intermitente recurrente (dieta hiposódica + ddAVP/agua).

Las imágenes DWI se adquirieron usando una secuencia eco planar de disparo único con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) = 1500 ms, tiempo de eco (TE) = 20.2 ms, 10 corte, grosor de la corte 1 mm, orientación axial, zona de interés (field of view, FOV) de 27 x 32 mm² y un tamaño de la matriz de 192x92 píxeles. Se usaron 5 valores b diferentes (0, 49, 308.8, 1039.8, 2026 s/mm²) en la dirección X (transversal al campo magnético) para obtener cinco imágenes diferentes las cuales se usaron para obtener los mapas de ADC.

Para la obtención de los valores de ADC, se definieron manualmente regiones de interés (ROIs) usando el software ImageJ (versión 1.52a, National Institutes of Health, NIH, USA) en 2-3 cortes axiales consecutivos, salvo en encéfalo completo, donde se utilizaron todos los cortes axiales. Las regiones elegidas fueron SG (caudado-putamen, corteza, hipocampo), hipotálamo, SB (cuerpo calloso, comisura anterior, cápsula interna) y encéfalo completo. Las subregiones incluidas en SG se analizaron también por separado. Para la localización y delimitación de las ROIs se utilizaron como referencia los cortes axiales del atlas de neuroanatomía murina Paxinos (157) (corteza Bregma -3.10 a -3.68 mm; cuerpo calloso, comisura anterior y cápsula interna Bregma -4.10 a -4.74 mm; caudado-putamen Bregma -4.60 a -6.10 mm; hipocampo Bregma -6.38 a -7.60 mm; hipotálamo Bregma -8.82 a -9.22 mm) (Fig 22).

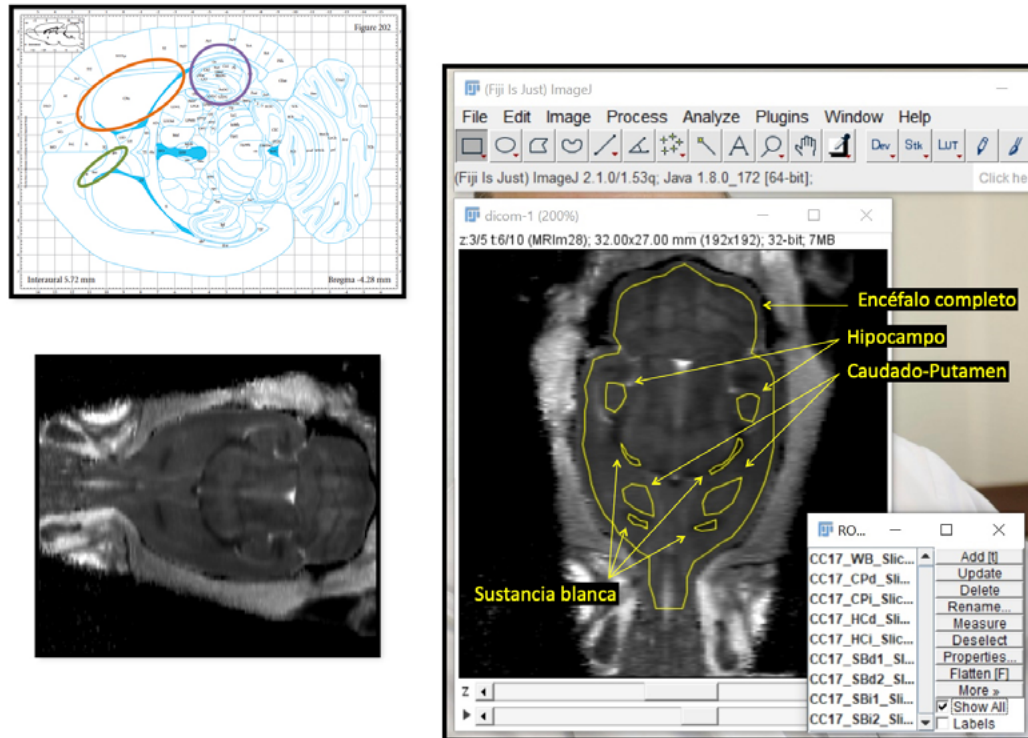


Figura 22. Ejemplo de la metodología del procesamiento y análisis de datos de las imágenes adquiridas por resonancia magnética. Cortes axiales.

6.2. Espectroscopia in vivo de osmolitos

La espectroscopia por RM obtiene un espectro que refleja la cantidad de metabolitos en la zona de interés de diferentes regiones del encéfalo (158). Los espectros de ^1H del caudado-putamen se adquirieron previamente a la inyección del bolo i.p. de agua (10% del peso corporal). Para ello se usó una secuencia PRESS en un volumen de $1.3 \times 1.5 \times 1.5 \text{ mm}^3$ con los siguientes parámetros: TE = 16.5 ms, TR = 2500 ms, 256 averages, 2048 puntos de adquisición y un ancho de banda de 3001 Hz.

Los osmolitos cuantificados fueron la glutamina/GABA, el mioinositol, la colina, el N-acetil aspartato (NAA) y la creatina. El valor absoluto se normalizó con respecto a la señal del agua.

7. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE ASTROCITOS Y OLIGODENDROCITOS

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron según el protocolo desarrollado en el laboratorio de la Dra López Gallardo (123–125) (Fig 19). Los lavados e incubaciones de los portaobjetos se realizaron en tampón de inmunohistoquímica (TI), PB 0,1M a pH 7,4 con un 0,5% de suero de albúmina bovino (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma) y 0,3% de tritón X-100 (Sigma). Se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución al 0.5% de peróxido de hidrógeno (Merk) en TI. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en TI con un 5% de BSA durante toda la noche a 4°C. Se empleó GFAP como marcador de astrocitos y MBP como marcador de oligodendrocitos (25,34) (ver apartado **1.4.1. Organización celular del sistema nervioso central**). Tras 3 lavados de 10 minutos con TI, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, 2h a temperatura ambiente (Tabla 2 para las características de los anticuerpos empleados).

Tabla 2. Anticuerpos usados en la inmunohistoquímica.

TIPO CELULAR	PROTEÍNA	AC. PRIMARIO	AC. SECUNDARIO
Astroglía	GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic-Protein</i>)	Rabbit anti-GFAP (Dako, Z0334) [1:600]	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Biotinylated (Thermo Scientific, 31820) [1:200]
Oligodendroglía	MBP (<i>Myelin Basic-Protein</i>)	Mouse anti-MBP (Santa Cruz, SC-271524) [1:200]	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Biotinylated (Vector Laboratories, BA-9200) [1:200]

Las concentraciones se expresan entre corchetes. Ac: anticuerpo.

El revelado se realizó con el complejo ABC-peroxidasa (Strept-Avidin Biotin Complex–Peroxidase, Thermo Scientific), tras una incubación de 1.5h, y 3 lavados posteriores con TI de 10 minutos cada uno. Como sistema de revelado se utilizó diaminobenzidina a una concentración de 0.5mg/dL durante 9-10 minutos (DAB, Sigma). El montaje de los portaobjetos se realizó tras deshidratar las muestras en concentraciones crecientes de alcohol, y en xilol, y se empleó Depex (Serva®) como medio de montaje. En cada prueba de inmunohistoquímica se incluyeron portaobjetos de los cuatro animales de cada grupo experimental (modelos de hiponatremia aguda, agudización de hiponatremia intermitente recurrente y efecto precoz de suero salino hipertónico) y un control negativo (sin añadir anticuerpo primario), para comprobar la especificidad de la prueba.

Las secciones se observaron en un microscopio Zeiss AxiolmagerA.12. En cada portaobjetos se seleccionó aleatoriamente un corte. Se realizó una microfotografía a 10 aumentos (10x) para cada región cerebral en estudio. Las microfotografías se obtuvieron bajo las mismas condiciones de luz y contraste mediante una cámara Zeiss Axiocam y con la utilización del software de captura Axiovision 40V4.1 (Carl Zeiss Vision GMBH).

Para la localización y delimitación de las áreas de estudio (corteza motora, cuerpo calloso, cápsula interna, hipotálamo periventricular) se utilizaron como referencia los cortes coronales del atlas de neuroanatomía murina Paxinos (157) (corteza y cuerpo calloso anterior Bregma 2.52 a 1.92 mm; hipotálamo y cuerpo calloso medio Bregma -0.96 a -1.44 mm; cápsula interna y cuerpo calloso posterior Bregma -2.64 a -3.24 mm). Las regiones incluidas se analizaron por separado y posteriormente agrupadas en SG (corteza motora, hipotálamo) y SB (cuerpo calloso, cápsula interna) (Fig 23).



Figura 23. Ejemplo de la metodología del procesamiento y extracción de datos de las imágenes del densitometrado de las microfotografías de las tinciones inmunohistoquímicas. Cortes coronales.

La cuantificación de la expresión de GFAP y MBP se realizó mediante el densitometrado óptico de las microfotografías realizadas con el programa ImageJ obteniendo un valor de densidad óptica (unidades arbitrarias) para cada una de las regiones de interés. El área de cuantificación obtenida directamente del programa ImageJ en píxeles se convirtió en μm^2 teniendo en cuenta que cada píxel corresponde $0.6573 \mu\text{m}^2$ (Tabla 3).

Tabla 3. Área total de cuantificación de densitometrado de las diferentes regiones a estudio.

REGIÓN	ÁREA DE DENSITOMETRADO (μm^2)
Cuerpo calloso central rostral	2864736
Cuerpo calloso central medio	711888
Cuerpo calloso central caudal	711888
Cuerpo calloso lateral derecho	1032238
Cuerpo calloso lateral izquierdo	1032238
Cápsula interna	1521774
Corteza motora	1448
Hipotálamo periventricular	1923

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) mientras que las variables cualitativas se expresan en frecuencias y porcentajes. Debido a las limitaciones del tamaño muestral por haber trabajado con animales, no siempre fue posible utilizar pruebas estadísticas clásicas para comprobar la normalidad de las variables numéricas. En cualquier caso, podemos asumir normalidad en las variables cuantitativas al no observar valores extremos.

Para los análisis de variables continuas frente a factores independientes, se aplicó, siempre que fue posible, un análisis de la varianza (ANOVA) factorial. A pesar del pequeño tamaño de nuestros grupos experimentales, se realizaron ANOVA dada la robustez de estos análisis. Los resultados de dichos ANOVA se presentan en las figuras correspondientes. La información proporcionada es la significación del modelo, la significación de cada factor y si fuese necesario, la significación de la interacción entre factores. Las diferencias entre niveles de los factores se ha investigado mediante test post hoc (Tukey y diferencia mínima significativa de Fisher (DMS)).

La comparación entre grupos por regiones y su evolución en el tiempo de los valores del ADC, se estudió mediante modelos lineales mixtos. Cada animal se consideró como un efecto aleatorio, mientras que el grupo, el tiempo, y la interacción grupo-tiempo, se consideró como un efecto fijo. Este tipo de modelos ofrece grandes ventajas en estudios de seguimiento con medidas repetidas o con valores faltantes respecto a otras técnicas como el ANOVA de medidas repetidas. A partir de estos modelos, se puede comparar cada grupo en cualquier momento del estudio, estudiar sus pendientes o incrementos por unidad de tiempo, y comparar si las pendientes son diferentes entre grupos (interacción).

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. Se utilizaron pruebas bilaterales y se consideraron como estadísticamente significativos aquellos resultados con una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados se presentarán siguiendo el orden de los diferentes modelos experimentales. Las gráficas y tablas combinan los resultados de diferentes modelos para facilitar la comparación visual de los resultados y evitar duplicidades, aunque la explicación en el texto seguirá el orden de los diferentes modelos como se ha indicado.

1. RESULTADOS INICIALES: ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

Se llevaron a cabo experimentos en ratones alimentados con pellet para evaluar los cambios comportamentales inducidos por la administración repetida de ddAVP, con y sin administración conjunta de agua.

En un primer estudio piloto se evaluaron los efectos de la administración de ddAVP a diario aisladamente (grupo ddAVP) o combinado con una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal (grupo ddAVP/agua). Al analizar el comportamiento de los animales en condiciones no forzadas a lo largo de los tres primeros días de administración de tratamiento, se observó que la administración de ddAVP era suficiente para reducir de forma notable la actividad exploradora cuantificada mediante el número de cambios de cuadrante y bipedestaciones. Los resultados del ANOVA muestran un efecto general del tratamiento ($p < 0,001$), un efecto general de los días de tratamiento ($p < 0,001$) así como una interacción entre el tratamiento y los días de tratamiento ($p < 0,001$), es decir, los efectos del tratamiento (ddAVP con o sin agua) sobre el comportamiento parecen ser incrementales a medida que pasan los días. A lo largo de los días los animales alimentados con dieta de pellet parecen incrementar su actividad motora espontánea (cambios de cuadrante/min), mientras que los grupos tratados con ddAVP, sólo o en combinación con el agua no muestran ningún cambio en dicha actividad motora. Los resultados para el número de bipedestaciones/minuto muestran una tendencia similar, que no alcanza la significación estadística (Fig 24).

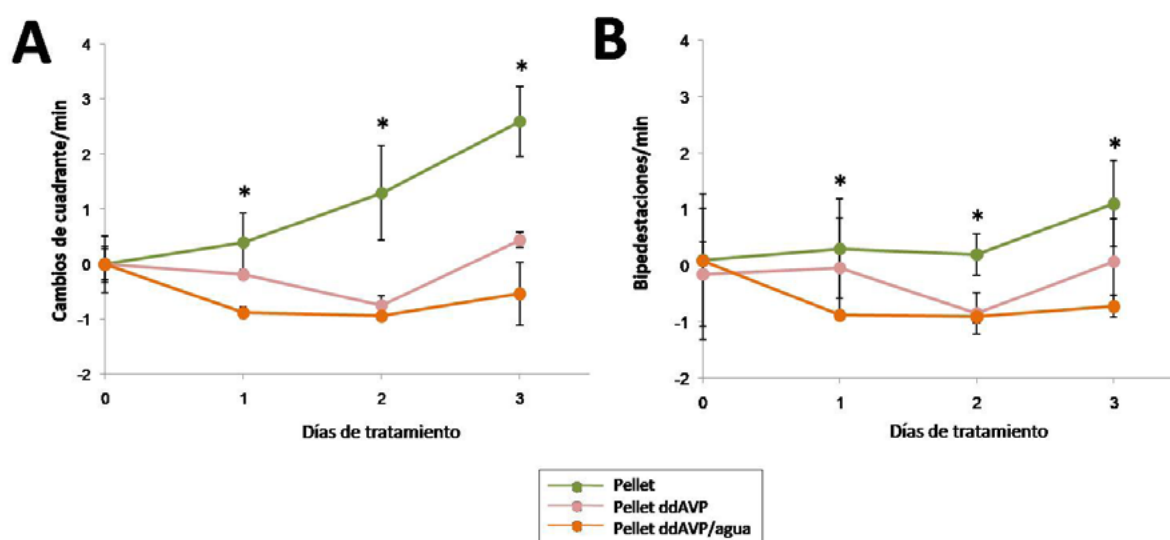


Figura 24. Actividad espontánea en la jaula de estabilización (condiciones no forzadas). Resultados normalizados al número de cambios de cuadrante/bipedestaciones el primer día. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=3$ por grupo experimental. Panel A: Cambios de cuadrante/minuto. ANOVA factorial del modelo $p < 0,001$; tratamiento $p < 0,001$; días de tratamiento $p < 0,001$; tratamiento*días de tratamiento $p < 0,001$. Panel B: Número de bipedestaciones/minuto. ANOVA factorial del modelo $p = 0,072$; tratamiento $p = 0,01$; días de tratamiento N.S.; tratamiento*días de tratamiento N.S.* $p < 0,05$ para el factor tratamiento, es decir, control vs ddAVP (con o sin agua).

Al analizar conjuntamente los resultados de todos los individuos en el laberinto de Morris en los días 1, 3 y 5 de administración de tratamiento, se evidenció una mejoría significativa en los tiempos ($p=0.002$) y un acortamiento en la longitud de las trayectorias ($p=0.001$) de resolución de la prueba a lo largo de las distintas repeticiones en un mismo día (aprendizaje), así como una mejoría progresiva de día en día en la primera prueba de la mañana (memoria) (tiempo $p=0.004$; trayectoria $p=0.002$). Al comparar los controles con los animales tratados con ddAVP (independientemente de si habían recibido o no una dosis diaria de agua), se observó una diferencia a favor de los controles (menor tiempo de resolución y longitud de la trayectoria), tanto en aprendizaje (tiempo $p=0.035$; longitud $p=0.063$) como en memoria, si bien en este último caso la diferencia no alcanzó la significación estadística (Fig 25 y 26).

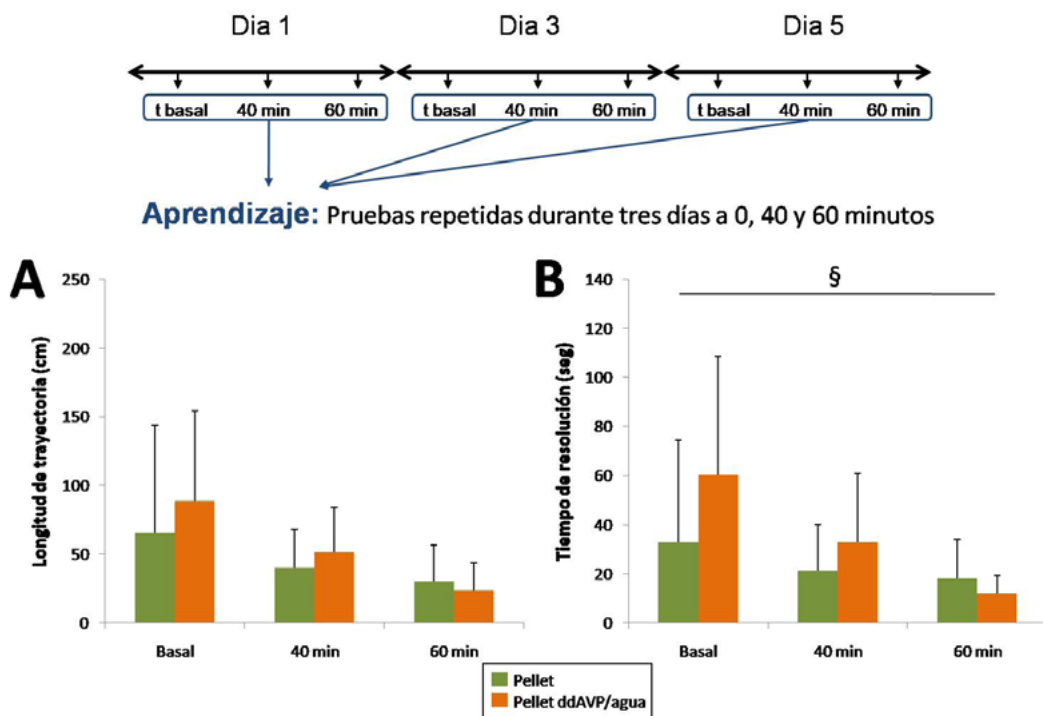


Figura 25. Estudio del aprendizaje en el laberinto de Morris entre los grupos de tratamiento a distintos tiempos de entrenamiento. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=3$ por grupo experimental. Panel A: Comparación de la longitud de la trayectoria recorrida hasta la resolución del laberinto. ANOVA factorial del modelo $p=0.063$; tiempo $p=0.014$; tratamiento N.S.; tiempo*tratamiento N.S. Panel B: Comparación del tiempo de resolución del laberinto. ANOVA factorial del modelo $p=0.035$; tiempo $p=0.023$; tratamiento N.S.; tiempo*tratamiento N.S. § $p<0.05$ para el factor tiempo, es decir, basal vs 40 min vs 60 min.

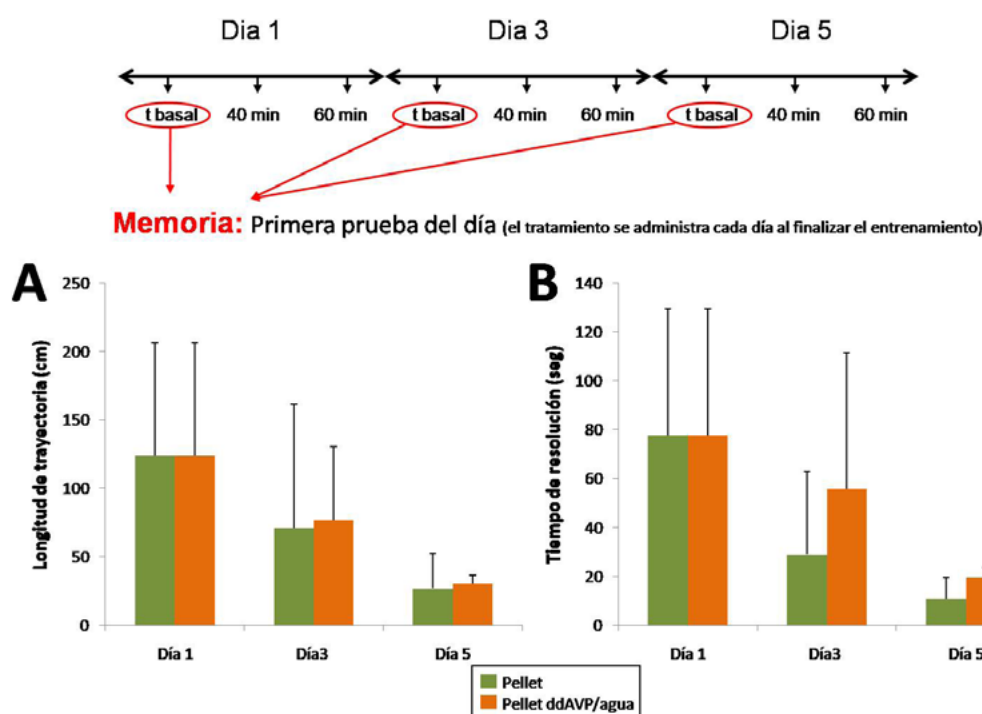


Figura 26. Estudio de la memoria en el laberinto de Morris entre los grupos de tratamiento en distintos días. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=3$ por grupo experimental. Panel A: Comparación de la longitud de la trayectoria recorrida hasta la resolución del laberinto. ANOVA factorial del modelo N.S. Panel B: Comparación del tiempo de resolución del laberinto. ANOVA factorial del modelo N.S.

Dichos resultados se confirmaron en un segundo experimento, donde además se evaluó el efecto de una sobrecarga i.p. de agua equivalente al 10% del peso del animal administrada tras el primer entrenamiento de una sesión extraordinaria realizada en el día 4 en cada uno de los grupos. La memoria (evaluada en el tiempo basal del laberinto de Morris del día 5) se vio gravemente afectada por la administración de ddAVP/agua sin y con una sobrecarga hídrica adicional el día anterior. El tratamiento con ddAVP/agua provocó un aumento en el recorrido y el tiempo necesario para encontrar la plataforma ($p=0.032$ y $p=0.003$, respectivamente) comparado con los animales control (pellet). La administración de una sobrecarga hídrica valorada de forma global sólo tuvo un efecto significativo sobre la longitud recorrida por los animales ($p=0.001$) y no sobre el tiempo de resolución (Fig 27).

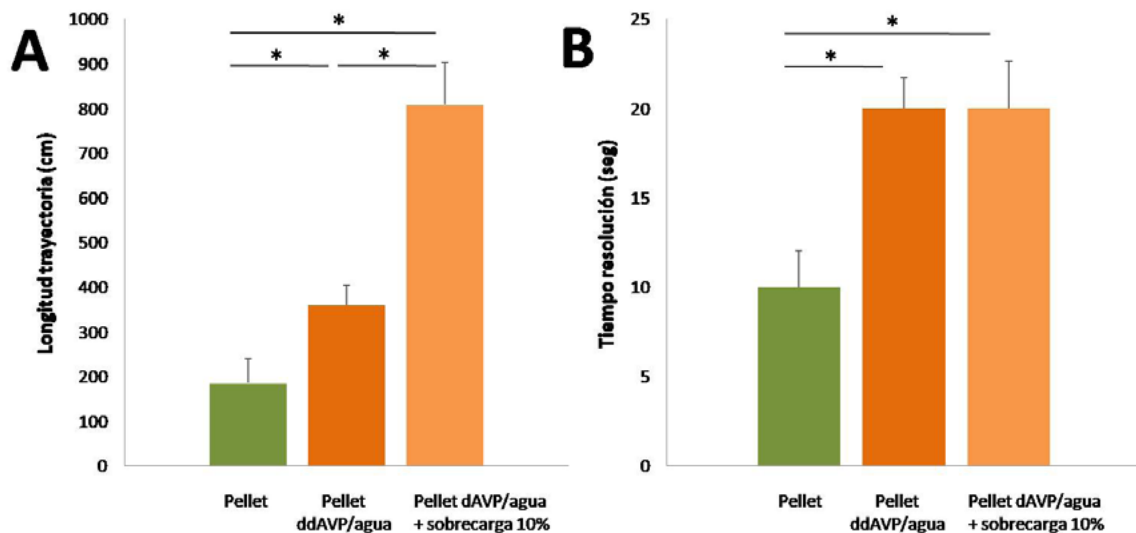


Figura 27. Estudio de la memoria en el tiempo basal del día 5 de entrenamiento: resolución del laberinto de Morris en animales control, tratados diariamente con una dosis de ddAVP y agua equivalente al 2.5% de su peso corporal (ddAVP/agua), y tratados con ddAVP/agua con una sobrecarga de agua equivalente al 10% de su peso corporal el día anterior (ddAVP/agua + sobrecarga 10%). Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=3$ por grupo experimental. Panel A: Longitud de la trayectoria. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor tratamiento $p=0.032$; factor sobrecarga 10% $p=0.001$. Panel B: Tiempo de resolución. ANOVA factorial del modelo $p=0.005$; factor tratamiento $p=0.003$; factor sobrecarga 5% N.S. * $p<0.05$ para las comparaciones entre los diferentes grupos de tratamiento.

