

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TESE**

**Avaliação do reservatório de sódio na pele e do equilíbrio hidromineral em função da idade e do dimorfismo sexual em ratos Wistar normotensos e Espontaneamente Hipertensos (SHR)**

**Verônica Cristina Lopes Menezes**

**2020**



**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TESE**

**Avaliação do reservatório de sódio na pele e do equilíbrio hidromineral em  
função da idade e do dimorfismo sexual em ratos Wistar normotensos e  
Espontaneamente Hipertensos (SHR)**

**Verônica Cristina Lopes Menezes**

*Sob orientação do Professor*

**Dr. Luis Carlos Reis**

Tese submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Doutor em Ciências  
Fisiológicas**, no Curso de Pós-graduação em  
Ciências Fisiológicas, Área de concentração em  
Fisiologia e Farmacologia

**Seropédica, RJ**

**MAIO 2020**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864/5  
41a

Lopes Menezes, Verônica Cristina, 1989-  
Avaliação do reservatório de sódio na pele e do  
equilíbrio hidromineral em função da idade e do  
dimorfismo sexual em ratos Wistar normotensos e  
Espontaneamente Hipertensos (SHR) / Verônica Cristina  
Lopes Menezes. - Seropédica, 2020.  
202 f.: il.

Orientador: Luís Carlos Reis. Tese(Doutorado). -  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, 2020.

1. Hipertensão. 2. Reserva corporal de sódio. 3.  
Dimorfismo sexual. 4. Equilíbrio hidroeletrolítico  
(Fisiologia). 5. Comportamento. I. Reis, Luís Carlos ,  
1952-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências  
Fisiológicas III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VERÔNICA CRISTINA LOPES MENEZES**

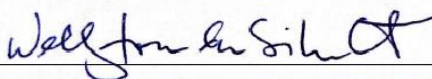
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 08/05/2020



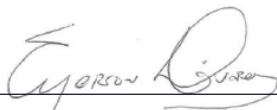
---

Prof Dr Luis Carlos Reis (Membro Interno ao Programa– Orientador - UFRRJ)



---

Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)



---

Prof Dr Emerson Lopes Olivares (Membro Interno – UFRRJ)



---

Prof Dr Renato Rizo Ventura (Membro Externo – UNIFAL)



---

Prof Dr Claudio da Silva Almeida (Membro Externo – UNESA)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço à CAPES pelo período de bolsa de Doutorado, no qual pude desenvolver habilidades acadêmicas e ampliar conhecimentos científicos. Agradeço à UFRRJ pelo ambiente acadêmico.

Agradeço ao meu orientador Professor Luis Carlos Reis e co-orientador Professor André Mecawi, que me apoiaram na realização desse estudo.

Agradeço às Professoras Laura Vivas, Andrea Godino e Ximena Caeiro pelo valioso período no Instituto Ferreyra e aos amigos Cíntia, Agustina, Pablo e Valentin pela convivência.

Agradeço aos Professores que me orientaram no estágio à docência Wellington, Luciano, Fábio, Luis, Norma e Emerson.

Agradeço ao Professor Evelton Casartelli pela conversa amigável e explicações durante a preparação do protocolo de avaliação do sódio tecidual.

Agradeço aos amigos com quem trabalhei na colônia de animais espontaneamente hipertensos: Edgard, Máyra, Cláudio, Wallace e Carolina Fonseca. Muito obrigada pela parceria!! Agradeço também aos funcionários do biotério Paulo e Juca.

Agradeço aos amigos com quem pude conviver durante a Iniciação Científica: Danilo, Cláudio, Roberto, Iracema, Fabrícia.

Agradeço às técnicas Raquel e Bruna pelo apoio em muitos momentos e aos funcionários Dione e Franklin.

Agradeço às técnicas Maria Valci e Milene Mantovani e ao Prof. José Antunes Rodrigues pela gentileza com que nos recebeu no laboratório.

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais Angela e Jorge por todo o apoio sempre, e amigos externos ao laboratório pelo apoio emocional e incentivo durante diversos momentos.

Agradeço aos amigos do grupo Bruno, Livia, Raoni, Sabrina, Edgard, Viviane, Carolina Pontes, Vítor, Ludimila e Máyra pela ajuda no trabalho, pelo companheirismo e aos demais colegas agradeço pela convivência.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”  
(Che Guevara)

## RESUMO

MENEZES, Verônica Cristina Lopes – **Avaliação do reservatório de sódio na pele e do equilíbrio hidromineral em função da idade e do dimorfismo sexual em ratos Wistar normotensos e Espontaneamente Hipertensos (SHR)**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas, Fisiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Palavras-chave: hormônios, sódio epitelial, hipertensão, dimorfismo, comportamento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A linhagem de animais espontaneamente hipertensos (SHR) é considerada como modelo de hipertensão essencial, sendo o modelo que mais se aproxima da hipertensão do ser humano. A reserva de sódio corporal pode ser armazenada, na pele, na cartilagem e em músculos, sendo também responsável pelo balanço de sódio e água corporais. O estoque de sódio armazenado na pele seria um possível mecanismo extrarrenal de regulação da excreção de eletrólitos e homeostase de volume. O objetivo central deste trabalho foi avaliar o status fisiológico das reservas ativa e inativa de sódio acumulado na pele em animais SHR e Wistar. Os objetivos secundários foram: identificar as mudanças no padrão ingestivo dos animais fazendo uma relação com a pressão arterial, reserva de sódio e hormônios; comparar machos e fêmeas e comparar as idades em condições fisiológicas. Foram analisados 10 grupos experimentais: na idade de 4 semanas (1) machos Wistar; (2) machos SHR, (3) fêmeas Wistar; (4) fêmeas SHR; na idade de 12 semanas (5) machos SHR; (6) machos Wistar; (7) fêmeas SHR (proestro/estro); (8) fêmeas SHR (metaestro/diestro); (9) fêmeas Wistar (proestro/estro) e (10) fêmeas Wistar (metaestro/diestro), obtidos do Biotério Central do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ e foram mantidos em condições-padrão de luz, temperatura e alimento. Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética para o uso de animais da UFRRJ sob o nº 23083.026847/2017-01. Realizamos 4 protocolos: avaliações comportamentais em gaiolas metabólicas, radioimunoensaio, avaliação indireta da pressão arterial (tail cuff) e análises do conteúdo de sódio e água da pele. Nossos resultados mostraram que na idade de 4 semanas machos e fêmeas SHR ingerem mais sódio e menos água e esse mesmo perfil comportamental também foi observado nos SHR adultos. Animais da linhagem SHR apresentaram menores índices ponderais em relação aos Wistar. Com o avanço da idade, ocorreu diminuição da concentração plasmática de AVP nos machos SHR, enquanto que as fêmeas SHR não apresentaram alteração em comparação à linhagem Wistar. A concentração plasmática de ANG II não foi modificada nos Machos SHR adultos em comparação aos filhotes, enquanto que nas fêmeas SHR adultas em proestro/estro e em metaestro/diestro apresentaram aumento em relação às fêmeas SHR de 4 semanas de idade. Machos SHR apresentaram aumento da pressão sistólica com 4 semanas de idade, enquanto que as fêmeas SHR em proestr/estro e em metaestro/diestro a partir da sexta semana de idade. A reserva ativa ou inativa acumulada não se altera em função da linhagem em machos adultos ou filhotes. Quando comparamos machos e fêmeas adultos, houve aumento na reserva osmoticamente inativa. Concluímos que a ingestão de sódio e água é influenciada pela linhagem e pelo dimorfismo sexual e maioria das variações hormonais ocorreram devido às diferenças de linhagem, na qual houve um estímulo predominante para retenção de sódio e água e inibição da sede nos SHR jovens e adultos. Animais SHR são hipertensos desde 4 semanas de idade e a hipertensão não altera a reserva osmoticamente ativa ou inativa em condições fisiológicas, no entanto, as diferenças de idade e o dimorfismo sexual foram os principais fatores influenciadores da reserva de sódio acumulada.



## ABSTRACT

MENEZES, Verônica Cristina Lopes – **Evaluation of the skin sodium reservoir and hydromineral balance as a function of age and sexual dimorphism in Wistar normotensive and Spontaneously Hypertensive rats (SHR)**. Thesis (Doctoral in Physiological Sciences, Physiology), Institute of Health and Biological Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Key-words: hormones, epithelial sodium, hypertension, dimorphism, behaviour.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance code 001. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are considered as a model of essential hypertension, being the model that most closely resembles human hypertension. The body's sodium reserve can be stored in the skin, cartilage and muscles, and is also responsible for the body's sodium and water balance. The skin sodium storage would be a possible extra-renal mechanism for regulating electrolyte excretion and volume homeostasis. The main objective of this work was to evaluate the physiological status of the active and inactive reserves of sodium accumulated in the skin in SHR and Wistar animals. The secondary objectives were: to identify changes in the animals' intake pattern by making a relationship with blood pressure, sodium reserve and hormones; compare males and females and compare ages under physiological conditions. Ten experimental groups of rats were analysed: at 4 weeks-age (1) Wistar males; (2) SHR males; (3) Wistar females; (4) SHR females; at 12 weeks-age (5) SHR males; (6) Wistar males; (7) SHR females (proestrus/estrus); (8) SHR females (metestrus/diestrus); (9) Wistar females (proestrus/estrus); (10) Wistar females (metestrus/diestrus), obtained from the Central Vivarium of the Department of Physiological Sciences at UFRRJ and were kept under standard conditions of light, temperature and food. This study was submitted to the Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals in the UFRRJ (23083.026847/2017-01). We performed 4 protocols: behavioral assessments in metabolic cages, radioimmunoassay, indirect assessment of blood pressure (tail cuff) and analysis of the sodium and water content of the skin. Our results showed that at the age of 4 weeks males and females SHR ingest more sodium and less water and this same behavioral profile was also observed in adult SHR. SHR strain showed lower weight indexes compared to Wistar. With advancing age, there was a decrease in the plasma concentration of AVP in SHR males, while SHR females showed no change compared to the Wistar strain. The plasma concentration of ANG II was not modified in adult SHR males, while SHR females showed no change compared to the Wistar strain. The ANG II plasma concentration was not modified in adult SHR males compared to puppies, whereas in adult SHR females in the proestrus/estrus and in the metestrus/diestrus showed an increase in relation to SHR females of 4 weeks-age. SHR males showed no increase in systolic pressure at 4 weeks of age, while SHR females in proestrus/estrus and metestrus/diestrus from the sixth week of age. The accumulated active or inactive skin sodium reserve does not change depending on the strain in adult males or young rats. When comparing adult males and females, there was an increase in the osmotically inactive skin sodium reserve. We conclude that sodium and water intake are influenced by lineage and sexual dimorphism and most hormonal variations occurred due to lineage differences, in which there was a predominant stimulus for sodium and water retention and thirst inhibition in young and adult SHR. SHR animals are hypertensive since 4 weeks-age and hypertension does not change the osmotically active or inactive reserve under physiological conditions, however, age differences and sexual dimorphism were the main factors influencing the accumulated skin sodium reserve.

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1-** O ciclo reprodutivo da mulher e da rata.

**Fig. 2-** Figura representativa do recrutamento de macrófagos residentes na pele devido à ingestão de alto e baixo conteúdo de sódio.

**Fig. 3-** Grupos experimentais e possibilidades de comparações entre os grupos.

**Fig. 4-** Linha temporal do experimento 1- Acompanhamento do comportamento ingestivo em gaiolas metabólicas em animais SHR e Wistar. (A) Avaliações diárias de uma semana qualquer e (B) Avaliações diárias dos filhotes.

**Fig. 5-** Linha temporal do experimento 2- Avaliações hormonais e sódio da pele em animais SHR e Wistar em 4 semanas (28-30 dias) e 12 semanas (84 dias).

**Fig. 6-** Linha temporal do experimento 3 – Avaliações de pletismografia de cauda em animais SHR e Wistar de 4 semanas a 12 semanas de vida.

### **Experimento 1 – Avaliações do comportamento ingestivo de animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade em gaiolas metabólicas.**

**Fig.7-** Avaliação do peso corporal diário de animais SHR e Wistar nas 4 semanas de idade sob dieta controle em condições basais. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*#P<0,05.

**Fig.8-** Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl em machos intactos na idade de 4 semanas. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05.

**Fig. 9-** Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl em fêmeas intactas na idade de 4 semanas. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05.

**Fig. 10-** Avaliação da ingestão basal de água em machos intactos na idade de 4 semanas de idade. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05.

**Fig. 11-** Avaliação da ingestão basal de água fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05.

**Fig. 12-** Avaliação da ingestão basal de alimento em machos (A) e em fêmeas (B) comparando as linhagens na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por

ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig.13-** Avaliação do volume urinário basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig.14-** Avaliação do volume urinário basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 15-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 16-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 17-** Avaliação da carga excretada de sódio basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig. 18-** Avaliação da carga excretada de sódio basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig. 19-** Avaliação da ingestão basal de salina hipertônica em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 20-** Avaliação da ingestão basal de água em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 21-** Avaliação da ingestão basal de alimento em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

**Fig. 22-** Avaliação do volume urinário basal em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig. 23-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em machos e fêmeas SHR(A) e Wistar B) 4 semanas, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig. 24-** Avaliação da carga excretada de sódio em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

**Fig. 25-** Avaliação do peso corporal em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 26-** Avaliação da ingestão espontânea de salina hipertônica em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 27-** Avaliação da ingestão espontânea de água em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 28-** Avaliação da ingestão espontânea de alimento em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 29-** Avaliação do volume urinário em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 30-** Avaliação da osmolalidade urinária em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

**Fig. 31-** Avaliação da carga excretada de sódio em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatremicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem.

**Experimento 2 – Avaliação dos hormônios ocitocina, vasopressina, angiotensina II e ANP plasmáticos em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

**Fig. 32-** Avaliação do hematócrito dos animais com 4 semanas (A) e 12 semanas (B) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 33-** Avaliação da osmolalidade plasmática dos animais de 4 semanas (A) e de 12 semanas (B) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

**Fig. 34-** Avaliação do índice uterino em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade sob condições basais, considerando o peso uterino com o conteúdo drenado. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 35-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) sob condições animais de 4 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 36-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em SHR e Wistar adultos de 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 37-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) sob condições animais de 4 semanas de idade SHR e Wistar normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 38-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) peptídeo natriurético atrial (B) em SHR e Wistar adultos de 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 39-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em machos de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado,  $*P<0,05$ .

**Fig. 40-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e

analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 41-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) em machos de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 42-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) em fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 43-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em fêmeas adultas da linhagem SHR em relação às Fêmeas Wistar adultas normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 44-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) peptídeo natriurético atrial (B) em fêmeas adultas da linhagem SHR em relação às Fêmeas Wistar adultas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

### **Experimento 3 – Avaliações da pressão sistólica, pressão diastólica e pressão arterial média em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

**Fig. 45–** Avaliação da frequência cardíaca em machos e em fêmeas SHR e Wistar da semana de avaliações com 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados, considerando apenas os animais adaptados ao teste. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 46–** Avaliação diária da pressão arterial sistólica em machos SHR e Wistar de 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados.(A) Insert gráfico em tamanho aumentado: avaliação das diferenças entre machos e fêmeas e (B) avaliação da pressão sistólica entre as linhagens. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 47–** Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados. (A) Insert gráfico em tamanho aumentado: avaliação das diferenças entre machos e fêmeas e (B) avaliação da pressão arterial sistólica entre as linhagens. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado,  $*P<0,05$ .

**Fig. 48**– Avaliação da frequência cardíaca em machos e em fêmeas SHR e Wistar da semana de avaliações com 12 semanas de idade normonatremicos e normohidratados, considerando apenas os animais adaptados ao teste. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 49**– Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em animais SHR e Wistar machos (A) e fêmeas (B) da 4ª semana até a 12ª semana de idade normonatremicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

#### **Experimento 4 – Avaliação do estoque tecidual de sódio na pele em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

**Fig. 50**- Avaliação da concentração de sódio total na pele comparando machos e fêmeas de 4 semanas de idade, da mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

**Fig. 51**- Avaliação da concentração de sódio total na pele comparando machos e fêmeas adultos da mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 52**- Avaliação da razão sódio/água na pele dos filhotes sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 53**- Avaliação da razão sódio/água na pele dos animais adultos sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 54**- Avaliação do sódio osmoticamente inativo total dos filhotes sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 55**- Avaliação do sódio osmoticamente inativo total na pele dos animais adultos sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 56**- Avaliação do sódio osmoticamente ativo e inativo acumulados na pele, comparando as cargas de sódio acumulado e as linhagens dos animais de 4 semanas (A,B) e de 12 semanas de idade (C) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 57-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele, comparando as idades dos machos de 4 semanas e 12 semanas de idade sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 58-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) inativo (B) acumulados na pele comparando machos e fêmeas de 4 semanas de idade sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 59-** Avaliação do sódio osmoticamente acumulado, comparando as fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade (A,B = proestro/estro) e (C,D = metaestro/diestro) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

**Fig. 60-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele de fêmeas de 12 semanas na fase de proestro/estro em relação aos machos de mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

**Fig. 61-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele de fêmeas de 12 semanas na fase de metaestro/diestro em relação aos machos de mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

**Fig. 62-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele, comparando as linhagens e fase do ciclo estral. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

### **Missão de investigação**

**Fig 63-** Figura 5 extraída de Geerling *et al.* (2006).



## LISTA DE TABELAS

**Experimento 2 – Avaliação dos hormônios ocitocina, vasopressina, angiotensina II e ANP plasmáticos em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

**Tabela 1:** Índices ponderais em animais das linhagens SHR e Wistar de 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 2:** Índices ponderais em animais das linhagens SHR e Wistar de 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Experimento 4 - Avaliação do estoque tecidual de sódio na pele em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

**Tabela 3:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 4:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 5:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos com 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 6:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas em proestro/estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 7:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas em metaestro/diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 8:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em animais machos e fêmeas Wistar com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 9:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas SHR com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 10:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas Wistar em proestro ou estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 11:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas Wistar em metaestro ou diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 12:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e em fêmeas SHR em proestro ou estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 13:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e em fêmeas SHR em metaestro ou diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 14:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas Wistar em função da fase do ciclo estral nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 15:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas SHR em função da fase do ciclo estral nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 16:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos Wistar de 12 semanas e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 17:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos SHR de 12 semanas e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 18:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas SHR de 12 semanas de idade em proestro ou estro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 19:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele nas fêmeas SHR de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 20:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele nas fêmeas Wistar de 12 semanas de idade em proestro ou estro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 21:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele nas fêmeas Wistar de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 22:** Parâmetros avaliados na pele de animais com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

**Tabela 23:** Parâmetros avaliados na pele em animais SHR e Wistar com 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Ar- ARNm para o receptor para andrógenos  
ARNm- ácido-ribonucleico mensageiro  
ANP – peptídeo natriurético atrial  
ANG 1- angiotensina tipo 1  
ANG 2 – angiotensina tipo 2  
AVP- arginina-vasopressina  
Esr1 – ARNm para o receptor para estrógeno tipo 1 (ER  $\alpha$ )  
Esr2 – ARNm para o receptor para estrógeno tipo 2 (ER  $\beta$ )  
GnRH- hormônio liberador de gonadotrofinas  
LH- hormônio luteinizante  
FSH- hormônio folículo estimulante  
ENaC- canais para sódio epiteliais  
ER  $\alpha$  – receptor estrogênico tipo alfa  
ER  $\beta$  – receptor estrogênico tipo beta  
ECA- enzima conversora de angiotensina  
FSHR-4- fêmeas espontaneamente hipertensas com 4 semanas de idade  
FSHR-12-PE- fêmea espontaneamente hipertensa em proestro ou estro  
FSHR-12-MD - fêmea espontaneamente hipertensa em metaestro ou diestro  
FW-12-PE- fêmea Wistar em proestro ou estro  
FW-12-MD - fêmea Wistar em metaestro ou diestro  
FW-4- fêmeas Wistar com 4 semanas de idade  
GAGs - glicosaminoglicanos  
HVM- hipotálamo ventro-medial  
LCR- líquido céfalo-raquidiano  
LEC- líquido extracelular  
LT- *lamina terminalis*  
MSHR-4- machos espontaneamente hipertensos com 4 semanas de idade  
MW-4- machos Wistar com 4 semanas de idade  
MSHR-12- machos espontaneamente hipertensos com 12 semanas de idade  
MW-12- machos Wistar com 12 semanas de idade  
NaCl- cloreto de sódio  
NTS- núcleo do trato solitário  
OT- ocitocina  
OVLT- órgão vascular da lâmina terminal  
PAS- pressão arterial sistólica  
PAD- pressão arterial diastólica  
PAM- pressão arterial média  
rSKNa<sup>+</sup>-relative skin sodium (sódio relativo da pele)  
R<sub>(SKNa<sup>+</sup>/SKW)</sub>- skin sodium/water ratio (razão sódio/água da pele)  
 $\Delta$ = letra grega (delta), significa variação  
 $\Delta R_{(SKNa<sup>+</sup>/SKW)}$  – skin sodium/water ratio variation (variação da razão sódio/água da pele)  
SDW- skin dry weight (peso seco da pele)  
SKW-total skin water (água total da pele)  
rSKW- relative skin water (água relativa da pele)  
rSKNa<sup>+</sup>- relative skin sodium (sódio relativo da pele)  
 $\Delta rSKW$  – relative skin water variation (variação de água relativa da pele)  
SKNa<sup>+</sup>- total skin sodium concentration (concentração de sódio total da pele)  
SKNa<sup>+</sup><sub>(a)</sub> – osmotically active skin sodium accumulation (sódio osmoticamente ativo acumulado na pele)  
SKNa<sup>+</sup><sub>(i)</sub> – osmotically inactive skin sodium accumulation (sódio osmoticamente inativo acumulado na pele)  
SNC- sistema nervoso central  
SKNa<sup>+</sup><sub>(i) total</sub>- total osmotically inactive skin sodium concentration (sódio inativo total da pele)  
SRAA- sistema renina-angiotensina-aldosterona  
SWW- skin wet weight (peso úmido da pele)  
VEGF-C- ARNm para o fator de crescimento vascular endotelial tipo C

## **LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS**

VEGFR3- receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo C  
TonEBP- ARNm para a proteína reativa ao aumento da tonicidade  
eNOS- óxido nítrico sintase endotelial

## SUMÁRIO

<b>1.0 Introdução</b> .....	página 21
<b>2.0 Objetivo</b> .....	página 43
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	página 43
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	página 43
<b>3.0 Material e Métodos</b> .....	página 44
<b>3.1 Animais e Manutenção</b> .....	página 44
<b>3.2 Grupos experimentais</b> .....	página 44
<b>4.0 Protocolos experimentais</b> .....	página 46
<b>4.1 Protocolo experimental geral</b> .....	página 46
<b>4.2 Protocolos específicos</b> .....	página 47
<b>5.0 Análise estatística</b> .....	página 56
<b>6.0 Resultados</b> .....	página 57
<b>Experimento 1</b> – Avaliações do comportamento ingestivo de animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade em gaiolas metabólicas.....	página 57
<b>Experimento 2</b> – Avaliação dos hormônios ocitocina, vasopressina, angiotensina II e ANP plasmáticos em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.....	página 96
<b>Experimento 3</b> – Avaliação da pressão sistólica em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.....	página 121
<b>Experimento 4</b> – Avaliação do estoque tecidual de sódio na pele em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.....	página 130
<b>7.0 Discussão</b> .....	página 161
<b>Parte 1:</b> Avaliações realizadas com 4 semanas de idade .....	página 161
<b>Parte 2:</b> Avaliações realizadas com 12 semanas de idade .....	página 167
<b>Parte 3:</b> Avaliações realizadas na comparação das idades.....	página 174
<b>8.0 Conclusões específicas</b> .....	página 176
<b>9.0 Conclusão geral</b> .....	página 177
<b>10.0 Perspectivas</b> .....	página 177
<b>11.0 Missão de investigação</b> .....	página 178
<b>12.0 Referências Bibliográficas</b> .....	página 181

## 1.0 Introdução

### Regulação do equilíbrio hidroeletrolítico

A ingestão de água e de cloreto de sódio são comportamentos motivados importantes para a homeostase dos fluidos corporais. A ingestão de água ocorre em situações em que há desidratação celular, perda de volume sanguíneo e hiperosmolalidade plasmática. Evidências da literatura demonstraram que em condições de hiperosmolalidade, não estão ativados apenas os mecanismos de sede e de redução da excreção urinária de água mediada pela vasopressina, mas também mecanismos que inibem o consumo adicional de soluto e que induzem à excreção de sódio mediada pela ocitocina e pelo peptídeo natriurético atrial (ANTUNES-RODRIGUES *et al.* 1997; JONHSON & THUNHORST, 1997).

Os estudos de Verney (1947) apresentaram o conceito de variações da osmolalidade plasmática que alteram a taxa de excreção renal de água e propuseram a existência de um mecanismo osmorreceptor relacionado à liberação de vasopressina em resposta ao aumento de osmolalidade dos líquidos corporais. Posteriormente, Anderson & McCann (1955), postularam a existência de um osmorreceptor que seria um sensor para sódio localizado em regiões cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, que poderiam estar envolvidas na regulação do apetite ao sódio e sua excreção em resposta a variações da concentração desse soluto no líquido cefalorraquidiano (LCR). O estudo de Noda (2007) verificou que canais para sódio sensíveis às concentrações de sódio são localizados em órgãos circunventriculares e que esses canais atuam como sensores dos níveis de sódio dos fluidos corporais. Os osmorreceptores são neurônios especializados capazes de traduzir variações da pressão osmótica no líquido extracelular (LEC) em sinais elétricos que ativam áreas do sistema nervoso central envolvidas no controle da ingestão e excreção de sal e água.

Essas células sensíveis às variações de osmolalidade ou concentração de sódio do LEC estão localizadas nos órgãos circunventriculares (CVOs) localizados principalmente na parede do terceiro ventrículo. Além de sua localização no SNC, receptores para sódio também estão localizados periféricamente nas terminações nervosas aferentes e adjacentes aos vasos hepáticos, renais e intestinais. Por exemplo, os receptores para sódio localizados em vasos hepáticos são estimulados pelo aumento na concentração de sódio na veia porta

e que por aferências vagais ativam neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) que é um importante centro de integração e estes, então, estimulam estruturas neurais do bulbo, que induzem o aumento da natriurese e inibição da absorção intestinal de sódio.

O controle da homeostase hidroeletrolítica conta ainda com um importante sistema de controle homeostático do volume e da tonicidade dos fluidos corporais. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), juntamente com peptídeo natriurético atrial, sistema ocitocinérgico e inervação simpática renal são mecanismos integrados da reabsorção renal de sódio.

A renina é uma enzima secretada pelas células justaglomerulares presentes na arteríola aferente e participa dessa reação em resposta à hiponatremia, alteração no volume de fluidos extracelular e hipotensão. Os níveis circulantes da renina são o fator limitante para esse sistema. A renina, portanto, age como o próprio regulador do sistema renina – angiotensina – aldosterona (IKEDA, 1982). Além disso, a renina converte o angiotensinogênio em angiotensina I (ANG I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) é a responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (ANG II).