El aprendizaje (evaluado en el tiempo 60 minutos del día 4) también se vio afectado por la administración de ddAVP/agua sin y con sobrecarga hídrica adicional (Fig 28).

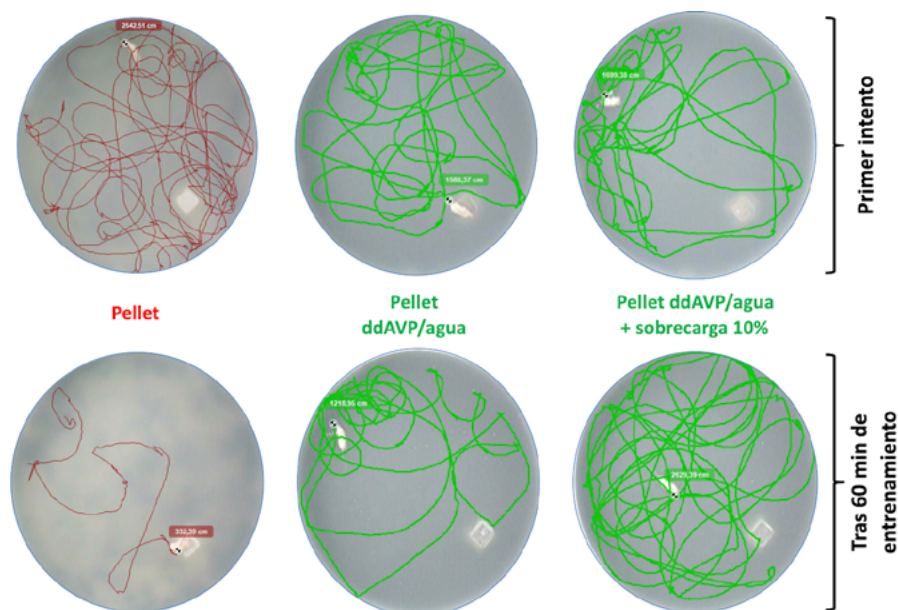


Figura 28. Ejemplo de la influencia de las distintas maniobras sobre 3 animales en el aprendizaje (tiempo basal y tiempo 60 minutos de la sesión extraordinaria de entrenamiento en el día 4): resolución del laberinto de Morris (longitud de la trayectoria en cm) en individuo control (izquierda), tratado diariamente con ddAVP/agua (centro), y tras la administración de una sobrecarga hídrica adicional equivalente al 10% del peso del animal tras la ronda de entrenamiento basal (derecha).

Estos resultados nos muestran que el tratamiento con ddAVP/agua, en general, produce un deterioro en el comportamiento de los animales, provocando una menor actividad espontánea de los mismos y un marcado deterioro cognitivo, al menos a nivel de la memoria espacial, ya que los animales necesitan llevar a cabo una natación más prolongada, y siguiendo una trayectoria más larga para alcanzar la plataforma oculta en el laberinto de Morris. Estos efectos son especialmente

marcados en aquellos animales tratados además con una sobrecarga hídrica adicional. Es por ello que consideramos necesario continuar nuestros estudios sobre los efectos de estos tratamientos sobre el medio interno y sobre determinados parámetros del SNC.

2. MODELO DE HIPONATREMIA AGUDA

Inicialmente, se estudió el efecto de una sobrecarga de agua equivalente al 10% del peso corporal sobre animales alimentados con pellet (ver apartado **1.4.1. Modelo de hiponatremia aguda** de Material y Métodos, Fig 15). Los resultados se detallan a continuación.

2. 1. Análisis del balance hidrosalino

Los animales fueron alimentados con una dieta convencional basada en pellets (Fig 11), que contiene 117 $\mu\text{mol/g}$ de sodio, 156 $\mu\text{mol/g}$ de potasio y 3900 cal/g. Los animales tenían acceso *ad libitum* a dicha dieta y al agua de bebida. La situación basal del medio interno de estos animales en la situación basal se describe en la tabla 4 y la figura 29 (dieta pellet basal).

Tabla 4. Comparación de los valores analíticos entre dieta pellet y dieta hiposódica, una semana tras la adaptación a la dieta (basal) y tras otra semana de administración de ddAVP/agua.

VARIABLE	BASAL		TRAS 7 DÍAS DE DDVP + AGUA 2.5%	
	D. PELLET	D. HIPOSÓDICA	D. PELLET	D. HIPOSÓDICA
Na plasmático (mEq/L)	140.25 $\pm$ 3.30	136.50 $\pm$ 1.73	142.50 $\pm$ 0.58	141.25 $\pm$ 0.96
Osm plasmática (mOsm/kg)	302.67 $\pm$ 11.55	310.00 $\pm$ 10.71	280.00 $\pm$ 15.41	289.33 $\pm$ 2.31 \$
Hematocrito (%)	40.25 $\pm$ 0.96	42.50 $\pm$ 2.52	41.25 $\pm$ 1.71	40.00 $\pm$ 2.45
Ingesta hídrica (mL/d)	29.25 $\pm$ 5.72	13.96 $\pm$ 3.33 *	30.13 $\pm$ 0.95	25.92 $\pm$ 9.11 \$
Ingesta Na (mEq/d)	1.66 $\pm$ 0.11	0.69 $\pm$ 0.16 *	1.45 $\pm$ 0.09 *	0.49 $\pm$ 0.19 \$†
Ingesta K (mEq/d)	2.21 $\pm$ 0.14	0.23 $\pm$ 0.05 *	1.92 $\pm$ 0.11 *	0.16 $\pm$ 0.06 \$†
Volumen de diuresis (ml/d)	13.75 $\pm$ 2.10	72.25 $\pm$ 11.70 *	13.25 $\pm$ 6.24	50.00 $\pm$ 23.22 \$†
Osm urinaria (mOsm/kg)	736.00 $\pm$ 145.79	189.25 $\pm$ 32.65 *	614.00 $\pm$ 63.38	201.25 $\pm$ 48.37
Excreción urinaria Na (mEq/d)	0.86 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.31	0.84 $\pm$ 0.19	0.74 $\pm$ 0.40
Excreción urinaria K (mEq/d)	0.92 $\pm$ 0.20	0.49 $\pm$ 0.20 *	0.90 $\pm$ 0.26	0.27 $\pm$ 0.21 †
Cl. agua libre (mL/d)	-20.30 $\pm$ 4.79	28.55 $\pm$ 10.95 *	-21.61 $\pm$ 4.79	10.00 $\pm$ 1.42 \$†

Resultados expresados como media $\pm$ DE; n=4 por dieta. * p<0.05 comparado con Dieta Pellet Basal. \$ p<0.05 comparado con Dieta Hiposódica Basal. † p<0.05 comparado con Dieta Pellet tras ddAVP/agua. Na: sodio. Osm: osmolalidad. K: potasio. Cl: aclaramiento.

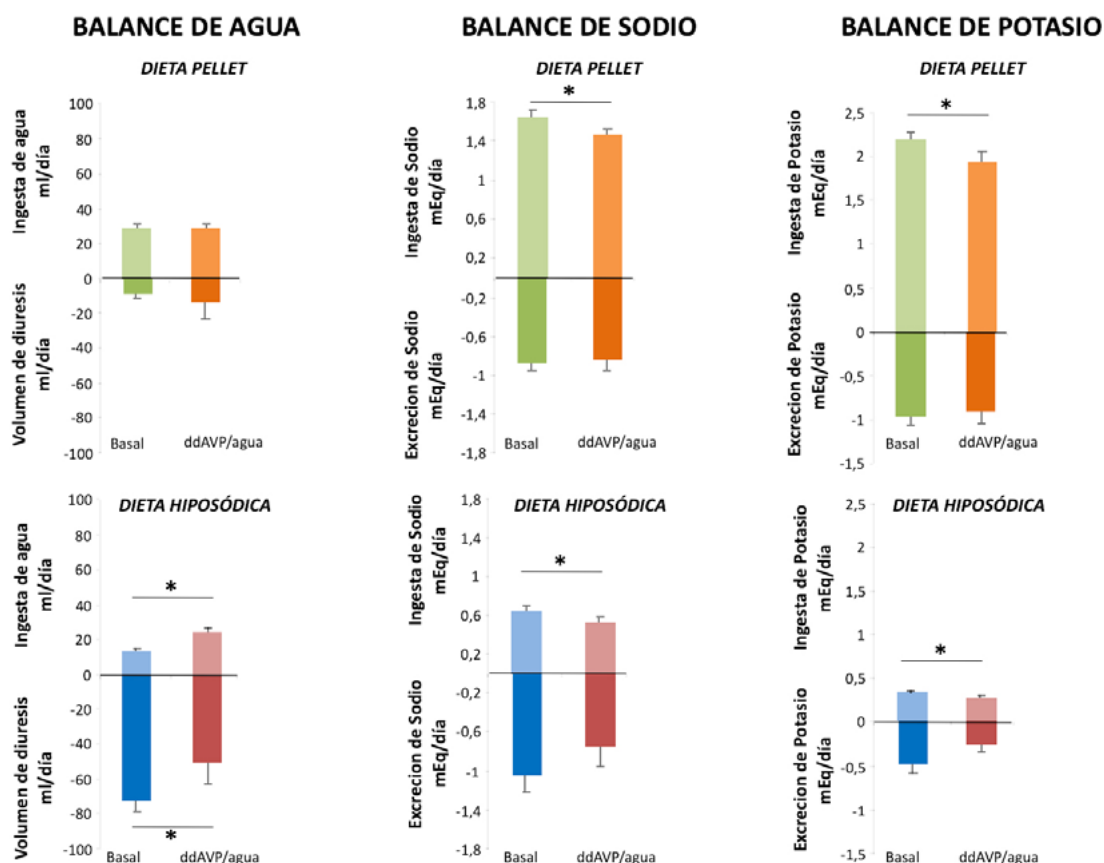


Figura 29. Representación gráfica del balance de agua, sodio y potasio entre dieta pellet y dieta hiposódica, una semana tras la adaptación a la dieta (basal) y tras otra semana de administración de ddAVP/agua con las distintas intervenciones. Resultados expresados como media $\pm$ DE; n=4 por dieta. *p<0.05 para la comparación entre la situación basal (tras una semana de adaptación a cada una de las dietas) y la situación final tras una semana más de administración diaria i.p. de ddAVP/agua (ddAVP/agua).

Para la inducción de una hiponatremia aguda, se administró una sobrecarga de agua i.p. equivalente al 10% del peso corporal del animal. A las 2h de dicha inyección, se evidenció una marcada hiponatremia hipoosmolar (Nap basal 140.25 ± 3.30 vs Nap final 113.33 ± 1.16 mEq/L, $p < 0.001$; Osm basal 302.67 ± 11.55 vs Osm final 264.93 ± 9.15 mOsm/kg, $p < 0.001$). La orina se diluyó (Osmo basal 736.00 ± 145.79 vs Osmo final 592.48 ± 82.35 mOsm/kg) si bien esta diferencia no alcanzó la significación estadística. El hematocrito pasó de 39.20 ± 2.11 % basalmente, a 42.33 ± 2.89 % tras la administración del bolo de agua ($p = 0.041$).

2.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

En el momento basal (T0), previamente a la administración de la sobrecarga hídrica, el valor del ADC para el encéfalo completo en animales alimentados con pellet fue de $26.71 \pm 2.40 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$. Al analizar las diferentes regiones por separado, la sustancia gris presentó valores de ADC significativamente mayores que la SB (23.45 ± 1.33 vs $16.52 \pm 1.07 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$, $p < 0.001$). A su vez, el hipotálamo fue la región con el valor más alto de ADC ($25.34 \pm 2.80 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$, $p < 0.05$ comparado con SG y SB) (Fig 30, grupo pellet).

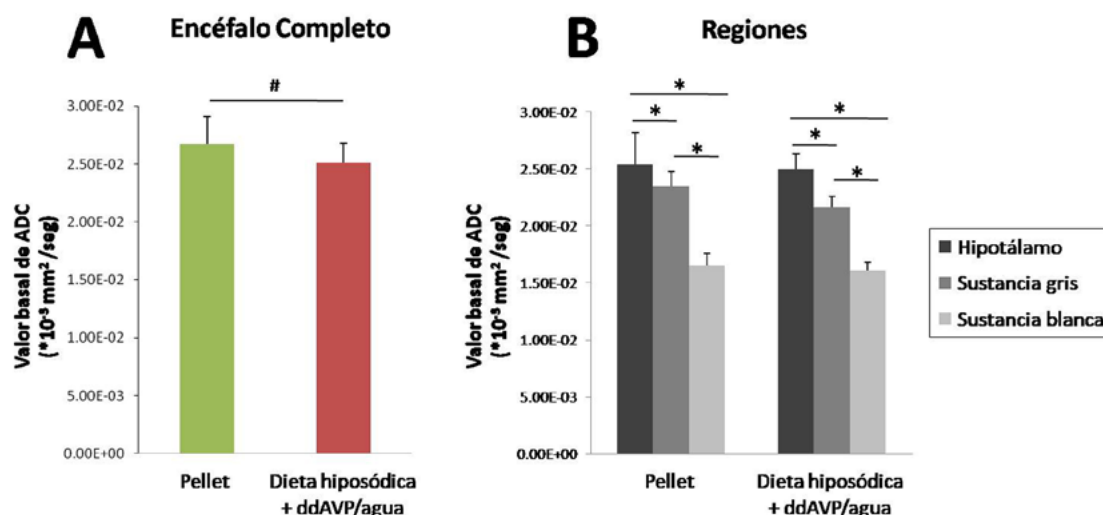


Figura 30. Valores basales del coeficiente de difusión aparente (ADC). Panel A: comparación del valor basal de ADC en encéfalo completo entre el grupo alimentado con dieta pellet y el alimentado con dieta hiposódica y tratado con ddAVP/agua. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo experimental. # $p<0.05$ entre dieta pellet y dieta hiposódica ddAVP/agua. Panel B: comparación de los valores basales de ADC entre diferentes regiones encefálicas en los diferentes grupos experimentales. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo. * $p<0.05$ entre las diferentes regiones estudiadas en cada una de las dietas. En la comparación entre las regiones en ambos grupos experimentales sólo se encontró una tendencia a la significación estadística en sustancia gris ($p=0.054$) que no se ha representado en la figura en aras de la simplicidad.

Los valores individuales del resto de las regiones analizadas están disponibles en la tabla 5 (grupo pellet basal).

Tabla 5. Valores de ADC basal y a los 120 minutos de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso corporal del animal en los distintos grupos experimentales.

REGIÓN	ADC BASAL (*10 ⁻³ MM ² /SEG)			ADC FINAL (*10 ⁻³ MM ² /SEG)		
	D. PELLET	D. HIPOSÓDICA + ddAVP/ AGUA	P	D. PELLET	D. HIPOSÓDICA + ddAVP/ AGUA	P
EC	26.71 $\pm$ 2.40	25.07 $\pm$ 1.71	0.050	25.21 $\pm$ 2.93	23.43 $\pm$ 0.38	0.275
SG	23.45 $\pm$ 1.33	21.63 $\pm$ 0.95	0.054	25.80 $\pm$ 4.27	22.20 $\pm$ 0.79	0.137
• CP	23.32 $\pm$ 1.00	21.28 $\pm$ 0.91	0.047	26.71 $\pm$ 5.15	22.25 $\pm$ 1.73	0.044
• Cx	23.70 $\pm$ 1.90	21.70 $\pm$ 1.16	0.092	26.11 $\pm$ 4.98	22.26 $\pm$ 0.96	0.239
• HC	23.28 $\pm$ 1.43	23.00 $\pm$ 1.68	0.068	23.51 $\pm$ 4.64	21.97 $\pm$ 0.62	0.357
HT	25.34 $\pm$ 2.80	24.97 $\pm$ 1.30	0.279	23.45 $\pm$ 3.34	23.81 $\pm$ 0.76	0.743
SB	16.52 $\pm$ 1.07	16.02 $\pm$ 0.75	0.192	21.70 $\pm$ 4.04	18.40 $\pm$ 1.33	0.043

Los resultados se expresan como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo experimental. EC: encéfalo completo; SG: sustancia gris; CP: caudado-putamen; Cx: corteza; HC: hipocampo; HT: hipotálamo; SB: sustancia blanca. El valor p corresponde a la comparación entre dieta pellet e hiposódica + ddAVP/agua en el momento basal y final respectivamente. Los resultados de EC, HT, SG y SB se presentan también en la figura 30.

Tras la administración de una sobrecarga de agua i.p. equivalente al 10% del peso del animal se observó una reducción progresiva en los valores de ADC en el encéfalo completo, con un descenso de $0.26 \pm 0.06 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$ cada 10 minutos ($p < 0.001$) (Fig 31, grupo pellet).

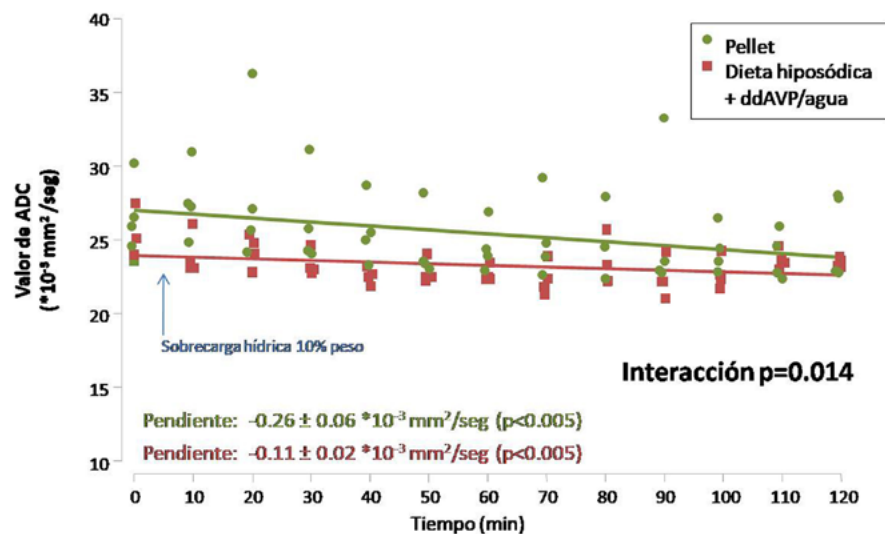


Figura 31. Evolución temporal de los valores del coeficiente de difusión (ADC) en el encéfalo completo tras la sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso corporal del animal. $n=4$ por grupo. Modelo lineal mixto. Los resultados del tiempo 0 (basal) se presentan también en la figura 30.

En el hipotálamo también se observó un descenso de $0.20 \pm 0.02 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$ cada 10 minutos ($p < 0.001$). Al analizar por separado la SG y la SB, no se encontraron cambios significativos en el comportamiento de la sustancia gris a lo largo del tiempo, mientras que el valor de ADC en la SB aumentó significativamente en $0.28 \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$ cada 10 minutos ($p < 0.001$) (Fig 32). Por tanto, encontramos que, tras la sobrecarga hídrica, el valor de ADC en la SB ascendía frente al descenso en hipotálamo y a la ausencia de variación en la SG ($p < 0.05$ para ambas interacciones) (Fig32, Tabla 5). A su vez, el hipotálamo también se comportó de forma diferente a la SG ($p=0.009$ para la interacción, no se muestran los datos).

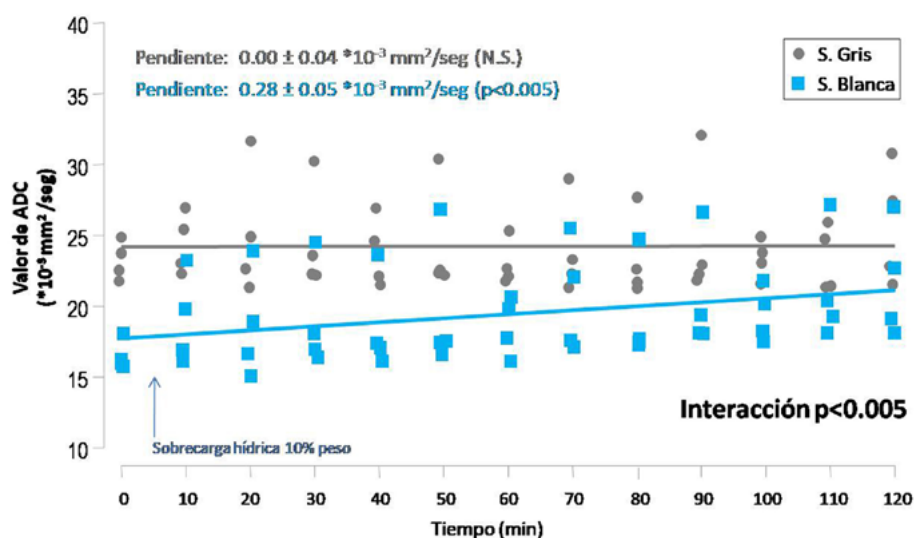


Figura 32. Evolución de ADC en sustancia gris y blanca en el grupo pellet tras la sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal. $n=4$ por grupo. Modelo lineal mixto. S. Gris: sustancia gris. S. Blanca: sustancia blanca. Los resultados del tiempo 0 (basal) se presentan también en la figura 30.

Para comprobar que la anestesia no afectaba de forma significativa a los animales se registraron diferentes parámetros fisiológicos (frecuencia cardiaca y respiratoria, saturación de oxígeno y temperatura corporal) en dos animales, alimentados con dieta pellet, y sometidos al mismo periodo de sedación que los animales experimentales, en ausencia de ninguna otra intervención. No se observaron cambios significativos en los registros iniciales y finales, ni a lo largo del periodo de sedación, sólo se observó un aumento significativo en la pO_2 (pre: 74.50 ± 2.12 vs post 136.00 ± 11.31 mmHg, $p=0.017$), posiblemente debido al empleo de oxígeno suplementario administrado junto con la anestesia durante el periodo de sedación.

2.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

2.3.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos

Al analizar los niveles de expresión de GFAP, en los animales alimentados con pellet, encontramos una expresión inicial mayor en SG que en SB, y a su vez mayor en SB lateral que en central ($p < 0.001$ para ambas comparaciones) (Fig 33 A, pellet basal). Los valores de densidad óptica obtenidos para cada una de las regiones estudiadas por separado están disponibles en la tabla 6 (pellet basal).