A angiotensina II (Ang II) é um potente vasoconstritor que através de seus receptores AT1 e AT2, atuam nos vasos sanguíneos, rins e coração além de promover a reabsorção renal de sódio. O receptor AT1 é responsável pela ação vasoconstritora (GAVRAS & GAVRAS, 1996) e também é o receptor predominante que media a secreção de aldosterona (TANABE, 1998). A angiotensina II, por sua vez poderá atuar na região cortical da glândula adrenal, estimulando a síntese e liberação de mineralocorticóides, principalmente a aldosterona, um hormônio que auxilia na retenção corpórea de íons sódio.

Algumas regiões cerebrais contêm neurônios imunorreativos à angiotensina II como os órgãos circunventriculares (FITZSIMONS, 1998). Dentre esses a área postrema (AP), o órgão subfornicial (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) seriam os principais sítios de ação para a ANG II no cérebro. A área postrema está envolvida na ação pressora da angiotensina, enquanto o núcleo subfornicial está relacionado ao comportamento de ingestão, efeito pressor e secreção de AVP (MANGIAPANE & SIMPSON, 1980). O OVLT e estruturas adjacentes são importantes locais para a ação central da angiotensina (SIMPSON & ROUNTENBERG, 1978). O acesso da ANG II à

região anterior do terceiro ventrículo parece ser essencial para a ingestão de água (DE LUCA *et al.* 1992). Existe uma relação entre o controle da pressão e a dipsogênese, como se pode ver pela inibição da ingestão estimulada pela ANG II, hiperosmolalidade ou hipovolemia sob condições de aumentos da pressão arterial (EVERED *et al.* 1988; STOCKER *et al.* 2001).

O papel da ANG II na indução da sede e do apetite ao sódio foi muito bem descrito por FITZSIMONS (1998). Na presença de estímulo hipovolêmico ocorre um aumento da ANG II circulante devido à queda da pressão arterial e consequente secreção de renina. Concomitantemente, alterações no volume sanguíneo influenciam a chegada de informações ao cérebro pelo NTS e provocam a liberação de ANG II cerebral, resultando em estimulação de sede. As informações aferentes oriundas dos barorreceptores cardiopulmonares que chegam ao NTS, participam também do controle da liberação de AVP, e ainda, do aumento da ingestão de água e sódio em resposta à queda do volume sanguíneo ou queda da pressão arterial.

Em situações de hiponatremia há um aumento na atividade do SRAA, aumento na secreção de ANP e na pressão arterial. As ações da ANG II sobre a ingestão e excreção de água e sal são antagonizadas por ANP e OT. No cérebro o ANP inibe a ingestão de água induzida por ANG II e desidratação (ANTUNES-RODRIGUES *et al.* 1985). Por sua vez, agonistas alfa-adrenérgicos bloqueiam a ingestão de água induzida por ANG II por estimularem a liberação neuronal de ANP no cérebro (BASTOS *et al.* 2001).

A aldosterona é sintetizada principalmente na zona glomerulosa da glândula adrenal. Foi relatada a síntese extra-adrenal da aldosterona tanto nas células endoteliais como no cérebro. Seus receptores estão presentes também nos miócitos cardíacos e células endoteliais (YOUNG *et al.* 1994). Também foi relatada a presença de um SRAA cardíaco com formação local de angiotensina (DE LANNOY *et al.*, 1998) e a síntese cardíaca da própria aldosterona (TAKEDA *et al.*, 2000). A aldosterona é um hormônio esteroidal, portanto derivado do colesterol. Sua biossíntese na glândula adrenal se dá principalmente pela ação de quatro enzimas: colesterol desmolase, 21-hidroxilase, aldosterona sintetase e 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase.

Os efeitos da aldosterona são gerados via receptores mineralocorticóides. Os receptores mineralocorticóides são encontrados no citoplasma e núcleo e os canais para



sódio são expressos na membrana apical das células epiteliais do túbulo contorcido distal assim como nas células envolvidas com a conservação de sal como as da língua e glândulas salivares. O mecanismo de ação da aldosterona na reabsorção de sódio se dá por sua ligação nos receptores mineralocorticoides que estão no citoplasma em complexo com outras proteínas. Após a ligação, o complexo aldosterona-receptores mineralocorticóides se transloca até o núcleo ligando-se a elementos hormônio-responsivos de genes alvo e modulam a taxa de transcrição. Canais de cálcio e proteínas relacionadas são os alvos desta regulação (ARAI & CHROUSOS, 1994).

O ADH (hormônio antidiurético) ou vasopressina também é importante nesse mecanismo de regulação. Em condição de hipovolemia ou desidratação e hiperosmolalidade plasmática os sistemas de controle homeostáticos reconhecem esse erro e sinalizam para a neurohipófise promover a liberação da vasopressina, que estimula a reabsorção renal de sódio nos túbulos renais e reabsorção de água pela inserção de canais para aquaporina tipo 2 na membrana apical dos túbulos coletores renais. Essa ação resulta no aumento da síntese de cAMP (adenosina-monofosfato cíclico) e fosforilação da região c-terminal de aquaporina 2 (canais para água) nas células tubulares no néfron distal (YAMAMOTO *et al.* 1995).

A presença de aquaporina 2 na membrana apical causa um aumento na permeabilidade à água seguida de movimento de água livre a partir do duto coletor para dentro da célula tubular e, por conseguinte, para a membrana basolateral facilitada pela expressão constitutiva de aquaporina 3 e 4 (KLUSSMANN *et al.* 2000).

A vasopressina possui ainda um efeito vasoconstritor levando ao aumento da pressão arterial através do receptor V1 (LIARD, 1986). O V1a é expresso no fígado, células endoteliais e vários outros tecidos periféricos (OSTROWSKI *et al.*, 1992). Essas influências hemodinâmicas são mediadas por aferentes neurogênicos que iniciam com receptores sensíveis a diferenças de pressão em conjunto com o átrio cardíaco e artéria aorta chegando ao tronco cerebral via nervo vago e glossofaríngeo. Pequenas diminuições no volume dos fluidos tem pouco efeito na secreção da AVP, mas qualquer redução superior a 10% do fluido extracelular causa uma marcante secreção da AVP que não só conserva a água, mas também pode ter um papel importante na manutenção da pressão sangüínea (RAMSAY, 1983).

A ocitocina aumenta a excreção renal de eletrólitos em várias espécies, sendo seus efeitos natriurético e caliurético independentes de vasopressina. A OT e a AVP são secretadas simultaneamente em resposta à hiperosmolalidade e à hipovolemia (BALMENT *et al.* 1980; STRICKER & VERBALIS, 1986; HAANWINCKEL *et al.* 1995). Alguns estudos sugeriram um efeito sinérgico da AVP e OT no ducto coletor da medula interna, onde ambos os peptídeos induziram aumento de cAMP e da natriurese (BALMENT *et al.* 1980; FORSLING *et al.* 1982).

A ocitocina liga-se ao receptor V2 da AVP por causa de sua semelhança com a AVP. A excreção urinária de sódio induzida pela OT é completamente bloqueada pelo pré-tratamento com um antagonista de OT, mas não é afetada por um antagonista de receptores V1 de AVP. No entanto, esse efeito foi parcialmente bloqueado pela combinação de tratamentos com antagonistas de receptores V1 e V2 (VERBALIS, *et al.* 1991). Além de seus efeitos periféricos, esses peptídeos podem também produzir outros efeitos complementares para sua ação fisiológica. De fato a AVP, injetada no SNC aumenta a ingestão de água (SZCZEPANSKA-SADOWSKA, *et al.* 1982). Em contraste, a administração central de OT diminui a ingestão de sal (STRICKER & VERBALIS, 1996). O estiramento dos cardiomiócitos e aumento na secreção da ocitocina, que possui efeito natriurético, reforça os estímulos para a excreção renal de sódio (FITZSIMONS, 1998).

Outro mecanismo de regulação ocorre pela atividade dos canais ENaC, que são canais para sódio epiteliais encontrados nos túbulos renais em sua porção cortical e são também responsáveis pela reabsorção de sódio. Frindt & Palmer (2012) evidenciaram que a aldosterona é capaz de aumentar os níveis protéicos da subunidade  $\alpha$ ENaC, presentes nos canais epiteliais para sódio renais, modulando positivamente esses canais. Assim, um outro possível mecanismo seria a modulação do canal pela aldosterona, que aumenta a permeabilidade da barreira apical dos epitélios, aumentando assim a absorção de íons  $\text{Na}^+$  no intestino grosso e a sua reabsorção no ducto coletor, o que leva a posterior redução na excreção urinária.

Dos-Santos *et al.* (2017) avaliou o papel central da angiotensina (1-7) na sede sob condições basais ou sob estímulo osmótico em modelos de privação hídrica e de sobrecarga salina em ratos machos. Os resultados mostraram que sob condições basais a

angiotensina 1-7 não induz sede, mas aumenta a ingestão de água sob estímulo osmótico. Os resultados mostraram uma nova função para esse peptídeo, que se liga ao receptor MAS e antagoniza os efeitos clássicos do sistema renina-angiotensina. A privação hídrica aumentou a expressão do receptor MAS no SON (núcleo supra óptico) e PVN (núcleo paraventricular), sem alterações na expressão de ARNm de ECA 2, o que se relaciona com o aumento da sede observado após privação hídrica.

Paes-Leme *et al.* (2018) avaliou em ratos machos da linhagem Sprague- Dawley os neurônios sensíveis à glicose e à ANG II no núcleo subfornicial (SFO). A angiotensina II (ANG II) é um peptídeo que regula a ingestão alimentar e o ganho de peso corporal. O experimento avaliou se alterações agudas na concentração de glicose poderiam modificar a resposta à ANG II na concentração de 10 mmol/L de glicose. Os dados permitiram concluir que um mesmo neurônio do SFO pode perceber variações na concentração de glicose e de ANG II e que alterações agudas na concentração de glicose podem alterar a resposta à ANG II.

Porcari *et al.* (2019) examinaram se a depleção de sódio corporal altera a expressão de subtipos de receptores AT1a no núcleo dorsal da rafe (NDR). Nesse estudo foram realizadas microscopia confocal e imunofluorescência para serotonina (5-HT). Os autores verificaram que neurônios serotoninérgicos expressam receptores AT1 no NDR. A imunofluorescência demonstrou que após a depleção de sódio existe uma significativa redução no conteúdo de serotonina, mas não houve alteração na expressão de receptores AT1 ou na co-localização AT1/5-HT. A depleção de sódio também aumentou a expressão de ARNm de *Agtr1a* no núcleo subfornicial e núcleo dorsal da rafe, indicando que a expressão de *Agtr1a* nesses núcleos pode ser um marcador da depleção de sódio.

### **Influência de hormônios gonadais na ingestão de cloreto de sódio e água**

Antunes-Rodrigues & Covian (1963) reportaram que a ingestão de cloreto de sódio varia em função da fase do ciclo estral em ratas. Assim, durante o estro há um aumento na ingestão de cloreto de sódio enquanto que no diestro quando altos níveis plasmáticos de estrogênio são encontrados a ingestão de salina hipertônica diminui. Dados

similares foram encontrados por Danielsen & Buggy (1980) em ratas intactas na fase do estro.

A avaliação do efeito dispsogênico da angiotensina II em ratos machos e fêmeas foi demonstrado por Vijande *et al.* (1978), o qual observou que as fêmeas adultas ingerem mais água do que os machos e também demonstrou que as fêmeas adultas apresentavam maior sensibilidade a ANG II durante o proestro. Os machos e as fêmeas castradas ao nascimento e fêmeas androgenizadas ao nascimento bebiam volumes similares de água após a injeção de ANG II. O padrão de ingestão induzida por estímulo é diferente em ambos os sexos, mas parece depender do estágio de desenvolvimento dos animais.

Mulheres que possuem níveis plasmáticos elevados de estrógeno como no momento da ovulação ou pela administração de estrógeno exógeno apresentam retenção de líquidos corporais. Durante a fase folicular, mulheres jovens apresentam níveis plasmáticos elevados de vasopressina em paralelo com elevadas concentrações de E2 (SOMPONPUN, 2007).

Auger *et al.* (2011) demonstraram especificamente em machos adultos da linhagem Sprague-Dawley, que tiveram duas semanas de recuperação cirúrgica até o início do tratamento com testosterona. Nesses animais a expressão de vasopressina no BST (*bed nucleus of stria terminalis*) no cérebro adulto é dependente da exposição à testosterona. A orquiectomia reduz dramaticamente a expressão de AVP (vasopressina) no BST, enquanto que a reposição com testosterona restaura a expressão de AVP no BST. Neste estudo foi testada a hipótese de que a expressão de AVP no cérebro adulto é mantida através de modificações epigenéticas no gene promotor da vasopressina. Neste estudo foi observado que a orquiectomia de machos adultos resultou na diminuição da expressão de vasopressina e aumento da metilação de sítios CpG específicos no gene promotor da vasopressina no BST.

Bingham *et al.* (2012) sugeriram que a aromatização de testosterona a estrógeno é importante para os efeitos neonatais da testosterona em relação a respostas neuroendócrinas a estímulos agudos. Neste estudo foi utilizado um bloqueador de aromatase que resultou na diminuição da expressão de arginina vasopressina dentro de regiões extra-hipotalâmicas em adultos, o que confirmou que a exposição cerebral ao

estrógeno é diminuída durante o desenvolvimento em machos. Os adultos tratados com o bloqueador de aromatase durante o período neonatal apresentaram níveis altos de corticosterona 30 minutos após a exposição ao estresse de restrição comparado com os animais controles bem como aumento da expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Epstein (1992) verificou que a ingestão espontânea de sal, que ocorre diariamente quando o rato está em balanço positivo de sal é organizado durante o período perinatal pela aromatização da testosterona que suprime a ingestão no macho. Em outro trabalho Chow *et al.* (1992) verificou que fêmeas ingerem maior volume de NaCl 3 % do que machos tanto em condição induzida ou pela ingestão espontânea e sugeriu que a ingestão de cloreto de sódio apresenta dimorfismo sexual que seria instaurado durante o período neonatal e que se torna significativamente diminuído na vida adulta por ação da testosterona. Neste estudo machos e fêmeas adultos castrados apresentaram ingestão de salina hipertônica suprimida pela testosterona exógena e parece que o dimorfismo sexual relacionado com a ingestão de sódio é governada pela testosterona que é convertida em estrógeno no cérebro. Tal achado foi demonstrado pelo tratamento de um dia em fêmeas castradas com um andrógeno não aromatizável, a dihidrotestosterona, que não alterou a ingestão espontânea e também não alterou a ingestão induzida de cloreto de sódio.

Na revisão de Santollo & Daniels (2015) foram abordadas as diferenças na expressão de receptores estrogênicos em diferentes estruturas encefálicas, bem como aspectos relacionados com o dimorfismo sexual relacionado com a ingestão de salina hipertônica de machos e fêmeas.

Kensicki *et al.* (2002) em modelo de fêmeas ovariectomizadas e tratadas com diferentes doses de estrógeno, mediante implantação de pellets subcutâneos, demonstrou que fêmeas ovariectomizadas da linhagem SHR ingeriram maior volume de salina hipertônica que fêmeas ovariectomizadas da linhagem Wistar Kyoto. Foi observado que concentrações salinas acima de 1,0% são bastante aversivas para fêmeas SHR sham e ovariectomizadas com estrógeno. Esses animais tiveram acesso a diferentes concentrações de solução salina hipertônica, a qual a salina hipertônica 0,5% apresentou maior consumo pelas fêmeas SHR e conforme a dose de estrógeno aumentava, maior era o consumo de salina nessa mesma concentração comparando com as fêmeas da linhagem Wistar Kyoto.

Em machos intactos SHR, o consumo induzido de cloreto de sódio foi cerca de 10 vezes maior que os da linhagem Wistar Kyoto (PEREIRA-DERDERIAN *et al.* 2010). Os autores observaram que no modelo de privação hídrica com ciclos de rehidratação parcial houve elevada expressão de *c-fos* na *lamina terminalis*, sendo significativa a imunoreatividade no órgão subfornicial em animais SHR. Esse modelo intensifica a atividade neuronal de áreas prosencefálicas e mesencefálicas relacionadas com o apetite por sódio.

Em fêmeas SHR ovariectomizadas, o tratamento com estradiol diminuiu respostas hedônicas e aumentou respostas aversivas ao cloreto de sódio e também reduziu a ingestão de cloreto de sódio durante o teste de apetite ao sódio, mas não afetou a pressão arterial média e a frequência cardíaca (PEREIRA *et al.* 2019).

Almeida-Pereira *et al.* (2019) demonstraram os mecanismos celulares pelos quais o estrógeno interage com as ações da angiotensina II em fêmeas ovariectomizadas. Os resultados mostraram que a via PKC/p38 MAPK está envolvida na ingestão de água induzida por ANG II e na secreção de ocitocina em ratas. Existiria um mecanismo intracelular distinto de sinalização da ANG II que levaria à liberação do hormônio neurohipofisário. O estrógeno atenuou a fosforilação da via p38/ MAPK/ E<sub>2</sub> em resposta à ANG II. Os resultados também sugeriram que o estradiol modula os efeitos da ANG II através da atenuação da via MAPK.

### **Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva em machos e fêmeas**

Os andrógenos são os hormônios sexuais masculinos no homem e no rato. Os andrógenos são: diidrotestosterona, testosterona, androstenediona e a desidroepiandrosterona. Esses hormônios são produzidos no testículo e na glândula adrenal. O colesterol é o precursor para a síntese dos esteroides sexuais na glândula adrenal, e posteriormente a testosterona será sintetizada nas células de Leydig e secretada no fluido dos túbulos seminíferos em direção à circulação sistêmica. Já a diidrotestosterona é sintetizada na próstata, uma vez que esse tecido expressa uma enzima importante, a 5 $\alpha$ -redutase, que converte a testosterona em diidrotestosterona. E as células de Sertoli são responsáveis por secretar a inibina. Todos esses hormônios realizam um importante feedback com a hipófise e regulam a função reprodutiva.

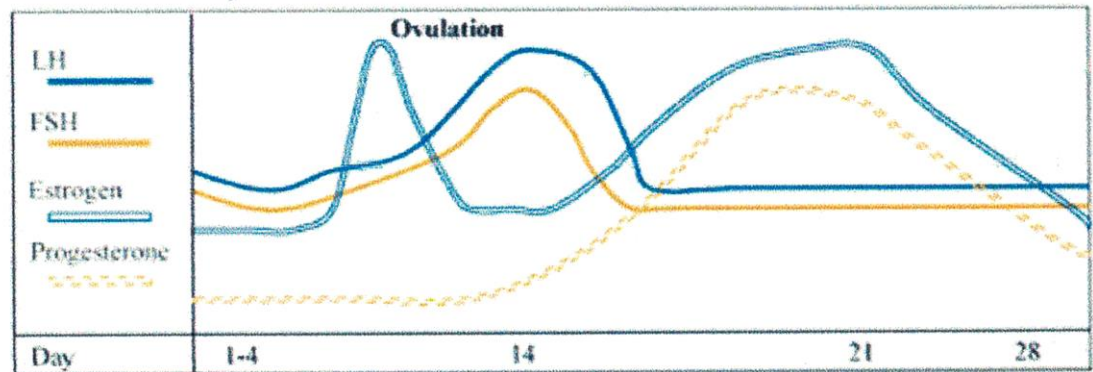
Os androgênios com efeitos fisiológicos mais relevantes são a testosterona e a diidrotestosterona. A testosterona possui efeitos importantes sobre a diferenciação dos ductos de Wolf na fase embrionária, na espermatogênese, possui efeito anabólico muscular, sobre a regulação das gonadotrofinas e GnRH, além de inibir o surgimento de caracteres sexuais femininos como o desenvolvimento mamário e promover o alongamento das cordas vocais. Já a diidrotestosterona possui ações relevantes na maturação sexual durante a puberdade e sobre a masculinização da genitália externa (GRIFFIN & WILSON, 2003).

Os hormônios gonadais femininos principais são os estrogênios: estradiol, estrona e a progesterona. As células da granulosa presentes no folículo ovariano são as responsáveis pela produção de estradiol, ativinas e inibinas e as células da teca secretam androgênios e progesterona. A regulação hormonal do ciclo reprodutivo na mulher envolve o controle hipotalâmico da secreção de hormônios, mediante o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que atua no gonadotrofo adeno-hipofisário, estimulando a liberação de hormônios como LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio folículo estimulante) e estradiol, cujas concentrações plasmáticas flutuam, o que regula a função ovariana, e promove o desenvolvimento das etapas de maturação folicular, ovulação e formação do corpo lúteo. Os hormônios FSHR, LH, estradiol e progesterona realizam feedback com a hipófise e as oscilações hormonais determinam efeitos tróficos importantes no tecido uterino. Na mulher existem duas fases no ciclo reprodutivo: a fase folicular e a fase lútea (YEN & ADASHI, 1999).

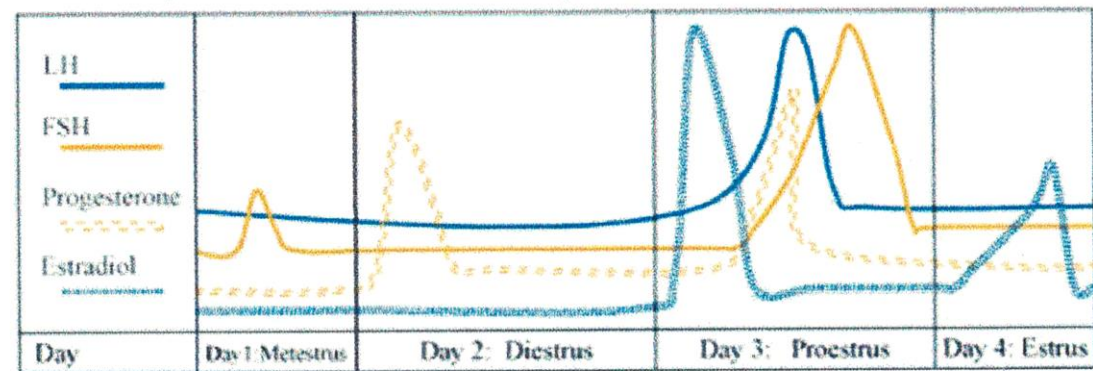
Sobre os aspectos da fisiologia reprodutiva das ratas, a literatura menciona a existência de 4 fases do ciclo estral que se repetem diariamente e assim são denominadas: proestro, estro, metaestro e diestro (MARCONDES *et al.* 2002).

Segundo a figura de Emanuelle *et al* 2002, existem diferenças entre o ciclo reprodutivo da mulher e o ciclo estral da rata.

### A Human Reproductive Menstrual Cycle



### B Rat Reproductive Menstrual Cycle



**Fig. 1-** O ciclo reprodutivo da mulher e da rata. A) *O ciclo reprodutivo humano.* O ciclo menstrual humano típico dura 28 dias, com a ovulação ocorrendo no 14º dia, que é o ponto médio. A primeira fase do ciclo é a fase folicular, na qual os níveis de estrógeno e de progesterona estão muito baixos. Aproximadamente no dia 12, ocorre o pico de estrogênio, causando aumento da secreção de LH e FSH a partir da hipófise, atingindo o pico de concentração hormonal no dia 14. O pico de LH/FSH resulta na ovulação, sustentada pela elevação do estrogênio e um novo aumento nos níveis de progesterona. Após a ovulação se inicia a fase lútea, na qual os níveis de estrógeno e progesterona aumentam e depois sofrem queda novamente. B) *O ciclo reprodutivo da rata.* O ciclo da rata é mais curto que o ciclo do ser humano, consistindo de 4 a 5 dias. A progesterona aumenta nitidamente na fase pós-ovulação ou lútea (diestro), no dia 2, e sofre uma queda no final do diestro. No início da fase folicular (tarde do proestro), os níveis estrogênicos aumentam, causando um rápido pico de LH e FSH entre 4 p.m e 6 p.m. e uma aumentada secreção de progesterona. Como nos humanos, o pico de gonadotropinas leva à ovulação. Todos esses hormônios retornam aos níveis basais quando ocorre a ovulação (estro) no dia 4. Finalmente ocorre um pico de estradiol no fim da tarde do estro. (Figura apresentada na íntegra e texto extraído da legenda da Figura 3 de EMANUELLE *et al.* (2002).



Ao observar a citologia vaginal das ratas podem ser encontrados diferentes tipos de células como células cornificadas, células epiteliais e leucócitos. As populações celulares variam de acordo com a fase do ciclo. No proestro predominam as células epiteliais, no estro são encontradas células cornificadas em grande quantidade, no metaestro os três tipos células se apresentam com igual população e na fase do diestro predomina a presença de leucócitos (MARCONDES *et al.* 2002).

### **O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e seu papel na hipertensão: aspectos neuroendócrinos**

Jöhren *et al.* (2003) avaliou a expressão de receptores AT<sub>1A</sub>, AT<sub>1B</sub> e AT<sub>2</sub> no hipotálamo, na hipófise e na adrenal antes e após o estabelecimento da hipertensão nos animais SHR e Wistar Kyoto na mesma idade e verificou que a maior atividade do sistema renina-angiotensina aldosterona na linhagem SHR implicava no aumento da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Um estudo de Pereira-Derderian *et al.* (2016) demonstrou alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona cerebral, principalmente na região hipotalâmica no modelo SHR. De acordo com esse estudo, os animais SHR não são especificamente sensíveis aos efeitos plásticos da angiotensina II em resposta a desidratação, já que provavelmente a sensibilização da ingestão de sódio pode ocorrer precocemente nessa linhagem, independente de sessões repetidas de desidratação.

Wang *et al.* (2017) avaliaram a expressão da ECA 2 (enzima conversora de angiotensina tipo 2) no hipotálamo e na hipófise e sua relação com a hipertensão, comparando animais machos intactos de 40 semanas de idade da linhagem SHR com os da linhagem Wistar Kyoto. Nesse estudo foi demonstrado que a expressão de ARNm para ECA, AT<sub>1R</sub>, ECA 2, MasR foi encontrada no hipotálamo e na hipófise tanto em animais da linhagem SHR quanto nos animais da linhagem Wistar, sugerindo que o eixo ECA-AngII-AT<sub>1R</sub> apresentava aumento de sua atividade no hipotálamo de animais SHR, enquanto que ao conteúdo de proteína ECA 2 estava relativamente insuficiente no hipotálamo e foi observado que o sistema renina angiotensina hipofisário não está envolvido na hipertensão de animais machos da linhagem SHR. A supra regulação da

expressão da ECA e a infra regulação da ECA 2 no hipotálamo sugeriram que o balanço entre ECA 2 e ECA hipotalâmicas são determinantes para a pressão arterial, sendo importante considerar a ação hormonal, por exemplo, a ação da testosterona na pressão arterial, conforme foi estudada por Dalmaso *et al.* 2017. Esses autores avaliaram os efeitos da suplementação com testosterona em ratos SHR machos de 12 e 22 semanas de idade em relação à pressão arterial, sendo que os animais também foram tratados com enalapril. Os dados sugeriram que a suplementação com testosterona pode causar em machos SHR jovens e intactos um aumento da pressão arterial com redução de ganho de peso, tecido adiposo, e dos níveis de leptina, embora no envelhecimento de machos SHR ainda não tenha sido elucidado o mecanismo pelo qual a hipertensão pode ser atenuada.

### **A reserva de sódio corporal**

Evidências da literatura demonstradas pelos estudos de Stricker & Wolf (1969), Wolf *et al.* (1974) e Ferreyra & Chiraviglio (1977) sugeriram que a longa latência para a resposta apetitiva ao sódio e pelo seu déficit extracelular poderia ser explicada pela existência de um reservatório de sódio corporal. Cannon (1932) também comentou em seu livro sobre a possível existência de um reservatório de sódio epitelial que poderia ser utilizada frente aos distúrbios homeostáticos.

Os íons  $\text{Na}^+$  se ligam aos sítios polianiônicos dos glicosaminoglicanos (GAGs), que são polissacarídeos lineares ligados covalentemente a proteoglicanos, consistindo em múltiplas unidades dissacarídicas (FARBER *et al.*, 1957). Essas unidades exibem sítios aniônicos (grupos sulfato) nos quais os cátions, como o  $\text{Na}^+$ , podem se ligar (FALLER & GUVENCH, 2015). GAGs estão presentes na pele e cartilagem de ratos (Titze *et al.*, 2004) e humanos (KOPP *et al.*, 2013). Os íons  $\text{Na}^+$  são possivelmente armazenados nessas regiões e podem ser mobilizados dependendo das diferentes condições fisiológicas para repor o  $\text{Na}^+$  plasmático após diferentes desafios hidroeletrólíticos, como a dieta crônica restrita ao sal (SCHAFFLHUBER *et al.*, 2007).

Entre os roedores, o rato é a espécie na qual a pele possui maiores similaridades estruturais em relação aos humanos (GODIN & TOUITOU, 2007) e a pele do macaco Rhesus é a que mais se assemelha à pele humana, filogeneticamente (JUNG *et al.* 2014).

A principal diferença entre a pele de roedores e a pele do ser humano é que nos roedores a capacidade de absorção de drogas através da pele é maior (JUNG *et al.* 2014). Outras diferenças na pele da orelha de coelhos em relação à dos humanos seriam a espessura do estrato córneo que é mais fina e a composição lipídica que é maior do que em humanos.

De acordo com WEISTEIN *et al.* (1984) os queratinócitos se proliferam a partir das células basais da parte mais interna da pele humana (estrato basal). As células-tronco epidérmicas estão ligadas por hemi-desmossomas ao estrato basal e podem se dividir em mais células-tronco, que persistem indefinidamente e mantém a capacidade regenerativa, mas possuem potencial de divisão limitado. Ao longo da diferenciação, os queratinócitos migram em direção ao estrato espinhoso e estrato granuloso para eventualmente se tornarem corneócitos que formam uma camada externa relativamente impermeável, o estrato córneo. Uma vez totalmente diferenciados, esses corneócitos perdem seus núcleos e células citoplasmáticas. As organelas eventualmente serão eliminadas por descamação. O tempo estimado para o turnover de células-tronco epidérmicas até a descamação na pele humana saudável é cerca de 39 dias. De acordo com a calculadora de Du Bois & Du Bois (1916), um ser humano de 1,70 m e 70 kg apresenta 0,064 m<sup>2</sup> de área de superfície corporal.

Hofmeister *et al.* (2015) após realizar ressonância magnética em humanos, com marcação de sódio radioativo, determinou a concentração de sódio na pele. Essa concentração de Na<sup>+</sup> poderia variar de 170 a 250 mmol/L. Considerando que os queratinócitos bombeiam Na<sup>+</sup> para a derme, haveria um aumento da concentração de Na<sup>+</sup> na papila dérmica, onde as células de Langerhans residem. A papila dérmica seria submetida à circulação de sangue em um sistema de contra-corrente semelhante ao do rim, que posteriormente concentraria os eletrólitos, e através de drenagem linfática haveria a redução da concentração intersticial de eletrólitos.

Alguns modelos de hipertensão foram estudados pelo grupo de Titze e colaboradores que determinaram os conteúdos de sódio osmoticamente ativo e inativo na pele. No modelo DOCA-salt no trabalho de Titze *et al.* (2005) que é modelo de hipertensão induzida por desoxicorticosterona resulta no acúmulo de Na<sup>+</sup> epitelial por diferentes mecanismos, nomeados estoque de Na<sup>+</sup> osmoticamente inativo e estoque de

sódio osmoticamente ativo. Esses estoques permitem a manutenção do volume independente do aumento do conteúdo de sódio corpóreo.

Assim, o estoque de sódio osmoticamente inativo acumulado estaria relacionado com o conteúdo de sódio formando complexos com as proteínas carregadas negativamente que são os glicosaminoglicanos; o estoque de sódio osmoticamente ativo seria o sódio presente na pele e que poderia se deslocar ao plasma através da microcirculação e vasos linfáticos; o estoque de sódio inativo total da pele toma como referência a carga de sódio que chega à pele através do fluido extracelular e o sódio ativo total seria a carga de sódio encontrada no plasma, ou seja, a própria concentração de sódio plasmático. Essas descrições podem ser encontradas nos trabalhos de TITZE *et al.* (2003, 2004).

O estoque de sódio osmoticamente inativo acumulado na pele, pode contribuir para a manutenção da eunatremia em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição de estrógeno, após a depleção de sódio com furosemida. A depleção de sódio induziu a mobilização da reserva osmoticamente inativa acumulada. A reposição com estrógeno não alterou a reserva osmoticamente inativa e também não exerceu influência sobre a mobilização de sódio inativo, mas reduziu a ingestão cumulativa de salina hipertônica em fêmeas tratadas com estrógeno (LOPES-MENEZES *et al.* 2019).

Em outro estudo, Titze *et al.* (2002) investigou o estoque de sódio em modelo de hipertensão. Nesse experimento foi verificado que o estoque de sódio osmoticamente inativo pode ser reduzido no modelo de hipertensão sensível ao sal e no modelo de hipertensão resistente ao sal (Dahl-model) pela utilização de duas dietas: uma delas com alto teor de sódio (8%) e outra com baixo teor de sódio (0,1%) por 4 semanas e a pressão arterial foi medida ao final do experimento. Nos animais com hipertensão sensível ao sal, a dieta de NaCl 8% levou ao acúmulo de sódio e retenção de água pela reduzida excreção renal de sódio apresentada nesse modelo.

Rendell *et al.* (1996) realizou a avaliação do fluxo sanguíneo epitelial mediante a técnica de Doppler em animais SHR e Wistar Kyoto a partir dos 3 meses de idade e avaliou os animais pelo período de um ano. Nesse trabalho foi observado que o fluxo sanguíneo epitelial diminui com o avanço da hipertensão, sobretudo quando esta se torna

crônica e o fluxo sanguíneo se torna ainda menor em regiões da pele com maior perfusão arteriovenosa.

Lankhorst *et al.* (2017) avaliaram que em resposta à ingestão de sal os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  se acumulam na pele, estimulando a linfangiogênese via ativação do sistema mononuclear fagocitário e pela sinalização do fator VEGF-C (fator de crescimento vascular endotelial). A inibição dessa via resulta na hipertensão sensível ao sal. O receptor VEGFR3 pertence à superfamília dos receptores VEGF e seu ligante é o VEGF-C. Esse receptor apresenta atividade tirosina kinase, cuja sinalização está voltada para migração, proliferação e linfangiogênese (BAE *et al.* 2015).

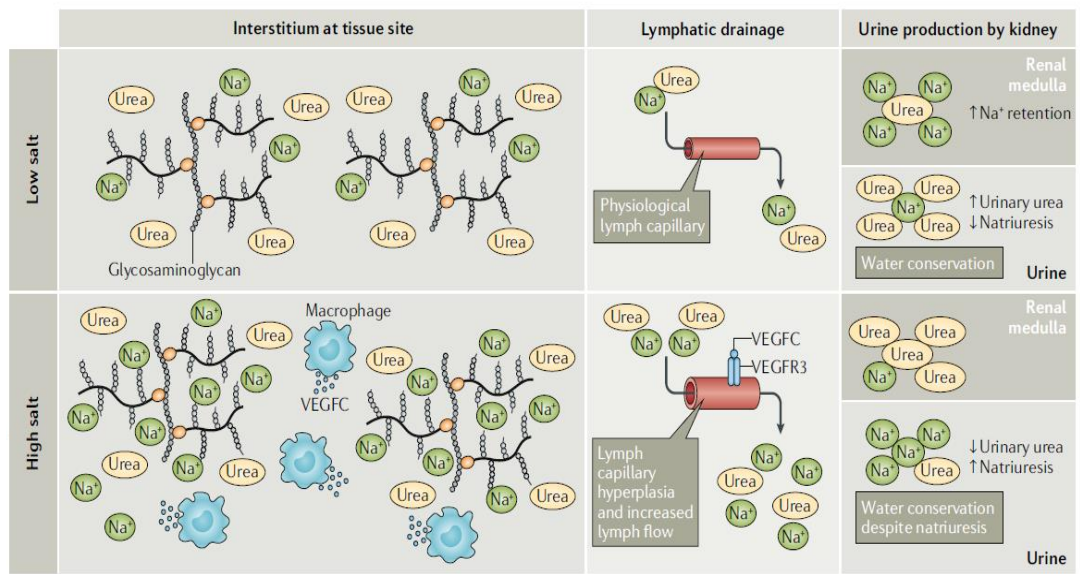
Wiig *et al.* (2013) avaliou um modelo de dietas com alto e baixo teor de sódio e observou que o microambiente da pele de animais com dieta hiperssódica seria hipertônico em relação ao plasma e que o sistema mononuclear fagocitário dita eventos regulatórios via TonEBP (proteína responsiva ao aumento da tonicidade) e que o VEGF-C presente na pele é importante para o controle da pressão arterial sistêmica. Este mesmo estudo também demonstrou que no meio intersticial da pele de animais sob dieta hiperssódica houve aumento na quantidade de células do sistema mononuclear fagocitário, aumento de células VEGF-C positivas. E ao avaliar a via TonEBP/VEGF-C foram observados aumentos da expressão de ARNm do TonEBP e VEGF-C, bem como aumento da expressão proteica de VEGF-C. Além disso, foi demonstrado que a densidade de capilares linfáticos também aumentou.

Wiig *et al.* (2018) reportaram em uma revisão que o meio intersticial da pele, pode ser considerado como um terceiro compartimento de armazenamento de sódio, e que o balanço de sódio envolve não somente a excreção renal de água e eletrólitos, mas também mecanismos de regulação extra-renais. Em conjunto, esses fatores contribuiriam para a manutenção da pressão arterial.

Na literatura vários autores discutem que a reserva de sódio corporal, principalmente a reserva de  $\text{Na}^+$  da pele, poderia estar integrada à manutenção da pressão arterial e do volume circulante (Titze *et al.* 2005; Titze *et al.* 2002) e que o rim não seria o único efector importante para o balanço de sódio e água corporal (TITZE *et al.* 2014). Além do rim, a pele poderia contribuir com o clearance de sódio (WIGG *et al.* 2013, MÜLLER *et al.* 2019).

O estudo clínico realizado por Van IJzendoorn *et al.* (2019) demonstraram em humanos (homens ou mulheres) com choque séptico apresentaram aumento no estoque de sódio osmoticamente ativo e de conteúdo de água na pele, sendo que o estudo foi realizado com biópsia de pele. Nos casos de hipernatremia na sepse foi observado aumento do estoque osmoticamente ativo de sódio, conferindo maior probabilidade de ocorrer edema.

Rabelink & Rotmans (2009), em um artigo de comentário também ilustrou um modelo para explicar o balanço de sódio no compartimento subcutâneo após sobrecarga salina, no qual o aumento da tonicidade do interstício levaria à inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e acúmulo de sódio na matrix extracelular, o que levaria à atração de macrófagos para o local em resposta ao estresse hipernatrêmico.



**Fig. 2-** Figura representativa do recrutamento de macrófagos residentes na pele devido à ingestão de alto e baixo conteúdo de sódio. *Painel superior: baixa ingestão de sódio.* Quando existe baixa ingestão de sódio a natriurese também é reduzida. Para conservar água e sódio um alto gradiente osmótico de sódio é formado entre a medula renal e o córtex, sendo excretada a urina rica em ureia. E os vasos linfáticos apresentam uma fisiologia normal. *Painel inferior: alta ingestão de sódio.* Quando a ingestão de sódio é alta, os macrófagos se infiltram no tecido, sinalizam a hipertonicidade e iniciam a sinalização de uma cascata do fator de ativação nuclear de células T tipo 5 (NFAT5), que leva a produção do fator de crescimento endotelial tipo C (VEGF-C). O VEGF-C ativa seu receptor VEGFR3, nos capilares linfáticos de células endoteliais, levando à hiperplasia de capilares linfáticos, que facilita o clearance de  $\text{Na}^+$  dos tecidos. Figura apresentada em parte e texto extraído da legenda da Figura 1 de MÜLLER *et al.* 2019.

Em outros trabalhos foi demonstrado que o bloqueio do sistema mononuclear fagocitário levaria a redução na densidade de capilares linfáticos cutâneos, ao acúmulo de eletrólitos na pele e redução na expressão de eNOS em vasos sanguíneos e aumento da pressão arterial. Esses achados sugerem que as células do sistema imune são reguladoras do ambiente interno e da homeostase da pressão arterial (MACHNIK *et al.* 2009, 2010).

Em geral, diversos estudos na literatura apontam o papel dos hormônios gonadais na pele. Alguns desses trabalhos foram motivados pelos aspectos dermatológicos outros estudos foram motivados por aspectos endócrinos ou funcionais da pele, sendo esse último tema descrito em mais detalhes nesta revisão.

A ação dos andrógenos, como a testosterona e a di-hidrotestosterona, na pele é mediada pelo receptor de andrógeno (Ar), e a ação dos estrógenos é mediada por receptores estrogênicos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), codificados como genes *Esr1* e *Esr2*. Esses receptores fazem parte da superfamília dos receptores nucleares.

A ação estrogênica na pele está relacionada com a melhora da cicatrização tecidual. No estudo de Perzelová *et al.* (2016) em cultura de células de ratas ovariectomizadas foi demonstrado que os queratinócitos expressam tanto receptores ER $\alpha$  quanto ER $\beta$ . O uso do agonista ER $\alpha$  melhorou a expressão da proteína Ki-67 e o uso do agonista ER $\beta$  melhorou a proliferação celular, a expressão de keratin-19 e acelerou a regeneração epitelial.

Em outro estudo, foi observado aumento da proliferação de fibroblastos em cultura de células da pele de ratas ovariectomizadas, também submetidas a tratamento com agonista ER $\alpha$  e agonista ER $\beta$  (NOVOTNÝ *et al.* 2011). O estímulo do receptor ER $\alpha$  levou a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos *in vitro*. A formação da matrix extracelular foi melhor e a força tensil da cicatriz foi aumentada quando o receptor ER $\beta$  foi estimulado.

A síntese de hormônios esteroides ocorre em vários tecidos como as glândulas adrenais, os ovários, os testículos e a placenta. Além desses tecidos, é possível haver esteroidogênese para a produção de andrógenos na pele, e sobretudo, essa característica é particularmente presente no homem e nos animais machos. Neste sentido, a pele possui toda a maquinaria enzimática necessária para produção de esteroides *de novo* e expressa enzimas importantes como a esteroide sulfatase, 3 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase, 17 $\beta$ -

hidroxyesteróide desidrogenase, 5 $\alpha$ -redutase, 3 $\alpha$ - hidroxí-esteróide desidrogenase e a aromatase. Assim, a pele consegue sintetizar esteroides a partir do colesterol endógeno (CHEN *et al.* 2002). Outra função dos andrógenos na pele seria a de estimular a produção de sebo (CERUTI, *et al.* 2018).

Kumtornrut *et al.* (2019) demonstraram a ação de andrógenos em um estudo *in vitro* na pele humana com acne e verificaram que os andrógenos aumentam a produção de fatores de crescimento a partir de fibroblastos da derme, e que esses fatores de crescimento produzidos podem alterar a diferenciação de queratinócitos na lesão da acne. Os andrógenos junto com seus co-reguladores, afetariam a função dos fibroblastos por mecanismos via receptor de andrógeno por via genômica e não genômica.

É importante lembrar que o processo de calcinação, abordado neste estudo nas análises de sódio da pele, é definido como um tratamento de remoção da água, dióxido de carbono e de outros gases ligados fortemente a hidratos e carbonatos. A calcinação é um processo vigorosamente endotérmico, sendo usada principalmente na produção de óxidos (SOARES, 2007).

### **Regulação da pressão arterial**

A manutenção da pressão arterial é essencial à preservação da vida, sendo necessária a constância de valores de pressão arterial e adequada perfusão tecidual para a continuidade de diversas funções fisiológicas.

Vários mecanismos e sistemas atuam de forma integrada para o controle homeostático da pressão. Existem, portanto, mecanismos de curto, médio prazo e longo prazo.

A regulação a curto e médio prazo ocorre com fatores neurais, locais e hormonais. Os fatores neurais ocorrem via quimiorreceptores e mecanorreceptores arteriais, além de receptores cardiopulmonares, que contam com a neurotransmissão vagal. Os fatores locais são dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), oxigênio (O<sub>2</sub>), fatores endoteliais, osmolalidade, variações de temperatura e fatores miogênicos (MICHELINI & KRIEGER, 1984). Os fatores hormonais seriam a vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial, sistema renina-angiotensina-aldosterona (HALL *et al.* 1984; SULLIVAN & RATTS, 1988).



Neurotransmissores como adrenalina e noradrenalina também seriam fatores parácrinos nessa regulação (JULIUS, 1991).

A regulação a longo prazo da pressão arterial conta com a resposta de ingestão de fluidos e excreção renal de eletrólitos para que ocorra um balanço de sódio e água corporais. Além disso, a angiogênese e a diminuição da população de vasos sanguíneos são mecanismos que ocorrem para modificar a hemodinâmica na hipertensão (BROOKS & OSBORN, 1995; COWLEY, 1992).

A diferença de gênero na regulação da pressão arterial em SHR se deve à expressão dimórfica do FGF-21 (fator de crescimento de fibroblastos). As fêmeas Wistar Kyoto apresentaram significativamente maior concentração sérica de FGF-21, enquanto que nos animais SHR a concentração desse fator estava reduzida (CHEN *et al.* 2019). Os autores reportaram que possivelmente ocorreu downregulation do receptor FGFR1/R4 em machos e de FGFR2/FGFR4 em fêmeas SHR. Os autores comentaram que na hipertensão fisiológica esse mecanismo ainda não foi elucidado.

Wsol *et al.* (2019) demonstraram o papel central da ocitocina na regulação da pressão arterial em ratos machos espontaneamente hipertensos submetidos à infusão intracerebroventricular de NaCl 0,9%. A injeção central de ocitocina foi hipotensora tanto nos animais SHR expostos e não expostos ao desafio osmótico, enquanto que na linhagem Wistar Kyoto, apenas os animais expostos responderam com a redução da pressão arterial.

Reckelhoff *et al.* (2019) reportaram que alguns antioxidantes como o tempol e a apocinina podem reduzir a pressão arterial em machos SHR, enquanto que nas fêmeas o estresse oxidativo parece ser importante na fase inicial da hipertensão. Ainda não está elucidado se a manutenção da hipertensão em fêmeas é devida ao estresse oxidativo.

### **O modelo de animais espontaneamente hipertensos (SHR)**

O modelo SHR (animais espontaneamente hipertensos) é um modelo de hipertensão essencial, sendo este o modelo que mais se aproxima da hipertensão do ser humano. Essa linhagem foi produzida por Okamoto & Aoki (1963) a partir de animais da

linhagem Wistar que desenvolviam hipertensão espontânea. Esses animais foram cruzados entre si e foram estudados por várias gerações e semanas. Os autores mencionaram que a partir da geração F3 havia 100% de animais hipertensos.

Geralmente, em estudos com a linhagem SHR o controle experimental é a linhagem Wistar Kyoto, comumente utilizados como controle normotenso.

De acordo com artigos já publicados na literatura, é possível a comparação entre ratos Wistar e ratos da linhagem SHR (HOSFORD *et al.* 2017, SCHRECKENBERG *et al.* 2017). Em ambos os trabalhos os ratos Wistar albinos foram utilizados como controle normotenso, o que justificaria a sua utilização neste presente estudo.

No estudo de Okamoto & Aoki (1963) foi observado que os animais dessa linhagem não apresentaram hipertensão até as 5 semanas de vida pós-natal. Isso torna o modelo SHR interessante para ser estudado antes do estabelecimento da hipertensão.

A hipertensão está associada com aumento de incidência de doenças coronarianas e cerebrovasculares. É uma doença de causa multifatorial na qual a herança familiar, a susceptibilidade individual, o ambiente e o estilo de vida são fatores importantes para o desenvolvimento da doença. O modelo SHR tem sido bastante estudado, do ponto de vista fisiológico, farmacológico e clínico, no contexto de melhorar a condição de hipertensão e agregar novos conhecimentos sobre esse tema.

A hipertensão arterial tem sido caracterizada como uma síndrome inflamatória crônica com ativação de receptores Toll-like (TLR) e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Recentemente foi demonstrado que os efeitos do DNA mitocondrial sobre o tônus vascular podem contribuir para o dimorfismo sexual na hipertensão arterial em animais espontaneamente hipertensos (ECHEM *et al.* 2019).

Saxena *et al.* (2018) em um artigo de revisão enfatizaram que a patogenia da hipertensão essencial está relacionada com a hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático e alterações em conexões hipotálamo-corticais. Os autores abordaram outros fatores que contribuem para a hipertensão essencial como: polimorfismos de genes, disfunção do endotélio vascular, ineficiência na excreção renal de sódio, níveis plasmáticos elevados de renina, a obesidade e resistência à insulina, apnéia do sono, hiperuricemia, a insuficiência da vitamina D, fatores ambientais (poluição e tabaco),

alterações no débito cardíaco e resistência periférica, fatores comportamentais e de estresse.

### **Hipóteses do estudo**

Levando em consideração que os animais SHR não são hipertensos até as 4 semanas de vida tentamos explicar porque esses animais não são hipertensos nesse momento e porque depois de adultos eles se tornariam hipertensos.

Consideramos também que a reserva de sódio da pele nunca foi investigada nessa linhagem, mesmo em condições fisiológicas, e que na literatura existem evidências de que essa reserva pode contribuir na manutenção do volume sanguíneo e da pressão arterial TITZE *et al.* (2005).

Pensamos, então que modificações no nível da reserva de sódio da pele poderiam ser atribuídas à hipertensão e isso poderia ser uma explicação para a hipertensão nos SHR. Por isso também, estudamos em duas idades: 4 semanas e nas 12 semanas de vida para contemplar a fase de desenvolvimento da hipertensão nos animais jovens e a fase madura da hipertensão nos adultos.

Os hormônios vasopressina, ocitocina e angiotensina 2 possuem relevância na regulação hidroeletrólítica e a angiotensina 2 estaria mais relacionada com a regulação da pressão, então nós pensamos que esses hormônios podem sofrer alterações pela idade dos animais, na hipertensão ou pela diferença entre machos e fêmeas. A literatura reporta que os hormônios ANG 2, AVP e OT também expressam receptores na pele (MANZANO-GARCIA *et al.* 2018; VISWANATHAN & SAAVEDRA 1992).

Considerando também evidências da literatura, foi mostrado que machos e fêmeas intactos possuem alta concentração de sódio osmoticamente inativo na pele, enquanto que, ao serem castrados, a concentração de sódio osmoticamente inativo diminui (Titze *et al.* 2003), o que indicaria que os hormônios sexuais são importantes na formação da reserva de sódio da pele. Por isso, foi colocada a hipótese de que machos e fêmeas podem ser diferentes em relação à reserva de sódio da pele e que o fator idade pode ser importante, tendo em vista a possível influência de hormônios gonadais e o estágio reprodutivo dos animais.

## **2.0 Objetivo**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar o status fisiológico da reserva de sódio corporal, principalmente armazenada na pele, em animais machos e fêmeas da linhagem Wistar e SHR nas 4 semanas e 12 semanas de vida.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- a) Relacionar a fase do ciclo estral com comportamento ingestivo, pressão arterial, sódio tecidual e hormônios.
- b) Avaliar a ingestão de alimento, água e salina hipertônica e excreção de eletrólitos em animais machos e fêmeas filhotes e adultos da linhagem SHR e Wistar em condições basais.
- c) Avaliar a pressão arterial sistólica de animais SHR e Wistar machos e fêmeas adultos e avaliar a relação entre a hipertensão na fase adulta e o reservatório de sódio da pele.
- d) Quantificar hormônios no plasma relacionados com a regulação da ingestão de sódio e água e da pressão arterial, comparando com os animais da linhagem SHR e Wistar, e verificar como o perfil hormonal se altera com o avanço da idade.
- e) Avaliar se o reservatório de sódio epitelial em animais SHR e Wistar filhotes e adultos poderia ser diferente entre machos e fêmeas, em função da idade dos animais ou em função da fase do ciclo estral.

### **Justificativa do estudo**

Esse estudo precisou ser realizado sob condições fisiológicas, porque o contexto central que é a investigação da reserva de sódio da pele ainda não foi investigada em animais espontaneamente hipertensos, sendo necessários maiores estudos da linhagem SHR antes do estabelecimento da hipertensão e também após o surgimento dessa condição.

### **3.0 Material e métodos**

#### **3.1 Animais e Manutenção**

Este trabalho foi conduzido conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação N° 85-23, revisado 1996) em consonância com a Lei AROUCA 11794 de 8 de outubro de 2008.

Foram utilizadas duas linhagens de ratos: animais da linhagem Wistar e da linhagem SHR (espontaneamente hipertensos). Para experimentos com a linhagem Wistar foram utilizados animais com 28 a 30 dias de idade pós-natal sendo esses animais machos (80-100 g) e fêmeas (80-100 g) e animais adultos de 12 semanas de idade machos (300-400 g) e fêmeas (250-300 g) e para experimentos com a linhagem SHR foram utilizados animais com 28 a 30 dias de idade pós-natal machos (40-50 g) e fêmeas (40-45 g) e animais com 12 semanas de idade machos (250-300 g) e fêmeas (180-200 g). Ambas as linhagens são provenientes do Biotério Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Essa espécie apresenta fácil manejo, bom índice reprodutivo, sendo um modelo que reproduz bons resultados, que via de regra, podem ser extrapolados para o ser humano.

Os animais foram mantidos em caixas coletivas (5 animais por caixa), aclimatados à temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz 6:00-18:00h). Os animais tiveram acesso à água e alimento *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no período da manhã, entre 08:00 – 11:00 horas. Para avaliação de ingestão de água e de solução salina hipertônica (NaCl 1,8%), ingestão de ração, volume urinário, carga excretada de sódio, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas, nas quais seriam aclimatados antes do experimento.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética sobre o Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o n° 23083.026847/2017-01.

#### **3.2 Grupos experimentais**

Para facilitar a leitura das tabelas e gráficos, os grupos foram denominados do seguinte modo: (i) FSHR-4: fêmeas espontaneamente hipertensas com 4 semanas de idade; (ii) FSHR-12-PE: fêmea espontaneamente hipertensa em proestro ou estro; (iii) FSHR-12-

MD: fêmea espontaneamente hipertensa em metaestro ou diestro; (iv) FW-12-PE: fêmea Wistar em proestro ou estro; (v) FW-12-MD: fêmea Wistar em metaestro ou diestro; (vi) FW-4: fêmeas Wistar com 4 semanas de idade; (vii) MSHR-4: machos espontaneamente hipertensos com 4 semanas de idade; (viii) MSHR-12: machos espontaneamente hipertensos com 12 semanas de idade; (ix) MW-4: machos Wistar com 4 semanas de idade; (x) MW-12: machos Wistar com 12 semanas de idade.