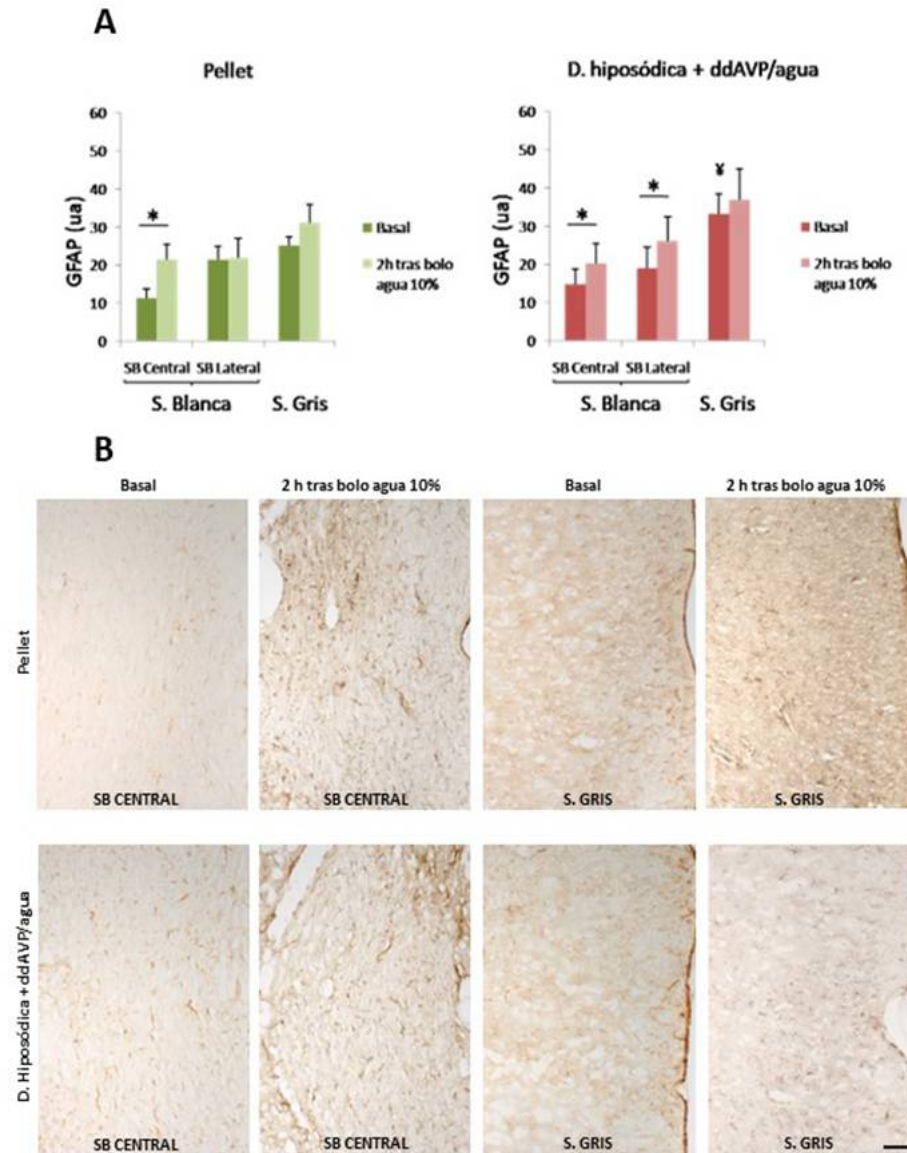


Figura 33. Hiponatremia aguda: expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en unidades arbitrarias de densidad óptica (ua), antes (basal) y 2 horas después de la administración de un bolo de agua i.p. equivalente al 10% del peso del animal. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE; n=4 por grupo experimental. Panel A izquierda: Animales alimentados con pellet. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor bolo agua 10% $p<0.001$; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción bolo agua 10% * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$. * $p<0.05$ en la comparación de SB central antes y después de la administración del bolo de agua. Panel A derecha: Animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor bolo agua 10% $p<0.001$; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción bolo agua 10% * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S. * $p<0.05$ en la comparación de SB central antes y después de la administración de un bolo de agua, y en la comparación de SB lateral antes y después de la administración de un bolo de agua. $¥p<0.05$ en la comparación de sustancia gris en el momento basal entre animales alimentados con pellet y aquellos alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. Panel B: Microfotografías representativas de la expresión de MBP en los distintos grupos experimentales. SB: sustancia blanca. S. Gris: sustancia gris. S. Blanca: sustancia blanca.

Tabla 6. Análisis detallado de la expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en las diferentes regiones de interés en los grupos pellet y dieta hiposódica ddAVP/agua antes y después de la administración de un bolo i.p. de agua equivalente al 10% del peso del animal.

REGIÓN	PELLET		D. HIPOSÓDICA + DDAMP/AGUA	
	BASAL	2H TRAS BOLO AGUA 10%	BASAL	2H TRAS BOLO AGUA 10%
Cuerpo calloso central rostral	12.05 ± 2.55	19.50 ± 5.55	13.27 ± 4.17	24.80 ± 3.72 \$
Cuerpo calloso central medio	11.62 ± 1.92	23.54 ± 2.51 *	11.89 ± 1.21	15.37 ± 3.34 †
Cuerpo calloso central caudal	9.87 ± 2.21	21.00 ± 4.05 *	18.95 ± 1.31 *	20.54 ± 3.98
Cuerpo calloso lateral derecho	22.34 ± 2.43	25.56 ± 1.91	22.98 ± 2.21	27.18 ± 3.09
Cuerpo calloso lateral izquierdo	20.61 ± 5.82	22.23 ± 1.86	12.84 ± 4.12	26.42 ± 3.92 \$
Cápsula interna	20.91 ± 1.45	17.77 ± 6.99	21.08 ± 3.35	24.68 ± 10.62
Corteza motora	25.25 ± 1.83	30.15 ± 6.70	33.20 ± 7.16	38.41 ± 11.78
Hipotálamo periventricular	24.90 ± 3.00	32.28 ± 2.14 *	33.24 ± 3.63 *	35.24 ± 3.52

Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media ± DE; n=4 por grupo experimental. *p<0.05 comparado con Dieta Pellet Basal. \$ p<0.05 comparado con Dieta Hiposódica + ddAMP/agua Basal. † p<0.05 comparado con Dieta Pellet tras bolo de agua equivalente al 10% del peso del animal.

La administración i.p. de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal aumentó de forma significativa la expresión de GFAP a las dos horas de la misma en SB central (p<0.001), sin apreciarse cambios significativos en SB lateral o SG (Fig 33, pellet basal vs pellet 2h tras bolo agua 10%). En el análisis detallado por regiones, destaca un aumento significativo en la expresión de GFAP en cuerpo calloso central medio (p<0.001) y posterior (p=0.001). Pese a no observarse diferencias globales en SG, sí se vio un aumento significativo en la expresión de GFAP en el hipotálamo (p=0.026) (Tabla 6).

2.3.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos

Al analizar los niveles de expresión de MBP, marcador de mielina y utilizado para localizar oligodendrocitos, en los animales alimentados con pellet, se observó que la expresión basal fue mayor en SB que en SG (p<0.001), sin que se observaran diferencias en su expresión entre SB central y lateral (Fig 34 A, pellet basal). Los valores de densidad óptica obtenidos para cada una de las regiones estudiadas por separado están disponibles en la tabla 7 (pellet basal).

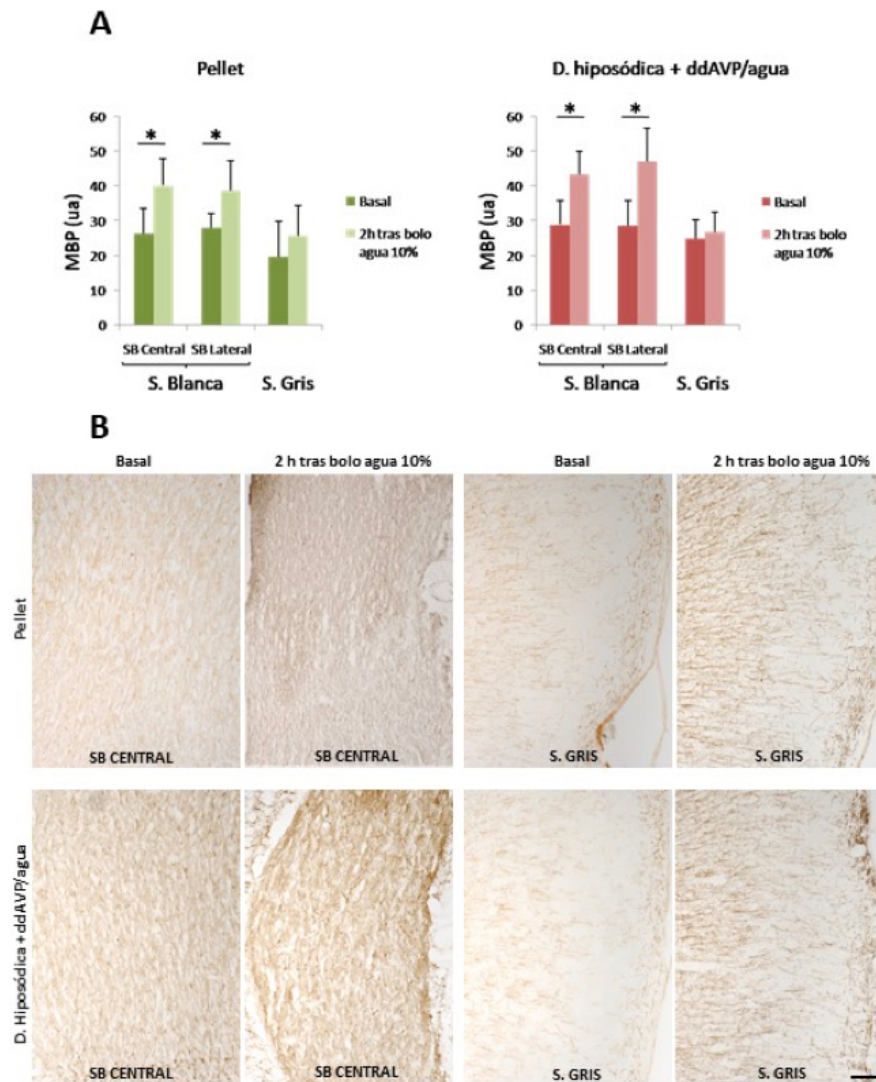


Figura 34. Hiponatremia aguda: expresión de proteína básica de la mielina (MBP) en unidades arbitrarias de densidad óptica (ua), antes (basal) y 2 horas después de la administración de un bolo de agua i.p. equivalente al 10% del peso del animal. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo experimental. Panel A izquierdo: Animales alimentados con pellet. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor bolo agua 10% $p<0.001$; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción bolo agua 10% * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S.* $p<0.05$ en la comparación de SB central y lateral antes y después de la administración del bolo de agua en animales alimentados con pellet. Panel A derecho: Animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor bolo agua 10% $p<0.001$; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción bolo agua 10% * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p=0.003$. * $p<0.05$ en la comparación de SB central antes y después de la administración de un bolo de agua, y en la comparación de SB lateral antes y después de la administración de un bolo de agua. Panel B: Microfotografías representativas de la expresión de MBP en los distintos grupos experimentales. SB: sustancia blanca. S. Gris: sustancia gris.

Tabla 7. Análisis detallado de la expresión de proteína básica de la mielina (MBP) en las diferentes regiones de interés en los grupos pellet y dieta hiposódica ddAVP/agua antes y después de la administración de un bolo i.p. de agua equivalente al 10% del peso del animal.

REGIÓN	PELLET		D. HIPOSÓDICA + ddAVP/AGUA	
	BASAL	2H TRAS BOLO AGUA 10%	BASAL	2H TRAS BOLO AGUA 10%
Cuerpo calloso central rostral	18.29 ± 4.18	45.04 ± 8.43 *	23.71 ± 5.55	42.80 ± 4.51 \$
Cuerpo calloso central medio	31.53 ± 2.32	38.35 ± 8.14	30.80 ± 7.55	39.73 ± 3.43
Cuerpo calloso central caudal	29.46 ± 5.15	37.07 ± 6.33	32.30 ± 6.05	47.34 ± 9.49 \$
Cuerpo calloso lateral derecho	26.98 ± 2.40	40.31 ± 4.44 *	33.67 ± 4.79	51.25 ± 5.26 \$†
Cuerpo calloso lateral izquierdo	28.01 ± 5.78	45.86 ± 5.35 *	30.25 ± 5.53	48.05 ± 3.36 \$
Cápsula interna	29.15 ± 4.29	30.17 ± 7.18	21.83 ± 6.78	42.03 ± 15.59 \$
Corteza motora	28.24 ± 5.47	20.85 ± 6.60	28.12 ± 5.31	22.33 ± 3.42
Hipotálamo periventricular	11.09 ± 3.53	30.64 ± 8.27 *	21.67 ± 3.49	31.13 ± 3.86

Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media ± DE; n=4 por grupo experimental. *p<0.05 comparado con Dieta Pellet Basal. \$ p<0.05 comparado con Dieta Hiposódica + ddAVP/agua Basal. † p<0.05 comparado con Dieta Pellet tras bolo de agua equivalente al 10% del peso del animal.

La administración i.p. de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal aumentó de forma significativa la expresión de MBP a las dos horas de la misma en SB central (p<0.001) y lateral (p<0.001), sin apreciarse cambios significativos en SG (Fig 34, pellet basal vs pellet 2h tras bolo agua 10%). En el análisis detallado por regiones, destaca un aumento significativo en la expresión de MBP en cuerpo calloso central rostral (p<0.001) y regiones laterales del cuerpo calloso (p<0.005 para ambos hemisferios). Pese a no observarse cambios globales en SG, sí se evidenció un aumento en la expresión de MBP en el hipotálamo (p=0.001) (Tabla 7).

3. MODELO DE HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE

Para explorar el efecto de la administración repetida de ddAVP con una dosis diaria de agua i.p. equivalente al 2.5% del peso corporal (ver apartado **1.4.2. Modelo de hiponatremia intermitente recurrente** de Material y Métodos, Fig 16), se diseñaron una serie de experimentos cuyos resultados se exponen a continuación.

3.1. Análisis del balance hidrosalino

Inicialmente, se administró diariamente durante 7 días ddAVP y agua i.p.(equivalente al 2.5% del peso corporal) a ratas alimentadas con pellet. A las 4:30h de la inyección diaria, se objetivó un descenso en la natremia (Nap basal 140.25 ± 3.30 vs postinyección 136.00 ± 2.83 mEq/L, $p=0.055$; Osm_p basal 302.67 ± 11.55 vs postinyección 256.95 ± 47.20 mOsm/kg, N.S.), que se revertía a las 24h (Nap 142.50 ± 0.58 mEq/L y Osm_p 280.00 ± 15.41 mOsm/kg, N.S. vs basal para ambas comparaciones) (Fig 35 A y B, grupo pellet).

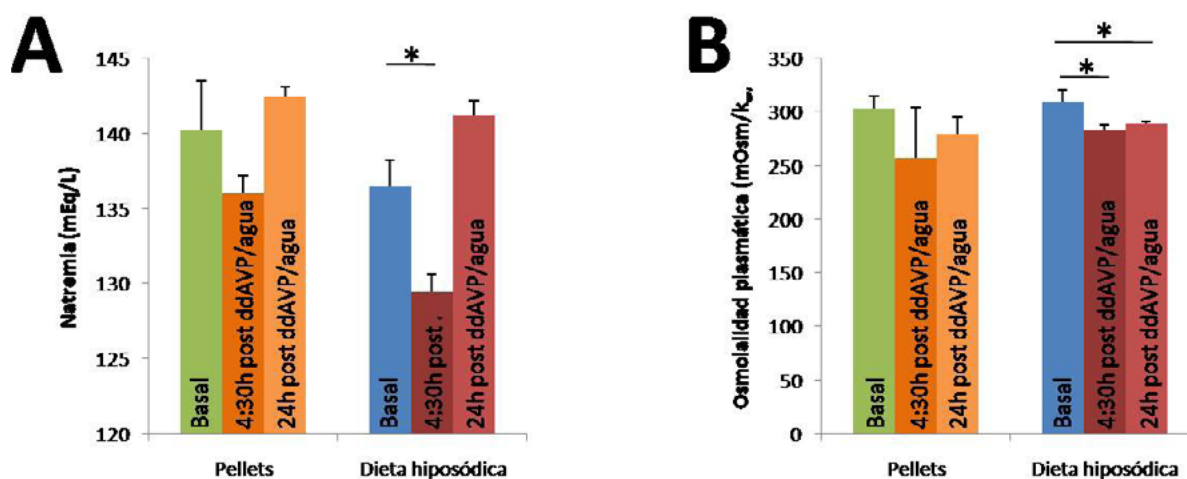


Figura 35. Evolución de la natremia(panel A) y la osmolalidad plasmática (panel B) en las primeras 24h tras la administración i.p. de ddAVP/agua en los diferentes grupos. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo. * $p<0.05$ para la comparación de cada grupo vs basal en el grupo dieta hiposódica.

Durante la semana en la que se administró el tratamiento, los animales no variaron su peso de forma significativa (inicial 246.25 ± 9.39 vs final 242.50 ± 8.35 g, N.S.) (Fig 36 A, grupo pellet + ddAVP/agua) y tampoco se modificó significativamente la ingesta hídrica. Sí se observó un descenso en la ingesta de sodio y potasio, probablemente relacionado con la menor ingesta calórica promedio diaria global observada durante esa semana (56.08 ± 10.06 vs 49.80 ± 9.48 cal/d, $p=0.086$) (Fig 36 B, grupo pellet + ddAVP/agua).

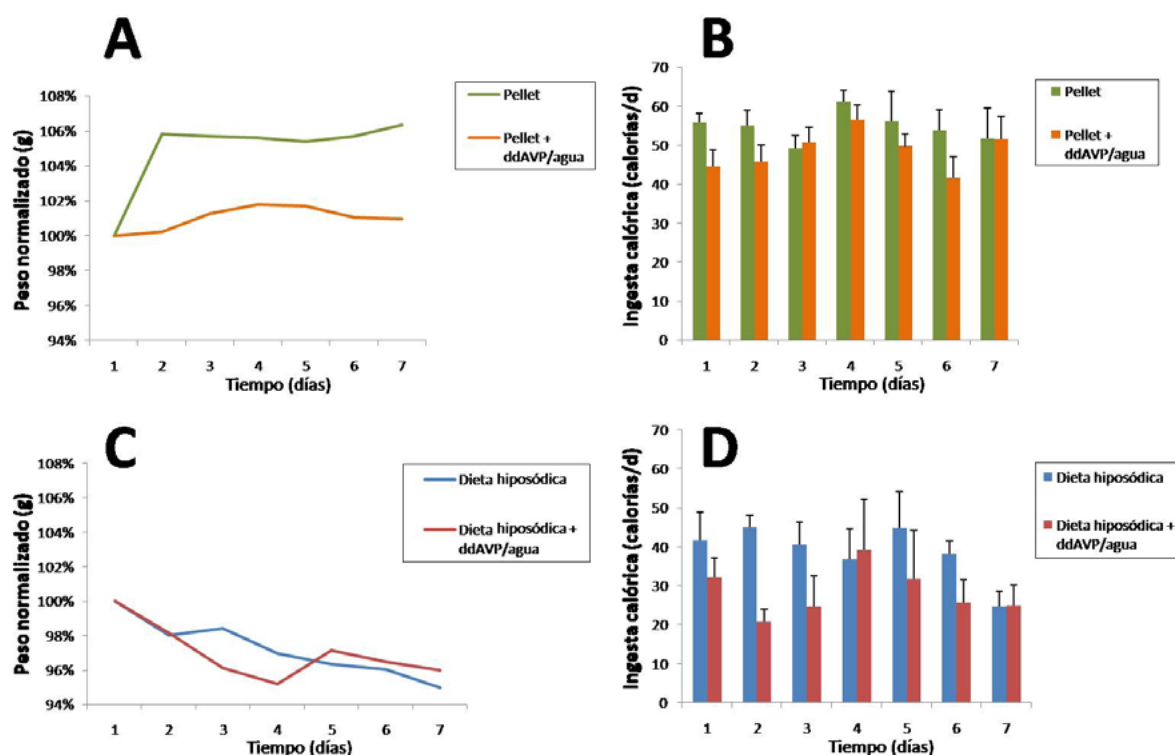


Figura 36. Evolución ponderal y de la ingesta calórica diaria. Panel A: Evolución ponderal en animales alimentados con pellet. Resultados expresados como normalización al peso inicial de la semana de adaptación a la dieta pellet (verde) o de la semana de administración diaria i.p. de ddAVP/agua (naranja); $n=4$ por grupo. ANOVA factorial del modelo N.S. Panel B: Evolución de la ingesta calórica diaria en animales alimentados con pellet. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo. ANOVA factorial del modelo N.S. Panel C: Evolución ponderal en animales alimentados con dieta hiposódica. Resultados expresados como normalización al peso inicial de la semana de adaptación a la dieta hiposódica (azul) o de la semana de administración diaria i.p. de ddAVP/agua (rojo); $n=4$ por grupo. ANOVA factorial del modelo N.S. Panel D: Evolución de la ingesta calórica diaria en animales alimentados con dieta hiposódica. Resultados expresados como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo. ANOVA factorial del modelo N.S.

No se vieron diferencias significativas con respecto a la situación basal en el volumen de diuresis, en la excreción de sodio y potasio, ni en el aclaramiento de agua libre. La osmolalidad en orina presentó escasa variación, no siendo las diferencias estadísticamente significativas (Fig 29, Tabla 4, dieta pellet basal vs dieta pellet + ddAVP/agua).

La elevada osmolalidad urinaria inducida por la dieta basada en pellets impide que la orina se pueda concentrar de manera eficaz ya que los osmoles urinarios fuerzan una pérdida obligada de agua que parece limitar cambios importantes en el volumen de diuresis.

Ante esta situación en la que la administración de ddAVP/agua en animales alimentados con pellets no parecía inducir una retención hídrica más marcada que la ya inducida por la propia dieta hiperosmolar, se cambió la dieta por una hiposódica gelificada para valorar sus efectos sobre el balance hidrosalino.

Inicialmente los animales fueron alimentados durante una semana con una dieta hiposódica gelificada (Fig 12) que contiene 4 $\mu\text{mol/ml}$ de sodio, 211 $\mu\text{mol/ml}$ de potasio y 232 cal/ml. Al término de esta fase de adaptación a la nueva dieta, los animales habían perdido peso (inicial 239.50 ± 17.06 vs final 227.50 ± 13.08 g), si bien esta tendencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.077$) (Fig 36 C, dieta hiposódica). En cualquier caso, la pérdida ponderal fue más marcada que en animales alimentados con pellet (interacción peso*dieta $p=0.033$). Las calorías aportadas diariamente con la dieta hiposódica en promedio fueron inferiores que con pellets (40.10 ± 12.85 vs 56.08 ± 10.06 cal/d, $p<0.001$) (Fig 36 B y D). El cambio de dieta no indujo cambios en la natremia ni en la osmolalidad plasmática (Fig 35 A y B, Tabla 4, dieta pellet basal vs hiposódica basal). La ingesta de agua, así como la de sodio y potasio, fue menor al pasar a la dieta hiposódica. Además, el cambio de dieta se

acompañó de un aumento marcado en el volumen de diuresis, estando la orina significativamente más diluida. Al analizar la composición de la orina, destaca un aumento del aclaramiento de agua libre y una reducción en la excreción urinaria de potasio (Fig 29 y Tabla 4, dieta pellet basal vs hiposódica basal). Al estudiar la diferencia en las osmolalidades urinarias entre ambas dietas, observamos que era debida principalmente a la presencia de osmoles iónicos en mucha mayor medida en los animales alimentados con pellet (42.25 ± 9.43 vs 266.30 ± 34.64 mOsm/kg, $p < 0.001$). Llama la atención la presencia de un osmol oculto, principalmente en la dieta basada en pellets (osmol gap de 20.40 ± 6.36 vs 99.89 ± 19.61 mOsm/kg, $p = 0.017$). Aunque los osmoles aportados por la urea eran mayores en la dieta basada en pellets en términos absolutos (125.75 ± 18.45 vs 369.54 ± 97.25 mOsm/kg, $p = 0.002$), la proporción sobre la osmolalidad urinaria total fue mayor en la dieta líquida (67% vs 50%). Los osmoles aportados por la glucosa (0.85 ± 1.36 vs 0.26 ± 0.19 mOsm/kg) no fueron significativamente diferentes entre la dieta líquida y los pellets respectivamente (Fig 37 A y B).

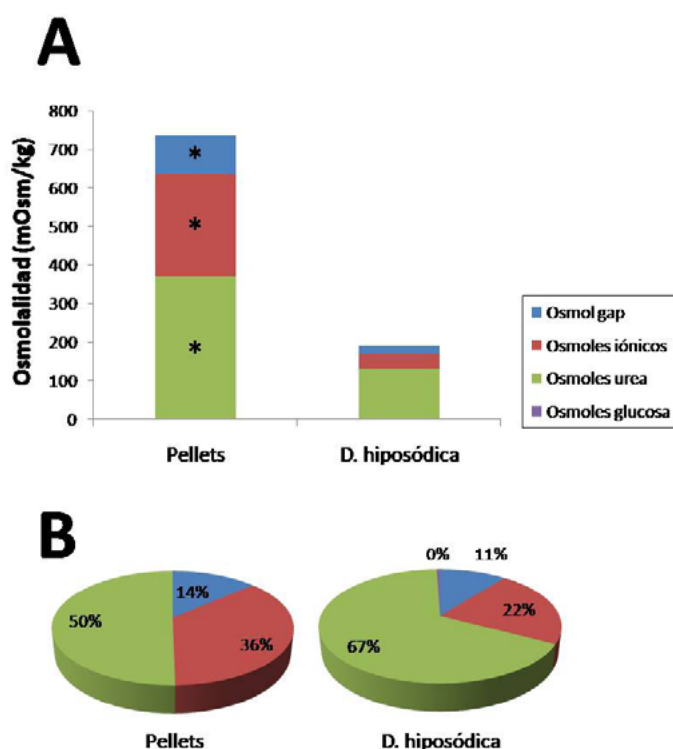


Figura 37. Análisis de la osmolalidad urinaria en función de la dieta. $n=4$ por grupo experimental. Panel A: Composición de la osmolalidad urinaria en función de la dieta. $*p < 0.05$ para la comparación entre pellet y dieta hiposódica. Panel B: Aportación porcentual de cada osmol al valor final de osmolalidad urinaria.