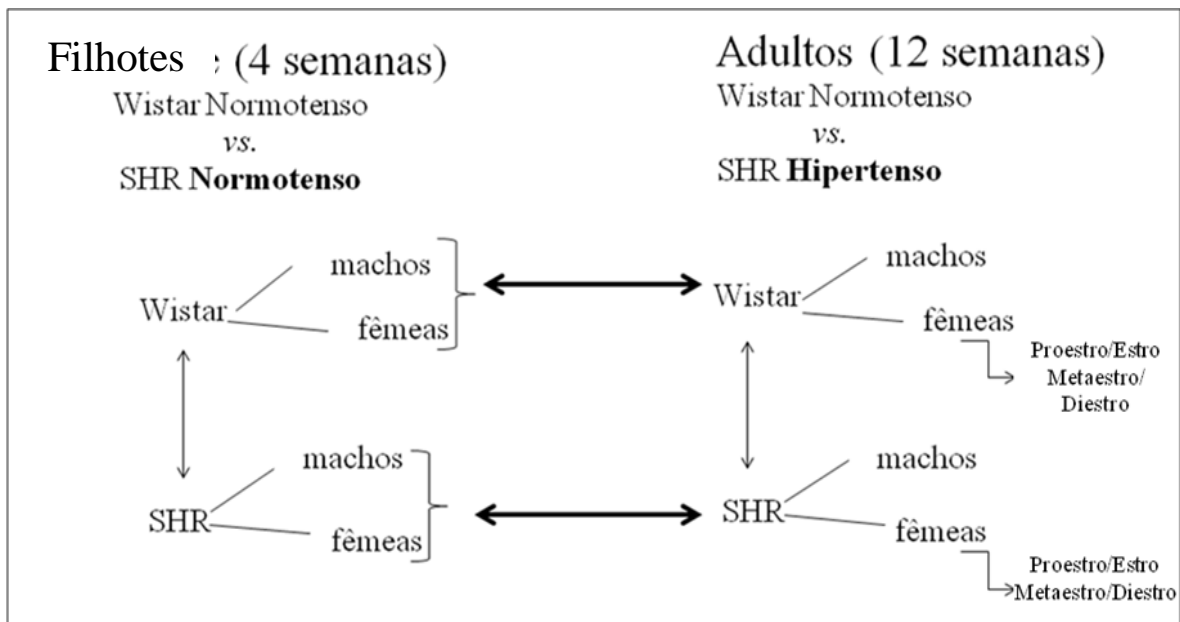
Assim:

Na comparação entre as linhagens, os animais da linhagem Wistar são o controle.

Ex.: Macho SHR vs. Macho Wistar

-Na avaliação do dimorfismo, o macho é o controle observando a mesma linhagem;

Ex. Macho SHR vs. Fêmea SHR proestro/estro (Macho SHR é o controle)



**Fig. 3-** Grupos experimentais e possibilidades de comparações entre os grupos. As setas horizontais indicam as comparações entre as idades (4 semanas e 12 semanas) e o dimorfismo sexual e as setas verticais indicam a comparação entre as linhagens. As fêmeas adultas serão comparadas entre as linhagens em função da fase do ciclo. No total são 10 grupos experimentais.

## **4.0 Protocolos experimentais**

### **4.1 Protocolo experimental geral**

Os animais foram acondicionados em caixas coletivas (5 animais por caixa) e mantidos com água e ração *ad libitum*, com a temperatura da sala mantida sob ar-condicionado na temperatura  $22 \pm 2$  °C. Os experimentos foram realizados com duas linhagens de ratos: animais Wistar albinos (n=210) e animais Espontaneamente Hipertensos (n=212).

O primeiro protocolo consistiu nas avaliações de comportamento ingestivo em gaiolas metabólicas, no segundo protocolo verificamos nas avaliações hormonais, no terceiro protocolo foram realizadas avaliações indiretas da pressão arterial, no quarto protocolo estudamos o conteúdo de sódio e água teciduais. O uso sequencial de animais ocorreu entre os protocolos 2 e 4. Foram realizados no total 4 protocolos experimentais, sendo incluídos todos os grupos em todos os protocolos. Os animais SHR e Wistar foram avaliados em dois momentos da vida: com 28 a 30 dias de idade pós-natal (4 semanas) e na fase adulta (12 semanas). Foram realizados acompanhamentos do desenvolvimento dos animais no protocolo 3 (pletismografia de cauda).

As fêmeas, quando adultas, foram agrupadas em dois grupos: proestro/estro e metaestro/diestro, sendo incluídas no estudo da fase adulta apenas as fêmeas com ciclo estral regular.

A ordem de execução dos experimentos foi definida no sentido de facilitar o desenvolvimento do presente estudo, sendo os protocolos 2 e 4 os primeiros a serem executados, concomitantemente, e os demais foram executados na seguinte ordem: protocolo 1 (segundo), protocolo 3 (terceiro).

## **4.2 Protocolos específicos**

**Experimento 1 – Avaliações do comportamento ingestivo de animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade em gaiolas metabólicas.**

### **Avaliação das ingestões de água e solução salina hipertônica (NaCl 1,8%)**

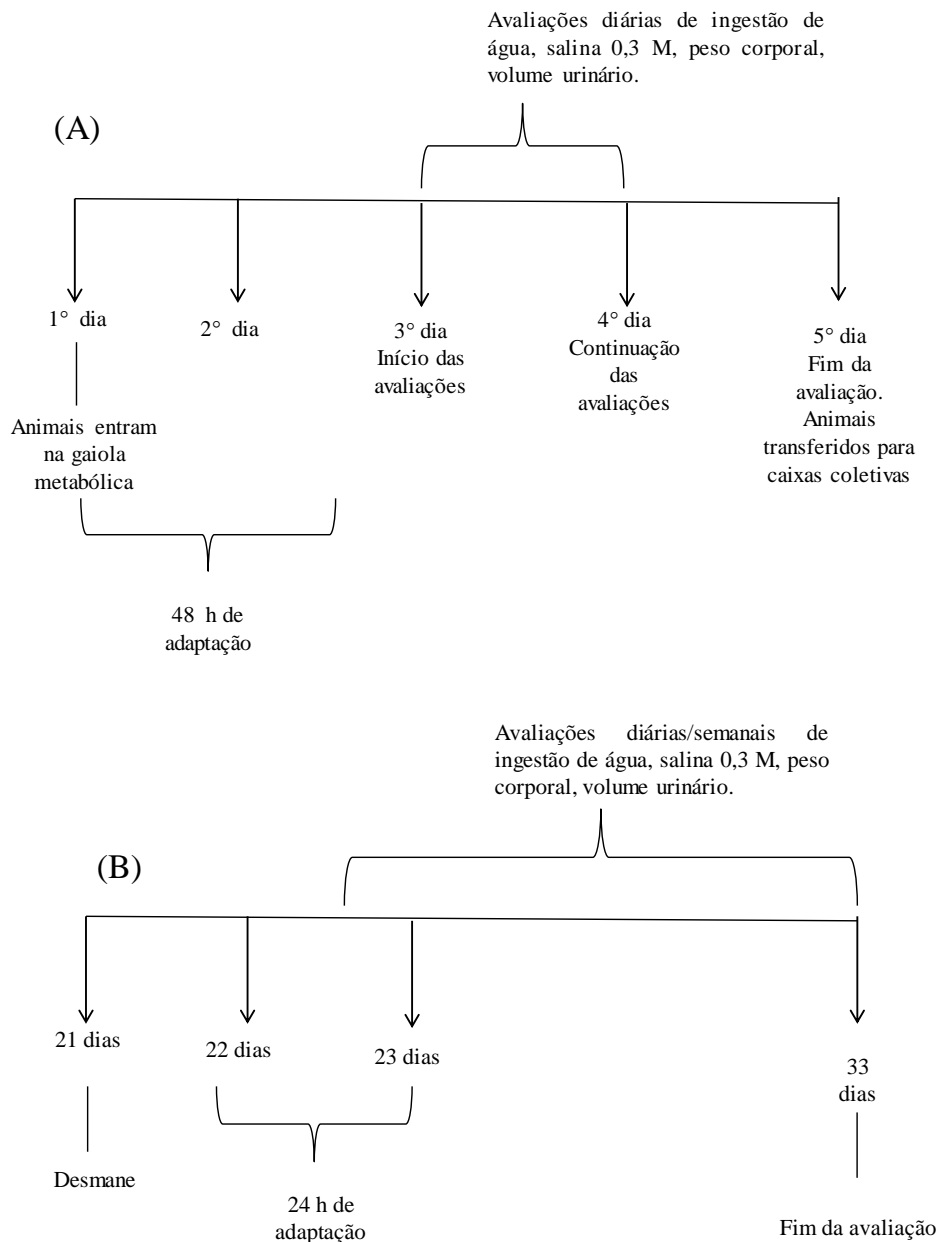
Ratos normovolêmicos e normohidratados foram previamente adaptados às gaiolas metabólicas por cinco dias. Os animais receberam em suas gaiolas bebedouros volumétricos individuais graduados em 0,1 mL contendo água e comedouros contendo ração comumente utilizada no biotério, *ad libitum*, previamente pesada, até o final do experimento. A ingestão basal dos fluidos foi avaliada em ciclos de 24 horas. Os animais foram avaliados diariamente em gaiolas metabólicas a partir de 23 dias de idade até completarem 33 dias, respeitando intervalos de 3 dias em caixas coletivas, permitindo a interação social dos animais, e recolocando os animais nas gaiolas para as próximas etapas de avaliação.

### **Avaliação do volume urinário e excreção de sódio**

O volume urinário basal foi avaliado diariamente, durante 10 dias, sob condições basais durante a fase de 23 a 33 dias. Após as coletas das amostras de urina realizadas em gaiolas metabólicas o conteúdo de sódio das mesmas foi determinado por meio de fotometria de chama (modelo B462, Micronal) pela emissão de radiação após exposição da amostra à chama e a osmolalidade urinária foi determinada por meio do osmômetro (Osmometer II, modelo 5005, Precision Systems) baseado no ponto de fusão da amostra (10 µL) e expresso por mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Para uniformizar os resultados, e para comparação entre médias dos diferentes grupos, os dados obtidos foram expressos em mEq/24h/100g para carga excretada de sódio e de mOsm/Kg H<sub>2</sub>O /24h para avaliação da osmolalidade.

A seguir mostramos a linha do tempo do experimento 1.





**Fig. 4-** Linha temporal do experimento 1- Acompanhamento do comportamento ingestivo em gaiolas metabólicas em animais SHR e Wistar. (A) Avaliações diárias de uma semana qualquer e (B) Avaliações diárias dos filhotes.

Ao final do experimento 1, os animais foram submetidos à eutanásia após anestesia com barbitúricos (Tiopentax®)/pentobarbital) na dose anestésica de 40 mg/kg, utilizando como veículo água estéril para injeção no frasco de 0,5g ou 40mL de solução.

## **Experimento 2 – Avaliação dos hormônios ocitocina, vasopressina, angiotensina II e ANP plasmáticos em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

Ratos de todos os grupos foram decapitados e o sangue foi coletado em animais normovolêmicos e normonatremicos para quantificar as concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP, ANG II, com o intuito de estudar o efeito da idade, do dimorfismo e da condição de hipertensão sobre o sistema-renina-angiotensina.

O método de decapitação por guilhotina apesar de restrito é o mais indicado para o protocolo 2, pois, o uso de agentes anestésicos podem influenciar os resultados obtidos nas análises hormonais e na hemodinâmica (CABRAL *et al.* 1998; GOULD, 2008; JACQUES *et al.* 2004; JANSSEN *et al.* 2004; SARANTEAS *et al.* 2005; WAKABAYASHI, 2001; XU *et al.* 2015).

### **Coleta de sangue**

O sangue foi coletado por decapitação, em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo, contendo o anticoagulante heparina para dosagens de AVP, OT, e sódio plasmático ou inibidores de peptidases (para ANP e ANG II). O plasma foi obtido após centrifugação por 20 minutos, 3000 rpm a 4 °C e estocado a -20 °C, até a realização das respectivas dosagens plasmáticas.

### **Coleta de tecidos**

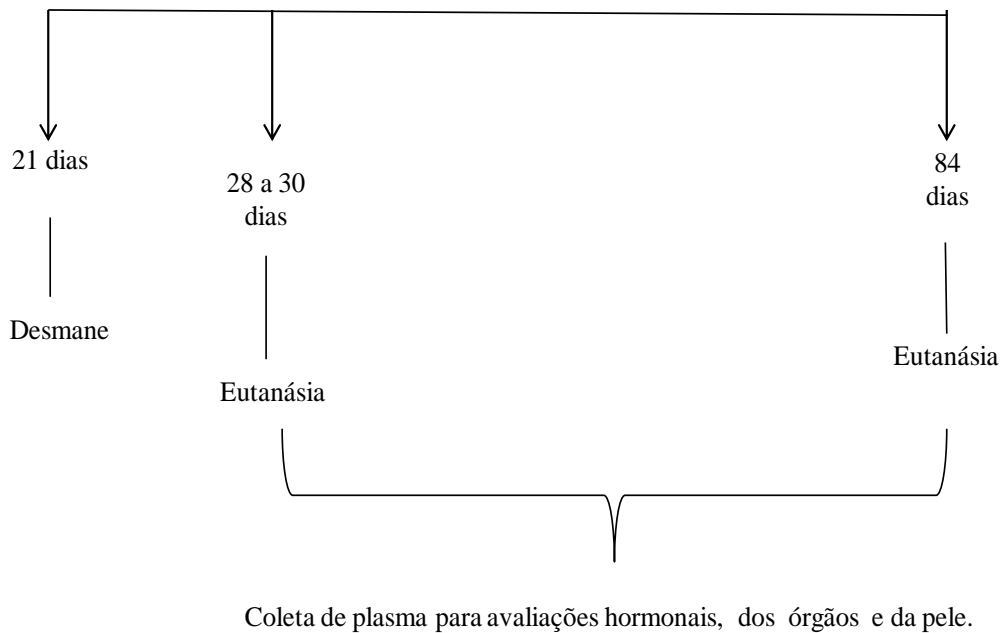
Foram coletados os seguintes tecidos: coração, fígado, rim e útero, que foram pesados para determinação dos índices ponderais e foi realizada a coleta da pele para quantificação do sódio epitelial. A pele foi congelada em nitrogênio para realização da técnica de PCR para um futuro estudo.

### **Dosagens hormonais**

Todas as extrações e dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos usando as técnicas descritas por Elias *et al.* (1998), Haanwinckel *et al.* (1995), Gutkowska *et al.* (1984), Botelho *et al.* (1994), Vecsei (1979) respectivamente para AVP, OT, ANG II, ANP. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata num mesmo ensaio. Foram utilizados anticorpos específicos para o radioimunoensaio de ANG II, AVP e OT que foram obtidos de Bachem Company, USA (ANG II: T4007, AVP: T4561 and OT: T4084), e o anticorpo para ANP foi doado por Jolanta Gutkowska (Universidade de Montreal, Canadá). A imunorreatividade do ensaio de vasopressina foi de 55,4%, no ensaio de ocitocina foi de 48,01%, no ensaio de angiotensina 2 foi de 27,94% e no ensaio de ANP foi de 25,57%. Foram realizados dois experimentos de radioimunoensaio, considerando cada hormônio estudado. Foi realizada a coleta do plasma para as avaliações hormonais de ocitocina, vasopressina, ANP e Angiotensina 2, Os ensaios foram realizados realizados em maio de 2018 e março de 2019 na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

### **Avaliação do sódio plasmático e hematócrito**

Para quantificação do Na<sup>+</sup> plasmático (mEq) o plasma foi diluído (1:100) e dosado por meio de fotometria de chama (Fotômetro de Chamas, Micronal – Modelo B 462). Após a decapitação dos animais foi determinado também o hematócrito, coletando-se o sangue do tronco por meio de tubo capilar para microhematócrito e centrifugação do mesmo por 5 minutos a 10000 rpm.



**Fig. 5-** Linha temporal do experimento 2- Avaliações hormonais e sódio da pele em animais SHR e Wistar em 4 semanas (28-30 dias) e 12 semanas (84 dias).

### **Experimento 3 – Avaliações da pressão sistólica em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

Avaliamos a evolução da pressão arterial sistólica (PAS) registradas através de pletismografia de cauda, utilizando o pletismômetro de cauda com aquecedor (Bonther Equipamentos, Ribeirão Preto, São Paulo), o qual contém um termostato para manutenção da temperatura a 39 graus celsius. Esse é um sistema indireto de avaliação da pressão arterial, no qual os animais são acondicionados em tubos cilíndricos de acrílico e ventilados, de maneira adequada para a realização das medidas de pressão arterial.

No procedimento experimental, um manguito de borracha foi acoplado na região proximal da cauda (estrangulador) dos animais, com a função de inflar e desinflar automaticamente em intervalos fixos de 15 segundos, juntamente com o transdutor de pulso (sensor), acoplado na parte distal da cauda, sendo adequado para cada tamanho de

animal. Os sinais foram captados por um sensor e analisados por um software (Pletismometer Tail Cuff versão 2.7.5, Bonther Equipamentos).

Os animais foram aclimatados na sala de experimentação 24 horas antes do teste, sob ciclo claro-escuro natural, uma vez que a luz branca é aversiva aos animais, implicando em maior estresse, e passaram por uma adaptação prévia ao teste, no qual foram incentivados a atravessar espontaneamente os tubos de acrílico, em seguida foram colocadas as travas de contenção e aguardamos por um período de um a dois minutos para a redução da frequência respiratória dos animais e observação de seu comportamento, e em seguida tracionamos a cauda para inserção da mesma nos manguitos. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em caixas coletivas.

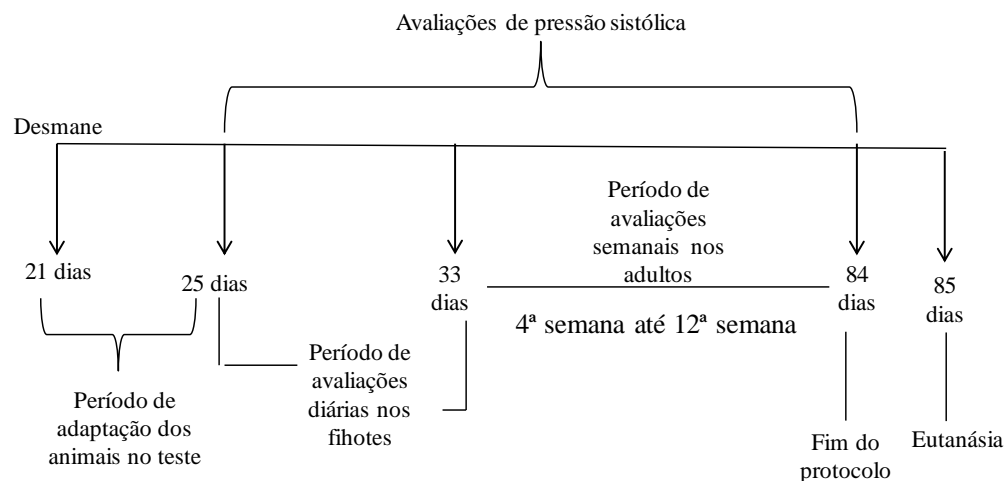
Neste estudo, as fêmeas intactas foram testadas em blocos de 5 a 6 animais para manutenção do horário de avaliação do ciclo estral após o teste, enquanto que os machos foram testados intercalados com as fêmeas. A coleta de dados foi realizada das 8h até às 14h do mesmo dia, considerando o período de sono dos animais. No restante da tarde seguimos com a adaptação de outros grupos no teste.

Foram realizadas cinco aferições de cada animal durante um período de 15 minutos, e assim a PAS de cada animal foram consideradas como a média de cinco aferições. Esse experimento foi realizado com o objetivo de acompanhar a evolução da pressão arterial e de confirmar a hipertensão arterial dos animais SHR em relação aos Wistar.

A aquisição dos dados foi feita durante 8 dias consecutivos (de 25 aos 33 dias de idade) e em seguida, o acompanhamento foi realizado semanalmente até os animais completarem a idade de 12 semanas. A aquisição dos dados foi realizada após ajustar o ganho para 1000, para que a amplitude estivesse entre 200 e 250.

Ao final do experimento 3, os animais foram submetidos à eutanásia após anestesia com barbitúricos (Tiopentax®)/pentobarbital) na dose anestésica de 40 mg/kg, utilizando como veículo água estéril para injeção no frasco de 0,5g ou 40mL de solução.

A seguir mostramos a linha do tempo experimental.



**Fig. 6-** Linha temporal do experimento 3 – Avaliações de pletismografia de cauda em animais SHR e Wistar de 4 semanas a 12 semanas de vida.

#### **Experimento 4 – Avaliação do estoque tecidual de sódio na pele em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

Amostras de pele de aproximadamente 6 g do dorso foram obtidas de animais adultos acordo com o método empregado por Titze *et al.* (2004) e amostras de aproximadamente 4 g do dorso foram obtidas dos filhotes. O procedimento para avaliação do reservatório de sódio foi modificado pelo nosso laboratório da seguinte forma: as amostras foram dessecadas a  $100 \pm 10$  °C por 72 h. O conteúdo de água total da pele foi calculado pela diferença entre o peso úmido e o peso seco (peso após estufa). As amostras dessecadas foram submetidas ao processo de calcinação a 450 °C for 48 h, e posteriormente as cinzas foram dissolvidas em 20 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 10% diluído em água destilada e para as amostras com massa menor que 6 gramas foi utilizado um volume de ácido proporcional à massa de tecido obtida. A concentração de sódio no plasma e na solução das cinzas com ácido nítrico foram medidas com o fotômetro de chamas (Micronal, modelo B462). Valores da concentração de sódio total na pele ( $\text{SKNa}^+$ , total skin sodium concentration), razão sódio/água ( $R_{\text{SKNa}^+/\text{SKW}}$ , skin sodium/water ratio), sódio osmoticamente ativo acumulado ( $\text{SKNa}^+_{(a)}$ , osmotically active skin sodium

accumulation), sódio osmoticamente inativo acumulado ( $SKNa^+_{(i)}$ , osmotically inactive skin sodium accumulation) e sódio inativo total da pele ( $SKNa^+_{(i) \text{ total}}$ , total osmotically inactive skin sodium concentration) foram medidos e calculados de acordo com os métodos de TITZE *et al.* (2003, 2004). Os cálculos estão descritos abaixo:

- ✓ **Concentração de  $Na^+$  total na pele ( $SKNa^+$ , total skin sodium concentration; mEq/L):** foi avaliada pelo fotômetro de chamas e os valores foram obtidos diretamente da leitura do aparelho, a partir do fator de diluição do padrão (1:100), posteriormente as concentrações foram convertidas em mmol/ml.
- ✓ **Conteúdo de água total da pele ( $SKW$ , total skin water; mL):** foi calculado pela diferença entre peso úmido da pele ( $SWW$ ) e peso seco após estufa ( $SDW$ ) resultando no peso da água (g), o que foi demonstrado pela equação 1.

$$SKW = SWW - SDW \quad (1)$$

A densidade da água (1g/mL) foi considerada como padrão para determinar o volume de água presente na pele.

- ✓ **Água relativa da pele ( $rSKW$ , relative skin water; mL/g):** foi calculada pela divisão entre o volume total de água da pele ( $SKW$ ) e o peso úmido da pele ( $SWW$ ), sendo demonstrado pela equação 2.

$$rSKW = \frac{SKW}{SWW} \quad (2)$$

- ✓ **Razão sódio/água da pele [ $R$  ( $SKNa^+/SKW$ ), skin sodium/water ratio; unidade arbitrária]:** foi calculada pela divisão entre a concentração de sódio total da pele ( $SKNa^+$ ) e a água total da pele ( $SKW$ ). Quando a razão aumenta significa que há maior conteúdo de sódio inativo acumulado na pele, o que foi mostrado pela equação 3.

$$R = \frac{SKNa^+}{SKW} \quad (3)$$

**Sódio osmoticamente ativo acumulado [SKNa<sup>+</sup><sub>(a)</sub>, osmotically active skin sodium accumulation; mmol/mL]:** primeiro calculamos o valor delta ( $\Delta$ ) de água relativa da pele que é obtido pela diferença entre as médias de rSKW. O valor delta é a variação de água relativa da pele entre os grupos de interesse e se encontra apresentado em tabelas de 3 até 23.

O sódio osmoticamente ativo acumulado foi calculado pela multiplicação dos fatores valor delta da água relativa da pele ( $\Delta rSKW$ , relative skin water variation), peso úmido da pele (SWW, skin wet weight) e concentração de sódio plasmático (mmol/mL).

Para obtermos o sódio ativo acumulado na pele com valores individuais consideramos para os cálculos o valor  $\Delta rSKW$  respectivo para cada condição do estudo, sendo utilizados os valores individuais de peso úmido da pele e de sódio plasmático de cada animal estudado, o que foi mostrado pela equação 4.

$$SKNa^+_{(a)} = \Delta rSKW \times SWW \times Na^+_{(plasma)} \quad (4)$$

**Sódio osmoticamente inativo acumulado [ $\Delta SKNa^+_{(i)}$ , osmotically inactive skin sodium accumulation; mmol/mL] :** primeiro calculamos o valor delta ( $\Delta$ ) da razão sódio/água da pele que é obtido pela diferença entre as médias de  $R_{(SKNa/SKW)}$ . O valor delta é a variação da razão sódio/água da pele entre os grupos de interesse e se encontra apresentado em tabelas de 3 até 23.

O sódio osmoticamente inativo acumulado foi calculado pela multiplicação dos fatores: valor delta da razão sódio/água da pele ( $\Delta R_{(SKNa/SKW)}$ , skin sodium/water ratio variation) e água total da pele (SKW).

Para obtermos o sódio inativo acumulado na pele com valores individuais consideramos para os cálculos o valor  $\Delta R_{(SKNa/SKW)}$  respectivo para cada comparação do



estudo, sendo utilizados os valores individuais de água total da pele de cada animal estudado, sendo o cálculo mostrado pela equação 5.

$$SKNa^+_{(i)} = \Delta R_{(SKNa^+/SKW)} \times SKW \quad (5)$$

**Sódio osmoticamente inativo total da pele [SKNa<sup>+</sup><sub>(i)</sub>, total osmotically inactive skin sodium concentration; mmol/mL]:** essa avaliação consiste na subtração entre a concentração de sódio plasmático e a concentração de sódio total da pele (SKNa<sup>+</sup>) que foi obtida da fotometria de chama, o que foi mostrado na equação 6. Assumimos que todo o Na<sup>+</sup> carregado para a pele foi oferecido pelo fluido extracelular.

$$SKNa(i)_{total} = Na_{plasma} - SKNa_{pele} \quad (6)$$

As equações mostradas acima foram obtidas de TITZE *et al.* (2003).

O método de decapitação por guilhotina foi também utilizado para o protocolo 4, uma vez que esse experimento foi realizado na sequência do protocolo 2, no qual obtivemos as amostras de plasma e também de pele. O uso de agentes anestésicos podem influenciar os resultados obtidos nas análises hormonais e na hemodinâmica (CABRAL *et al.* 1998; GOULD, 2008; JACQUES *et al.* 2004; JANSSEN *et al.* 2004; SARANTEAS *et al.* 2005; WAKABAYASHI, 2001; XU *et al.* 2015).