Seguidamente, procedimos a evaluar el efecto de la administración diaria de ddAVP i.p. junto con una dosis de agua equivalente al 2.5% del peso del animal en aquellas ratas alimentadas con dieta hiposódica (dieta hiposódica ddAVP/agua) (ver apartado **1.4.2. Modelo de hiponatremia intermitente recurrente** de Material y Métodos, Fig 16).

A las 4:30h de la inyección diaria, se objetivó el desarrollo de hiponatremia (Nap basal 136.50 ± 1.73 vs postinyección 129.44 ± 1.20 mEq/L, $p < 0.001$; Osm_p basal 310.00 ± 10.71 vs postinyección 283.91 ± 4.52 mOsm/L, $p = 0.030$). A las 24h de la última dosis de tratamiento, la natremia se recuperó (Nap 141.25 ± 0.96 mEq/L, N.S. respecto a basal), pero la osmolalidad plasmática permaneció por debajo del valor basal (289.33 ± 2.31 mOsm/L, $p = 0.024$) (Fig 35).

A pesar de la reducción en la ingesta calórica diaria promedio (40.10 ± 12.85 vs 32.39 ± 18.88 cal/d, $p = 0.081$), el peso no varió significativamente (inicial 223.50 ± 12.07 vs final 210.00 ± 17.15 g, N.S.) Llama la atención cómo, a partir del cuarto día de la administración de tratamiento, se invierte la

tendencia a la pérdida ponderal (Fig 36 C y D, dieta hiposódica + ddAVP/agua). La ingesta hídrica aumentó significativamente. El volumen de diuresis y el aclaramiento de agua libre se redujeron significativamente, en tanto la osmolalidad urinaria aumentó (sin alcanzar la significación estadística) (Fig 29, Tabla 4, dieta hiposódica basal vs hiposódica + ddAVP/agua).

Por tanto, la administración de ddAVP y una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal no lograba inducir una hiponatremia crónica, pero sí producía una hiponatremia leve y transitoria que se recuperaba a las 24h de su administración, situación que se repetía a lo largo de varios días consecutivos. Es decir, con la dieta hiposódica gelificada se logró un equilibrio del medio interno que sí respondía al efecto de la administración repetida de ddAVP/agua. Los datos sugerían una retención neta de agua a pesar de no haberse inducido una hiponatremia crónica. A esta situación, que no hemos encontrado descrita en la literatura hasta la fecha, la denominamos "hiponatremia intermitente recurrente". Seguidamente se estudió si en efecto se detectaba un aumento en el edema cerebral en esta condición.

3.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

Tras 7 días de administración diaria de ddAVP/agua a animales alimentados con dieta hiposódica, el valor del ADC para el encéfalo completo fue de $25.07 \pm 1.71 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$. Este valor fue significativamente menor que en el grupo alimentado con pellet ($p=0.05$) (Fig 30 A). Al analizar las diferentes regiones por separado, la SG presentó valores de ADC significativamente mayores que la SB (21.63 ± 0.95 vs $16.02 \pm 0.75 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$, $p<0.001$) (Fig 30 B). Los valores de ADC en SG fueron menores en los animales alimentados con dieta líquida ddAVP/agua con respecto a aquellos alimentados con pellet ($p=0.054$), pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en SB (Tabla 5, dieta pellet vs dieta hiposódica + ddAVP/agua en situación basal). A su vez, el hipotálamo fue la región con el valor más alto de ADC ($24.97 \pm 1.30 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$, $p<0.05$ comparado con SG y SB), sin encontrarse diferencias con el grupo pellet (Fig 30 B). Los valores individuales del resto de las regiones analizadas están disponibles en la tabla 5.

3.3. Análisis por espectroscopia del contenido de osmolitos *in vivo*

Se quiso comprobar si en la hiponatremia intermitente recurrente se producía una adaptación cerebral a esas horas de hiponatremia al día. Para ello, se midió *in vivo* el contenido de los principales osmolitos en la región caudado-putamen mediante la aplicación del análisis de espectroscopia por resonancia magnética. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de dieta hiposódica + ddAVP/agua y el grupo pellet sin tratamiento en contenido de miosina, colina, glutamina/GABA, NAA o agua (Fig 38).

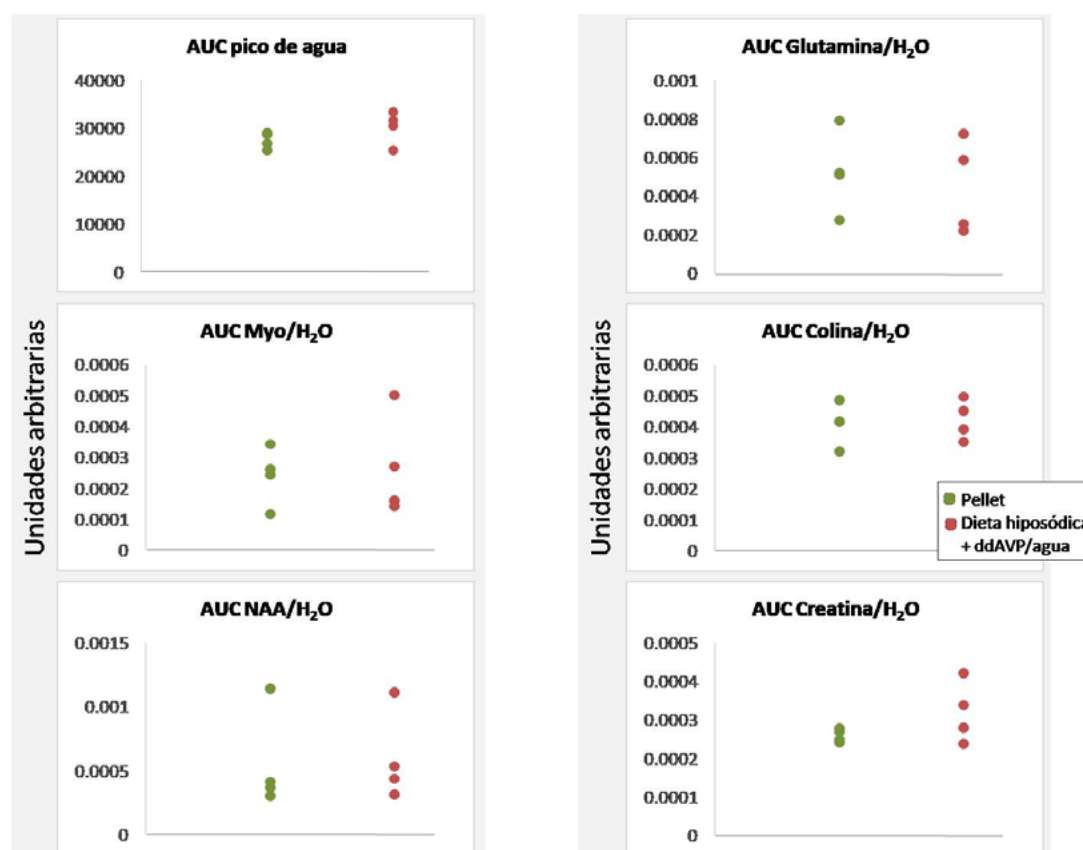


Figura 38. Cuantificación de osmolitos en caudado-putamen tras una semana de hiponatremia intermitente comparado con dieta pellet sin tratamiento i.p. AUC normalizado con respecto a la señal de agua. n=4 por grupo experimental. No hubo diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

3.4. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

3.4.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos

En situación basal, en los animales del grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua se apreció un efecto de la región sobre la expresión de GFAP, siendo mayor en SG que en SB ($p < 0.001$), y sin evidenciarse cambios entre SB lateral y central (Fig 33 B, dieta hiposódica + ddAVP/agua). Los valores de densidad óptica obtenidos para cada una de las regiones estudiadas por separado están disponibles en la tabla 6 (dieta hiposódica + ddAVP/agua).

Comparado con los animales alimentados con pellet, se vio que la inducción de una hiponatremia intermitente recurrente (dieta hiposódica + ddAVP/agua) aumentaba la expresión de GFAP en la SG ($p = 0.031$) (Fig 33 B). El análisis detallado de las diferencias se presenta en la tabla 6; donde se confirmó el aumento de expresión de GFAP en hipotálamo ($p = 0.012$). En SB, la expresión de GFAP aumentó en cuerpo calloso central caudal ($p = 0.007$).

3.4.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos

En cuanto a la expresión de MBP, los encéfalos de los animales del grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua presentaron valores mayores en SB que en SG ($p < 0.001$), sin evidenciarse cambios entre SG lateral y central (Fig 34 B, dieta hiposódica + ddAVP/agua). Los valores de densidad óptica obtenidos para cada una de las regiones estudiadas por separado están disponibles en la tabla 7 (dieta hiposódica + ddAVP/agua).

Comparado con los animales alimentados con pellet, se vio que la inducción de una hiponatremia intermitente recurrente (dieta hiposódica + ddAVP/agua) tendía a aumentar la expresión global de MBP ($p=0.06$), pero no logramos confirmar dicha tendencia en el análisis separado de SB (central y lateral) y SG (Fig 34). Al analizar detalladamente cada región por separado; sólo en hipotálamo se encontró una tendencia al aumento en la expresión de MBP ($p=0.058$) (Tabla 7, dieta pellet basal vs dieta hiposódica + ddAVP/agua basal).

4. MODELO DE AGUDIZACIÓN DE LA HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE

El siguiente paso en la investigación consistió en valorar el efecto de una sobrecarga hídrica i.p. equivalente al 10% del peso corporal en animales con hiponatremia intermitente recurrente (ver apartado **1.4.3. Agudización de hiponatremia intermitente recurrente** en Material y Métodos, Fig 17).

4.1. Análisis del balance hidrosalino

A las 2h de la administración i.p. de una sobrecarga de agua equivalente al 10% del peso animal a ratas alimentadas con dieta hiposódica y tratadas durante una semana con ddAVP/agua, se evidenció una marcada hiponatremia hipoosmolar (Na_p basal 141.25 ± 0.96 vs final $116.00 \pm 1.16 \text{ mEq/L}$, $p < 0.001$; Osm_p basal 294.05 ± 2.43 vs final $261.73 \pm 5.87 \text{ mOsm/kg}$, $p=0.001$). La orina no se diluyó (Osm_o basal 201.25 ± 48.37 vs final $364.87 \pm 42.02 \text{ mOsm/kg}$, N.S.), ni el hematocrito varió significativamente (Hto basal 40.00 ± 2.45 vs final $39.75 \pm 1.89 \%$, N.S.).

4.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

Tras la administración de una sobrecarga de agua i.p. equivalente al 10% del peso del animal al grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua, se observó una reducción progresiva en los valores de ADC en el encéfalo completo, con un descenso de $0.11 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$ cada 10 minutos ($p < 0.001$) (Fig 31, dieta hiposódica + ddAVP/agua). No hubo cambios significativos a lo largo del tiempo en el comportamiento del hipotálamo (no se muestran los datos). Al analizar por separado la SG y la SB, ambas presentaban un ascenso progresivo en los valores de ADC, más marcado en la SB (0.05 ± 0.02 y $0.19 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$ cada 10 minutos respectivamente, $p < 0.001$ para ambas; $p=0.013$ para la interacción) (Fig 39). Con respecto al hipotálamo, tanto la SG como la SB presentaron un comportamiento temporal significativamente diferente ($p < 0.001$ para ambas interacciones, no se muestran los datos).

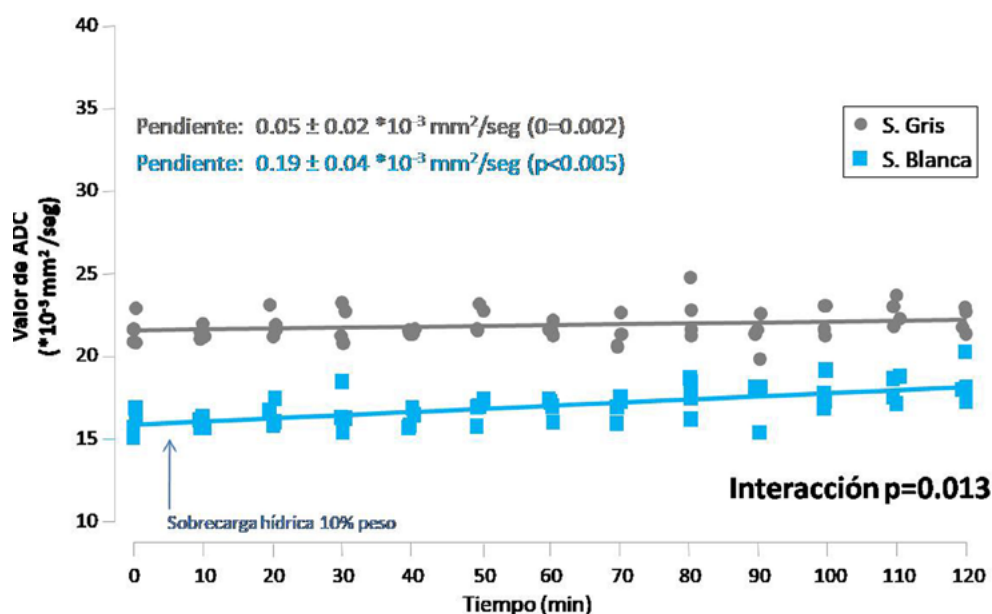


Figura 39. Evolución de ADC en sustancia gris y blanca en la hiponatremia intermitente recurrente (dieta hiposódica + ddAVP/agua) tras sobrecarga hídrica. n=4 por grupo. Modelo lineal mixto.

La reducción progresiva en los valores de ADC observada en el encéfalo completo fue más pronunciada en los animales alimentados con pellet ($p=0.014$) (Fig 31), acortándose las diferencias entre grupos a lo largo del tiempo. De hecho, los valores finales entre ambos grupos no fueron significativamente diferentes (Tabla 5). Llama la atención que el valor medio final de ADC en animales alimentados con pellet ($25.21 \pm 2.93 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$) es similar al valor basal en dieta hiposódica + ddAVP/agua ($25.07 \pm 1.71 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$), lo que sugiere que el grado final de edema cerebral en animales alimentados con pellet tras recibir una sobrecarga hídrica es similar al grado de edema presentado basalmente por los animales sometidos a una hiponatremia intermitente recurrente (dieta hiposódica + ddAVP/agua basal). El comportamiento en el tiempo de las diferentes regiones analizadas sólo fue diferente entre los grupos en el hipotálamo ($p=0.002$).

4.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

4.3.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos

En los animales del grupo dieta líquida + ddAVP/agua, la administración i.p. de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal aumentó de forma significativa la expresión de GFAP a las dos horas de la misma en SB central ($p=0.009$) y lateral ($p=0.008$), sin apreciarse cambios significativos en SG (Fig 33 B, dieta hiposódica + ddAVP/agua basal vs dieta hiposódica + ddAVP/agua 2h tras bolo agua 10%). En el análisis detallado por regiones, destaca un aumento significativo en la expresión de GFAP en cuerpo calloso central medio ($p=0.009$) y lateral izquierdo ($p=0.003$) (Tabla 6). La situación final (a las 2h de la sobrecarga hídrica) fue similar entre ambos grupos experimentales (Fig 33, pellet 2h tras bolo agua 10% vs ddAVP/agua 2h tras bolo agua 10%), a excepción del cuerpo calloso a nivel medio, donde la expresión de GFAP fue mayor en el grupo de dieta hiposódica + ddAVP/agua ($p=0.002$, tabla 6).

4.3.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos

La administración i.p. de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal aumentó de forma significativa la expresión de MBP a las dos horas de la misma en SB central ($p<0.001$) y

lateral ($p<0.001$), sin apreciarse cambios significativos en SG (Fig 3 4 B, dieta hiposódica + ddAVP/agua basal vs dieta hiposódica + ddAVP/agua 2h tras bolo agua 10%). En el análisis detallado por regiones, destaca un aumento significativo en la expresión de MBP en cuerpo calloso central y ambos cuerpos callosos laterales a nivel rostral ($p<0.005$ para las 3 comparaciones), y central a nivel caudal ($p=0.043$), así como en cápsula interna ($p=0.046$) (Tabla 7). La administración del bolo de agua no indujo cambios en SG. En SB lateral se observó un aumento del 65% en la expresión de MBP en el grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua comparado con un aumento del 38% en el grupo pellet ($p=0.05$) (Fig 34, Tabla 7, pellet 2h tras bolo agua 10% vs ddAVP/agua 2h tras bolo agua 10%).

5. MODELO DEL EFECTO PRECOZ DE SUERO SALINO HIPERTÓNICO

Se evaluaron los efectos precoces de la administración de suero salino hipertónico sobre el balance hidrosalino y la macroglía (ver apartado **1.4.4. Modelo del efecto precoz de suero salino hipertónico** en Material y Métodos, Fig 18). Los resultados se explican a continuación.

5.1. Análisis del balance hidrosalino

Se exploraron los efectos precoces (en los primeros 45 minutos) de una dosis (2 ml/100g de peso corporal) de suero salino hipertónico sobre la situación hidroelectrolítica de los animales de experimentación. En todos ellos se comprobó un aumento significativo de la osmolalidad plasmática ($p=0.025$ para la comparación en dieta pellet; $p=0.001$ para la comparación en dieta hiposódica + ddAVP/agua), si bien sólo en aquellos alimentados con dieta hiposódica y administración diaria de ddAVP/agua aumentó también la natremia ($p=0.048$) (Tabla 8, pellet basal vs pellet + NaCl3%).

Tabla 8. Comparación de los valores analíticos entre los grupos dieta pellet y dieta hiposódica + ddAVP/agua antes y después del bolo de salino hipertónico.

REGIÓN	PELLET		D. HIPOSÓDICA + DDVP/AGUA	
	BASAL	POST NaCl3%	BASAL	POST NaCl3%
Na plasmático (mEq/L)	140.25 ± 3.30	145.25 ± 2.63	141.25 ± 0.96	148.25 ± 1.71 ^{\$}
Osm plasmática (mOsm/kg)	302.67 ± 11.55	314.50 ± 4.51 *	289.33 ± 2.31	324.92 ± 4.75 ^{\$}

Los resultados se expresan como media ± DE; n=4 por grupo experimental. * $p<0.05$ comparado con Dieta Pellet Basal. \$ $p<0.05$ comparado con Dieta Hiposódica + ddAVP/agua Basal. Na: natremia; Osm: osmolalidad plasmática; NaCl3%: suero salino hipertónico.

5.2. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

5.2.1. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos

A continuación, se exploraron los efectos precoces (en los primeros 45 minutos) de una dosis (2 ml/100g de peso corporal) de suero salino hipertónico sobre la expresión de GFAP en los distintos grupos experimentales.

En animales alimentados con pellet, la expresión basal de GFAP en la SG comparada con la SB fue mayor, así como la expresión de GFAP en regiones laterales de la SB comparadas con localizaciones centrales ($p < 0.001$ para ambas comparaciones) (Fig 40 A). La administración de suero salino hipertónico no indujo cambios sobre la expresión de GFAP, salvo en cápsula interna, donde se apreció una disminución significativa de su expresión ($p = 0.02$) (Fig 40 A y Tabla 9, pellet basal vs pellet 45 min tras bolo NaCl3%).

La comparación en la expresión basal de GFAP entre la dieta pellet y la dieta hiposódica + ddAVP/agua se ha descrito en el apartado **2.4 Análisis inmunohistoquímico de la macroglía**.

En los animales del grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua, globalmente, la administración de hipertónico no tuvo un impacto significativo, aunque sí se observó que su efecto era diferente en función de la región estudiada (Fig 40 B). En estos animales se evidenció una mayor expresión de GFAP tras la administración de hipertónico en SG comparado con sustancia blanca ($p < 0.001$), y en SB lateral comparado con SB central ($p < 0.001$). En el análisis detallado por regiones, se vio un aumento de la expresión de GFAP en cuerpo calloso central rostral ($p = 0.022$) y medio ($p < 0.001$), y una disminución en cuerpo calloso caudal ($p = 0.082$) y corteza motora ($p = 0.048$) (Tabla 9). Comparado con la situación final (tras la administración del bolo de hipertónico) observada en animales alimentados con pellet, se aprecia un aumento significativo en la expresión de GFAP en la SB central en los animales que partían de una hiponatremia intermitente recurrente ($p = 0.001$) (Fig 40). Analizado en detalle, parece confirmarse dicho aumento en regiones rostrales ($p = 0.054$) y medias ($p = 0.001$) del cuerpo calloso central, mientras que en el cuerpo calloso lateral derecho la tendencia es a una menor expresión de GFAP ($p = 0.081$) (Tabla 9, dieta pellet postNaCl3% vs dieta hiposódica + ddAVP/agua postNaCl3%).

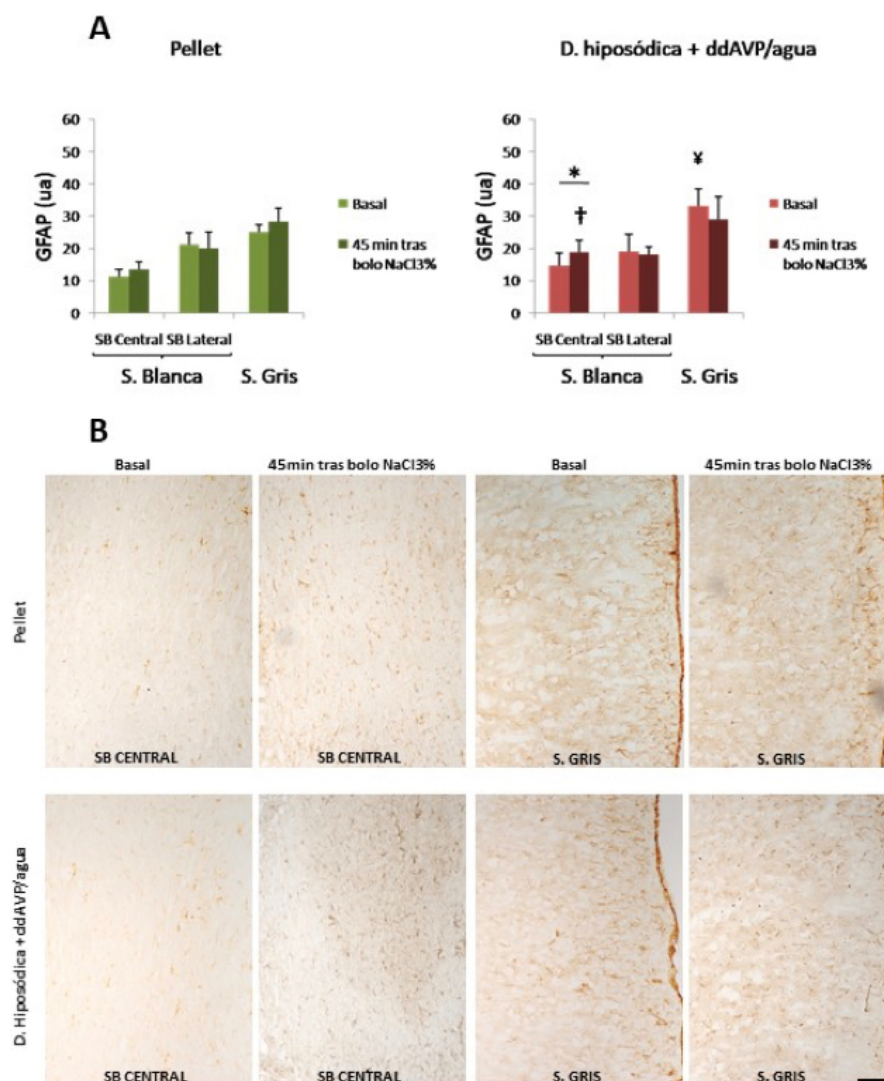


Figura 40. Efecto precoz del suero salino hipertónico: expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en unidades arbitrarias de densidad óptica (ua), antes (basal) y 45 minutos después de la administración i.p. de un bolo de suero salino hipertónico (NaCl 3%). Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo experimental. Panel A izquierdo: Animales alimentados con pellet. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor suero salino hipertónico N.S.; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción suero salino hipertónico * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S. Panel A derecho: Animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. ANOVA factorial del modelo $p<0.001$; factor suero salino hipertónico N.S.; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p<0.001$; interacción suero salino hipertónico * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S.* $p<0.05$ en la comparación de SB central antes y después de la administración de hipertónico en animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. † $p<0.05$ en la comparación de SB central a los 45 minutos del bolo de hipertónico entre animales alimentados con pellet y aquellos alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. ‡ $p<0.05$ en la comparación de sustancia gris en el momento basal entre animales alimentados con pellet y aquellos alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. Panel B: Microfotografía representativa de la expresión de GFAP en los distintos grupos experimentales. SB: sustancia blanca. S. Gris: sustancia gris.