## 5.0 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP). Os dados foram analisados usando o programa Graphpad Prism 6.0 (San Francisco, USA). Foi realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk e de Grubbs ( $\alpha=0,05$ ) que indica um outlier. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias e ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni. Foram comparadas as interações entre idade *vs.* dimorfismo sexual, linhagem *vs.* dimorfismo sexual, linhagem *vs.* acúmulo de sódio e linhagem *vs.* fase do ciclo estral. O intervalo de confiança adotado para todo o estudo foi de 95% ( $\alpha = 5\%$ ).

## **6.0 Resultados**

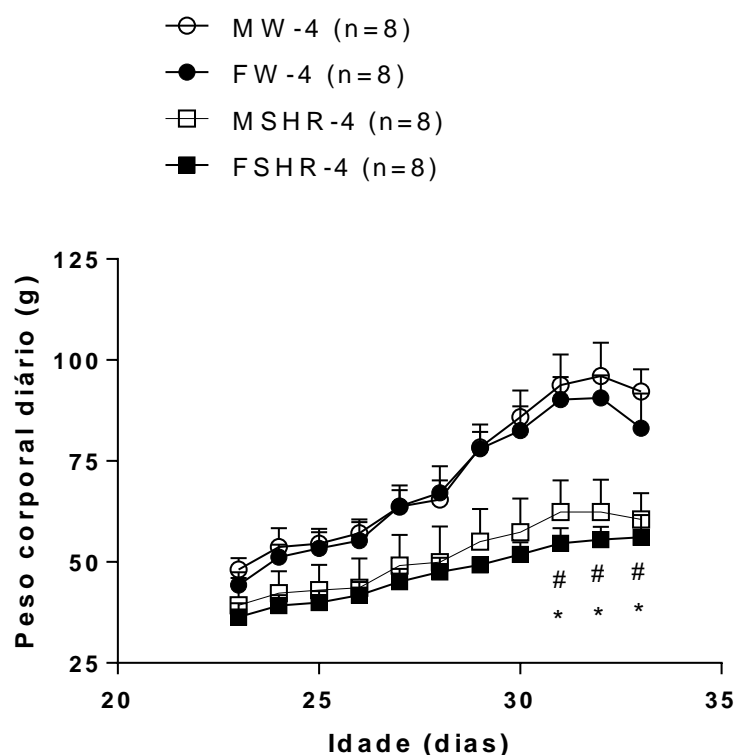
### **Experimento 1 – Avaliações do comportamento ingestivo de animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade em gaiolas metabólicas.**

Esse experimento foi conduzido tomando em conjunto machos e fêmeas de ambas as linhagens simultaneamente e foi o terceiro protocolo a ser executado. Os experimentos de avaliações comportamentais ocorreram em dois blocos distintos: um bloco para 4 semanas e outro bloco para 12 semanas. Para o experimento da fase adulta foi mantidos todos os animais da fase de 4 semanas, sendo aumentado o número de fêmeas.

### **Avaliações metabólicas obtidas em SHR e Wistar de 4 semanas de idade**

#### **✓ Peso corporal**

A análise estatística da Figura 1 (Avaliação do peso corporal em animais de 4 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(3,28) = 52,90$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(10,280) = 580,2$ ;  $P < 0,0001$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(30,280) = 29,98$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Fig. 7-** Avaliação do peso corporal diário de animais SHR e Wistar nas 4 semanas de idade sob dieta controle em condições basais. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*#P<0,05.

Nesse gráfico observamos diferenças significativas entre as linhagens desde os 24 dias de idade, mas nós gostaríamos de destacar as diferenças mais significativas: (i) machos SHR vs. machos Wistar aos 31 dias ( $62,4 \pm 7,8$  vs.  $93,8 \pm 7,5$  g;  $P < 0,0001$ ), aos 32 dias ( $62,4 \pm 8,0$  vs.  $96,0 \pm 8,3$  g,  $P < 0,0001$ ), aos 33 dias de idade ( $60,6 \pm 6,4$  vs.  $92,2 \pm 5,5$  g,  $P < 0,0001$ ) e (ii) fêmeas SHR vs. fêmeas Wistar nos mesmos dias, respectivamente: aos 31 dias ( $54,6 \pm 3,7$  vs.  $90,2 \pm 5,6$  g,  $P < 0,01$ ), aos 32 dias de idade ( $55,5 \pm 3,2$  vs.  $90,6 \pm 5,6$  g,  $P < 0,0001$ ) e aos 33 dias de idade ( $56,1 \pm 5,6$  vs.  $83,1 \pm 8,5$ g,  $P < 0,0001$ ).

Esses dados demonstraram que os animais SHR possuem menor peso corporal que os animais Wistar nas 4 semanas de vida, o que era esperado e indica que a evolução da carcaça ocorre mais lentamente nos SHR. Nesta avaliação machos e fêmeas de ambas as

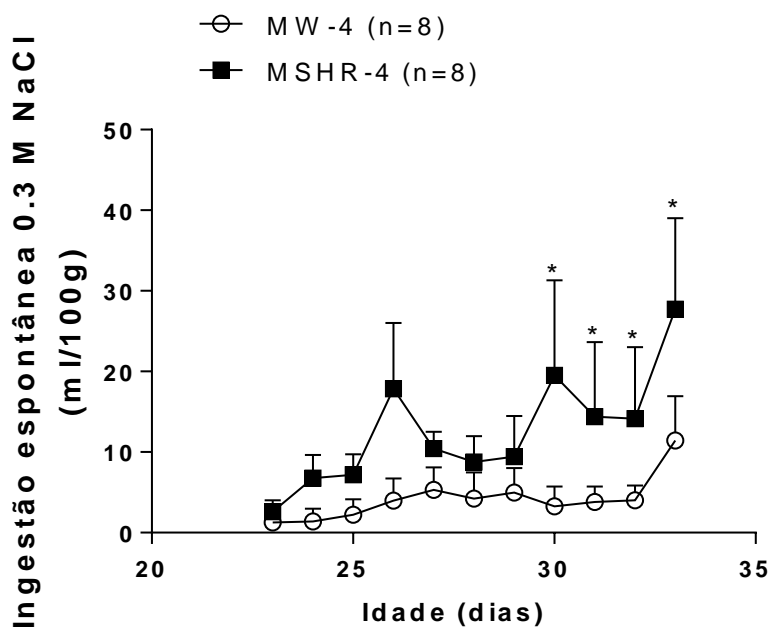
linhagens não diferiram entre si no acompanhamento de peso corporal. Nesse experimento obtivemos uma boa ninhada fruto de um bom manejo no biotério.

#### ✓ **Ingestão espontânea de salina hipertônica**

Neste estudo mostramos o padrão de ingestão espontânea de fluidos nos animais SHR e Wistar na idade de 4 semanas. O objetivo desse estudo foi de determinar em que momento os animais SHR estão mudando seu comportamento ingestivo em função do desenvolvimento da hipertensão, em comparação com animais Wistar.

Apresentamos a seguir a avaliação da ingestão basal de salina hipertônica em machos SHR e Wistar.

A análise estatística da Figura 2 (Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl em machos de 4 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70) = 5,621$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7) = 38,03$ ;  $P = 0,0005$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70) = 18,05$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Fig. 8-** Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl em machos intactos na idade de 4 semanas. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P < 0,05$ .

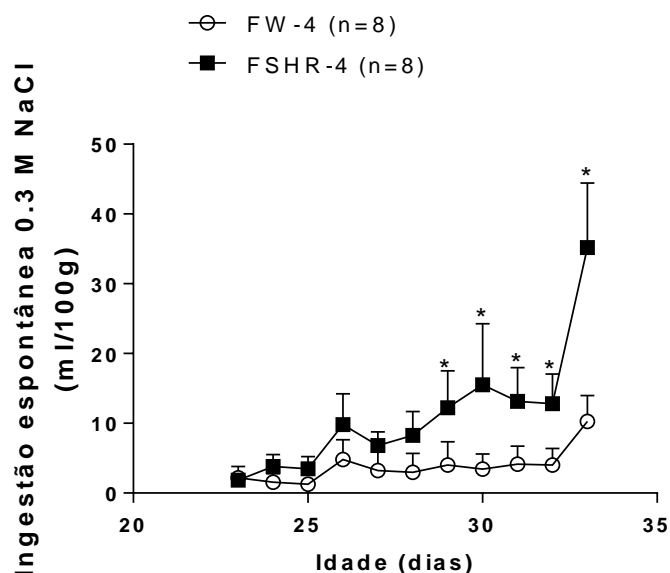
Nesse gráfico observamos diferenças significativas entre os grupos machos SHR vs. machos Wistar aos 30 dias ( $19,52 \pm 11,81$  vs.  $3,29 \pm 2,45$  mL/100g ,  $P < 0,0001$ ), aos 31 dias ( $14,40 \pm 9,25$  vs.  $3,81 \pm 1,92$  mL/100g,  $P < 0,01$ ), aos 32 dias ( $14,13 \pm 8,9$  vs.  $4,0 \pm 1,86$  mL/100g,  $P < 0,01$ ) e aos 33 dias de idade ( $27,74 \pm 11,27$  vs.  $11,44 \pm 5,5$  mL/100g ,  $P < 0,0001$ ).

Esses dados demonstraram que os machos SHR possuem padrão de ingestão basal de salina hipertônica distinto em relação aos animais Wistar, antes das 4 semanas de vida), período no qual a hipertensão ainda não foi instalada nos SHR.

Vimos que os machos SHR apresentaram um pico de ingestão de cloreto de sódio aos 30 dias de vida e parecem apresentar contínuo aumento da ingestão desse fluido, enquanto que os animais machos Wistar parecem manter a ingestão de salina reduzida, como era esperado.

Na figura a seguir (Fig. 3) observamos diferenças na ingestão espontânea de salina hipertônica entre fêmeas SHR e fêmeas Wistar, que foram avaliadas no mesmo período.

A análise estatística da Figura 3 (Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl fêmeas de 4 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70) = 17,64$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7) = 39,90$ ;  $P = 0,0004$  ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70) = 43,60$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Fig. 9-** Avaliação da ingestão basal de 0,3 M NaCl em fêmeas intactas na idade de 4 semanas. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P < 0,05$ .

Observamos diferenças na ingestão de salina hipertônica entre fêmeas SHR vs. fêmeas Wistar aos 29 dias ( $12,24 \pm 5,27$  vs.  $4,03 \pm 3,33$  mL/100g ,  $P < 0.001$ ), aos 30 dias ( $15,51 \pm 8,76$  vs.  $3,46 \pm 2,13$  mL/100g,  $P < 0.0001$ ), aos 31 dias ( $13,16 \pm 4,81$  vs.  $4,15 \pm 2,58$  mL/100g ,  $P < 0.001$ ), aos 32 dias ( $12,8 \pm 4,24$  vs.  $4,02 \pm 2,36$  mL/100g,  $P < 0.001$ ) e aos 33 dias ( $35,20 \pm 9,25$  vs.  $10,25 \pm 3,72$  mL/100g,  $P < 0.0001$ ).

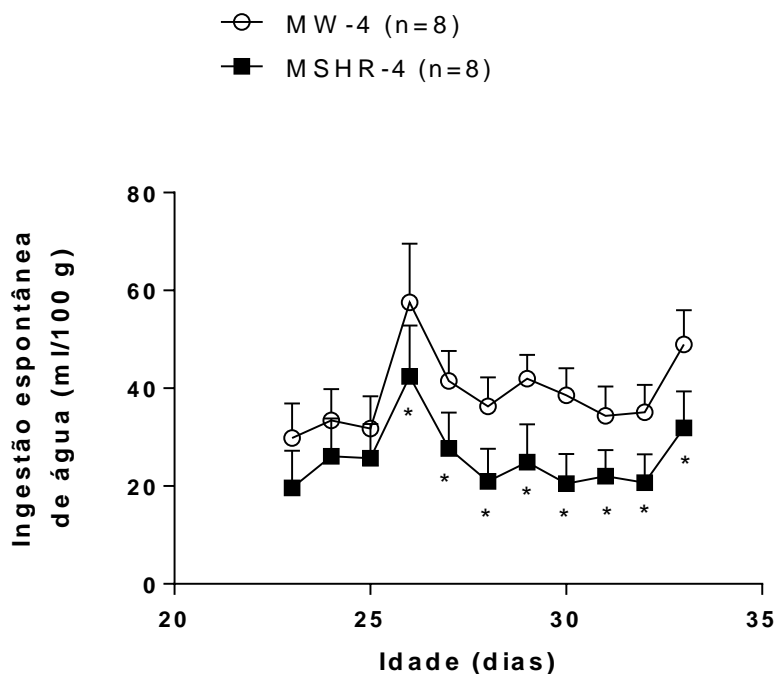
O resultado sugeriu que fêmeas SHR também possuem padrão de ingestão basal de salina hipertônica distinto em relação às fêmeas Wistar, antes das 4 semanas de idade, no qual as fêmeas SHR ingerem maior volume de NaCl 0,3 M ao longo do tempo em relação às fêmeas Wistar de mesma idade.

Verificamos que as fêmeas SHR apresentaram uma flutuação ascendente do consumo de salina não significativa aos 26 dias e aumento significativo do consumo a partir dos 29 dias de vida e parecem apresentar contínuo aumento da ingestão desse fluido, enquanto que as fêmeas Wistar parecem ingerir um volume menor de salina como era esperado.

A ingestão espontânea de água nos animais SHR e Wistar na idade de 4 semanas também foi avaliada nesse experimento, sendo mostrada a seguir.

A análise estatística da Figura 4 (Avaliação da ingestão basal de água em machos de 4 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=2,035$ ;  $P=0,0423$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=72,48$ ;  $P < 0,0001$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70)=17,29$ ;  $P < 0,0001$ ].

## ✓ Ingestão espontânea de água



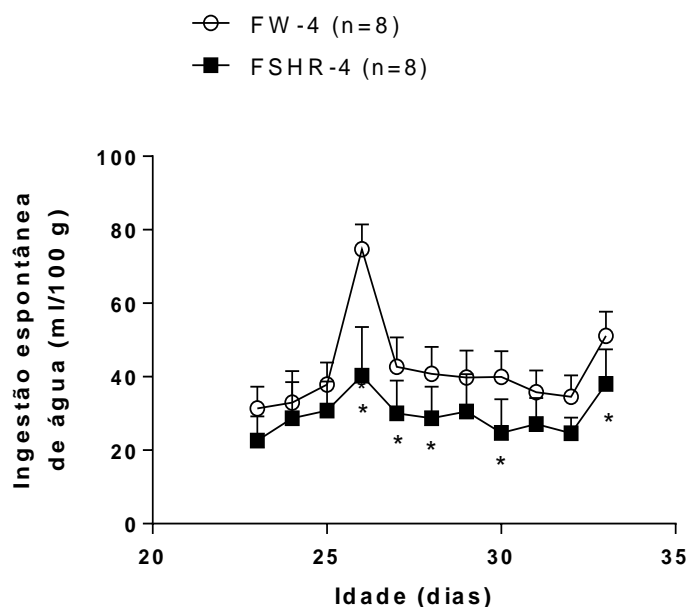
**Fig. 10-** Avaliação da ingestão basal de água em machos intactos na idade de 4 semanas de idade. Dados analisados por Anova de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05.

Na figura 4, observamos diferenças significativas entre os grupos: machos SHR vs. machos Wistar aos 26 dias ( $42,45 \pm 10,39$  vs.  $57,55 \pm 12,03$  mL/100g,  $P<0.001$ ), aos 27 dias ( $27,71 \pm 7,3$  vs.  $41,48 \pm 6,19$  mL/100g,  $P<0.01$ ), aos 28 dias ( $20,95 \pm 6,67$  vs.  $36,27 \pm 5,94$  mL/100g,  $P<0.001$ ), aos 29 dias ( $24,89 \pm 7,73$  vs.  $41,99 \pm 4,85$  mL/100g,  $P<0.0001$ ), aos 30 dias ( $20,52 \pm 6,1$  vs.  $38,56 \pm 5,51$  mL/100g,  $P<0.0001$ ), aos 31 dias ( $22,01 \pm 5,36$  vs.  $34,34 \pm 6,03$  mL/100g,  $P<0.01$ ), aos 32 dias ( $20,71 \pm 5,76$  vs.  $35,07 \pm 5,66$  mL/100g,  $P<0.001$ ), e aos 33 dias ( $31,91 \pm 7,43$  vs.  $48,96 \pm 6,97$  mL/100g,  $P<0.0001$ ).

O resultado sugeriu que os machos SHR também possuem um distinto padrão comportamental de ingestão de água em relação aos machos Wistar, sob condições fisiológicas. Verificamos que os machos SHR apresentaram uma redução significativa do consumo de água a partir dos 26 dias de vida e parecem apresentar contínua redução da ingestão desse fluido, enquanto que os machos Wistar parecem ingerir um volume maior de água, basalmente, como era esperado.

Na Fig.5 a seguir mostramos a ingestão de água em fêmeas SHR comparadas com as fêmeas Wistar.

A análise estatística da Figura 5 (Avaliação da ingestão basal de água em fêmeas de 4 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=4,548$ ;  $P<0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=33,91$ ;  $P=0,0006$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70) = 25,28$ ;  $P<0,0001$ ].



**Fig. 11-** Avaliação da ingestão basal de água fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P<0,05$ .

Verificamos diferenças significativas entre os grupos Fêmeas SHR vs. Fêmeas Wistar aos 26 dias ( $40,27 \pm 13,28$  vs.  $74,74 \pm 6,72$  mL/100g,  $P<0,0001$ ), aos 27 dias ( $30,08 \pm 8,67$  vs.  $42,74 \pm 7,94$  mL/100g,  $P<0,01$ ), aos 28 dias ( $28,71 \pm 8,55$  vs.  $40,79 \pm 7,35$  mL/100g,  $P<0,01$ ), aos 30 dias ( $24,74 \pm 9,17$  vs.  $39,95 \pm 6,98$  mL/100g,  $P<0,01$ ) e aos 33 dias ( $38,08 \pm 9,37$  vs.  $51,17 \pm 6,50$  mL/100g,  $P<0,05$ ).

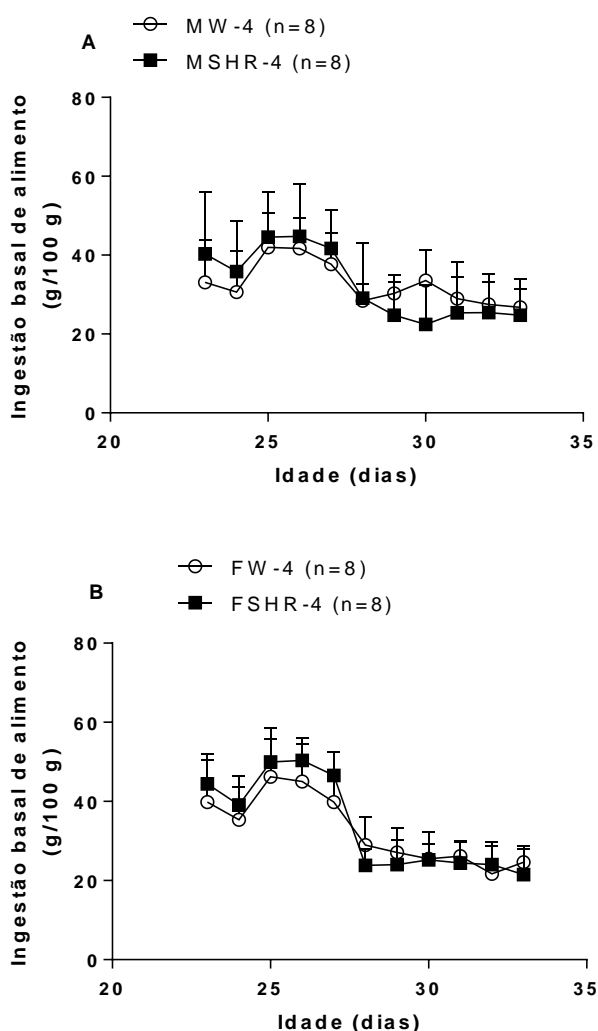
O resultado sugeriu que as fêmeas SHR também possuem um comportamento de ingestão de água diferente em relação às fêmeas Wistar, sob condições fisiológicas. Verificamos que as fêmeas SHR apresentaram uma redução significativa do consumo de água a partir dos 26 dias de vida e parecem apresentar permanente redução da ingestão



desse fluido, enquanto que as fêmeas Wistar parecem ingerir um volume maior de água, basalmente, como era esperado.

### ✓ Ingestão espontânea de alimento

A análise estatística da Figura 6 (Avaliação da ingestão basal de alimento em animais de 4 semanas de idade) não evidenciou efeito da linhagem [F(3,21)=0,1442; P=0,9323], demonstrou efeito da idade [F(10,70)=27,93; P<0,0001], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(30, 210)=1,954; P=0,0035].

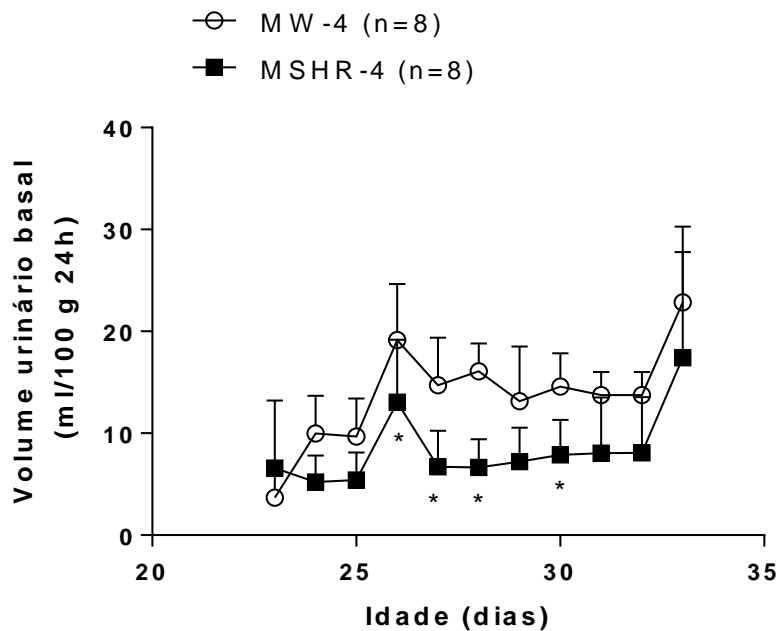


**Fig. 12-** Avaliação da ingestão basal de alimento em machos (A) e em fêmeas (B) comparando as linhagens na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

O resultado indicou que a ingestão de alimento não é um parâmetro influenciado pela linhagem, ou seja, independente da linhagem a ingestão de alimento é semelhante nos animais avaliados.

### ✓ Volume urinário

A análise estatística da Figura 7 (Avaliação do volume urinário basal machos de 4 semanas de idade) evidenciou efeito da linhagem [F(10,70)=2,288; P=0,0219], demonstrou efeito da idade [F(1,7)=7,606; P=0,0282], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(10,70) =19,88; P<0,0001].



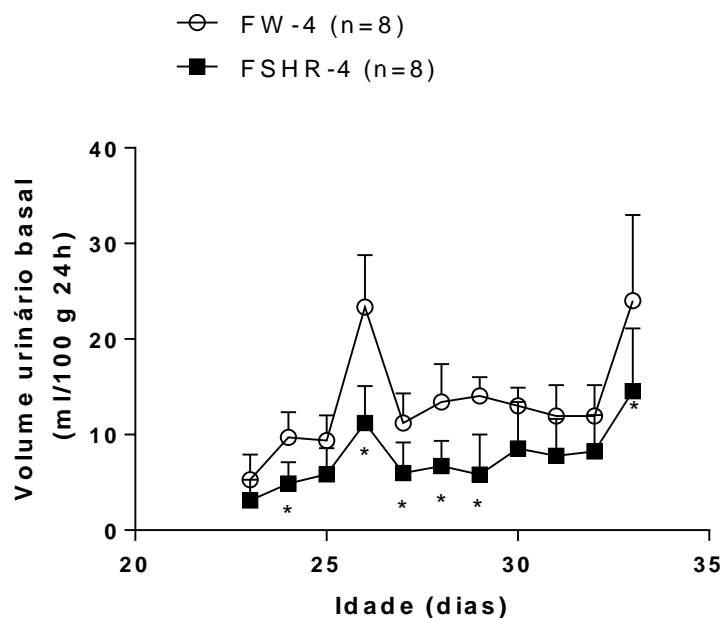
**Fig. 13-** Avaliação do volume urinário basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

Verificamos diferenças significativas entre os grupos machos SHR vs. machos wistar aos 26 dias ( $13,06 \pm 6,13$  vs.  $19,14 \pm 5,49$  mL/100g,  $P<0,05$ ), aos 27 dias ( $6,71 \pm 3,53$  vs.  $14,71 \pm 4,68$  mL/100g,  $P<0,01$ ), aos 28 dias ( $6,63 \pm 2,79$  vs.  $16,07 \pm 2,75$

mL/100g,  $P < 0,0001$ ) e aos 30 dias de idade ( $7,87 \pm 3,44$  vs.  $14,58 \pm 3,29$  mL/100g,  $P < 0,05$ ).

Os resultados indicam que o volume urinário é influenciado pela diferença entre as linhagens e que apesar de os machos tomarem mais salina hipertônica espontaneamente e ingerirem menor volume de água, o volume urinário produzido por esses animais é também menor, o que demonstra uma característica dessa linhagem no desenvolvimento da hipertensão.

A análise estatística da Figura 8 (Avaliação do volume urinário basal em fêmeas de 4 semanas de idade) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=3,358$ ;  $P=0,0013$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=19,21$ ;  $P=0,0032$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70) = 20,64$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Fig. 14-** Avaliação do volume urinário basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P < 0,05$ .

Verificamos diferenças significativas entre os grupos fêmeas SHR vs. fêmeas Wistar aos 24 dias ( $4,87 \pm 2,23$  vs.  $9,72 \pm 2,64$  mL/100g,  $P < 0,01$ ), aos 26 dias ( $11,22 \pm 3,86$  vs.  $23,36 \pm 5,43$  mL/100g,  $P < 0,00001$ ), aos 27 dias ( $5,99 \pm 3,18$  vs.  $11,22 \pm 3,08$  mL/100g,  $P < 0,05$ ), aos 28 dias de idade ( $6,71 \pm 2,63$  vs.  $13,40 \pm 3,97$  mL/100g,

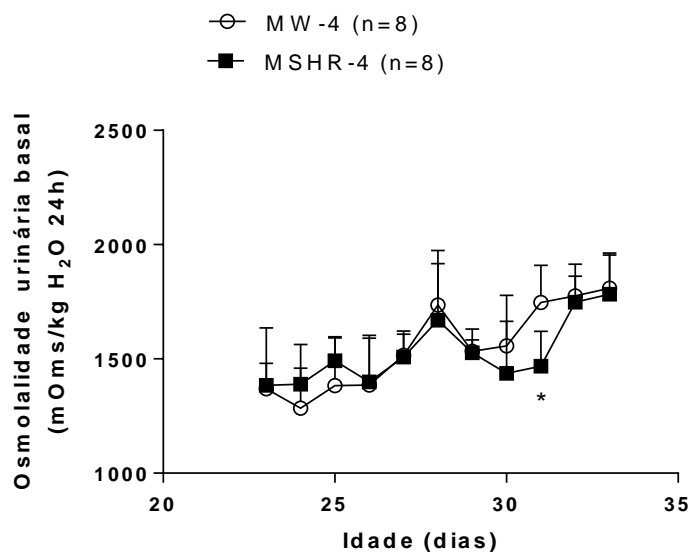
P<0,01), aos 29 dias ( $5,83 \pm 4,17$  vs.  $14,06 \pm 1,97$  mL/100g , P<0,00001) e aos 33 dias de idade ( $14,56 \pm 6,57$  vs.  $24,02 \pm 8,97$  mL/100g, P<0,00001).

Os resultados com as fêmeas demonstraram a mesma resposta fisiológica obtida com os machos. As fêmeas SHR produziram menor volume urinário em relação às fêmeas Wistar, indicando uma característica da linhagem SHR nas 4 semanas de vida. Essa característica seria a de menor produção de urina, apesar de as fêmeas SHR ingerirem maior volume de salina hipertônica que as fêmeas Wistar e menor volume de água.

Ao associarmos os resultados de volume urinário de ambas as linhagens, os resultados indicariam que a linhagem SHR poderia expressar mecanismos para retenção de volume e sódio mais exacerbados mesmo no desenvolvimento da hipertensão.

#### ✓ Osmolalidade urinária

A análise estatística da Figura 9 (Avaliação da osmolalidade urinária basal em machos de 4 semanas de idade) evidenciou efeito da linhagem [F(10,70)=2,009; P=0,0451], não demonstrou efeito da idade [F(1,7)=1,297; P=0,2922], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(10,70) =15,33; P<0,0001].

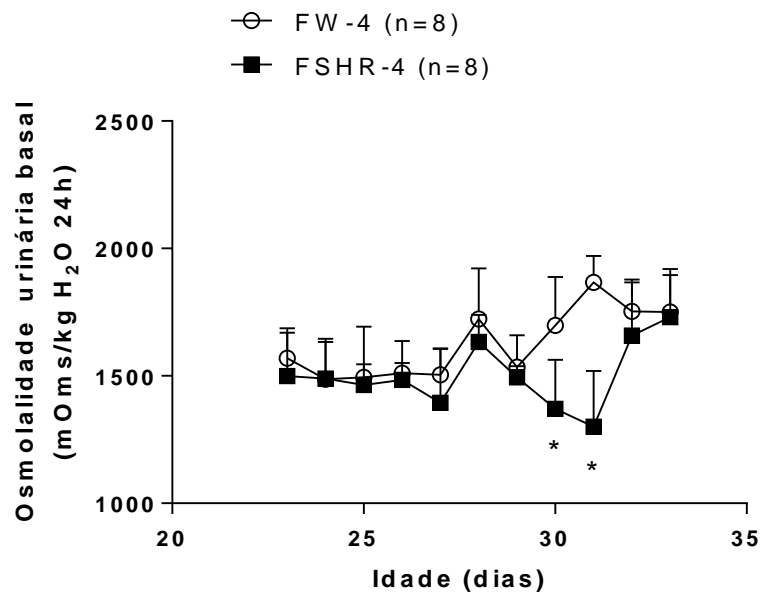


**Fig. 15-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

Verificamos diferenças significativas entre os grupos machos SHR vs. machos Wistar aos 31 dias de idade ( $1468,37 \pm 152,49$  vs.  $1747,37 \pm 162,06$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O 24h,  $P < 0,05$ ).

O resultado da osmolalidade urinária avaliada nos machos, demonstrou uma diminuição da osmolalidade urinária como variação fisiológica desse parâmetro em animais SHR de 4 semanas de idade.

A análise estatística da Figura 10 (Avaliação da osmolalidade urinária basal em fêmeas de 4 semanas de idade) evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=5,097$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=18,64$ ;  $P=0,0035$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70) = 6,349$ ;  $P < 0,0001$ ].



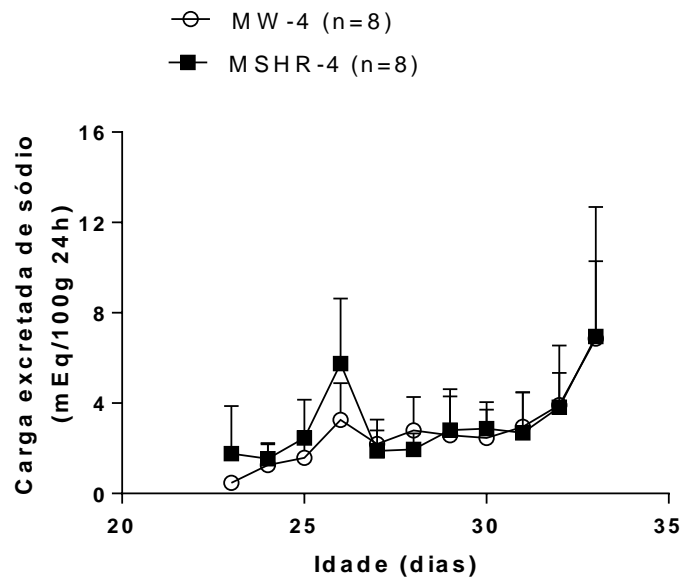
**Fig. 16-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P < 0,05$ .

Verificamos diferenças significativas entre os grupos fêmeas SHR vs. fêmeas Wistar aos 30 dias ( $1370,37 \pm 193,11$  vs.  $1698,12 \pm 190,12$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O 24h,  $P < 0,0001$ ), aos 31 dias ( $1301,12 \pm 218,57$  vs.  $1866,37 \pm 104,22$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O 24h,  $P < 0,0001$ ).

Os resultados indicaram que as fêmeas SHR na idade de 4 semanas apresentam redução da osmolalidade urinária, sendo essa uma variação fisiológica encontrada.

#### ✓ Carga excretada de sódio

A análise estatística da Figura 11 (Avaliação da carga excretada de sódio basal em machos de 4 semanas de idade) não evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=0,7821$ ;  $P=0,6454$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=0,2114$ ;  $P=0,6596$ ], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(10,70)=24,05$ ;  $P<0,0001$ ].

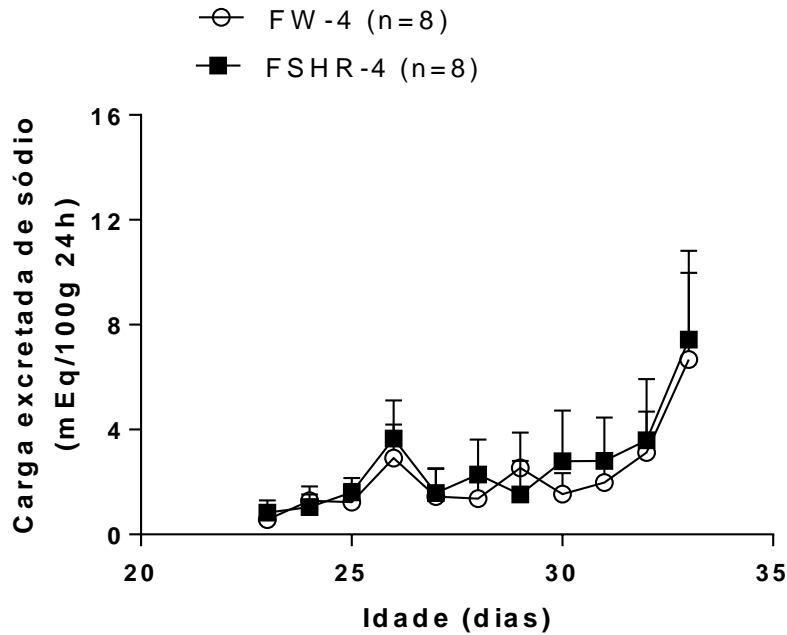


**Fig. 17-** Avaliação da carga excretada de sódio basal em machos SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

O resultado da carga excretada de sódio em machos não é influenciado pela diferença de linhagem, o que significa que outros mecanismos influenciam esse parâmetro.

A análise estatística da Figura 12 (Avaliação da carga excretada de sódio basal em fêmeas de 4 semanas de idade) não evidenciou efeito da linhagem [ $F(10,70)=0,8972$ ;

P=0,5404], não demonstrou efeito da idade [F(1,7)=0,5138; P=0,4967], e demonstrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(10,70)=31,29; P<0,0001].



**Fig. 18-** Avaliação da carga excretada de sódio basal em fêmeas SHR e Wistar na idade de 4 semanas, normonatrêmicas e normohidratadas. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

O resultado indicou que a carga excretada não sofre variações fisiológicas devido à diferença de linhagem dos animais nesse período de avaliação.

#### **Avaliações metabólicas obtidas em animais SHR e Wistar em função das diferenças entre machos e fêmeas**

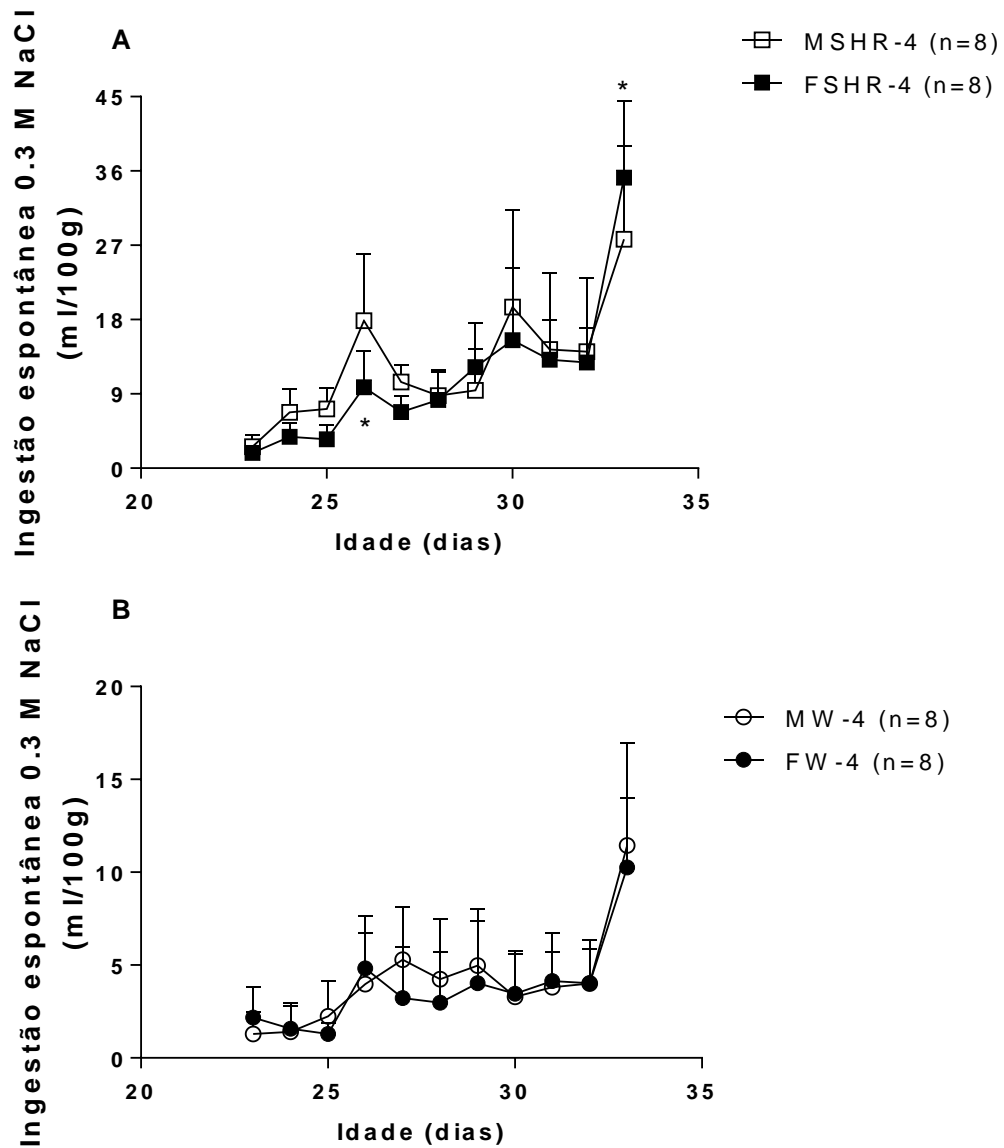
Avaliamos se o padrão de comportamento natriorexigênico ou dipsogênico dos animais SHR e Wistar é sexualmente dimórfico, mesmo antes da maturação reprodutiva e no desenvolvimento da hipertensão da hipertensão nos SHR.

✓ **Ingestão espontânea de salina hipertônica**

A análise estatística da Figura 13A (Avaliação da ingestão basal de salina hipertônica em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(10,70)=3,330$ ;  $P= 0,0014$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(1,7) =1,166$ ;  $P=0,3160$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70)=29,11$ ;  $P<0,0001$ ].

A análise estatística da Figura 13B (Avaliação da ingestão basal de salina hipertônica em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(10,70)=20,44$ ;  $P<0,0001$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)= 0,1681$ ;  $P=0,6940$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70)= 1,305$ ;  $P = 0,2451$ ].





**Fig. 19-** Avaliação da ingestão basal de salina hipertônica em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) de 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

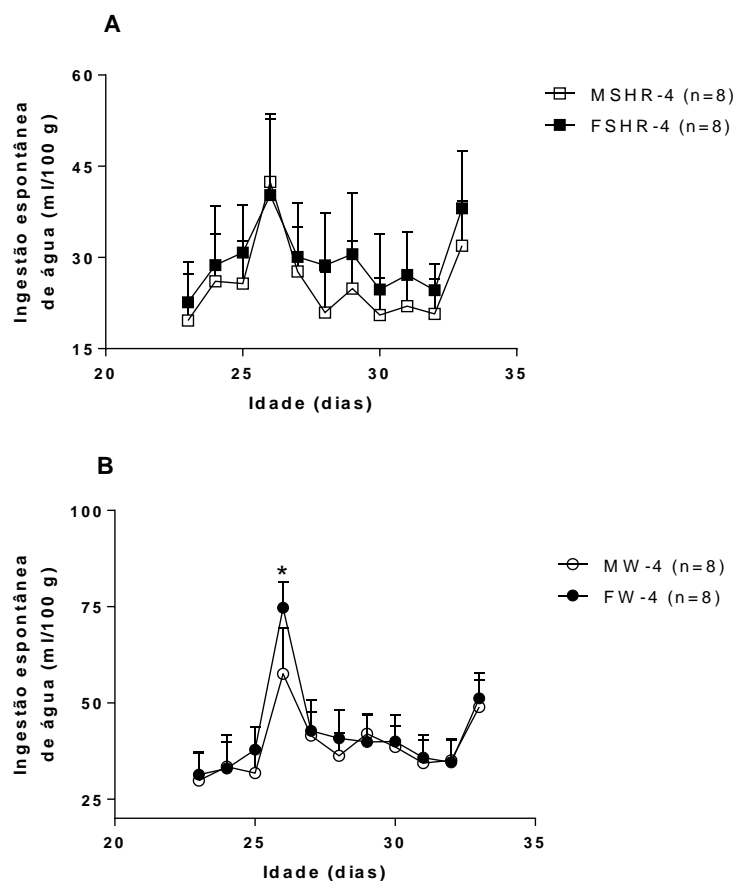
Verificamos diferenças significativas entre os grupos machos SHR vs. fêmeas SHR aos 26 dias ( $17,87 \pm 8,14$  vs.  $9,79 \pm 4,44$  mL/100g,  $P < 0,01$ ) e aos 33 dias ( $27,74 \pm 11,27$  vs.  $35,20 \pm 9,25$  mL/100g,  $P < 0,05$ ). Foi observado que o padrão de comportamento natrorexigênico nos animais SHR é sexualmente dimórfico, mas não é dimórfico nos animais da linhagem Wistar.

### ✓ Ingestão espontânea de água

O dimorfismo do comportamento dipsogênico é mostrado a seguir.

A análise estatística da Figura 14A (Avaliação da ingestão basal de água em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(10,70)=0,6034$ ;  $P=0,8058$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=5,048$ ;  $P=0,5950$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70) =9,304$ ;  $P<0,0001$ ].

A análise estatística da Figura 14B (Avaliação da ingestão basal de água em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(10,70)=2,748$ ;  $P=0,0065$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(1,7)=2,006$ ;  $P=0,1996$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70)=45,66$ ;  $P<0,0001$ ].



**Fig. 20-** Avaliação da ingestão basal de água em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P<0.05$ .

Verificamos diferenças significativas entre os grupos Machos Wistar vs. Fêmeas Wistar aos 26 dias ( $57,55 \pm 12,03$  vs.  $74,74 \pm 6,72$  mL/100g,  $P < 0,0001$ ). O consumo espontâneo de água é sexualmente dimórfico apenas na linhagem Wistar no período avaliado.

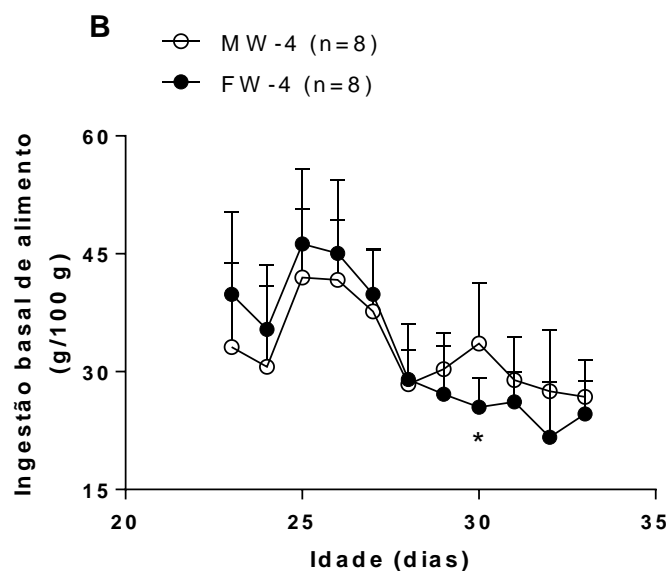
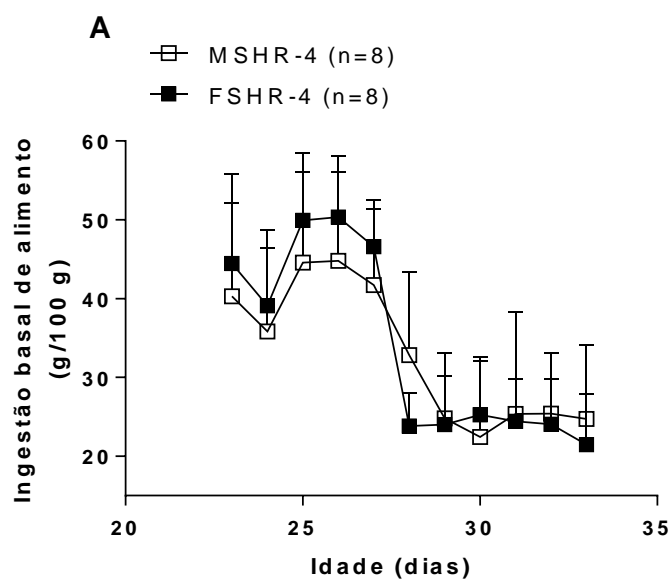
✓ **Ingestão espontânea de alimento**

A análise estatística da Figura 15A (Avaliação da ingestão basal de alimento em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(1,7) = 0,2639$ ;  $P = 0,6233$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(10,70) = 19,91$ ;  $P < 0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70) = 0,8430$ ;  $P = 0,5894$ ].

A análise estatística da Figura 15B (Avaliação da ingestão basal de alimento em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(1,7) = 0,05432$ ;  $P = 0,9943$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(10,70) = 14,59$ ;  $P < 0,0001$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70) = 3,537$ ;  $P = 0,0008$ ].

Verificamos diferenças significativas na ingestão de alimento entre os grupos fêmeas Wistar vs. machos Wistar aos 30 dias de idade ( $25,49 \pm 3,72$  vs.  $33,57 \pm 7,74$  g/100g,  $P < 0,05$ ).

Foi observado que o padrão de comportamento alimentar nos animais Wistar e SHR não é sexualmente dimórfico, mas foi encontrada uma variação fisiológica na ingestão de alimento em animais Wistar.



**Fig. 21-** Avaliação da ingestão basal de alimento em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0.05.

✓ **Volume urinário basal**

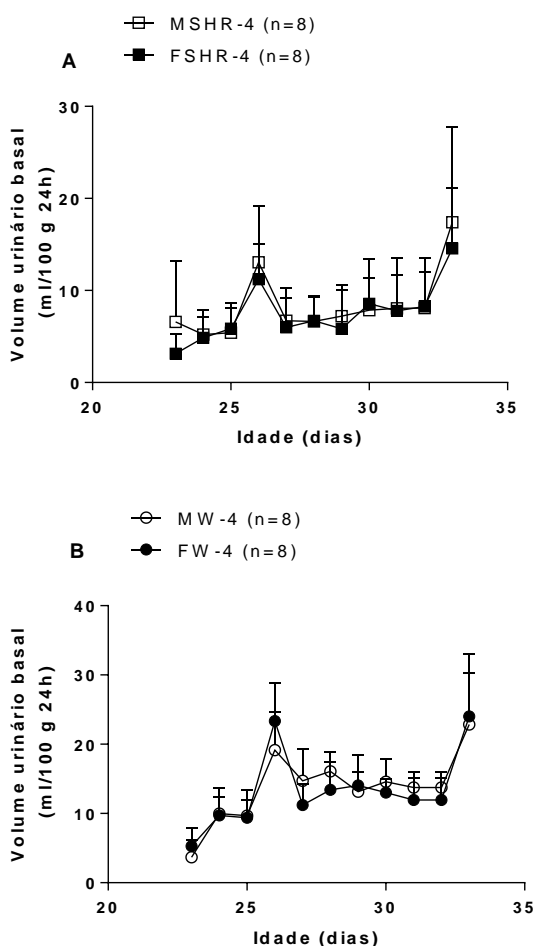
A análise estatística da Figura 16A (Avaliação do volume urinário basal em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo

[F(1,7)=1,673; P=0,2370], não demonstrou efeito da idade [F(10,70)=0,6997; P=0,7296], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [F(10,70)=8,381; P<0,0001].

A análise estatística da Figura 16B (Avaliação do volume urinário basal em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [F(1,7)=0,1218; P=0,7374], demonstrou efeito da idade [F(10,70)=2,133; P=0,0328], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [F(10,70)=32,85; P<0,0001].

Verificamos que não há diferenças significativas entre os grupos avaliados em ambas as linhagens.

Foi observado que o parâmetro volume urinário nos animais Wistar e SHR não é sexualmente dimórfico.

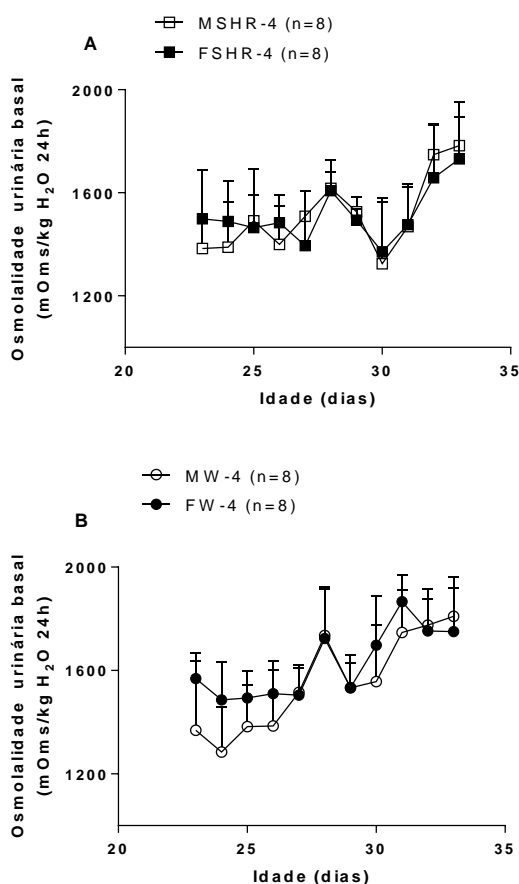


**Fig. 22-** Avaliação do volume urinário basal em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

✓ **Osmolalidade urinária**

A análise estatística da Figura 17A (Avaliação da osmolalidade urinária em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [F(1,7)=0,4723; P=0,5141], não demonstrou efeito da idade [F(10,70)=1,324; P=0,2350], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [F(10,70)=8,404; P<0,0001].

A análise estatística da Figura 17B (Avaliação da osmolalidade urinária em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [F(1,7)=3,791; P=0,0926], não demonstrou efeito da idade [F(10,70) = 1,818; P=0,0731], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [F(10,70) = 15,81; P<0,0001].



**Fig. 23-** Avaliação da osmolalidade urinária basal em machos e fêmeas SHR(A) e Wistar B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).

Verificamos que não há diferenças significativas entre os grupos avaliados em ambas as linhagens.

Foi observado que o parâmetro osmolalidade urinária nos animais Wistar e SHR não é sexualmente dimórfico.

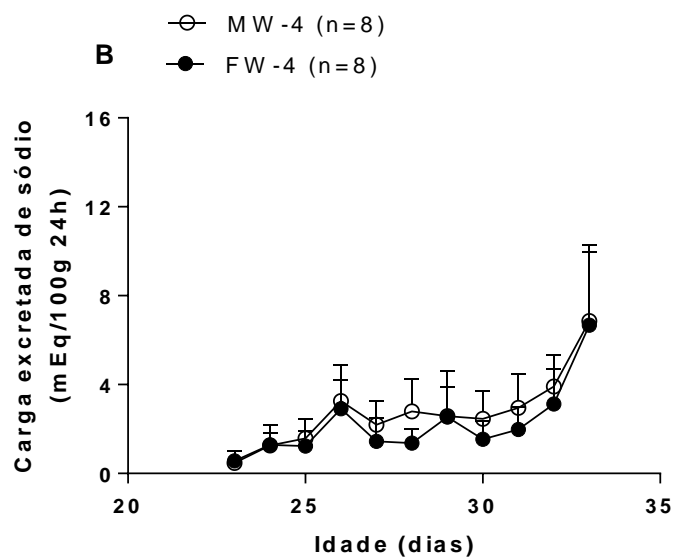
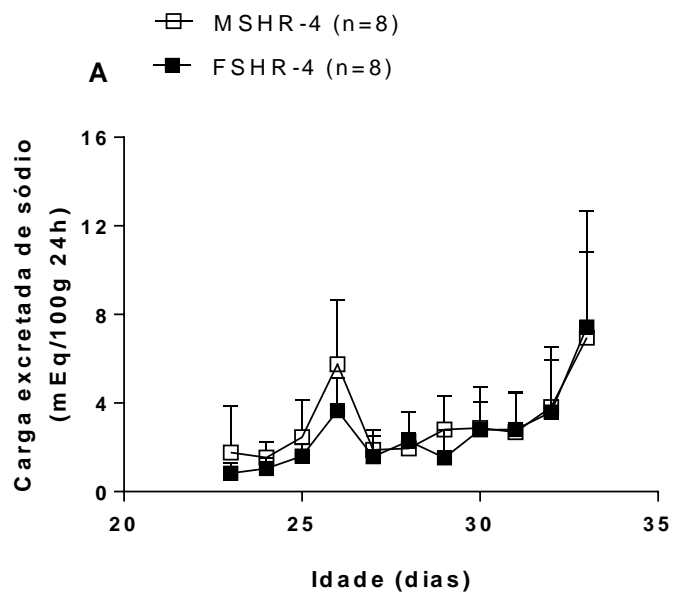
✓ **Carga excretada de sódio**

A análise estatística da Figura 18A (Avaliação da carga excretada de sódio em machos e em fêmeas SHR de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(1,7)=1,840$ ;  $P=0,2170$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(10,70)=10,70$ ;  $P=0,3561$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70) = 10,52$ ;  $P < 0,0001$ ].