5.2.2. Análisis inmunohistoquímico de oligodendrocitos

Tabla 9. Análisis detallado de la expresión de proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en las diferentes regiones de interés en los grupos pellet y dieta hiposódica d ddAVP/agua antes y después de la administración i.p. de un bolo de suero salino hipertónico.

REGIÓN	PELLET		D. HIPOSÓDICA + DDVP/AGUA	
	BASAL	45 MIN TRAS BOLO NaCl3%	BASAL	45 MIN TRAS BOLO NaCl3%
Cuerpo calloso central rostral	12.05 ± 2.55	14.35 ± 1.84	13.27 ± 4.17	20.33 ± 2.49 ^{\$†}
Cuerpo calloso central medio	11.62 ± 1.92	13.31 ± 2.61	11.89 ± 1.21	20.73 ± 2.22 ^{\$†}
Cuerpo calloso central caudal	9.87 ± 2.21	12.36 ± 3.40	18.95 ± 1.31 *	15.17 ± 3.98
Cuerpo calloso lateral derecho	22.34 ± 2.43	24.16 ± 4.68	22.98 ± 2.21	18.73 ± 0.35
Cuerpo calloso lateral izquierdo	20.61 ± 5.82	21.11 ± 3.44	12.84 ± 4.12	18.94 ± 2.23
Cápsula interna	20.91 ± 1.45	14.65 ± 1.50 *	21.08 ± 3.35	16.28 ± 3.18
Corteza motora	25.25 ± 1.83	26.14 ± 3.42	33.20 ± 7.16	24.16 ± 2.65 ^{\$}
Hipotálamo periventricular	24.90 ± 3.00	30.17 ± 4.54	33.24 ± 3.63 *	33.97 ± 6.75

Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media ± DE; n=4 por grupo experimental. * p<0.05 comparado con Dieta Pellet Basal. \$ p<0.05 comparado con Dieta Hiposódica + ddAVP/agua Basal. † p<0.05 comparado con Dieta Pellet tras NaCl3%. NaCl3%: suero salino hipertónico.

Basalmente, la expresión de MBP fue mayor en SB que gris en todos los animales (p<0.001), sin diferencias entre la SB central o lateral (Fig 41).

En el grupo pellet, se observó un aumento significativo en la expresión global de MBP tras la administración de un bolo de hipertónico (p=0.024), aunque éste no indujo cambios ni en SG ni en SB (central y lateral) cuando dichas regiones se estudiaron por separado. En cuerpo calloso lateral derecho e hipotálamo se observó una tendencia a una mayor expresión de MBP tras la maniobra (p=0.066 y p=0.06 respectivamente) (Tabla 10).

La comparación en la expresión de MBP entre la dieta pellet y la dieta hiposódica + ddAVP/agua se ha descrito en el apartado **2.4 Análisis inmunohistoquímico de la macroglía**.

La administración de un bolo de hipertónico no modificó la expresión de MBP en el grupo dieta hiposódica + ddAVP/agua (Fig 41 B). Tan sólo en el análisis detallado por regiones se encontró un aumento significativo de la expresión de MBP en cápsula interna (p=0.021) y en cuerpo calloso central rostral (p=0.054) (Tabla 10, dieta hiposódica+ddAVP/agua basal vs dieta hiposódica+ddAVP/agua 45 min tras bolo NaCl3%).

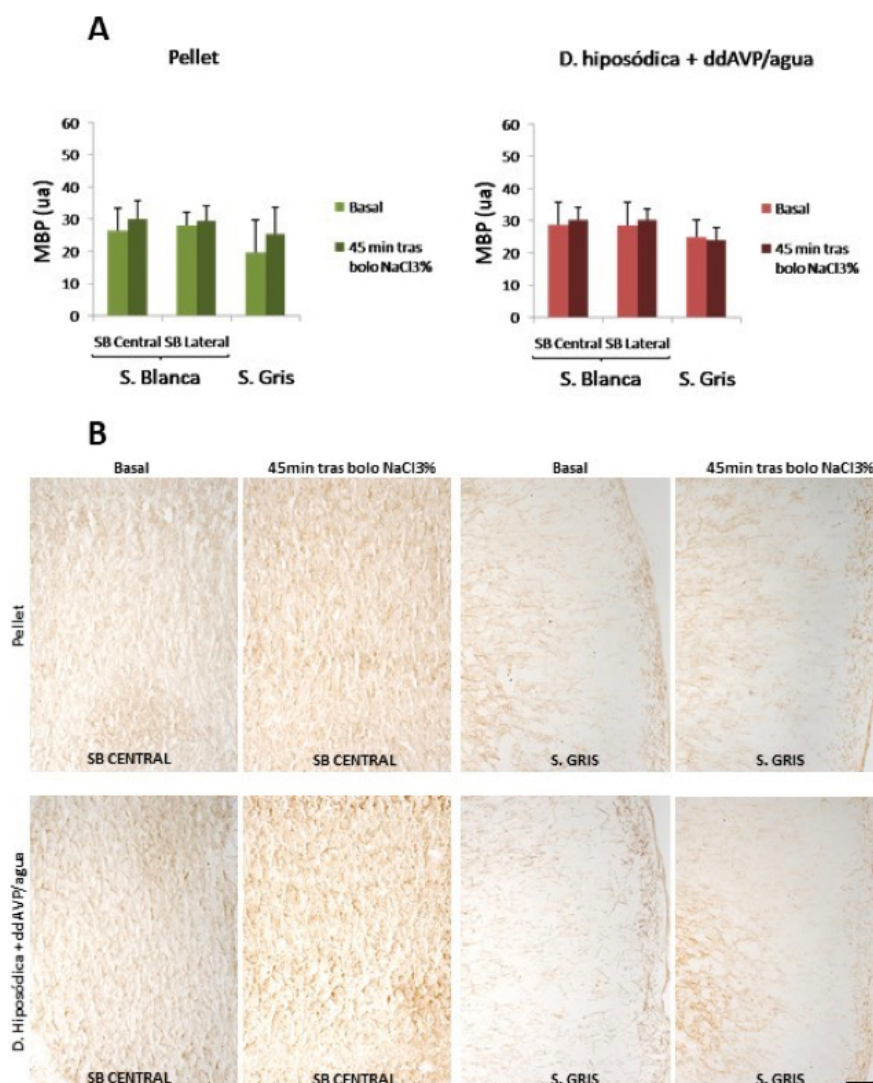


Figura 41. Efecto precoz del suero salino hipertónico: expresión de proteína básica de la mielina (MBP) en unidades arbitrarias de densidad óptica (ua), antes (basal) y 45 minutos después de la administración i.p. de un bolo de suero salino hipertónico (NaCl 3%). Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media $\pm$ DE; $n=4$ por grupo experimental. Panel A izquierdo: Animales alimentados con pellet. ANOVA factorial del modelo $p=0.014$; factor suero salino hipertónico $p=0.024$; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p=0.01$; interacción suero salino hipertónico * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S. Panel A derecho: Animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. ANOVA factorial del modelo $p=0.06$; factor suero salino hipertónico N.S.; factor región (SB central/SB Lateral/S. Gris) $p=0.009$; interacción suero salino hipertónico * región (SB central/SB Lateral/S. Gris) N.S. Panel B: Microfotografía representativa de la expresión de MBP en los distintos grupos experimentales. SB: sustancia blanca. S. Gris: sustancia gris.

Tabla 10. Análisis detallado de la expresión de proteína básica de la mielina (MBP) en las diferentes regiones de interés en los grupos pellet y dieta hiposódica d ddAVP/agua antes y después de la administración i.p. de un bolo de suero salino hipertónico.

REGIÓN	PELLET		D. HIPOSÓDICA + DDVP/AGUA	
	BASAL	45 MIN TRAS BOLO NaCl3%	BASAL	45 MIN TRAS BOLO NaCl3%
Cuerpo calloso central rostral	18.29 ± 4.18	23.30 ± 3.63	23.71 ± 5.55	32.88 ± 4.18 [†]
Cuerpo calloso central medio	31.53 ± 2.32	34.19 ± 2.21	30.80 ± 7.55	30.17 ± 4.11
Cuerpo calloso central caudal	29.46 ± 5.15	32.93 ± 1.90	32.30 ± 6.05	27.87 ± 2.37
Cuerpo calloso lateral derecho	26.98 ± 2.40	33.55 ± 2.96	33.67 ± 4.79	31.44 ± 2.51
Cuerpo calloso lateral izquierdo	28.01 ± 5.78	30.32 ± 3.53	30.25 ± 5.53	27.26 ± 2.03
Cápsula interna	29.15 ± 4.29	25.11 ± 2.06	21.83 ± 6.78	32.49 ± 2.61 ^{\$}
Corteza motora	28.24 ± 5.47	31.92 ± 2.94	28.12 ± 5.31	27.17 ± 2.02
Hipotálamo periventricular	11.09 ± 3.53	19.25 ± 5.85	21.67 ± 3.49 [*]	21.12 ± 2.46

Resultados expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica, como media ± DE; n=4 por grupo experimental. * p<0.05 comparado con Dieta Pellet Basal. \$ p<0.05 comparado con Dieta Hiposódica + ddAVP/agua Basal. † p<0.05 comparado con Dieta Pellet tras NaCl3%.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis doctoral confirman la hipótesis de que una hiponatremia intermitente recurrente, hiponatremia leve y transitoria que se recupera a las 24h de su inducción, pero que se produce de manera repetida a lo largo de varios días consecutivos, es capaz de inducir un deterioro en la memoria y el aprendizaje, así como una retención hídrica que se refleja en un mayor contenido de agua cerebral, especialmente a nivel de la SG, y una astrogliosis en la SG. Esta situación de hiponatremia intermitente recurrente parece predisponer a la SB a un mayor daño cuando se somete a los animales a una sobrecarga hídrica importante (inducción de una hiponatremia aguda). Por el contrario, la administración de un bolo de suero salino hipertónico pareció tener un efecto precoz sobre los astrocitos presentes en la SB de estos animales.

1. ALTERACIONES EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE

En una primera aproximación al concepto de hiponatremia intermitente recurrente, quisimos establecer si la administración intermitente de ddAVP, con o sin una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal, era suficiente para inducir cambios significativos en la memoria y el aprendizaje que pudieran explicar algunas de las alteraciones descritas en humanos con hiponatremia leve (78).

En nuestro caso, decidimos realizar los estudios de memoria y aprendizaje con ratones por una cuestión práctica, ya que el tamaño del laberinto de Morris es menor. Además de su validez probada para el estudio de la memoria espacial, el laberinto de Morris es sencillo y fácilmente adaptable a las condiciones de nuestro laboratorio. Nos hemos centrado en el análisis de los tiempos y trayectorias de resolución, por ser los parámetros más ampliamente utilizados para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial (57,146).

Se han estudiado las alteraciones conductuales de la hiponatremia crónica en modelos de síndrome de secreción inadecuada de ADH (SIADH) en rata y ratón mediante tests de la marcha, reconocimiento de objetos nuevos, condicionamiento del miedo y laberintos en T para valorar el deterioro cognitivo y de la memoria, encontrando que los roedores desarrollan una marcha atáxica, y en ellos se produce un deterioro en la memoria asociativa y de reconocimiento (162,163). Tanto la corteza perirrinal como el hipocampo se han implicado en estos tipos de memoria, por lo que parece que la hiponatremia afecta a diversos tipos de memoria y a múltiples áreas cerebrales implicadas en el procesamiento de la memoria (164,165). Hasta donde sabemos, no se han estudiado nunca los cambios en la memoria y aprendizaje inducidos por cambios en la tonicidad con el laberinto de Morris, pero nuestros resultados sugieren que es una herramienta útil para cuantificar el grado de deterioro en estas condiciones, observándose un alargamiento significativo tanto en los tiempos como en las trayectorias de resolución en aquellos animales sometidos a estrés osmótico.

La inyección de ddAVP de manera repetida a lo largo de varios días, independientemente de la administración concomitante de agua equivalente al 2.5% del peso corporal, empeora significativamente el rendimiento de los animales en el laberinto de Morris, tanto en ensayos repetidos a lo largo del mismo día (aprendizaje) como en días sucesivos (memoria), aunque en los animales que sí recibían agua los cambios eran más marcados. Es necesario indicar que, en este estudio, preferimos no incluir administraciones de vehículo en nuestros animales control ya que una inyección podría haber inducido la liberación de ADH en nuestros animales (166) generando un factor de confusión que habría complicado notablemente las conclusiones del presente estudio. Existen en el SNC múltiples receptores para ADH, los V1a se localizan en neuronas y células gliales en varias regiones cerebrales, y los V1b en la hipófisis anterior, estando implicados en la regulación de cambios de humor y comportamiento (167). Un estudio reciente compara los resultados en memoria entre animales control, animales con hiponatremia crónica y animales normonatremicos que habían recibido durante 6 días ddAVP en infusión continua junto con una dieta rica en sodio. Sólo en el grupo de hiponatremia crónica se encontró un deterioro de la memoria, por lo que los autores concluyeron

que no se debe a un efecto directo del ddAVP, sino de la hiponatremia per se (163). Por tanto, no parece que la administración de ddAVP sea la responsable de los cambios de comportamiento que hemos observado en este estudio.

Es importante conocer los mecanismos neurobiológicos subyacentes a este deterioro cognitivo, y el presente trabajo profundiza en el estudio de las posibles áreas cerebrales que puedan verse más afectadas por este fenómeno, tanto con estudios de neuroimagen, para estudiar la distribución de las moléculas de agua en el tejido cerebral, como con estudios de microscopía óptica e IHQ para explorar la posible afectación de astrocitos y oligodendrocitos, principales células implicadas en la regulación del volumen encefálico y procesos de mielinización.

2. HIPONATREMIA AGUDA

Ante una hiponatremia aguda se produce un edema cerebral en las primeras horas. Algunos estudios han demostrado diferencias regionales en el comportamiento del cerebro ante un estrés hipotónico agudo (132,134), pero ninguno ha realizado una valoración simultánea del medio interno, las diferencias topográficas en el edema cerebral y la respuesta glial, que es precisamente en lo que se centra esta tesis doctoral.

2.1. Balance hidrosalino

En nuestros experimentos, la administración de un bolo agua 10% peso corporal vía i.p. es capaz de inducir hiponatremia hipoosmolar aguda en animales alimentados con pellet, pero curiosamente hemos observado hemoconcentración, aumentando el hematocrito un 8% tras la administración de la sobrecarga hídrica. Si bien la inyección i.p. de agua ha sido utilizada clásicamente como modelo animal de hiponatremia dilucional aguda (83,90,92,93,97,98,121–131), algunos autores proponen que la administración i.p. de una sobrecarga hídrica en realidad provoca una redistribución de sodio hacia el líquido peritoneal, ahora hipotónico con respecto al espacio extracelular, provocando reducción del volumen plasmático y hemoconcentración (133), como hemos observado nosotros. Así mismo, hubiéramos esperado encontrar una dilución significativa de la orina de estos animales, como resultado de la disminución en la osmolalidad plasmática. Sin embargo, aunque sí se observó una reducción en el valor absoluto de osmolalidad urinaria, dicha diferencia no alcanzó la significación estadística en nuestro estudio. Esto podría deberse al mecanismo propuesto por Overgaard-Steensen *et al* (133) en el que la reducción en el volumen plasmático podría haber estimulado la secreción de ADH endógena, aumentando la reabsorción de agua a nivel renal. Una explicación alternativa podría ser que el corto periodo de observación (dos horas) no sea suficiente para alcanzar la máxima dilución urinaria posible.

Por tanto, la administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal induce una marcada hiponatremia (descenso agudo de 27 mEq/L) hipoosmolar en animales alimentados con pellet. Quisimos evaluar si en esta situación se producían cambios en la distribución del agua intra y extracelular a nivel encefálico, para lo cual estudiamos la evolución temporal del ADC.

2.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

Nuestros resultados muestran que el contenido inicial de agua intracelular en animales alimentados con pellet varía en función de la región del encéfalo estudiada. Encontramos un valor menor de ADC en la SB comparado con la SG, sugiriendo un mayor contenido de agua intracelular a ese nivel. Estos resultados son contrarios a lo reportado por otros autores, quienes encuentran un menor con-

tenido de agua en la SB que en el encéfalo completo, y argumentan que puede ser debido al alto contenido lipídico de la mielina (132). Sin embargo, nuestros datos son similares a los reportados por Kuroiwa *et al* (168) en gatos. Este mismo grupo de investigación demostró en un modelo de edema vasogénico por daño cerebral criogénico una diferencia en las propiedades biomecánicas de la SG y la SB, mostrando en la primera las moléculas de agua un movimiento aleatorio (difusión isotrópica), mientras que en la segunda la direccionalidad de los axones puede condicionar la dirección del movimiento de las partículas de agua (difusión anisotrópica), cuestión que ha de tenerse en cuenta al interpretar las diferencias en los valores observados de ADC (151,169).

A su vez, en nuestros experimentos, el hipotálamo fue la región con menor contenido de agua intracelular, lo que lo convierte en una región ideal para funcionar como sensor osmótico, responsable de la regulación de la secreción de ADH. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que es posible que la selección de las ROIs en los mapas de ADC haya podido dejar sin incluir áreas con alto poder osmorregulador. De hecho, algunos estudios sugieren que el contenido en agua en el hipotálamo es mayor, tanto en condiciones fisiológicas (170) como en individuos con obesidad, en quienes este hecho que se ha puesto en relación con la inflamación inducida por esta condición (171).

Tras la administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal, observamos a lo largo de las dos horas siguientes, una reducción progresiva en los valores de ADC (por tanto, un aumento relativo del agua intracelular), tanto en encéfalo completo como en hipotálamo. No hemos observado cambios en el comportamiento de la SG (corteza, hipocampo y caudado-putamen). Nuestro estudio incluye una amplia representación de áreas del encéfalo, además de la valoración del encéfalo completo. La mayoría de los estudios publicados se centran en la valoración del ADC en hipocampo y corteza en modelos de hiponatremia aguda en rata, y encuentran una disminución de un 10% aproximadamente comparado con animales control (163,172,173). Sólo unos pocos estudios valoran diferencias regionales en la respuesta a la hiponatremia aguda por intoxicación acuosa. Amiry-Moghaddam *et al* (92) fueron los primeros en describir un descenso precoz de los valores de ADC en cerebelo comparado con otras regiones de SG, como la corteza y el estriado, cambios que atribuyen a una diferente distribución espacial de AQP4. Overgaard-Steensen *et al* (132) estudian el encéfalo completo y una representación de SG (tálamo) y SB en un modelo de hiponatremia aguda en cerdo. Encuentran una reducción progresiva en los valores de ADC del encéfalo completo, atribuyéndolo a la extrusión de LCR y sangre fuera del cráneo como consecuencia del edema intracelular, lo que modificaría el cociente agua intracelular/extracelular. Sin embargo, estos mismos autores describen en su trabajo que no hay cambios en el tiempo en los valores de ADC en tálamo y SB. Atribuyen la ausencia de cambios en el ADC a posibles cambios proporcionales en la cantidad de agua intra y extracelular, al no existir en el área talámica una cantidad significativa de LCR que pueda ser desplazado (133). Nosotros tampoco hemos encontrado cambios en el comportamiento de SG, incluyendo nuestro estudio una representación más extensa de la misma que en los trabajos anteriores, excluyendo así mismo áreas de LCR. Por el contrario, hemos observado en SB un aumento en los valores de ADC, lo que indicaría una disminución relativa de la cantidad de agua intracelular. El espacio extracelular parece ser el mayor determinante del ADC efectivo. En un modelo de isquemia aguda en gatos, se demostró un descenso de ADC tanto en SG como en SB, secundario a un edema intracelular a nivel astrocitario en SG, y a nivel tanto de astrocitos como de oligodendrocitos en SB. Además, se observó un acúmulo de agua en los axones, así como un aumento del espacio periaxonal en fibras mielinizadas. En este estudio, además encuentran un comportamiento diferencial en la respuesta a la isquemia de SG y SB, que consideran están en relación con la distinta distribución de agua en cada una de las sustancias (168). Un acúmulo de agua predominantemente en el espacio extracelular en la SB como el descrito podría justificar nuestros hallazgos (aumento progresivo de ADC en SB tras una sobrecarga hídrica).

Con ánimo de explorar en mayor profundidad si existen diferencias en la respuesta a la administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal entre astrocitos y oligodendrocitos, procedimos a comparar la expresión de sus marcadores respectivos, GFAP y MBP, en los cerebros de animales alimentados con pellet, sometidos o no a dicho choque hipotónico.

2.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

Quisimos investigar el efecto de una hiponatremia aguda (sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso corporal) en ratas alimentadas con pellet sobre la expresión de GFAP y MBP.

Globalmente, la expresión de GFAP fue mayor en SG que en SB. Por el contrario, MBP se expresó más en SB que en SG, por la mayor presencia fisiológica de oligodendrocitos a ese nivel (25,174).

La administración de la sobrecarga hídrica provocó un aumento en la expresión de GFAP y MBP a nivel de SB (sobre todo central), sin que se apreciaran cambios en SG. Estos resultados sugieren que la inducción de una hiponatremia aguda provoca una activación de las células gliales, pero pone de manifiesto una respuesta diferencial entre las diferentes regiones encefálicas, siendo la SB más sensible al daño. Estos resultados son congruentes con los observados al analizar la evolución temporal del ADC en esta misma situación, donde no se apreciaron cambios en SG, pero por el contrario en SB se vio un aumento progresivo del valor de ADC, como se acaba de discutir. Tomados en su conjunto, podríamos interpretar estos resultados como que la activación glial en SB a consecuencia de la hiponatremia aguda induce cambios que se traducen en una extrusión de agua al espacio extracelular. El aumento en el marcaje de GFAP puede deberse a un aumento en su síntesis o a un desacoplamiento entre los haces de filamentos y la membrana celular secundario al edema celular (140), por tanto, y especialmente teniendo en cuenta que la hiponatremia aguda induce un aumento del volumen intracelular, nuestros resultados deben interpretarse con cautela. Varios estudios más demuestran por microscopía de barrido láser multifotón y electrónica un acúmulo de agua intracelular a nivel astrociario tras la inducción de una hiponatremia aguda (126,128,134). Es posible que el grado de edema demostrado por técnicas de microscopía avanzada en estos estudios no sea suficiente para inducir una activación de los astrocitos, de hecho, en el trabajo realizado por Ramírez de Noriega *et al* (134) en un modelo de intoxicación acuosa en cerdos, el examen con microscopía óptica de las muestras de tejido no demostró gliosis ni cambios morfológicos con tinción de hematoxilina-eosina en los ganglios basales, tálamo, SB cerebral y tronco encefálico.

3. HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE

No se ha estudiado hasta la fecha si el hecho de presentar una hiponatremia intermitente, pero recurrente en el tiempo, es relevante. Este fue el objetivo principal de esta tesis: valorar los efectos de una administración intermitente de ddAVP asociado con una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal a nivel del balance hidrosalino, la distribución del agua cerebral y la activación glial.

3.1. Balance hidrosalino

Nuestros hallazgos sugieren que los animales alimentados con pellets están en una situación inicial de retención hídrica. La ingesta de grandes cantidades de sodio y potasio con dicha dieta probablemente causa un cierto grado inicial de deshidratación intracelular por aumento de la osmolalidad del medio interno, lo que estimula el mecanismo de la sed y una respuesta osmótica de ADH, con el objetivo último de aumentar la retención de agua y preservar la homeostasis. Nuestros resultados corroboran lo publicado por Kitada *et al* (175), quienes comprueban que, tras aumentar la ingesta de sodio en la dieta, se produce un reciclaje de urea a nivel renal, aumentando la concentración de la misma en la médula renal, lo que permite recuperar agua. Este mecanismo evita una diuresis osmótica secundaria al aumento en la excreción urinaria de iones que conduciría a la deshidratación del individuo. El grupo japonés observó una disminución en el aclaramiento de agua libre y una reducción proporcional en los aportes de la urea a la osmolalidad final de la orina, resultados reproducidos en nuestro trabajo.