A análise estatística da Figura 18B (Avaliação da carga excretada de sódio em machos e em fêmeas Wistar de 4 semanas) não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(1,7)=1,202$ ;  $P=0,3092$ ], não demonstrou efeito da idade [ $F(10,70)=1,0005$ ;  $P=0,4484$ ], e evidenciou interação entre os fatores (dimorfismo x idade) [ $F(10,70)=26,77$ ;  $P < 0,0001$ ].

Verificamos que não há diferenças significativas entre os grupos avaliados em ambas as linhagens.

Foi observado que o parâmetro carga excretada de sódio nos animais Wistar e SHR não é sexualmente dimórfico.



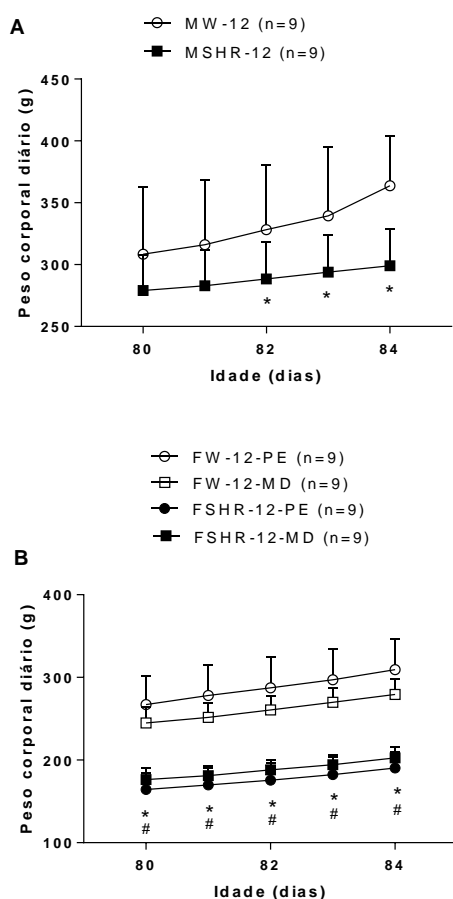
**Fig. 24-** Avaliação da carga excretada de sódio em machos e fêmeas SHR (A) e Wistar (B) 4 semanas, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP).



## Avaliações metabólicas obtidas em SHR e Wistar de 12 semanas de idade

Mostramos a seguir os parâmetros avaliados em animais de 12 semanas de idade. Os animais entraram na gaiola metabólica com 80 dias de idade, considerando o período de adaptação de 3 dias. Os dias experimentais foram considerados quando os animais apresentaram 83 e 84 dias de idade. A avaliação do dimorfismo sexual foi realizada pela observação dos resultados na mesma figura (gráficos A e B). Os dados mostram alguns animais que estavam presentes no experimento de 4 semanas de idade e que permaneceram neste experimento de 12 semanas de idade, sendo aumentado o número de animais por grupo.

### ✓ **Peso corporal**



**Fig. 25-** Avaliação do peso corporal em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

A análise estatística da Figura 19A (Avaliação do peso corporal em machos SHR e Wistar de 12 semanas) não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,8)=3,494$ ;  $P=0,0985$ ], e demonstrou efeito da idade [ $F(4,32)=32,13$ ;  $P<0,0001$ ], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(4,32)=7,150$ ;  $P=0,0003$ ].

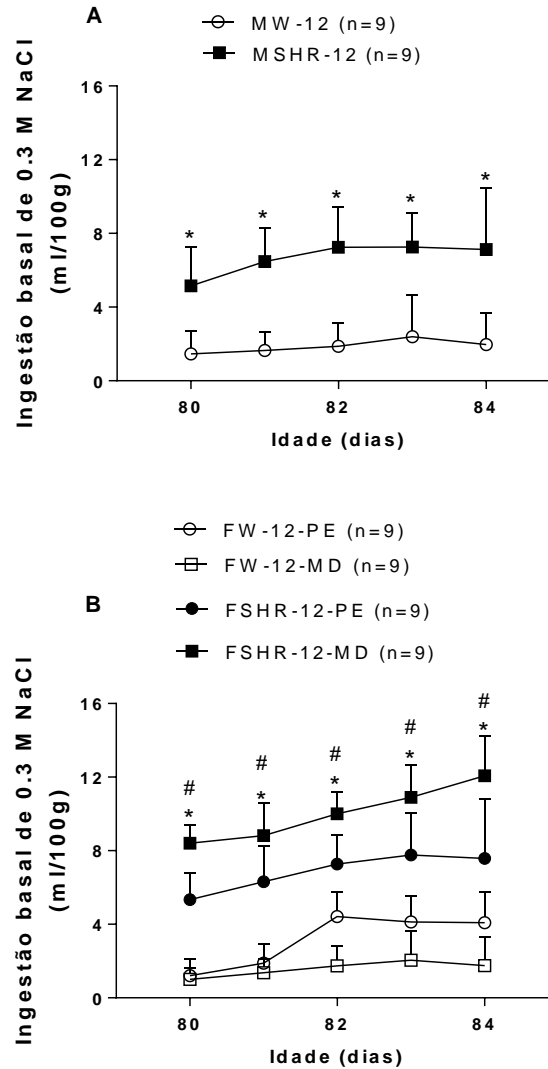
A análise estatística da Figura 19B (Avaliação do peso corporal em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas) evidenciou efeito da linhagem [ $F(3,24)=43,53$ ;  $P<0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(4,32)=507,7$ ;  $P<0,0001$ ], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(12,96)=7,219$ ;  $P<0,0001$ ].

No gráfico A observamos diferenças no peso corporal com 82 ( $288,3\pm 29,9$  vs.  $328,2 \pm 52,3$  g,  $P<0,0001$ ), 83 ( $293,9\pm 30,6$  vs.  $339,3\pm 55,6$  g,  $P<0,0001$ ) e 84 ( $299,0\pm 30,1$  vs.  $363,7 \pm 40,2$  g,  $P<0,0001$ ) dias de idade, comparando os animais SHR com os da linhagem Wistar e no gráfico B observamos diferenças significativas com 80 dias ( $164,4\pm 19,8$  vs.  $267,0\pm 34,4$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de proestro/estro ( $176,3\pm 13,9$  vs.  $244,9\pm 19,0$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de metaestro/diestro; com 81 dias ( $169,8\pm 20,0$  vs.  $278,1\pm 36,8$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de proestro/estro ( $181,1\pm 12,3$  vs.  $251,7\pm 17,7$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de metaestro/diestro; com 82 ( $175,6\pm 21,0$  vs.  $287,5\pm 37,7$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de proestro/estro e ( $188,1\pm 11,8$  vs.  $260,7\pm 16,9$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de metaestro/diestro; com 83 ( $182,3\pm 21,6$  vs.  $297,1\pm 37,3$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de proestro/estro e ( $194,3\pm 11,9$  vs.  $269,8\pm 16,9$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de metaestro/diestro; com 84 ( $190,3\pm 19,1$  vs.  $369,4\pm 37,3$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de proestro/estro e ( $202,6\pm 13,7$  vs.  $279,3\pm 19,4$  g,  $P<0,0001$ ) na fase de metaestro/diestro, comparando os animais SHR com os da linhagem Wistar. Neste parâmetro foi observada uma significativa influência da linhagem no peso corporal das fêmeas, mas não dos machos, e comparando os gráficos A e B podemos observar que o peso dos machos é maior em relação às fêmeas, conforme será mostrado também na estatística dos índices ponderais no experimento 2.

#### ✓ **Ingestão espontânea de salina hipertônica**

A análise estatística da figura 20 A (Avaliação da ingestão espontânea de salina hipertônica em machos) demonstrou influencia da idade [ $F(4,32)=5,317$ ,  $P=0,0021$ ],

evidenciou influencia da linhagem [F(1,8)=89,76, P<0,0001], mas não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(4,32)=1,586, P=0,2020].



**Fig. 26-** Avaliação da ingestão espontânea de salina hipertônica em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

Demonstramos as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico A observamos aumento na ingestão de salina hipertônica pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação. Com 80 dias de idade, comparando as machos SHR com os

machos Wistar ( $5,15 \pm 2,14$  vs.  $1,47 \pm 1,23$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ). Com 81 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar ( $6,47 \pm 1,85$  vs.  $1,65 \pm 0,98$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ). Com 82 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar ( $7,24 \pm 2,2$  vs.  $1,87 \pm 1,27$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ). Com 83 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar ( $7,26 \pm 1,86$  vs.  $2,39 \pm 2,28$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ). Com 84 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar ( $7,12 \pm 3,32$  vs.  $1,97 \pm 1,69$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

A análise estatística da figura 20 B (Avaliação da ingestão espontânea de salina hipertônica em fêmeas) demonstrou influencia da idade [ $F(4,32)=21,19$ ,  $P < 0,0001$ ], evidenciou influencia da linhagem [ $F(3,24)=162,1$ ,  $P < 0,0001$ ], mas não evidenciou interação (idade x linhagem) [ $F(12,96)=1,782$ ,  $P=0,0619$ ].

Demonstramos, primeiramente, as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico B observamos aumento na ingestão de salina hipertônica pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação das fêmeas.

Com 80 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro ( $5,34 \pm 1,46$  vs.  $1,21 \pm 0,86$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $8,4 \pm 0,9$  vs.  $1,0 \pm 0,6$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro ( $6,31 \pm 1,96$  vs.  $1,89 \pm 1,03$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $8,82 \pm 1,76$  vs.  $1,37 \pm 0,75$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro ( $7,27 \pm 1,59$  vs.  $4,42 \pm 1,34$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $10,0 \pm 1,2$  vs.  $1,74 \pm 1,09$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro ( $7,76 \pm 2,29$  vs.  $4,13 \pm 1,42$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $10,90 \pm 1,73$  vs.  $2,04 \pm 1,6$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro ( $7,76 \pm 2,29$  vs.  $4,13 \pm 1,42$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $10,90 \pm 1,73$  vs.  $2,04 \pm 1,6$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Também foi observada a influencia da fase do ciclo estral com dias 80 de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $5,34 \pm 1,46$  vs.  $8,4 \pm 0,9$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $6,31 \pm 1,96$  vs.  $8,82 \pm 1,76$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $7,27 \pm 1,59$  vs.  $10,00 \pm 1,20$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $4,42 \pm 1,34$  vs.  $1,74 \pm 1,09$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

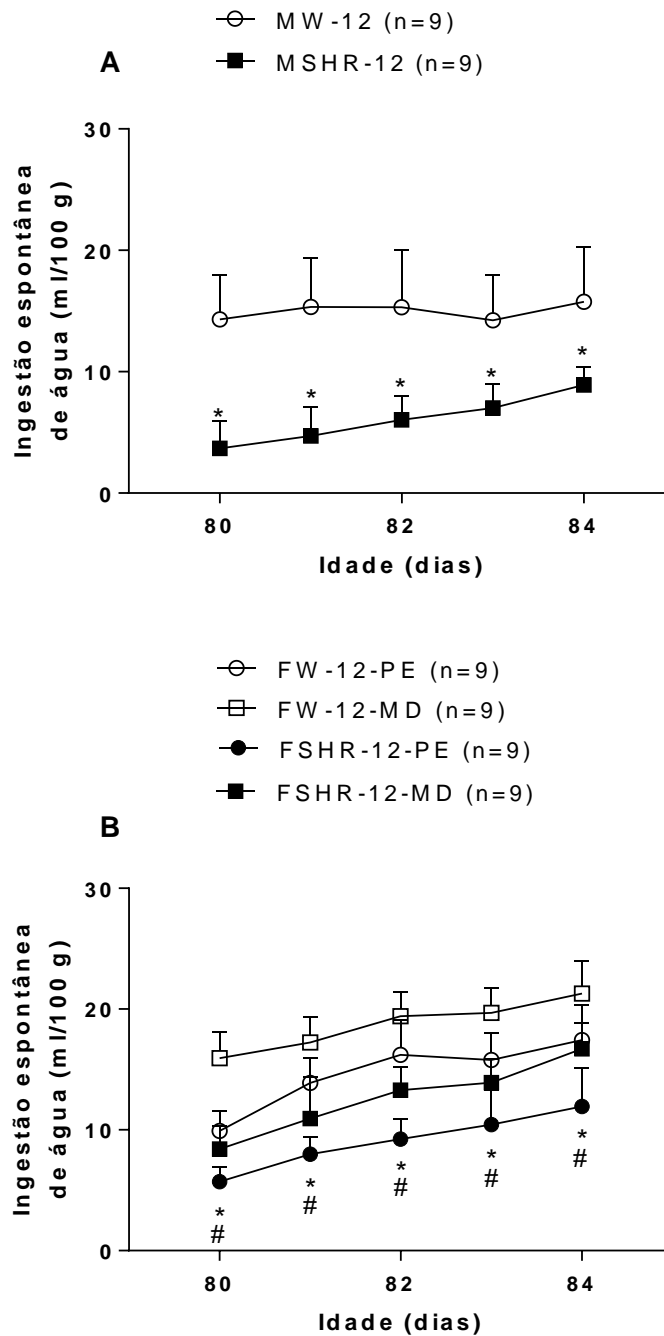
Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $7,76 \pm 2,29$  vs.  $10,90 \pm 1,73$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $4,13 \pm 1,42$  vs.  $2,04 \pm 1,6$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $7,58 \pm 3,22$  vs.  $12,08 \pm 2,16$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $4,09 \pm 1,67$  vs.  $1,75 \pm 1,55$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Em geral, a análise estatística evidenciou que os animais machos e fêmeas SHR adultos ingerem maior volume de salina hipertônica espontaneamente em relação aos animais da linhagem Wistar, sendo essa uma característica fenotípica padrão nos SHR. Os machos SHR tomam volume de salina hipertônica equivalente ao volume ingerido pelas fêmeas SHR em metaestro/diestro e o mesmo ocorre com os machos Wistar que tomam volume de salina hipertônica equivalente ao volume ingerido pelas fêmeas Wistar em metaestro/diestro.

As fêmeas SHR tomam maior volume de salina na fase de metaestro/diestro, enquanto que as fêmeas Wistar ingerem maior volume na fase de proestro/estro.

✓ Ingestão espontânea de água



**Fig. 27-** Avaliação da ingestão espontânea de água em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

A análise estatística da figura 21 A (Avaliação da ingestão espontânea de água em machos) demonstrou influencia da idade [F(4,32)=6,808, P=0,0004], evidenciou influencia da linhagem [F(1,8)=45,82, P=0,0001], e evidenciou interação (idade x linhagem) [F(4,32)=4,457, P=0,0056].

Demonstramos as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico A observamos aumento na ingestão de salina hipertônica pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação.

Com 80 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (3,69±2,21 vs. 14,31±3,69 mL/100 g, P<0,0001).

Com 81 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (4,71±2,38 vs. 15,34±4,04 mL/100 g, P<0,0001).

Com 82 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (6,08±1,91 vs. 15,3±4,74 mL/100 g, P<0,0001).

Com 83 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (7,01±1,98 vs. 14,25±3,73 mL/100 g, P<0,0001).

Com 84 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (8,9±1,47 vs. 15,76±4,49 mL/100 g, P<0,0001).

A análise estatística da figura 21 B (Avaliação da ingestão espontânea de água em fêmeas) demonstrou influencia da idade [F(4,32)=74,06, P<0,0001], evidenciou influencia da linhagem [F(3,24)=55,43, P<0,0001], mas não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(12,96)=1,599, P=0,1046].

Demonstramos, primeiramente, as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico B observamos aumento na ingestão de salina hipertônica pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação das fêmeas.

Com 80 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro (9,91±1,66 vs. 5,71±1,23 mL/100 g, P<0,0001) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro (15,93±2,15 vs. 8,42±1,92 mL/100 g, P<0,0001).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro (13,89±2,01 vs. 7,99±1,41 mL/100 g, P<0,0001)

e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $17,25 \pm 2,09$  vs.  $10,93 \pm 3,48$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $16,22 \pm 2,84$  vs.  $9,25 \pm 1,68$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $19,41 \pm 1,99$  vs.  $13,3 \pm 1,88$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $15,78 \pm 2,21$  vs.  $10,44 \pm 2,82$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $19,68 \pm 2,1$  vs.  $13,90 \pm 1,95$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $17,43 \pm 2,94$  vs.  $11,94 \pm 3,14$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $21,27 \pm 2,68$  vs.  $16,72 \pm 2,16$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Também foi observada a influencia da fase do ciclo estral com dias 80 de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $5,71 \pm 1,23$  vs.  $8,42 \pm 1,92$  mL/100 g,  $P < 0,01$ ).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $13,89 \pm 2,01$  vs.  $17,25 \pm 2,09$  mL/100 g,  $P < 0,001$ ) e as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $7,99 \pm 1,41$  vs.  $10,93 \pm 3,48$  mL/100 g,  $P < 0,001$ ).

Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $16,22 \pm 2,84$  vs.  $19,41 \pm 1,99$  mL/100 g,  $P < 0,001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $9,25 \pm 1,68$  vs.  $13,3 \pm 1,88$  mL/100 g,  $P < 0,001$ ).

Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $15,78 \pm 2,21$  vs.  $21,27 \pm 2,69$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $10,44 \pm 2,82$  vs.  $13,90 \pm 1,95$  mL/100 g,  $P < 0,0001$ ).

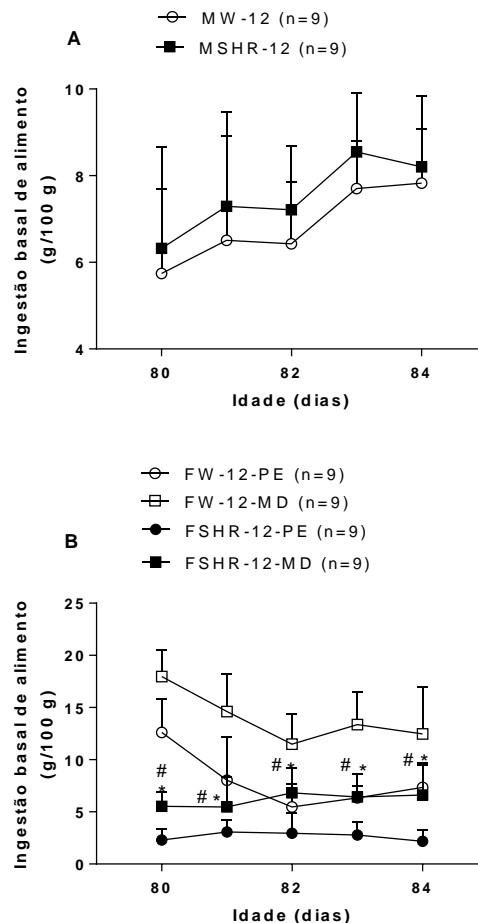
Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $15,78 \pm 2,21$  vs.  $21,27 \pm 2,69$  mL/100 g,



P<0,0001) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro (10,44±2,82 vs. 13,90±1,95 mL/100 g, P<0,0001).

Em resumo, os animais SHR machos e fêmeas tomam menor volume de água espontaneamente em relação aos animais machos e fêmeas Wistar. As fêmeas de ambas as linhagens ingerem maior volume de água quando se encontram na fase de metaestro ou diestro. Observamos, então, o comportamento típico de ingestão de água espontânea nos animais espontaneamente hipertensos e nos animais normotensos.

### ✓ Ingestão espontânea de alimento



**Fig. 28-** Avaliação da ingestão espontânea de alimento em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

A análise estatística da figura 22 A (Avaliação da ingestão espontânea de alimento em machos) demonstrou influencia da idade [ $F(4,32)=6,877$ ,  $P=0,0004$ ], evidenciou influencia da linhagem [ $F(1,8)=1,095$ ,  $P=0,3259$ ], e evidenciou interação (idade x linhagem) [ $F(4,32)=0,1097$ ,  $P=0,9782$ ].

Demonstramos as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico A observamos aumento na ingestão de alimento pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação.

A análise estatística da figura 22 B (Avaliação da ingestão espontânea de alimento em fêmeas) demonstrou influencia da idade [ $F(4,32)=16,15$ ,  $P<0,0001$ ], evidenciou influencia da linhagem [ $F(3,24)=56,02$ ,  $P<0,0001$ ], e evidenciou interação (idade x linhagem) [ $F(12,96)=5,767$ ,  $P<0,0001$ ].

Demonstramos, primeiramente, as alterações observadas pelas diferenças de linhagem. No gráfico B observamos aumento na ingestão de alimento pela influencia da linhagem em todos os dias de avaliação das fêmeas.

Com 80 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $12,62\pm 3,19$  vs.  $2,3\pm 1,11$  g/100 g,  $P<0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $17,97\pm 2,52$  vs.  $5,52\pm 1,35$  g/100 g,  $P<0,0001$ ).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $8,02\pm 4,15$  vs.  $3,07\pm 1,13$  g/100 g,  $P<0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $14,62\pm 3,58$  vs.  $5,47\pm 2,84$  g/100 g,  $P<0,0001$ ).

Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $5,46\pm 2,21$  vs.  $2,96\pm 1,91$  g/100 g,  $P<0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $11,5\pm 2,89$  vs.  $6,83\pm 2,34$  g/100 g,  $P<0,0001$ ).

Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $6,34\pm 1,12$  vs.  $2,78\pm 1,21$  g/100 g,  $P<0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $13,36\pm 3,16$  vs.  $6,42\pm 2,21$  g/100 g,  $P<0,0001$ ).

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro ( $7,35 \pm 2,33$  vs.  $2,18 \pm 1,03$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $12,46 \pm 4,5$  vs.  $6,62 \pm 2,88$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Também foi observada a influencia da fase do ciclo estral com 80 dias de idade, comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $2,3 \pm 1,11$  vs.  $5,52 \pm 1,35$  g/100 g,  $P < 0,01$ ).

Com 81 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $8,02 \pm 4,15$  vs.  $14,62 \pm 3,58$  g/100 g,  $P < 0,001$ ) e as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $3,07 \pm 1,13$  vs.  $5,47 \pm 2,84$  g/100 g,  $P < 0,001$ ).

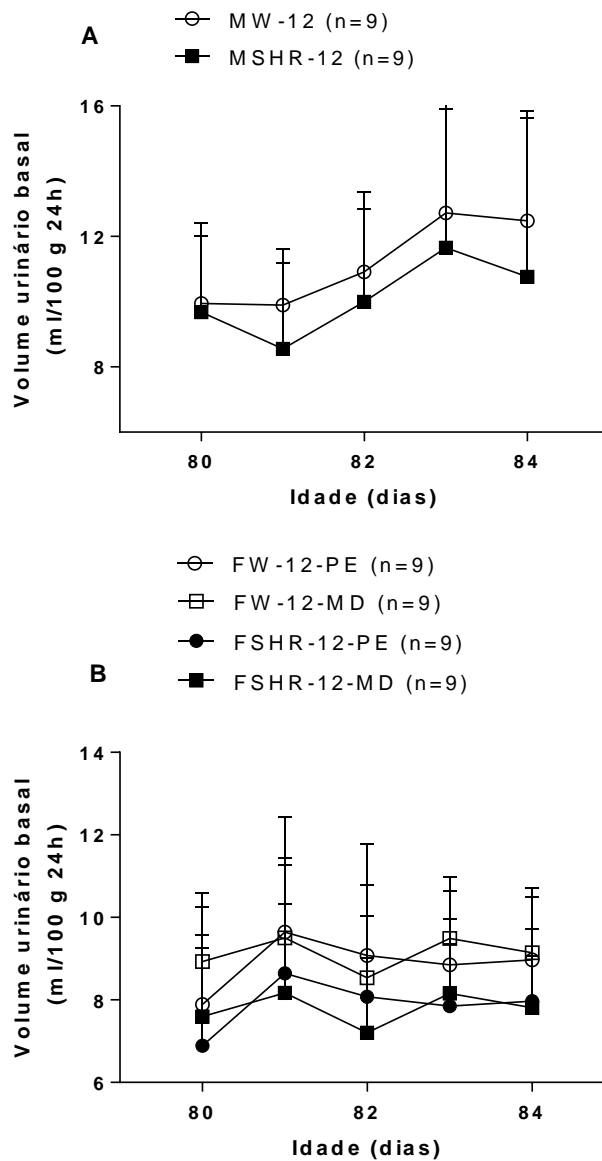
Com 82 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $5,46 \pm 2,21$  vs.  $11,5 \pm 2,89$  g/100 g,  $P < 0,001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $2,96 \pm 1,91$  vs.  $6,83 \pm 2,34$  g/100 g,  $P < 0,001$ ).

Com 83 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $6,34 \pm 1,12$  vs.  $13,36 \pm 3,16$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $2,78 \pm 1,21$  vs.  $6,42 \pm 2,21$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro ( $7,35 \pm 2,33$  vs.  $12,46 \pm 4,5$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ) e comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro ( $2,18 \pm 1,03$  vs.  $6,62 \pm 2,88$  g/100 g,  $P < 0,0001$ ).

Com esses resultados podemos dizer que a linhagem não influenciou o comportamento ingestivo nos machos, mas nas fêmeas houve a influencia da linhagem e na fase do ciclo de metaestro/diestro as fêmeas de ambas as linhagens ingeriram maior quantidade de alimento.

✓ **Volume urinário basal**



**Fig. 29-** Avaliação do volume urinário em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

A análise estatística da figura 23 A (Avaliação do volume urinário em machos) demonstrou influencia da idade [F(4,32)=3,646, P=0,0148], não evidenciou influencia da

linhagem [F(1,8)=2,254, P=0,1717], e não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(4,32)=0,4185, P=0,7940].

Ao comparar os volumes urinários de todos os grupos observamos que não houve diferença significativa neste parâmetro, sob condições fisiológicas.

A análise estatística da figura 23 B (Avaliação do volume urinário em fêmeas) demonstrou influencia da idade [F(4,160)=1,622, P=0,1713], evidenciou influencia da linhagem [F(3,160)=3,099, P=0,0284], e evidenciou interação (idade x linhagem) [F(12,160)=0,2789, P=0,9918].

Observamos que o volume urinário das fêmeas não se modificou durante os dias de avaliação.

#### ✓ **Osmolalidade urinária**

A análise estatística da figura 24 A (Avaliação da osmolalidade urinária em machos) demonstrou influencia da idade [F(4,32)=0,4988, P=0,7367], não evidenciou influencia da linhagem [F(1,8)=170,2, P<0,0001], e não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(4,32)=0,3434, P=0,8466].