Observamos que, durante la semana de administración diaria de ddAVP/agua a animales alimentados con pellets, estos redujeron su ingesta calórica. Sin embargo, y contrario a lo que sería de esperar, no perdieron peso, sino que éste se mantuvo estable. Interpretamos estos hechos como resultado de una retención hidrosalina inducida por el tratamiento. Un estudio reciente apoya nuestra interpretación, al demostrar que la administración continua de ddAVP a animales alimentados con pellet induce un aumento en la expresión renal de AQP2, favoreciendo por tanto la retención hídrica (162). Sin embargo, hemos observado una cierta resistencia a la acción de ddAVP en el grupo pellet, ya que la orina no se concentra de manera eficaz. Esto parece ser el resultado de la presencia de un osmol oculto en la orina, que fija las pérdidas urinarias de agua. El efecto de la administración de ddAVP/agua en los animales alimentados con pellets es despreciable y se ve sobrepasado por la composición de esta dieta, no encontrándose diferencias en la osmolalidad urinaria, el volumen de diuresis o el aclaramiento de agua libre tras la intervención.

La utilización de una dieta con menor contenido en sodio y menor residuo sólido es esencial para desarrollar modelos murinos de hiponatremia, hecho muy relevante de cara a los estudios preclínicos con fármacos que pueden producir un SIADH, ya que, si se mantiene la dieta estándar de los animales de experimentación, pasará desapercibida la inducción del mismo durante las fases iniciales del desarrollo de fármacos. La aparición de SIADH asociado a medicamentos en condiciones de vida real es cada vez más frecuente (176–196).

Ante los resultados obtenidos en animales alimentados con pellets, en los que dicha dieta induce una situación de antiacuarexis difícil de modificar, decidimos explorar el uso de una dieta hiposódica gelificada.

Los animales alimentados con dieta hiposódica perdieron peso de forma marcada a lo largo del periodo de observación. Si bien es posible que parte de la pérdida ponderal observada se deba al hecho de que la dieta líquida en la reconstitución empleada en este trabajo (diluida 4 veces respecto a las recomendaciones del fabricante por una cuestión de palatabilidad) es hipocalórica con respecto a los pellet (0,24cal/g vs 4cal/g), no consideramos que ésta sea la única causa, ya que los animales tenían acceso no restringido al alimento y está bien establecido que al reducir en un 7% la ingesta de sodio se induce una pérdida de peso del 2% a lo largo de 5 ó 6 días (197). En nuestro caso, se produjo una reducción de un 75% en la ingesta diaria de sodio, lo que podría llegar a justificar hasta un 20% de pérdida ponderal. El cambio a dieta hiposódica aumentó el volumen de diuresis, el aclaramiento de agua libre y redujo en la osmolalidad urinaria, lo cual podría reflejar una reducción de la producción endógena de ADH, como ya se ha descrito en otros estudios (162).

La vida media del ddAVP es de 8-12h, por lo que es esperable encontrar una normalización de la natremia a las 24h de su administración, tras un descenso inicial en las primeras horas. Por eso es especialmente llamativo que en los animales alimentados con dieta hiposódica sí parece inducir una retención neta de agua, evidenciada por la inversión de la tendencia a la pérdida ponderal, la reducción del volumen de diuresis y del aclaramiento de agua libre, con la consiguiente concentración de la orina, sugiriendo que el organismo no es capaz de deshacerse por completo de la sobrecarga de agua incluso cuando el sodio sérico ya se ha corregido. Kawakami *et al* obtuvieron resultados comparables a los nuestros: el cambio de una dieta pellet a una dieta líquida asociada con una infusión continua de ddAVP, que indujo hiponatremia crónica a lo largo de 3 semanas, diluyó 5 veces la orina y aumentó el volumen de diuresis de forma significativa (162).

En un modelo de hiponatremia crónica en ratón, la administración de ddAVP a animales alimentados con dieta líquida aumentó la expresión de AQP2 en el riñón, justificando la retención hídrica (162). Si bien nuestro modelo no induce una hiponatremia crónica, es posible que uno de los mecanismos implicados en la retención hídrica que observamos durante la hiponatremia intermitente recurrente sea similar. Sería interesante evaluar los niveles de expresión de AQP2 a nivel renal como uno de los posibles mecanismos implicados en la retención hídrica que observamos también en nuestro modelo.

Por tanto, aunque la administración diaria de ddAVP/agua no logra inducir una hiponatremia crónica mantenida en el tiempo, presumiblemente por la corta vida media del fármaco, la hiponatremia intermitente, repetida durante varios días consecutivos, es capaz de inducir una retención hídrica sin repercusión aparente en el medio interno. A esta situación, que no hemos encontrado descrita en la literatura hasta la fecha, la hemos denominado hiponatremia intermitente recurrente, cuya trascendencia clínica deberá ser estudiada en humanos, ya que en determinadas patologías (cirrosis, insuficiencia cardíaca) existe una tendencia a mantener natremias en el límite bajo de la normalidad, y ciertos fármacos utilizados con frecuencia en estas condiciones, como los diuréticos, cuya vida media suele ser inferior a las 24h y cuya dosificación suele ser una vez al día, podrían inducir hiponatremias leves de horas de duración que actualmente estén pasando desapercibidas, pero que podrían tener una repercusión sobre síntomas cognitivos o la calidad de vida de los pacientes.

3.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

La administración de ddAVP y una dosis diaria de agua equivalente al 2.5% del peso del animal no logra inducir una hiponatremia crónica, pero sí produce una hiponatremia leve y transitoria que se recupera a las 24h de su administración. En esta situación se observó que el valor basal de ADC en el encéfalo completo en estos animales era significativamente más bajo que en los animales alimentados con pellet. Este hallazgo sugiere que en los animales sometidos a una hiponatremia intermitente recurrente se produce un aumento del agua intracelular a nivel encefálico, que hipotetizamos es secundario a la retención hídrica que parece producirse en este grupo como se acaba de discutir. Es decir, unas horas de hiponatremia al día, incluso con la corrección de la misma en las primeras 24h, si se mantiene en el tiempo, es suficiente para inducir cambios en el grado de edema cerebral, que si bien son sutiles, son estadísticamente significativos y podrían tener relevancia clínica. Esta situación no se había descrito previamente, hasta donde hemos podido averiguar, ya que se asume que la corrección de una hiponatremia aguda en las primeras horas no tiene consecuencias duraderas (70). Además, el grado de hiponatremia que hemos inducido es leve, situación a la que con frecuencia no se le da valor en clínica humana (78–80,198,199).

Al analizar por separado las diferentes regiones del encéfalo, observamos que el valor de ADC fue también más bajo que en animales alimentados con pellet en SG, pero no hubo diferencias en hipotálamo ni en SB. Estos resultados sugieren que el exceso de agua acumulado durante la fase de hiponatremia intermitente recurrente se localiza en SG, presumiblemente a nivel astrocitario (169,200), y refuerzan la hipótesis de que el escaso contenido de agua a nivel hipotalámico podría estar en relación con su papel osmorregulador.

Una explicación alternativa, y que deberá ser sujeto de investigaciones futuras, es el posible efecto de la administración repetida de ddAVP a nivel cerebral, independientemente de la natremia, si bien Fujisawa *et al* no encontraron diferencias en un estudio de comportamiento sólo con la administración de ddAVP en animales normonatremicos (163). Tampoco se puede descartar por completo que al menos parte de los cambios observados se deban a las diferencias entre ambas dietas, y no al efecto de la administración de ddAVP/agua.

La espectroscopia por RMN obtiene un espectro que refleja la cantidad de metabolitos en la zona de interés de diferentes regiones del encéfalo (158).

Se ha descrito una reducción en la concentración de determinados osmolitos en diversas regiones cerebrales como adaptación a la hiponatremia crónica, cuyo objetivo es la restauración del volumen encefálico (201). Quisimos evaluar la potencial adaptación del cerebro a una situación de hiponatremia intermitente recurrente. Para ello, se realizó espectroscopia *in-vivo* de los principales osmolitos cerebrales. Se eligió el caudado-putamen como región de estudio por ser fácil de identificar, profunda y de adecuada resolución espacial. No se observaron diferencias significati-

vas en la cuantificación de osmolitos en los animales con hiponatremia intermitente recurrente al normalizarlos a la señal de agua. Para evitar que un posible aumento del agua intracelular dificultara la interpretación de la cuantificación de osmolitos, se optó por la normalización a la señal de agua, en lugar de al contenido de creatina. Por tanto, no hemos podido demostrar que exista una adaptación cerebral análoga a la observada en la hiponatremia crónica en esta nueva situación de hiponatremia intermitente recurrente. Serán necesarios estudios más amplios, que incluyan más regiones cerebrales, ya que el caudado-putamen puede no ser representativo del comportamiento del encéfalo global, y con técnicas más sensibles, como la espectroscopia ex-vivo (202), antes de poder afirmar o descartar que exista una adaptación cerebral a la hiponatremia intermitente recurrente en términos de extrusión de osmolitos.

3.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

En los animales que habían sido alimentados con dieta hiposódica y que habían recibido ddAVP/agua, es decir, en aquellos animales sometidos a una hiponatremia intermitente recurrente, observamos un aumento en la expresión de GFAP a nivel de la SB comparado con aquellos animales alimentados con pellet. Este resultado, asociado al hallazgo de un menor valor inicial de ADC en este grupo de hiponatremia intermitente recurrente, sugiere que unas horas de hiponatremia al día quizá sean suficientes para producir un acúmulo de agua a nivel astrocitario en SB, lo que podría contribuir a explicar la astrogliosis vista.

En nuestro experimento, no se observó ningún cambio en la expresión de MBP en los animales sometidos a hiponatremia intermitente recurrente comparado con el grupo pellet. De nuevo, este resultado es consistente con la ausencia de diferencias significativas en el valor de ADC inicial en SB en ambos grupos experimentales. Este hecho probablemente refleja que la hiponatremia intermitente recurrente no induce lesiones en el oligodendrocito, y el tiempo de observación es probablemente demasiado corto como para observarse cambios en la mielina.

4. AGUDIZACIÓN DE HIPONATREMIA INTERMITENTE RECURRENTE

Quisimos evaluar si los animales sometidos a hiponatremia intermitente recurrente eran más sensibles al daño inducido por una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal, comparado con aquellos alimentados con pellet. En humanos, algunos pacientes con síntomas graves presentan un elemento de hiponatremia aguda sobreimpuesto a una hiponatremia crónica (64).

4.1. Balance hidrosalino

La administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal induce hiponatremia hipoosmolar aguda también en animales alimentados con dieta hiposódica + ddAVP/agua. Sin embargo, en ellos no objetivamos hemoconcentración, y la orina tampoco se diluyó de forma significativa. Estos resultados hacen pensar que la retención hídrica inducida por la administración repetida de ddAVP impide detectar dichos cambios, incluso cuando aumentamos el contenido hipotónico en la cavidad peritoneal (133).

4.2. Coeficiente de difusión aparente (ADC)

En aquellos animales alimentados con dieta hiposódica y que recibieron ddAVP/agua durante una semana también se observó un descenso progresivo y significativo en los valores de ADC a lo largo

de las dos primeras horas tras la administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% de su peso. Con respecto a lo observado tras el choque osmótico en animales alimentados con pellet, la velocidad de descenso del ADC fue significativamente menor. Las diferencias entre ambos grupos tendieron a desaparecer, siendo el nivel de edema intracelular final similar. Esto sugiere una menor entrada de agua al espacio intracelular en la hiponatremia intermitente recurrente. Esto podría deberse a un menor gradiente osmótico transmembrana, si la fuerza iónica intracelular estuviera disminuida en caso de existir una adaptación cerebral a la hiponatremia intermitente recurrente (137). Otra posibilidad es que se induzcan cambios post-transcripcionales en los transportadores de osmolitos, aumentando su extrusión al espacio extracelular y disminuyendo en consecuencia la entrada de agua al interior de la célula, con un mecanismo análogo al visto en situaciones de hipertonicidad (3), si bien dichos cambios no se han estudiado en situaciones de hipotonicidad. Por último, una *down-regulación* de AQP4 en esta situación también podría reducir la entrada de agua al interior celular, como se ha descrito en situaciones similares (203–205).

Una explicación alternativa sería que, de forma secundaria al aumento de volumen intracelular inicialmente inducido por la hiponatremia intermitente recurrente, se hubiera producido una extrusión de sangre y LCR fuera del cráneo según lo discutido anteriormente (132), y por lo tanto ante una sobrecarga hídrica importante el cambio en el cociente volumen intracelular/extracelular no fuera tan llamativo.

Al analizar por separado la SG en el grupo de hiponatremia intermitente recurrente, observamos un ascenso significativo pero de pequeña magnitud en el ADC (pendiente $0.05 \pm 0.02 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$) que no fue diferente de lo observado en animales alimentados con pellet, donde la pendiente no varió significativamente. Por tanto, queda por confirmar la relevancia fisiopatológica de este discreto ascenso en el ADC. En SB se confirma lo observado en animales alimentados con pellet, es decir un ascenso progresivo en los valores de ADC, resultado que apoya una respuesta diferencial a la hipotonicidad entre astroglia y oligodendroglia, como sugieren algunos autores (92).

4.3. Análisis inmunohistoquímico de astrocitos y oligodendrocitos

La administración de una sobrecarga hídrica equivalente al 10% del peso del animal a ratas alimentadas con dieta hiposódica + AVP/agua indujo un aumento en la expresión tanto de GFAP como de MBP en la SB, sin apreciarse cambios en SG. La situación final tras la administración del bolo de agua fue similar a la observada en animales alimentados con pellet sometidos a una hiponatremia aguda. Por tanto, tomando todos los resultados en su conjunto, parece que la administración de una sobrecarga hídrica, independientemente de la situación de partida del animal, produce una activación de la macroglía, concretamente de los astrocitos, a nivel de la SB y no de la SG, junto con un aumento en la formación o engrosamiento de la vaina de mielina.

Es interesante que tras la administración de una sobrecarga hídrica a los animales sometidos a hiponatremia intermitente recurrente se aprecie un aumento discreto pero significativo del ADC en SG a lo largo del periodo de observación (pendiente $0.05 \pm 0.002 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{seg}$, $p=0.002$), que sin embargo no se ve reflejado en un cambio en la expresión de GFAP. Es posible que el cambio en el volumen a nivel astrocitario en este caso no sea suficiente como para inducir astrogliosis.

Por último, quisimos evaluar el efecto de la administración de un bolo de suero salino hipotónico, clásicamente reservado para el tratamiento de los síntomas graves de la hiponatremia, en nuestros modelos, donde la natremia es normal pero existen cambios cerebrales que presumiblemente implican a la glía, para explorar los efectos precoces de dicha maniobra.

5. EFECTO PRECOZ DEL SUERO SALINO HIPERTÓNICO

La administración de un bolo de suero salino hipertónico provocó un aumento de la natremia y la osmolalidad plasmática, consistentes pero de pequeña magnitud, en ambos grupos experimentales (pellet y dieta hiposódica ddAVP/agua).

En animales alimentados con pellet, no se observaron efectos tras los primeros 45 minutos de la administración de suero salino hipertónico en ninguna de las regiones estudiadas, salvo por un descenso en la expresión de GFAP en cápsula interna, no objetivado en regiones laterales pero más anteriores de SB. En animales alimentados con dieta hiposódica ddAVP/agua (hiponatremia intermitente recurrente), la administración de un bolo de hipertónico indujo un aumento en la expresión de GFAP en SB central, especialmente en regiones rostrales y medias. La expresión de GFAP a los 45 min de la administración del hipertónico es mayor en la SB central del grupo dieta hiposódica ddAVP/agua que en el grupo pellet, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad al daño astrocitario en estos animales. Los resultados anteriores podrían sugerir la existencia de un gradiente temporal de respuesta a los estímulos anisomóticos, en el que las regiones más anteriores o centrales podrían responder antes al daño.

No se observaron cambios en la expresión de MBP en ninguno de los grupos experimentales tras la administración de un bolo de suero salino hipertónico.

El papel central de la lesión astrocitaria durante las fases iniciales de la DMO está cada vez mejor establecido (95). De confirmarse, nuestros resultados serían los primeros en apuntar a una afectación tan precoz en el contexto del aumento en la osmolalidad. A su vez, la estrecha comunicación entre astrocitos y oligodendrocitos acaba redundando en las lesiones desmielinizantes que típicamente aparecen unos días tras la corrección brusca de la hiponatremia, por lo que es probable que 45 minutos sean insuficientes para reflejar una alteración en la mielina. Por otro lado, es posible que el grado de daño inducido por la hiponatremia intermitente recurrente no sea suficiente para predisponer a lesiones desmielinizantes. Finalmente, las regiones elegidas para estudiar la SB no son las más afectadas por la DMO, lo que puede estar influyendo en la ausencia de cambios observados (206).

En resumen, hemos descrito un nuevo modelo de hipotonicidad, la hiponatremia intermitente recurrente. La vida media del ddAVP hace que su administración una vez al día junto con una dosis diaria de agua no logre inducir una hiponatremia crónica, pero sí una hiponatremia intermitente, que si se repite en el tiempo es suficiente para inducir una retención hídrica y un aumento en el contenido intracelular de agua cerebral, que parece localizarse a nivel astrocitario. Además, parece ser capaz de inducir también cambios cuantificables en el aprendizaje y la memoria. Esta situación, tal y como se ha indicado a lo largo de esta Tesis Doctoral, podría tener una gran relevancia clínica, aunque es preciso realizar estudios prospectivos en humanos para determinar en qué situaciones patológicas, o en relación a la administración de qué fármacos, se observa esta condición, así como establecer la prevalencia, progresión y severidad de la misma.

La respuesta regional a los cambios en la osmolalidad en el SNC es diferente, ya sean hipo o hipertónicos. A partir de nuestros resultados de RM e IHQ, parece que las diferencias observadas podrían traducir una diferente respuesta de los astrocitos y los oligodendrocitos productores de mielina a la anisotonicidad, así como un gradiente de respuesta temporal entre las diferentes regiones.

El contenido osmolar de la dieta es importante, ya que la dieta hiperosmolar (pellet) parece impedir una mayor concentración de la orina, lo que podría dificultar la detección de SIADH durante el desarrollo preclínico de fármacos.

LIMITACIONES

Nuestro trabajo tiene una serie de limitaciones. En primer lugar, hemos usado dos especies diferentes, el ratón y la rata, para el desarrollo de los experimentos. Esto ha obedecido a razones eminentemente prácticas, ya que los estudios de comportamiento eran técnicamente más sencillos usando especies más pequeñas, y la rata ofrece por su mayor tamaño mejor resolución espacial para los estudios de imagen e inmunohistoquímica. En cualquier caso, está ampliamente aceptado el uso del laberinto de agua de Morris en ratones (147–149) y es razonable pensar que los resultados obtenidos por este medio serían extrapolables desde dicha especie.

Todos los animales de experimentación utilizados en los estudios de balance hidrosalino, RM e IHQ son hembras. En experimentos piloto llevados a cabo en nuestro laboratorio en 2013, se observó un inicio precoz de los síntomas de la hiponatremia aguda en hembras, asociado con un mayor grado de edema cerebral, comparado con los machos, ante los mismos estímulos hipotónicos (207). Es conocido que las hembras son más sensibles a los cambios inducidos por la hiponatremia (82–84,208), y varios estudios en modelos animales utilizan sólo hembras, en base posiblemente a este hecho (132–134). Si bien esta elección limita la generalización de nuestros resultados, aumenta la homogeneidad de la muestra utilizada, lo que es una ventaja en vista del pequeño número de animales utilizado. Será necesario en un futuro estudiar posibles diferencias entre machos y hembras en la respuesta cerebral a la hiponatremia intermitente recurrente.

Una de las principales limitaciones del presente trabajo es el reducido tamaño muestral empleado en algunos de los experimentos descritos. Especialmente en el caso de los estudios de comportamiento, este hecho se ha tenido en cuenta a la hora de establecer las conclusiones del presente trabajo, aunque dichos ensayos nos han servido para confirmar en modelos animales las observaciones existentes en humanos (78–80). Nuestro trabajo pretendía poner a punto un nuevo modelo experimental, la hiponatremia intermitente recurrente, por lo que el número de animales de experimentación utilizados se redujo al mínimo, al buscar los diseños sólo la prueba de concepto, ya que dicho modelo no está establecido en la literatura. Si nuestros hallazgos se confirman, se podrán explorar otras áreas relevantes con este modelo, como el estudio de la expresión de AQP4 como mediadora de la entrada de agua a los astrocitos a través de la BHE (209), o la expresión de las conexinas 43 y 47, responsables de las *tight-junctions* entre astrocitos y oligodendrocitos y necesarias para la adecuada función de la mielina (210).

Por el diseño utilizado, no podemos descartar que los cambios atribuidos a la administración de ddAVP/agua no estén influidos, al menos parcialmente, por la diferencia en las dietas. Tras haber comprobado que la administración de ddAVP/agua a los animales alimentados con pellet no inducía una mayor retención hídrica, se optó por utilizar este grupo como comparador al ser la situación del medio interno equivalente a la observada en animales alimentados con dieta hiposódica y tratados diariamente con ddAVP/agua.

La toxicidad de los anestésicos generales sobre el SNC ha sido objeto de estudio durante años. Los datos en roedores demuestran una influencia de la dosis y duración de la exposición al anestésico, y de la edad y el sexo del animal, en el grado de deterioro neurocognitivo inducido, siendo éste más probable en edades extremas de la vida y con administraciones repetidas o prolongadas de ciertos fármacos (211). Además, se utilizó la dosis mínima necesaria de sevoflurano durante la fase de mantenimiento. Para excluir un efecto de la sedación sobre parámetros fisiológicos que pudieran afectar de forma indirecta a la actividad cerebral (150), se realizó un control sobre dos individuos control sometidos al mismo esquema de sedación que los grupos experimentales, sin apreciarse cambios significativos en las variables medidas a lo largo del tiempo de observación. Si bien Tian et al (212) comprobaron que el uso de sevoflurano no afecta a la expresión de GFAP en animales control, no podemos descartar por completo que nuestros resultados puedan estar influidos, al menos parcialmente, por un efecto de la sedación prolongada.

Los estudios de RM no tienen resolución celular, por lo que sólo podemos hipotetizar que los cambios vistos en ADC reflejen de hecho movimiento neto de agua del compartimento extracelular al

intracelular y viceversa. Además, hay que tener en cuenta la limitada resolución espacial de las DWI, lo que dificulta la selección de algunas ROIs, particularmente en la región del hipotálamo. Por ello, complementamos estos estudios con análisis IHQ, que nos han permitido determinar la afectación de astrocitos y oligodendrocitos, los tipos celulares que, según la literatura, mostrarían una mayor afectación en estas situaciones. En los estudios de IHQ nos hemos centrado principalmente en el estudio detallado de la SB, ya que por la resolución espacial de la RM resultaba difícil obtener ROIs significativas si se elegían regiones diferenciadas de la misma. Sin embargo, sería deseable ampliar el estudio de SG mediante IHQ, para poder obtener además una mayor representatividad y profundizar en las potenciales diferencias entre regiones. En concreto, en un futuro debería prestarse especial atención al hipocampo y el cerebelo, ambas regiones muy implicadas en el aprendizaje, la memoria y las funciones motoras. Así mismo, sería interesante utilizar otras técnicas para la valoración de la morfología celular, como la microscopía electrónica o de barrido láser multifotón (126,128,134).

CONCLUSIONES

1. La hiponatremia intermitente recurrente es un nuevo modelo experimental que modeliza una situación no descrita hasta la fecha, una hiponatremia leve y transitoria, pero repetida en el tiempo.
2. La hiponatremia intermitente recurrente pone de manifiesto la importancia de la retención hídrica, incluso con natremia normal, en los efectos sobre el SNC y la aparición de deterioro cognitivo.
3. El laberinto de Morris es una herramienta útil para estudiar el aprendizaje y la memoria en diferentes condiciones de hipotonicidad.
4. La dieta hiperosmolar (pellet) evita la concentración de la orina, impidiendo detectar los efectos de dosis elevadas de acetato de desmopresina, lo que puede ser relevante en el desarrollo preclínico de fármacos que puedan inducir un síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética.
5. La distinta distribución regional de agua en el encéfalo pone de relieve una respuesta diferenciada entre la sustancia gris y la sustancia blanca tras una sobrecarga hídrica importante.
6. Tanto la hiponatremia intermitente recurrente como la hiponatremia aguda y la administración de suero salino hipertónico presentan efectos precoces sobre los astrocitos y los oligodendrocitos, sentando las bases para estudios futuros que exploren posibles diferencias temporales y regionales de estas células ante los diferentes estímulos.
7. Este estudio pone de manifiesto la importancia de las pequeñas fluctuaciones en la natremia, que si, se mantienen en el tiempo, pueden traducir una situación subyacente de retención hídrica con consecuencias a nivel del sistema nervioso central, lo que a su vez podría tener una repercusión sobre los síntomas cognitivos o la calidad de vida de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borga M, West J, Bell JD, Harvey NC, Romu T, Heymsfield SB, et al. Advanced body composition assessment: from body mass index to body composition profiling. *J InvestigMed*. 2018 Jun;66(5):1–9.
2. Durán Sánchez F, Rodríguez Rodríguez FJ. "Capítulo 24: Composición y compartimientos líquidos del organismo". Pg 368- 376. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
3. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev*. 2009 Jan;89(1):193–277.
4. Sharma GS, Krishna S, Khan S, Dar TA, Khan KA, Singh LR. Protecting thermodynamic stability of protein: The basic paradigm against stress and unfolded protein response by osmolytes. *Int J Biol-Macromol*. 2021 Apr 30;177:229–40.
5. Giebisch, Windhager E. "Chapter 32: Organization of the urinary system". Pg 737- 756. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1a edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
6. Cachofeiro V, Lahera V, Tresguerres JAF. "Capítulo 25: Aspectos anatomofuncionales del riñón". Pg 377- 385. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
7. García-Estañ J, Ortiz MC, Atucha NM. "Capítulo 26: Hemodinámica renal y filtración glomerular". Pg 386- 395. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
8. Tejedor A. "Capítulo 27: Manejo tubular del filtrado glomerular". Pg 396- 409. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
9. Caramelo C. "Capítulo 28: Regulación del volumen y la osmolaridad de los líquidos corporales. Mecanismos de concentración y dilución de la orina". Pg 410- 422. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
10. Salazar FJ, Llinás MT. "Capítulo 29: Regulación humoral de la función renal". Pg 423- 430. En "Fisiología humana". Editores: Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Martínez Verano JA, Mora Teruel F, Rodríguez Roisin R, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, Zarco Gutiérrez P. 2a edición. 1999. McGraw Hill – Interamericana de España, SAU. ISBN 84-486-0237-4.
11. Giebisch G, Windhager E. "Chapter 34: Transport of sodium and chloride". Pg 774- 789. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1a edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
12. Giebisch G, Windhager E. "Chapter 35: Transport of urea, glucose, phosphate, calcium, magnesium and organic". Pg 790- 813. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1a edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.

13. Giebisch G, Windhager E. "Chapter 36: Transport of potassium by the tubules". Pg 814- 827. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1ª edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
14. Giebisch G, Windhager E. "Chapter 37: Urine concentration and dilution". Pg 827- 844. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1ª edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
15. Welling PA, Ho K. A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. Am J Physiol-Ren Physiol. 2009 Oct;297(4):F849–63.
16. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Apr;286(4):F599-605.
17. Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. Am J Physiol-Ren Physiol. 1997 Jan;272(1):F3–12.
18. Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S, Marumo F. Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. J Am Soc Nephrol. 1997 Jun 1;8(6):861–7.
19. Hozawa S, Holtzman EJ, Ausiello DA. cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. Am J Physiol-Cell Physiol. 1996 Jun;270(6):C1695–702.
20. Prager-Khoutorsky M, Bourque CW. Mechanical Basis of Osmosensory Transduction in Magnocellular Neurosecretory Neurons of the Rat Supraoptic Nucleus. J Neuroendocrinol. 2015;27(6):507–15.
21. Giebisch G, Windhager E. "Chapter 39: Integration of salt and water balance". Pg 861- 876. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1ª edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
22. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. Nat Rev Neurosci. 2003 Dec;4(12):991-1001.
23. Tébar Massó FJ, Portillo Ortega P. "Chapter 12: Neurohipófisis. Diabetes insípida. Secreción inadecuada de vasopresina". Pg 117- 128. En "Endocrinología". Editores: Albarrán J. 2ª edición. 2010. Editorial Médica Panamericana, S.A, Madrid. ISBN 978-84-9835-235-1.
24. Kamel KS, Halperin ML. "Chapter 10: Hyponatremia". Pg 265-308. In "Fluid, electrolyte and acid-base physiology. A problem-based approach". 5ª edición. 2017. Elsevier, Philadelphia. ISBN 978-0-323-35515-5.
25. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev. 2001 Apr;81(2):871-927.
26. Bunge RP. Glial cells and the central myelin sheath. Physiol Rev. 1968 Jan;48(1):197–251.
27. Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N. Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse 'shiverer.' Neurosci Lett. 1979 Apr 1;12(1):107–12.
28. Roach A, Takahashi N, Pravtcheva D, Ruddle F, Hood L. Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. Cell. 1985 Aug 1;42(1):149–55.
29. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. Cell Mol Life Sci CMLS. 2006 Sep 1;63(17):1945–61.
30. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. Eur J Neurol. 2019;26(1):27–40.
31. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. Science. 2010 Nov 5;330(6005):774–8.

32. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front Hum Neurosci*. 2016 Nov 8;10:566.
33. Liu B, Teschemacher AG, Kasparov S. Neuroprotective potential of astroglia. *J Neurosci Res*. 2017;95(11):2126–39.
34. Shulyatnikova T, Verkhatsky A. Astroglia in Sepsis Associated Encephalopathy. *Neurochem Res*. 2020;45(1):83–99.
35. Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS, Abrams CK. Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci*. 2007 Dec 19;27(51):13949–57.
36. Nagy JI, Rash JE. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Rev*. 2000 Mar 24;32(1):29–44.
37. Giaume C. Astroglial wiring is adding complexity to neuroglial networking. *Front Neuroenergetics*. 2010 Sep 20;2:129.
38. Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1551–5.
39. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Front Cell Dev Biol*. 2016 Jun 28;4:71.
40. Tress O, Maglione M, May D, Pivneva T, Richter N, Seyfarth J, et al. Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J Neurosci*. 2012 May 30;32(22):7499–518.
41. Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Develop*. 2018 May 1;13:7.
42. Durkee CA, Araque A. Diversity and specificity of astrocyte-neuron communication. *Neuroscience*. 2019 Jan 1;396:73–8.
43. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314–8.
44. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 17;7:45.
45. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol*. 2007;81(6):1345–51.
46. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):3974–80.
47. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011 Dec 1;128(6):309–16.
48. García-Cáceres C, Balland E, Prevot V, Luquet S, Woods SC, Koch M, et al. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci*. 2019 Jan;22(1):7–14.
49. Bigio D, R M. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 Jan 1;119(1):55–73.
50. Ransom BR. "Chapter 10: Organization of the nervous system". Pg 257-279. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1a edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
51. Amaral DG. "Chapter 17: The anatomical organization of the central nervous system". Pg 317-336. In "Principles of neural science". Editores: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 4a edición. 2000. McGraw Hill, USA. ISBN 0-8385-7701-6.

52. Xu RX, Grigoryev N, Li TL, Bian HS, Zhang R, Liu XY. Development of hexagonal maze procedure for evaluating memory in rat. *Biomed Rep.* 2013;1(1):134–8.
53. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. "Chapter 62: Learning and memory". Pg 1227-1246. In "Principles of neural science". Editores: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 4a edición. 2000. McGraw Hill, USA. ISBN 0-8385-7701-6.
54. Okano H, Hirano T, Balaban E. Learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12403–4.
55. Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2009 Nov 5;203(2):151–64.
56. Zlotnik G, Vansintjan A. Memory: an extended definition. *Front Psychol.* 2019 Nov 7;10:2523.
57. Othman MZ, Hassan Z, Che Has AT. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Exp Anim.* 2022;71(3):264–80.
58. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971 Nov 12;34(1):171–5.
59. O'Keefe J. A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol.* 1979 Jan 1;13(4):419–39.
60. Bush D, Barry C, Burgess N. What do grid cells contribute to place cell firing? *Trends Neurosci.* 2014 Mar;37(3):136–45.
61. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 2014;55(2):310–32.
62. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Feb;7(2):a021808.
63. Tan HM, Wills TJ, Cacucci F. The development of spatial and memory circuits in the rat. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci.* 2017 May;8(3).
64. Adrogué HJ, Tucker BM, Madias NE. Diagnosis and management of hyponatremia: a review. *JAMA.* 2022 Jul 19;328(3):280.
65. Burst V. Etiology and epidemiology of hyponatremia. *Front Horm Res.* 2019;52:24-35.
66. Davila CD, Udelson JE. Hypervolemic hyponatremia in heart failure. *Disord Fluid Electrolyte Metab.* 2019;52:113–29.
67. Solà E, Ginès P. Hypervolemic hyponatremia (Liver). *Disord Fluid Electrolyte Metab.* 2019;52:104–12.
68. Wald R, Jaber BL, Price LL, Upadhyay A, Madias NE. Impact of hospital-associated hyponatremia on selected outcomes. *Arch Intern Med.* 2010 Feb 8;170(3):294–302.
69. Corona G, Giuliani C, Parenti G, Norello D, Verbalis JG, Forti G, et al. Moderate hyponatremia is associated with increased risk of mortality: evidence from a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2013 Dec 18;8(12):e80451.
70. Seay NW, Leich RW, Greenberg A. Diagnosis and management of disorders of body tonicity—hyponatremia and hypernatremia: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis.* 2020 Feb;75(2):272–86.
71. Selmer C, Madsen JC, Torp-Pedersen C, Gislason GH, Faber J. Hyponatremia, all-cause mortality, and risk of cancer diagnoses in the primary care setting: A large population study. *Eur J Intern Med.* 2016 Dec 1;36:36–43.
72. Corona G, Giuliani C, Parenti G, Colombo GL, Sforza A, Maggi M, et al. The economic burden of hyponatremia: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2016 Aug 1;129(8):823-835.e4.

73. Boscoe A, Paramore C, Verbalis JG. Cost of illness of hyponatremia in the United States. *Cost Eff Resour Alloc*. 2006 May 31;4:10.
74. Corona G, Giuliani C, Verbalis JG, Forti G, Maggi M, Peri A. Hyponatremia Improvement Is Associated with a Reduced Risk of Mortality: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2015 Apr 23;10(4):e0124105.
75. Yoshioka K, Matsue Y, Kagiya N, Yoshida K, Kume T, Okura H, et al. Recovery from hyponatremia in acute phase is associated with better in-hospital mortality rate in acute heart failure syndrome. *J Cardiol*. 2016 May 1;67(5):406–11.
76. Donzé JD, Beeler PE, Bates DW. Impact of Hyponatremia Correction on the Risk for 30-Day Re-admission and Death in Patients with Congestive Heart Failure. *Am J Med*. 2016 Aug;129(8):836–42.
77. Berardi R, Santoni M, Newsom-Davis T, Caramanti M, Rinaldi S, Tiberi M, et al. Hyponatremia normalization as an independent prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line therapy. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;8(14):23871–9.
78. Renneboog B, Musch W, Vandemergel X, Manto MU, Decaux G. Mild Chronic Hyponatremia Is Associated With Falls, Unsteadiness, and Attention Deficits. *Am J Med*. 2006 Jan;119(1):71.e1-71.e8.
79. Geboy AG, Filmyer DM, Josiassen RC. Motor Deficits Associated With Mild, Chronic Hyponatremia: A Factor Analytic Study. *J MotBehav*. 2012 Jul;44(4):255–9.
80. Carlos Ayus J, Negri AL, Kalantar-Zadeh K, Moritz ML. Is chronic hyponatremia a novel risk factor for hip fracture in the elderly? *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Oct 1;27(10):3725–31.
81. Kheetan M, Ogu I, Shapiro JI, Khitan ZJ. Acute and chronic hyponatremia. *Front Med*. 2021 Aug 3;8:693738.
82. Arieff AI, Kozniowska E, Roberts TP, Vexler ZS, Ayus JC, Kucharczyk J. Age, gender, and vasopressin affect survival and brain adaptation in rats with metabolic encephalopathy. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1995 May;268(5):R1143–52.
83. Fraser CL, Kucharczyk J, Arieff AI, Rollin C, Sarnacki P, Norman D. Sex differences result in increased morbidity from hyponatremia in female rats. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1989 Apr;256(4):R880–5.
84. Arieff AI. Hyponatremia, convulsions, respiratory arrest, and permanent brain damage after elective surgery in healthy women. *N Engl J Med*. 1986 Jun 12;314(24):1529–35.
85. Sun XL, Ding JH, Fan Y, Zhang J, Gao L, Hu G. Aquaporin 4 regulates the effects of ovarian hormones on monoamine neurotransmission. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 9;353(2):457–62.
86. Edwards KM, Burns VE, Ring C, Carroll D. Individual differences in the interleukin-6 response to maximal and submaximal exercise tasks. *J Sports Sci*. 2006 Aug;24(8):855–62.
87. Siegel AJ, Verbalis JG, Clement S, Mendelson JH, Mello NK, Adner M, et al. Hyponatremia in marathon runners due to inappropriate arginine vasopressin secretion. *Am J Med*. 2007 May 1;120(5):461.e11-461.e17.
88. Swart RM, Hoorn EJ, Betjes MG, Zietse R. Hyponatremia and inflammation: the emerging role of Interleukin-6 in osmoregulation. *Nephron Physiol*. 2010 Dec 22;118(2):p45–51.
89. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Mar;36(3):513–38.
90. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000 Feb;6(2):159–63.

91. Shenaq M, Kassem H, Peng C, Schafer S, Ding JY, Fredrickson V, et al. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 α after traumatic brain injury (TBI). *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1):134–40.
92. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug F, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, et al. Alpha syntrophin deletion removes the perivascular but not the endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):542–4.
93. Vajda Z, Pedersen M, Füchtbauer EM, Wertz K, Stødkilde-Jørgensen H, Sulyok E, et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):13131–6.
94. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2004 Feb;286(2):C426–32.
95. Nicaise C, Marneffe C, Bouchat J, Gilloteaux J. Osmotic demyelination: from an oligodendrocyte to an astrocyte perspective. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 5;20(5):1124.
96. Melton JE, Nattie EE. Intracranial volume adjustments and cerebrospinal fluid pressure in the osmotically swollen rat brain. *Am J Physiol.* 1984 Apr;246(4 Pt 2):R533–41.
97. Melton JE, Nattie EE. Brain and CSF water and ions during dilutional and isosmotic hyponatremia in the rat. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 1983 May;244(5):R724–32.
98. Melton JE, Patlak CS, Pettigrew KD, Cserr HF. Volume regulatory loss of Na, Cl, and K from rat brain during acute hyponatremia. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1987 Apr;252(4):F661–9.
99. Arieff AI, Llach F, Massry SG. Neurological manifestations and morbidity of hyponatremia: correlation with brain water and electrolytes. *Medicine (Baltimore).* 1976 Mar;55(2):121–9.
100. GankamKengne F, Decaux G. Hyponatremia and the brain. *Kidney Int Rep.* 2018 Jan;3(1):24–35.
101. Lien YH, Shapiro JI, Chan L. Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest.* 1990 May;85(5):1427–35.
102. Lien YH, Shapiro JI, Chan L. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest.* 1991 Jul 1;88(1):303–9.
103. Lien YH. Role of organic osmolytes in myelinolysis. A topographic study in rats after rapid correction of hyponatremia. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1579–86.
104. Adrogue HJ, Madias NE. Hyponatremia. *N Engl J Med.* 2000 May 25;342(21):1581–9.
105. Soupart A, Penninckx R, Namias B, Stenuit A, Perier O, Decaux G. Brain myelinolysis following hypernatremia in rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Jan 1;55(1):106–13.
106. Brown WD. Osmotic demyelination disorders: central pontine and extrapontine myelinolysis. *Curr Opin Neurol.* 2000 Dec;13(6):691–7.
107. Pearce JMS. Central Pontine Myelinolysis. *Eur Neurol.* 2009;61(1):59–62.
108. Sterns RH, Silver SM. Brain volume regulation in response to hypo-osmolality and its correction. *Am J Med.* 2006 Jul;119(7):S12–6.
109. Kleinschmidt-DeMasters BK, Rojiani AM, Filley CM. Central and extrapontine myelinolysis: then...and now. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Jan 1;65(1):1–11.
110. Burkewitz K, Choe K, Strange K. Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in *C. elegans*. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2011 Sep;301(3):C566–76.

111. Choe KP, Strange K. Genome-wide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of damaged proteins as an essential hypertonic stress response. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2008 Dec;295(6):C1488–98.
112. Bouchat J, Couturier B, Marneffe C, Gankam-Kengne F, Balau B, De Swert K, et al. Regional oligodendrocytopathy and astrocytopathy precede myelin loss and blood-brain barrier disruption in a murine model of osmotic demyelination syndrome. *Glia*. 2018 Mar;66(3):606–22.
113. Popescu BFG, Bunyan RF, Guo Y, Parisi JE, Lennon VA, Lucchinetti CF. Evidence of aquaporin involvement in human central pontine myelinolysis. *Acta NeuropatholCommun*. 2013 Dec;1(1):40.
114. DeLuca G, Nagy Zs, Esiri M, Davey P. Evidence for a role for apoptosis in central pontine myelinolysis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002 Jun 1;103(6):590–8.
115. GankamKengne F, Nicaise C, Soupart A, Boom A, Schiettecatte J, Pochet R, et al. Astrocytes are an early target in osmotic demyelination syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Oct;22(10):1834–45.
116. Giuliani C, Peri A. Effects of hyponatremia on the brain. *J Clin Med*. 2014 Oct 28;3(4):1163–77.
117. Benvenuti S, Deledda C, Luciani P, Modi G, Bossio A, Giuliani C, et al. Low extracellular sodium causes neuronal distress independently of reduced osmolality in an experimental model of chronic hyponatremia. *NeuroMolecular Med*. 2013 Sep 1;15(3):493–503.
118. Garrahy A, Dineen R, Hannon AM, Cuesta M, Tormey W, Sherlock M, et al. Continuous versus bolus infusion of hypertonic saline in the treatment of symptomatic hyponatremia caused by SIAD. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Sep 1;104(9):3595–602.
119. Baek SH, Jo YH, Ahn S, Medina-Liabres K, Oh YK, Lee JB, et al. Risk of overcorrection in rapid intermittent bolus vs slow continuous infusion therapies of hypertonic saline for patients with symptomatic hyponatremia. *JAMA Intern Med*. 2021 Jan;181(1):1–12.
120. Chifu I, Gerstl A, Lengenfelder B, Schmitt D, Nagler N, Fassnacht M, et al. Treatment of symptomatic hyponatremia with hypertonic saline: a real-life observational study. *Eur J Endocrinol*. 2021 Feb 25;184(5):647–55.
121. Woodbury DM. Effect of acute hyponatremia on distribution of water and electrolytes in various tissues of the rat. *Am J Physiol-Leg Content*. 1956 May;185(2):281–6.
122. Dila CJ, Pappius HM. Cerebral water and electrolytes. An experimental model of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Arch Neurol*. 1972 Jan;26(1):85–90.
123. Olson JE, Katz-Stein A, Reo NV, Jolesz FA. Evaluation of acute brain edema using quantitative magnetic resonance imaging: Effects of pretreatment with dexamethasone. *MagnReson Med*. 1992;24(1):64–74.
124. Nagelhus EA, Lehmann A, Ottersen OP. Neuronal-glial exchange of taurine during hypo-osmotic stress: A combined immunocytochemical and biochemical analysis in rat cerebellar cortex. *Neuroscience*. 1993 Jun 1;54(3):615–31.
125. Nagelhus EA, Lehmann A, Ottersen OP. Neuronal and glial handling of glutamate and glutamine during hypoosmotic stress: A biochemical and quantitative immunocytochemical analysis using the rat cerebellum as a model. *Neuroscience*. 1996 Jun 1;72(3):743–55.
126. Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP. Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia*. 2008 Jun;56(8):895–902.
127. Thrane AS, Rappold PM, Fujita T, Torres A, Bekar LK, Takano T, et al. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca²⁺ signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Jan 11;108(2):846–51.

128. Steier R, Aradi M, Pál J, Perlaki G, Orsi G, Bogner P, et al. A biexponential DWI study in rat brain intracellular oedema. *Eur J Radiol*. 2012 Aug;81(8):1758–65.
129. Yamaguchi M, Wu S, Ehara K, Nagashima T, Tamaki N. Cerebral blood flow of rats with water-intoxicated brain edema. *Acta NeurochirSuppl (Wien)*. 1994;60:190-2.
130. Yeung PKK, Lo ACY, Leung JWC, Chung SSM, Chung SK. Targeted overexpression of endothelin-1 in astrocytes leads to more severe cytotoxic brain edema and higher mortality. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Dec 1;29(12):1891–902.
131. Kozler P, Riljak V, Pokorný J. Both water intoxication and osmoticBBB disruption increase brain water content in rats. *Physiol Res*. 2013 Nov 30;S75–80.
132. Overgaard-Steensen C, Stødkilde-Jørgensen H, Larsson A, Broch-Lips M, Tønnesen E, Frøkiaer J, et al. Regional differences in osmotic behavior in brain during acute hyponatremia: an in vivo MRI-study of brain and skeletal muscle in pigs. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*. 2010 Aug;299(2):R521-532.
133. Overgaard-Steensen C, Stødkilde-Jørgensen H, Larsson A, Tønnesen E, Frøkiaer J, Ring T. The frequently used intraperitoneal hyponatraemia model induces hypovolaemic hyponatraemia with possible model-dependent brain sodium loss. *Exp Physiol*. 2016 01;101(7):932–45.
134. Ramirez de Noriega F, Manley GT, Moscovici S, Itshayek E, Tamir I, Fellig Y, et al. A swine model of intracellular cerebral edema – Cerebral physiology and intracranial compliance. *J Clin Neurosci*. 2018 Dec;58:192–9.
135. Thurston JH, Hauhart RE, Nelson JS. Adaptive decreases in amino acids (taurine in particular), creatine, and electrolytes prevent cerebral edema in chronically hyponatremic mice: Rapid correction (experimental model of central pontine myelinolysis) causes dehydration and shrinkage of brain. *Metab Brain Dis*. 1987 Dec;2(4):223–41.
136. Verbalis JG. An experimental model of syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion in the rat. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1984 Oct;247(4):E540–53.
137. Verbalis JG, Drutarosky MD. Adaptation to chronic hypoosmolality in rats. *Kidney Int*. 1988 Sep;34(3):351–60.
138. Verbrugge FH, Grodin JL, Wilfried M, Taylor DO, Starling RC, Tang WHW. Transient Hyponatremia during Hospitalization for Acute Heart Failure. *Am J Med*. 2016 Jun;129(6):620–7.
139. Chang CH, Chuang CH, Lee CT, Liao JJ. Recurrent hyponatremia after traumatic brain injury. *Am J Med Sci*. 2008 May 1;335(5):390–3.
140. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *BrainPathol*. 1994 Jul;4(3):229-37.
141. Ficha técnica Minurin.https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/61413/FT_61413.pdf[Acceso 17/9/22]
142. Runkle I, Villabona C, Navarro A, Pose A, Formiga F, Tejedor A, Poch E; EuropeanHyponatremia Network. El tratamiento de la hiponatremia secundaria al síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética [The treatment of hyponatremia secondary to the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion]. *Med Clin (Barc)*. 2013 Dec 7;141(11):507.e1-507.e10.
143. BD Rose y TW Post. “Trastornos de los electrolitos y del equilibrio ácido-base”. Editores: BD Rose y TW Post. 5ª edición. 2005. Marbán libros, S.L., Madrid. ISBN 84-7101-352-5.
144. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47–60.
145. D’Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev*. 2001 Aug;36(1):60–90.

146. Mohseni F, Ghorbani Behnam S, Rafaiee R. A Review of the historical evolutionary process of dry and water maze tests in rodents. *Basic Clin Neurosci*. 2020;11(4):389–402.
147. Baeta-Corral R, Giménez-Llort L. Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the Morris water maze in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease. *BehavNeurosci*. 2015;129:129–37.
148. Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris Water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS ONE*. 2015 Apr 17;10(4):e0124521.
149. Sankowski R, Huerta TS, Kalra R, Klein TJ, Strohl JJ, Al-Abed Y, et al. Large-scale validation of the paddling pool task in the clockmaze for studying hippocampus-based spatial cognition in mice. *Front BehavNeurosci*. 2019;13:121.
150. Wang R, Foniok T, Wamsteeker JI, Qiao M, Tomanek B, Vivanco RA, et al. Transient blood pressure changes affect the functional magnetic resonance imaging detection of cerebral activation. *NeuroImage*. 2006 May 15;31(1):1–11.
151. Sener RN. Diffusion MRI: apparent diffusion coefficient (ADC) values in the normal brain and a classification of brain disorders based on ADC values. *Comput Med Imaging Graph*. 2001 Jul 1;25(4):299–326.
152. van Gelderen P, de Vleeschouwer MHM, DesPres D, Pekar J, van Zijl PCM, Moonen CTW. Water diffusion and acute stroke. *MagnReson Med*. 1994;31(2):154–63.
153. Norris DG, Niendorf T, Leibfritz D. Healthy and infarcted brain tissues studied at short diffusion times: The origins of apparent restriction and the reduction in apparent diffusion coefficient. *NMR Biomed*. 1994;7(7):304–10.
154. Wick M, Nagatomo Y, Prielmeier F, Frahm J. Alteration of intracellular metabolite diffusion in rat brain in vivo during ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995 Oct;26(10):1930–3; discussion 1934.
155. Hori M, Kamiya K, Murata K. Technical basics of diffusion-weighted imaging. *MagnReson Imaging Clin N Am*. 2021 May;29(2):129–36.
156. Obenaus A, Badaut J. Role of the non-invasive imaging techniques in monitoring and understanding the evolution of brain edema. *J Neurosci Res*. 2022;100(5):1191–200.
157. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2009.
158. Bothwell JHF, Griffin JL. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol Rev*. 2011;86(2):493–510.
159. Rodríguez-Arias M, Montagud-Romero S, Guardia Carrión AM, Ferrer-Pérez C, Pérez-Villalba A, Marco E, et al. Social stress during adolescence activates long-term microglia inflammation insult in reward processing nuclei. *PLoS ONE*. 2018 Oct 26;13(10):e0206421.
160. Gomes FV, Llorente R, Del Bel EA, Viveros MP, López-Gallardo M, Guimarães FS. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophr Res*. 2015 May 1;164(1):155–63.
161. Garrido A, De La Serna M, De La Fuente M, Marco EM, López-Gallardo M. Neuronal and glial region dependent changes in female mice from a model of premature aging. *Exp Gerontol*. 2021 Apr 1;146:111224.
162. Kawakami T, Fujisawa H, Nakayama S, Yoshino Y, Hattori S, Seino Y, et al. Vasopressin escape and memory impairment in a model of chronic syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in mice. *Endocr J*. 2021;68(1):31–43.
163. Fujisawa H, Sugimura Y, Takagi H, Mizoguchi H, Takeuchi H, Izumida H, et al. Chronic hyponatremia causes neurologic and psychologic impairments. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016 Mar;27(3):766–80.

164. Holland PC, Bouton ME. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Apr 1;9(2):195–202.
165. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008 Jul 1;32(5):1055–70.
166. Shepshelovich D, Leibovitch C, Klein A, Zoldan S, Milo G, Shochat T, et al. The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion: Distribution and characterization according to etiologies. *Eur J Intern Med.* 2015 Dec 1;26(10):819–24.
167. Zeynalov E, Jones SM, Elliott JP. Vasopressin and vasopressin receptors in brain edema. *Vitam Horm.* 2020;113:291-312.
168. Kuroiwa T, Nagaoka T, Ueki M, Yamada I, Miyasaka N, Akimoto H. Different apparent diffusion coefficient. *Stroke.* 1998 Apr;29(4):859–65.
169. Kuroiwa T, Ueki M, Chen Q, Ichinose S, Okeda R. Is the swelling in brain edema isotropic or anisotropic? *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1994;60:155–7.
170. Schwab M, Bauer R, Zwiener U. The distribution of normal brain water content in Wistar rats and its increase due to ischemia. *Brain Res.* 1997 Feb 21;749(1):82–7.
171. Kullmann S, Abbas Z, Machann J, Shah NJ, Scheffler K, Birkenfeld AL, et al. Investigating obesity-associated brain inflammation using quantitative water content mapping. *J Neuroendocrinol.* 2020;32(12):e12907.
172. Sevic RJ, Kanda F, Mintorovitch J, Arieff AI, Kucharczyk J, Tsuruda JS, Norman D, Moseley ME. Cytotoxic brain edema: assessment with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology.* 1992 Dec;185(3):687-90.
173. Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, et al. The influence of benzamil hydrochloride on the evolution of hyponatremic brain edema as assessed by in vivo MRI study in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 2011 Oct 1;153(10):2091–7.
174. Ransom BR. "Chapter 16: The neuronal microenvironment". Pg 399- 419. In "Medical physiology". Editores: Boron WF, Boulpaep EL. 1a edición. 2005. Elsevier Saunders Philadelphia, Pennsylvania. ISBN 1-4160-2328-3.
175. Kitada K, Daub S, Zhang Y, Klein JD, Nakano D, Pedchenko T, et al. High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J Clin Invest.* 2017 Apr 17;127(5):1944–59.
176. Luzecky MH, Burman KD, Schultz ER. The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone associated with amitriptyline administration. *South Med J.* 1974 Apr;67(4):495–7.
177. Holt WL ten, van Iperen CE, Schrijver G, Bartelink AKM. Severe hyponatremia during therapy with fluoxetine. *Arch Intern Med.* 1996 Mar 25;156(6):681–2.
178. Jackson C, Carson W, Markowitz J, Mintzer J. SIADH associated with fluoxetine and sertraline therapy. *Am J Psychiatry.* 1995 May;152(5):809–10.
179. Liu BA, Mittmann N, Knowles SR, Shear NH. Hyponatremia and the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone associated with the use of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of spontaneous reports. *CMAJ Can Med Assoc J.* 1996 Sep 1;155(5):519–27.
180. Movig KLL, Leufkens HGM, Lenderink AW, van den Akker VGA, Hodiament PPG, Goldschmidt HMJ, et al. Association between antidepressant drug use and hyponatraemia: a case-control study. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Apr;53(4):363–9.
181. Peterson JC, Pollack RW, Mahoney JJ, Fuller TJ. Inappropriate Antidiuretic Hormone: Secondary to a Monamine Oxidase Inhibitor. *JAMA.* 1978 Apr 3;239(14):1422–3.

182. Peck V, Shenkman L. Haloperidol-induced syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Clin Pharmacol Ther.* 1979 Oct;26(4):442–4.
183. Meinders AE, Cejka V, Robertson GL. The antidiuretic action of carbamazepine in man. *Clin Sci Mol Med.* 1974 Oct;47(4):289–99.
184. Gold PW, Robertson GL, Ballenger JC, Kaye W, Chen J, Rubinow DR, et al. Carbamazepine diminishes the sensitivity of the plasma arginine vasopressin response to osmotic stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983 Nov;57(5):952–7.
185. Flegel K m., Cole C h. Inappropriate antidiuresis during carbamazepine treatment. *Ann Intern Med.* 1977 Dec;87(6):722–3.
186. Van Amelsvoort Th, Bakshi R, Devaux CB, Schwabe S. Hyponatremia associated with carbamazepine and oxcarbazepine therapy: a review. *Epilepsia.* 1994;35(1):181–8.
187. Kuz GM, Manssourian A. Carbamazepine-Induced hyponatremia: assessment of risk factors. *Ann Pharmacother.* 2005 Nov 1;39(11):1943–6.
188. Holtschmidt-Täschner B, Soyka M. Hyponatremia-induced seizure during carbamazepine treatment. *World J Biol Psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry.* 2007;8(1):51–3.
189. Dong X, Leppik IE, White J, Rarick J. Hyponatremia from oxcarbazepine and carbamazepine. *Neurology.* 2005 Dec 27;65(12):1976–8.
190. Nielsen OA, Johannessen AC, Bardrum B. Oxcarbazepine-induced hyponatremia, a cross-sectional study. *Epilepsy Res.* 1988 Jul 1;2(4):269–71.
191. Ikeda K, Moriyasu H, Yasaka M, Oita J, Yamaguchi T. [Valproate related syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH)--a case report]. *RinshoShinkeigaku.* 1994 Sep;34(9):911–3.
192. Robertson GL, Bhoopalam N, Zelkowitz LJ. Vincristine neurotoxicity and abnormal secretion of antidiuretic hormone. *Arch Intern Med.* 1973 Nov 1;132(5):717–20.
193. Ravikumar TS, Grage TB. The syndrome of inappropriate ADH secretion secondary to vinblastine-bleomycin therapy. *J Surg Oncol.* 1983 Nov;24(3):242–5.
194. Raftopoulos H. Diagnosis and management of hyponatremia in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2007 Dec 1;15(12):1341–7.
195. Berghmans T. Hyponatremia related to medical anticancer treatment. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer.* 1996 Sep;4(5):341–50.
196. Frahm H, von Hülst M. [Increased secretion of vasopressin and edema formation in high dosage methotrexate therapy]. *Z Gesamte Inn Med.* 1988 Aug 1;43(15):411–4.
197. Tejedor A. “Capítulo 35: Diuréticos”. Pg 533- 582. En “Tratado de hipertensión”. Editores: Rodicio JL, Romero JC, Ruilope LM. 2a edición. 1993. Fundación para el Estudio de las Enfermedades Cardiovasculares. ISBN 84-86241-52-9.
198. Singer GG, Brenner BM. Fluid and electrolytes disturbances. In: Braunwald E, et al. eds. *Harrison’s Principles of Internal Medicine.* 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:271-282. In.
199. Lauriat SM, Berl T. The hyponatremic patient: practical focus on therapy. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Oct 1;8(10):1599–607.
200. Rojiani AM, Prineas JW, Cho ES. Electrolyte-induced demyelination in rats. 1. Role of the blood-brain barrier and edema. *Acta Neuropathol.* 1994;88(4):287-92.
201. Videen JS, Michaelis T, Pinto P, Ross BD. Human cerebral osmolytes during chronic hyponatremia. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest.* 1995 Feb 1;95(2):788–93.

202. Llorente R, Villa P, Marco EM, Viveros MP. Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience*. 2012 Jan 10;201:12–9.
203. Pan C fei, Zhu S mei, Zheng Y ying. Ammonia induces upregulation of aquaporin-4 in neocortical astrocytes of rats through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Jul;123(14):1888–92.
204. Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, et al. Hyperosmolar mannitol stimulates expression of Aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem*. 2003 Nov;278(45):44525–34.
205. He Z, Wang X, Wu Y, Jia J, Hu Y, Yang X, Li J, Fan M, Zhang L, Guo J, Leung MC. Treadmill pre-training ameliorates brain edema in ischemic stroke via down-regulation of aquaporin-4: an MRI study in rats. *PLoS One*. 2014 Jan 9;9(1):e84602.
206. Martin RJ. Central pontine and extrapontine myelinolysis: the osmotic demyelination syndromes. *J NeurolNeurosurgPsychiatry*. 2004 Sep 1;75(suppl 3):iii22–8.
207. Melendo Viu M, Morales Tirado A, Vila Zárata C, Lizasoain I, Tejedor A. Caracterización de un modelo de edema cerebral osmótico por secreción inadecuada de ADH. Trabajo fin de grado en medicina con nivel de master, curso 2012-2013. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. España.
208. Ashouri OS. Severediuretic-induced hyponatremia in the elderly: a series of eight patients. *Arch Intern Med*. 1986 Jul 1;146(7):1355–7.
209. Benfenati V, Caprini M, Dovizio M, Mylonakou MN, Ferroni S, Ottersen OP, et al. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2563–8.
210. May D, Tress O, Seifert G, Willecke K. Connexin47 protein phosphorylation and stability in oligodendrocytes depend on expression of connexin43 protein in astrocytes. *J Neurosci*. 2013 May 1;33(18):7985–96.
211. Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Nov;17(11):705–17.
212. Tian Y, Chen K yan, Liu L dan, Dong Y xia, Zhao P, Guo S bin. Sevoflurane exacerbates cognitive impairment induced by $\alpha\beta_{1-40}$ in rats through initiating neurotoxicity, neuroinflammation, and neuronal apoptosis in rat hippocampus. *Mediators Inflamm*. 2018 Oct 9;2018:e3802324.

ANEXO

Congresos o reuniones científicas nacionales e internacionales en los que se han presentado los resultados de esta tesis:

- (1) "Dynamic NMR spectroscopy in the follow-up of acute and chronic hypotonic brain edema". Comunicación oral. M Tejedor, L Cussó, A Nava, A Rojo, G Martín, C Usón, J Soto, MA González-Nicolás, A Tejedor. 55th ERA-EDTA Congress. May 24th-27th, 2018. Copenhagen (Denmark).
- (2) "MRI spatial and temporal characterization of acute and chronic hypotonic brain edema". Póster. Marta Tejedor, Giovanna Martín, Ángel Nava, Clara Usón, Javier Soto, Alberto Tejedor. ASN Kidney Week 2017. 31st October-5th November 2017. New Orleans (USA).

Otras publicaciones durante esta tesis:

- (1) Tejedor M, Delgado A, Melero R, Fernández-Alonso V, Salcedo M, Rodríguez-Benítez P. "Tolvaptan in portal hypertension: real life experience". Rev Esp Enferm Dig. 2022 Sep 12. doi: 10.17235/reed.2022.9145/2022. Epub ahead of print.
- (2) Tejedor M, Herrero A, Castresana C, Mesón R, Taracido JC, Sánchez M, Delgado M. "Can artificial intelligence increase the efficiency in referrals from primary to specialized care?" Rev Esp Enferm Dig. 2022 Jun 30. doi: 10.17235/reed.2022.9020/2022. Epub ahead of print.
- (3) Tejedor M, Selzner N, Berenguer M. "Are MELD and MELDNa still reliable tools to predict mortality on the Liver Transplant waiting list?". Transplantation: May 16, 2022 - Volume - Issue - 10.1097/TP.0000000000004163 doi: 10.1097/TP.0000000000004163. (IF 4.939; Q1).
- (4) Oliveira A, Yebra J, Amaral C, Tejedor M, Eirás P, Hernández-Pérez M, Suárez-Cabredo C, Spigarelli I, Suárez-Ferrer C, Morales-Arráez D, Chico I, Díaz-Flores F, Rodríguez R, Llorente S, Molina E, Hernández-Guerra MN. "Retrieval and treatment of patients with primary biliary cholangitis who are lost in the health system". Rev Esp Enferm Dig. 2021 Nov;113(11):776-779. (IF 2.086; Q4).
- (5) Marta Tejedor, Daniel Alcalde, Cristina Cruces, Elena Hernando, María del Carmen López-Martín, Rosa Briz, Almudena Calvache, Raquel Barranco, Luis Alonso Castillo, Inmaculada Chico, María de Lucas, Rosmery Marruffo, Raquel Rodríguez, María Delgado. "Functional gastrointestinal disorders: real-life results of a multidisciplinary non-pharmacological approach based on group-consultations". Rev Esp Enferm Dig. 2021 Sep;113(9):627-634. (IF 2.086; Q4).

****Esta publicación ha sido galardonada con los siguientes premios:**

Premio José Antonio Solís Herruzo de la Revista Española de Enfermedades Digestivas (REED) en la convocatoria 2022 por el trabajo "Functional gastrointestinal disorders: real-life results of a multidisciplinary non-pharmacological approach based on group-consultations".

Segundo premio de la 1a edición de los Premios de Jóvenes Investigadores Clínicos IIS-FJD y UICO Red4H en la convocatoria 2022 por el trabajo "Functional gastrointestinal disorders: real-life results of a multidisciplinary non-pharmacological approach based on group-consultations".

- (6) Isabel Solares, Marta Tejedor, Daniel Jericó, Monserrat Morales-Conejo, Rafael Enríquez de Salamanca, Antonio Fontanellas, Alberto Tejedor-Jorge. "Management of hyponatremia associated with acute porphyria-proposal for the use of tolvaptan". Ann Transl Med. 2020 Sep;8(17):1098. (IF 3.932; Q3).
- (7) Spanish Hepatologist Women Group (GEMHEP) @HepatologAs. "Spanish women hepatologists: breaking the glass ceiling?". Am J Gastroenterol 2018;113(4):622-623.

Otros congresos o reuniones científicas:

- (3) "Análisis del cribado de la infección por SARS-COV2 previo a pruebas endoscópicas en un hospital de segundo nivel". Poster. Tejedor M; Gil A; Ojeda E; Neria F; Barranco R; Briz R; Calvache A; Castillo LA; Chico I; de Lucas M; López-Martín MC; Rodríguez R; Monsalve S; Bellart M; Guzmán MA; Alcalde D. LXXXI Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva. 16-18 Jun 2022. León (España).
- (4) "Can artificial intelligence increase the efficiency in referrals from primary to specialized care?". Poster. Marta Tejedor; María Delgado; Daniel Alcalde; Raquel Barranco; Rosa Briz; Almudena Calvache; Luis Alonso Castillo; Inmaculada Chico; María Carmen López-Martín; Rosmery Marruffo Ramos; Sara Monsalve; Raquel Rodríguez; Pablo Solís; María de Lucas. United European Gastroenterology Week Virtual. October 3rd-5th, 2021.
- (5) "¿Puede la inteligencia artificial mejorar la eficiencia en las derivaciones desde atención primaria a atención especializada?". Póster con relevancia clínica. Marta Tejedor; María Delgado; Daniel Alcalde; Raquel Barranco; Rosa Briz; Almudena Calvache; Luis Alonso Castillo; Inmaculada Chico; María Carmen López-Martín; Rosmery Marruffo Ramos; Sara Monsalve; Raquel Rodríguez; Pablo Solís; María de Lucas. II Congreso Virtual Digestivo SEPD. 6-7 Mayo de 2021.
- (6) "Uso de *patient reported experience measures* para identificar áreas de mejora en la unidad de endoscopias de un hospital de segundo nivel". Comunicación oral. Marta Tejedor; María Delgado; Daniel Alcalde; Raquel Barranco; Rosa Briz; Almudena Calvache; Luis Alonso Castillo; Inmaculada Chico; María Carmen López-Martín; Rosmery Marruffo Ramos; Sara Monsalve; Raquel Rodríguez; Pablo Solís; María de Lucas. 24^a Reunión Anual de la Asociación Española de Gastroenterología. 1-4 Junio de 2021.
- (7) "¿Puede la inteligencia artificial mejorar la eficiencia en las derivaciones desde atención primaria a atención especializada?". Comunicación oral breve. Marta Tejedor; María Delgado; Daniel Alcalde; Raquel Barranco; Rosa Briz; Almudena Calvache; Luis Alonso Castillo; Inmaculada Chico; María Carmen López-Martín; Rosmery Marruffo Ramos; Sara Monsalve; Raquel Rodríguez; Pablo Solís; María de Lucas. 24^a Reunión Anual de la Asociación Española de Gastroenterología. 1-4 Junio de 2021.
- (8) "Uso de *patient reported experience measures* para identificar áreas de mejora en la unidad de endoscopias de un hospital de segundo nivel". Póster. Marta Tejedor; María Delgado; Daniel Alcalde; Raquel Barranco; Rosa Briz; Almudena Calvache; Luis Alonso Castillo; Inmaculada Chico; María Carmen López-Martín; Rosmery Marruffo Ramos; Sara Monsalve; Raquel Rodríguez; Pablo Solís; María de Lucas. II Congreso Virtual Digestivo SEPD. 6-7 Mayo de 2021.
- (9) "Are we using ultrasonography appropriately for the screening of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B?: An audit of clinical practice in secondary care". Póster. Tejedor M, Chico I, de Lucas M, Barranco R, Alcalde D, Briz R, Calvache A, Castillo LA, Rodríguez R, López MC, Marruffo R, Solís P, Delgado M. United European Gastroenterology Week Virtual. October 11th-13th, 2020.
- (10) "¿Usamos adecuadamente la ecografía para el cribado de hepatocarcinoma en la hepatitis B crónica? Auditoría de la práctica clínica en un hospital universitario de segundo nivel". Póster. Tejedor M, Chico I, de Lucas M, Barranco R, Alcalde D, Briz R, Calvache A, Castillo LA, Rodríguez R, López MC, Marruffo R, Solís P, Delgado M. I Congreso Virtual Digestivo SEPD. 18-20 Junio de 2020.
- (11) "¿Usamos adecuadamente la ecografía para el cribado de hepatocarcinoma en la hepatitis B crónica? Auditoría de la práctica clínica en un hospital universitario de segundo nivel". Póster. Tejedor M, Chico I, de Lucas M, Barranco R, Alcalde D, Briz R, Calvache A, Castillo LA, Rodríguez R, López MC, Marruffo R, Solís P, Delgado M. 45 Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 12-14 Febrero de 2020. Madrid (España).

- (12) "Tolvaptan in portal hypertension: real-life experience". Póster. Tejedor M, Delgado A, Melero MR, Rodríguez P, Fernandez V, Salcedo M, Tejedor A. Kidney Week ASN. 5-10 Noviembre de 2019. Washington DC (USA).
- (13) "Un año después: resultados del abordaje no farmacológico multidisciplinar mediante consultas grupales en trastornos funcionales digestivos". Póster oral. Tejedor M, Alcalde D, Cruces C, Hernando E, López MC, Briz R, Calvache A, Barranco R, Castillo LA, Chico I, de Lucas M, Marruffo R, Rodríguez R, Delgado M. Semana de las Enfermedades Digestivas. 13-15 de Junio de 2019. Santander (España).
- (14) "Schwannoma de colon: un hallazgo infrecuente en colonoscopia de cribado". Póster. Delgado M, Quijano S, Marruffo R, Barranco R, Alcalde D, Briz R, Calvache A, Castillo A, Chico I, de Lucas M, López C, Rodríguez R, Solís P, Tejedor M. Semana de las Enfermedades Digestivas. 13-15 de Junio de 2019. Santander (España).
- (15) "Vesícula en panal de abeja. Un hallazgo inesperado". Póster. Alcalde D, de Lucas M, López C, Marruffo R, Castillo L, Tejedor M, Briz R, Chico I, Calvache A, Rodríguez R, Barranco R, Solís P, Quispe AP, Delgado M. Semana de las Enfermedades Digestivas. 13-15 de Junio de 2019. Santander (España).
- (16) "Programa precolon: no solo para ccr. Un hallazgo infrecuente como causa de SOH+". Póster. Calvache A, López C, Quijano S, Tejedor M, Barranco R, Chico I, Briz R, Alcalde D, de Lucas M, Marruffo R, Rodríguez R, Castillo L, Solís P, Delgado M. Semana de las Enfermedades Digestivas. 13-15 de Junio de 2019. Santander (España).
- (17) "Consultas grupales para el manejo no farmacológico multidisciplinar de los trastornos funcionales digestivos" Comunicación oral. Tejedor M, Alcalde D, Cruces C, Hernando E, López MC, Briz R, Calvache A, Barranco R, Castillo LA, Chico I, de Lucas M, Marruffo R, Rodríguez R, Delgado M. XXII reunión anual de la asociación española de gastroenterología. 20-22 de Marzo de 2019. Madrid (España).
- (18) "Multidisciplinary shared medical appointments for functional gastrointestinal disorders: preliminary results of a non-pharmacological pilot study". Poster. Tejedor M, Alcalde D, Cruces C, Hernando E, López MC, Briz R, Calvache A, Barranco R, Castillo LA, Chico I, de Lucas M, Marruffo R, Rodríguez R, Delgado M. 26th United European Gastroenterology Week. October 22nd-24th, 2018. Vienna (Austria).
- (19) "Abordaje no farmacológico multidisciplinar mediante consultas grupales en trastornos funcionales digestivos: resultados preliminares de un estudio piloto". Comunicación oral. Tejedor M, Alcalde D, Cruces C, Hernando E, Delgado M. Semana de las Enfermedades Digestivas. 21-23 de Junio de 2018. Valencia (España).
- (20) "Five years real life analysis of tolvaptan introduction in a third level hospital". Póster. Agustín Delgado, Rosa Melero, Patrocinio Rodríguez, Marta Tejedor, Alberto Tejedor. 55th ERA-EDTA Congress. May 24th-27th, 2018. Copenhagen (Denmark).
- (21) "Efficacy and safety of Elbasvir/Grazoprevir in chronic hepatitis: prospective and observational study in real-world". Raquel Souto-Rodríguez, GEMHEP (Spanish Women Hepatologist Group). AASLD The Liver Meeting. 20-24th Oct 2017. Washington (USA).
- (22) "Spanish Women Hepatologists: Breaking The Glass Ceiling?". Trinidad Serrano, GEMHEP (Spanish Women Hepatologist Group). AASLD The Liver Meeting. 20-24th Oct 2017. Washington (USA).