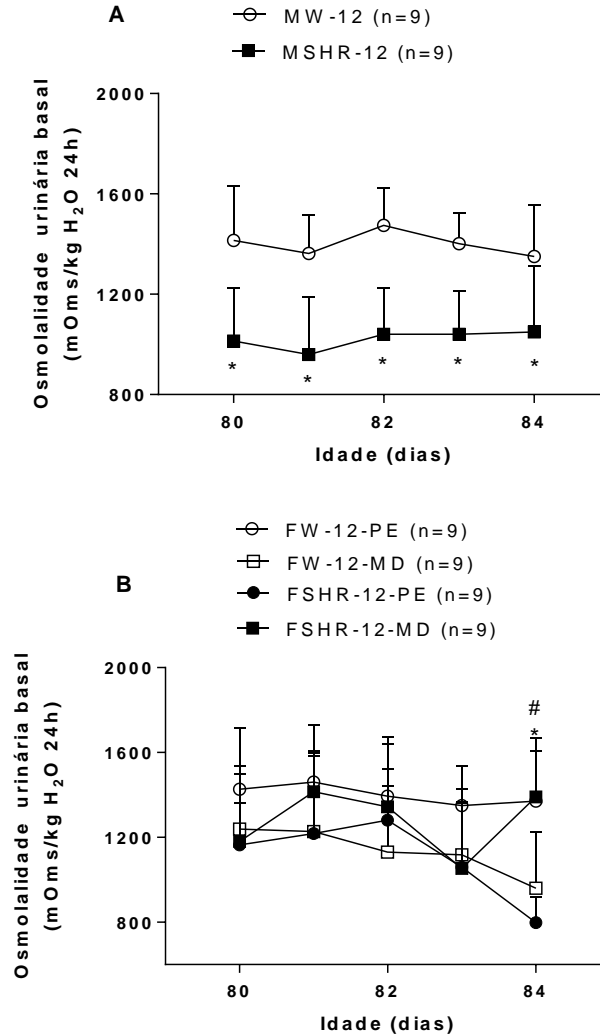
Com 80 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (1013±209,47 vs. 1414,22±216,57 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, P<0,0001).

Com 81 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (959,56±230,06 vs. 1362,33±154,13 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, P<0,0001).

Com 82 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (1040,0±185,47 vs. 1474,11±151,1 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, P<0,0001).

Com 83 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (1040,33±174,01 vs. 1401,33±122,75 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, P<0,0001).

Com 84 dias de idade, comparando as machos SHR com os machos Wistar (1049,22±261,83 vs. 1350,22±204,03 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, P<0,0001).



**Fig. 30-** Avaliação da osmolalidade urinária em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatrêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças na fase do ciclo estral.

A análise estatística da figura 24 B (Avaliação da osmolalidade urinária em fêmeas) demonstrou influencia da idade [F(4,32)=5,71; P=0,0014], evidenciou influencia da linhagem [F(3,24)=7,325; P=0,0012], evidenciou interação (idade x linhagem) [F(12,96)=2,271; P=0,0139].

Com 84 dias de idade, comparando as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro (959,67±265,57 vs. 1370,22±296,58 mOsm/kg

H<sub>2</sub>O; P<0,0001); comparando as fêmeas SHR na fase de proestro/estro com as fêmeas Wistar na fase de proestro/estro (797,22±120,2 vs. 1370,22±296,58 mOsm/kg H<sub>2</sub>O; P<0,0001); comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas Wistar na fase de metaestro/diestro (1389,89±216,6 vs. 959,67±265,57 mOsm/kg H<sub>2</sub>O; P<0,0001) e, por fim, comparando as fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro com as fêmeas SHR na fase de proestro/estro (1389,89±216,6 vs. 797,22±120,2 mOsm/kg H<sub>2</sub>O; P<0,0001).

Durante os dias de avaliação a osmolalidade urinária nos machos da linhagem SHR foi menor que nos animais da linhagem Wistar. Nas fêmeas SHR foi observada redução da osmolalidade urinária na fase de proestro/estro e na fase de metaestro/diestro das fêmeas Wistar apenas aos 84 dias de idade. O aumento da osmolalidade urinária foi observado nas fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro e na fase de proestro/estro das fêmeas Wistar apenas aos 84 dias de idade.

#### ✓ **Carga excretada de sódio**

A análise estatística da figura 25 A (Avaliação da carga excretada de sódio em machos) não demonstrou influencia da idade [F(4,32)=0,04849; P=0,9954], evidenciou influencia da linhagem [F(1,8)=18,66; P=0,0025], não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(4,32)=2,427; P=0,0681].

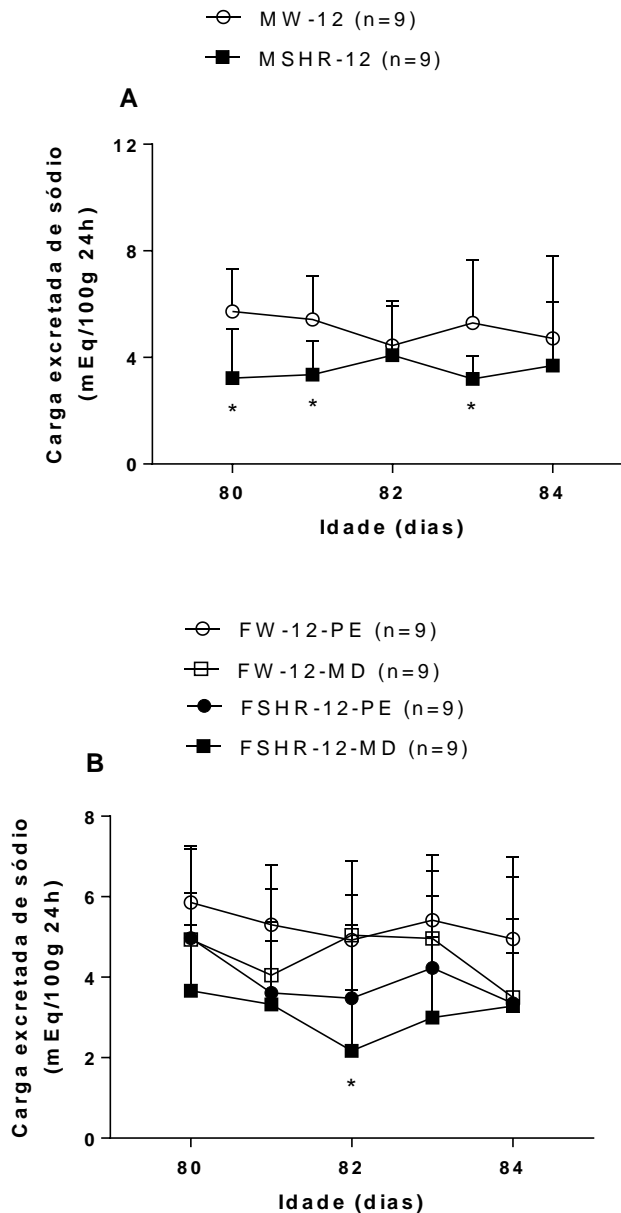
Com 80 dias de idade, comparando os machos SHR com os machos Wistar (3,23±1,83 vs. 5,73 ±1,58 mEq/100g 24h, P<0,0001).

Com 81 dias de idade, comparando os machos SHR com os machos Wistar (3,35±1,28 vs. 5,42±1,64 mEq/100g 24h, P<0,0001).

Com 83 dias de idade, comparando os machos SHR com os machos Wistar (3,19±0,85 vs. 5,29±2,38 mEq/100g 24h, P<0,0001).

A análise estatística da figura 25 B (Avaliação da carga excretada de sódio em fêmeas) não demonstrou influencia da idade [F(4,32)=1,781; P=0,1570], evidenciou influencia da linhagem [F(3,24)=5,666; P=0,0044], não evidenciou interação (idade x linhagem) [F(12,96)=0,5659; P=0,8643].

Nesta avaliação, houve diferenças significativas entre fêmeas SHR metaastro/diestro e fêmeas Wistar metaastro/diestro com 82 dias de idade ( $3,23 \pm 1,83$  vs.  $5,73 \pm 1,58$  mEq/100g 24h,  $P < 0,0001$ ).



**Fig. 31-** Avaliação da carga excretada de sódio em machos (A) e fêmeas (B) das linhagens Wistar e SHR de 12 semanas de idade, normonatêmicos e normohidratados. Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni e expressos por média(DP), \* $P < 0,05$  para as diferenças de linhagem.



Verificamos que houve influencia da linhagem na carga excretada de sódio nos machos. A linhagem SHR apresentou reduzida carga excretada de sódio, indicando que essa linhagem possui como característica a dificuldade da excreção desse eletrólito com 12 semanas de idade.

Durante o período de avaliação, verificamos uma variação fisiológica na carga excretada de sódio nas fêmeas na fase de metaestro/diestro, no qual as fêmeas SHR excretaram menos sódio.

Possivelmente a característica de incapacidade de excretar sódio é mais importante em machos do que em fêmeas sob condições fisiológicas.

## **Experimento 2 – Avaliação dos hormônios ocitocina, vasopressina, angiotensina II e ANP plasmáticos em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

O experimento 2 foi o primeiro a ser executado por ser o protocolo mais demorado.

A partir dos mesmos animais foram obtidos os tecidos e foi realizada a pesagem dos órgãos para avaliação dos índices e padronização do tamanho corporal dos animais utilizados nesse estudo. Assim os dados dos índices foram obtidos pela divisão do peso do órgão (peso úmido) pelo comprimento da tíbia em milímetros. O comprimento da tíbia é um valor constante que não varia em função de maior ingestão de alimento ou de água, ou seja é uma medida mais fidedigna que o peso corporal.

Avaliamos também neste estudo o hematócrito e a osmolalidade plasmática sob condições basais.

## **Avaliações do hematócrito, da osmolalidade plasmática e dos índices ponderais em filhotes de 4 semanas e adultos de 12 semanas.**

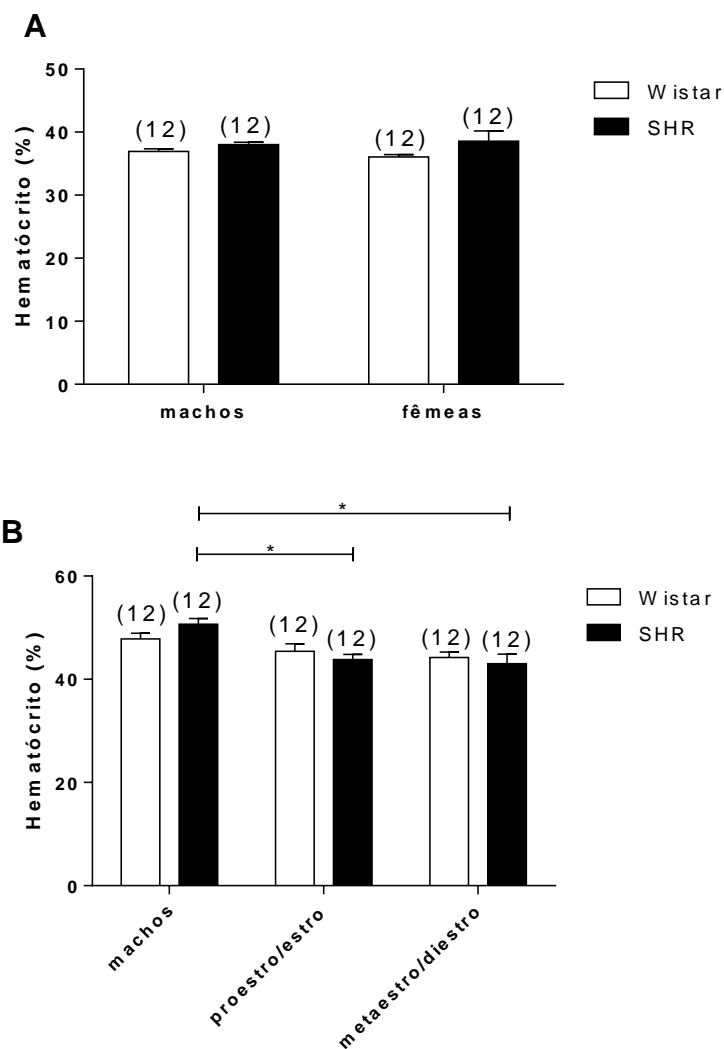
### **Avaliação do hematócrito**

A análise estatística do hematócrito em filhotes SHR e Wistar (Fig. 26A) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,44)=4,147$ ;  $P=0,0478$ ], não demonstrou efeito do

dimorfismo [ $F(1,44)=0,02018$ ;  $P=0,8877$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(1,44)=0,6481$ ;  $P=0,4251$ ].

Na avaliação do hematócrito dos filhotes de 4 semanas não foram observadas diferenças significativas sob condições basais como era esperado. Os percentuais de hematócrito encontrados mostram que os animais utilizados no estudo, nesta faixa etária, estavam normohidratados, comprovando a condição experimental.

Também foi realizada a análise estatística do hematócrito em animais SHR e Wistar adultos (Fig. 26B), que não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,63)=0,0002507$ ;  $P = 0,9874$ ], demonstrou efeito do dimorfismo [ $F(2,63)=11,02$ ;  $P<0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(2,63)=1,857$ ;  $P=0,1645$ ].



**Fig. 32-** Avaliação do hematócrito dos animais com 4 semanas (A) e 12 semanas (B) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Avaliamos o hematócrito dos animais adultos sob condições basais e verificamos que as (i) fêmeas SHR em metaestro/diestro apresentaram redução no hematócrito em relação aos machos SHR ( $43,0 \pm 1,86$  vs.  $50,7 \pm 1,1$  %,  $P < 0,01$ ) e também que (ii) fêmeas SHR em proestro/estro apresentaram redução no hematócrito em relação aos machos SHR ( $43,8 \pm 0,98$  vs.  $50,7 \pm 1,1$  %,  $P < 0,01$ ).

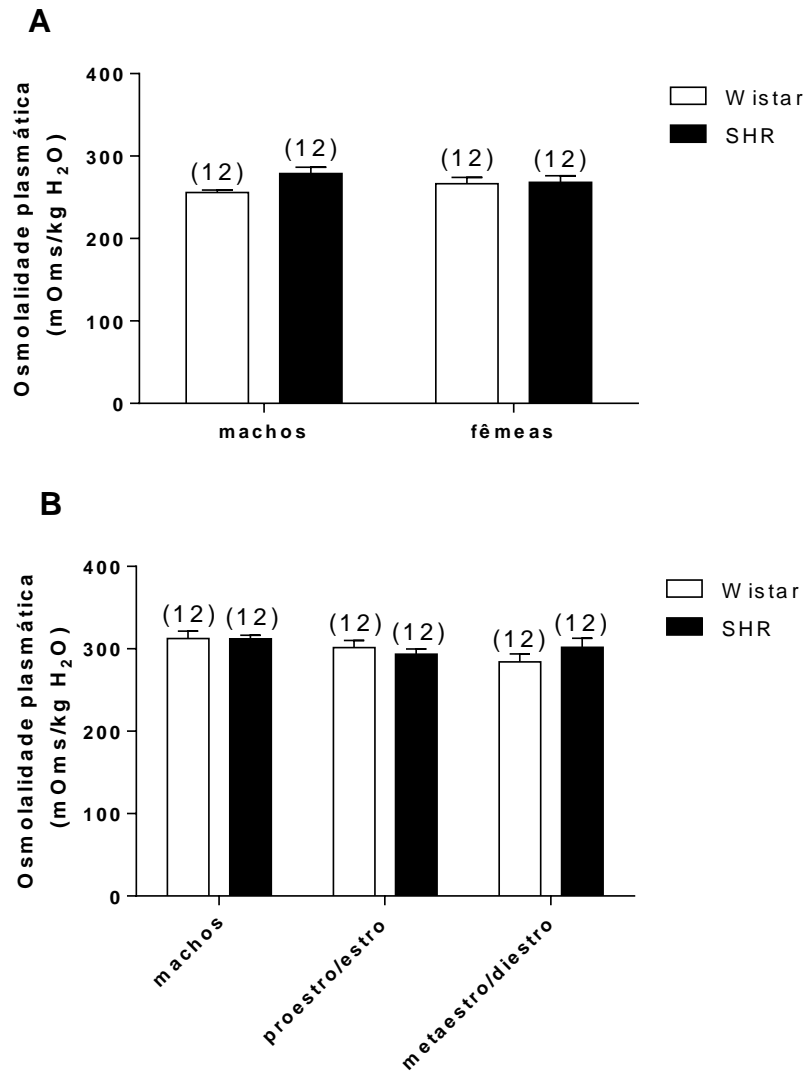
Ao observar os gráficos 26A e 26B em conjunto vimos que no hematócrito ocorreu dimorfismo sexual apenas na linhagem SHR, quando adultos, e essa resposta ocorreu independentemente da fase do ciclo estral, enquanto que o hematócrito na idade de 4 semanas não foi influenciado pela linhagem ou pela diferença entre machos e fêmeas.

### **Avaliação da osmolalidade plasmática**

A seguir mostramos a análise estatística da osmolalidade plasmática em filhotes SHR e Wistar (Fig. 27A), que não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,44)=3,283$ ;  $P=0,0768$ ], não demonstrou efeito do dimorfismo [ $F(1,44)=3,722$ ;  $P=0,9952$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(1,44)=2,382$ ;  $P=0,1299$ ]. Na avaliação da osmolalidade plasmática nos animais de 4 semanas de idade não foram observadas diferenças significativas sob condições basais.

Na análise estatística da osmolalidade plasmática (Fig. 27B) em animais SHR e Wistar adultos não foi evidenciado o efeito da linhagem [ $F(1,66)=0,1871$ ;  $P=0,6668$ ], não ocorreu efeito do dimorfismo [ $F(2,66)=2,849$ ;  $P=0,0650$ ], e não foi demonstrada a interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(2,66)=1,205$ ;  $P=0,3063$ ].

Em conjunto, os gráficos 27A e 27B indicam que a osmolalidade plasmática não é um parâmetro que pode ser influenciado pela linhagem ou pelo estado hipertensivo dos animais, em condições fisiológicas. Verificamos que a osmolalidade plasmática também não foi influenciada pelo dimorfismo ou pela fase do ciclo estral em condições basais. As médias de osmolalidade plasmática obtidas sugerem que os animais utilizados no estudo, quando filhotes e adultos, estavam normohidratados.



**Fig. 33-** Avaliação da osmolalidade plasmática dos animais de 4 semanas (A) e de 12 semanas (B) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

### Avaliações dos índices ponderais

**Tabela 1.** Índices ponderais em animais das linhagens SHR e Wistar de 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

Parâmetros	Wistar		SHR		Estatística		
	MW-4 (n=12)	FW-4 (n=12)	MSHR-4 (n=12)	FSHR-4 (n=12)	Efeito do dimorfismo	Efeito da linhagem	Interação
Peso corporal, g	113,5± 6,0 (a)	93,7 ± 1,8 (b)(c)	62,1 ± 1,9	57,5 ± 3,5	F(1,44) = 10,76; P = 0,0020	F(1,44) = 139,7; P < 0,0001	F(1,44) = 4,181; P = 0,0469
Comprimento da Tíbia, mm	23,6 ± 0,46 (a)	22,1 ± 0,39 (b)(c)	21,8 ± 0,07	20,6 ± 0,29	F(1,44) = 15,63; P = 0,0003	F(1,44) = 24,49; P < 0,0001	F(1,44) = 0,07483; P = 0,7857
Índice de peso corporal	5,2 ± 0,27 (a)	4,56 ± 0,09 (b)(c)	2,63 ± 0,06	2,58 ± 0,13	F(1,44) = 4,815; P = 0,0335	F(1,44) = 207,8; P < 0,0001	F(1,44) = 3,469; P = 0,0692
Índice atrial	0,02 ± 0,0004	0,002 ± 0,0002	0,001 ± 0,0007	0,001 ± 0,0001	F(1,44) = 0,2866; P = 0,5951	F(1,44) = 6,603; P = 0,0136	F(1,44) = 0,1404; P = 0,7097
Índice ventricular	0,03 ± 0,001(a)	0,023 ± 0,0008 (c)	0,012 ± 0,0003	0,014 ± 0,002	F(1,44) = 0,6088; P = 0,4394	F(1,44) = 102,4; P < 0,0001	F(1,44) = 4,628; P = 0,0370
Índice cardíaco	0,028 ± 0,016 (a)	0,024 ± 0,0008 (c)	0,014 ± 0,0004	0,015 ± 0,0016	F(1,44) = 0,5208; P = 0,4743	F(1,44) = 96,65; P < 0,001	F(1,44) = 3,925; P = 0,0538
Índice pulmonar	0,046 ± 0,0027 (a)	0,040 ± 0,002 (c)	0,022 ± 0,0006	0,019 ± 0,0009	F(1,44) = 4,943; P = 0,0314	F(1,44) = 146,9; P < 0,0001	F(1,44) = 0,6224; P = 0,4344
Índice hepático	0,3 ± 0,02 (a)	0,24 ± 0,015 (b)(c)	0,014 ± 0,006	0,12 ± 0,005	F(1,44) = 8,006; P = 0,0070	F(1,44) = 109,7; P < 0,0001	F(1,44) = 3,615; P = 0,0638
Índice renal (rim esquerdo)	0,03 ± 0,002(a)	0,03 ± 0,002(c)	0,016 ± 0,0005	0,014 ± 0,0006	F(1,44) = 5,023; P = 0,0301	F(1,44) = 147,0; P < 0,0001	F(1,44) = 1,104; P = 0,2992

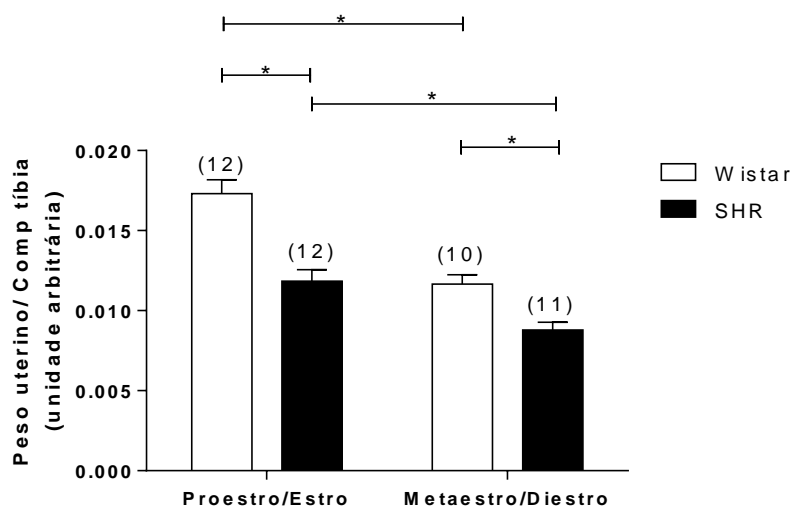
Dados expressos como média(DP) e analisados por ANOVA two way medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni, P<0,05. Os índices são apresentados em unidades arbitrárias.(a) MSHR vs. MW; (b) FW vs. MW; (c) FSHR vs. FW.

Tabela 2. Índices ponderais em animais das linhagens SHR e Wistar de 12 semanas de idade.

Parâmetros	Wistar					SHR					Estatística	
	MW-12 (n=12)	FW-12-PE (n=12)	FW-12-MD (n=12)	M5HR-12 (n=12)	FSHR-12-PE (n=12)	FSHR-12-MD (n=12)	Efeito do dimorfismo	Efeito da linhagem	Interação			
Peso corporal, g	395,1 ± 15,3 (a)(b)(c)	282,4 ± 5,4 (f)	289,2 ± 8,1(g)	282,7 ± 8,3 (d)(e)	190,6 ± 1,29	187,2 ± 2,1	F(2,63) = 100,2; P < 0,0001	F(1,63) = 222,0; P < 0,0001	F(2,63) = 0,7886; P = 0,4589			
Comprimento da Tibia, mm	36,78 ± 1,05(a)(b)(c)	32,38 ± 0,18	32,76 ± 0,17	33,89 ± 0,52	33,03 ± 1,46	33,83 ± 2,38	F(2,63) = 10,71; P < 0,0001	F(1,63) = 0,6238; P = 0,4326	F(2,63) = 6,485; P = 0,0027			
Índice de peso corporal	11,36 ± 0,5 (a)(b)(c)	8,73 ± 0,19(f)	8,83 ± 0,23(g)	8,33 ± 0,17 (d)(e)	5,78 ± 0,08	5,55 ± 0,1	F(2,63) = 70,35; P < 0,0001	F(1,63) = 213,2; P < 0,0001	F(2,63) = 0,2090; P = 0,8119			
Índice arterial	0,02 ± 0,0008	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,006	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,006	F(2,63) = 0,1087; P = 0,8972	F(1,63) = 4,123; P = 0,0465	F(2,63) = 1,011; P = 0,3697			
Índice ventricular	0,036 ± 0,001 (a)(b)(c)	0,030 ± 0,001(f)	0,029 ± 0,0009(g)	0,031 ± 0,0007 (d)(e)	0,024 ± 0,001	0,023 ± 0,001	F(2,63) = 24,34; P < 0,0001	F(1,63) = 37,00; P < 0,0001	F(2,63) = 0,007532; P = 0,9925			
Índice cardíaco	0,04 ± 0,001 (a)(b)(c)	0,03 ± 0,001(f)	0,026 ± 0,0009(g)	0,032 ± 0,0007 (e)	0,03 ± 0,001	0,026 ± 0,0009	F(2,63) = 18,09; P < 0,0001	F(1,63) = 52,41; P < 0,0001	F(2,63) = 0,4947; P = 0,6121			
Índice pulmonar	0,46 ± 0,28	0,46 ± 0,07(f)	0,45 ± 0,034(g)	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,08	0,3 ± 0,017	F(2,63) = 1,538; P = 0,2227	F(1,63) = 37,92; P < 0,0001	F(2,63) = 1,210; P = 0,3051			
Índice hepático	4,66 ± 0,56	3,52 ± 0,3	3,56 ± 0,36	3,07 ± 0,19	2,29 ± 0,16	2,37 ± 0,31	F(2,63) = 46,97; P < 0,0001	F(1,63) = 307,6; P < 0,0001	F(2,63) = 0,3333; P = 0,7178]			
Índice renal (rim esquerdo)	0,46 ± 0,07 (a)(b)(c)	0,35 ± 0,03(f)	0,34 ± 0,033(g)	0,3 ± 0,02 (d)(e)	0,21 ± 0,01	0,2 ± 0,01	F(1,44) = 5,023; P = 0,0301	F(1,44) = 147,0; P < 0,0001]	F(1,44) = 1,104; P = 0,2992			

Dados expressos como média (DP) e analisados por ANOVA two way medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni, P < 0,05. Os índices são apresentados em unidades arbitrárias. (a) Machos SHR vs. Machos Wistar, (b) Machos Wistar vs. Fêmeas Wistar proestro estro, (c) Machos Wistar vs. Fêmeas Wistar metestro diestro, (d) Machos SHR vs. Fêmeas SHR, proestro estro, (e) Machos SHR, metestro diestro, (f) Fêmeas Wistar proestro estro vs. Fêmeas SHR, proestro estro, (g) Fêmeas Wistar metestro diestro vs. Fêmeas SHR, metestro diestro.

A seguir mostramos a análise estatística do índice uterino (Fig. 28) em fêmeas SHR e Wistar adultas, que evidenciou efeito da linhagem [F(1,41)=35,11; P<0,0001], demonstrou efeito da fase do ciclo estral [F(1,41)=38,38; P<0,0001], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x fase do ciclo estral) [F(1,41)=3,422; P=0,0716].



**Fig. 34-** Avaliação do índice uterino em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade sob condições basais, considerando o peso uterino com o conteúdo drenado. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Na avaliação do índice uterino observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas Wistar proestro/estro (0,012±0,0007 vs. 0,017±0,0009, P<0,0001); (ii) Fêmeas Wistar proestro/estro vs. Fêmeas Wistar metaestro/diestro (0,0173±0,0009 vs. 0,0116±0,0006, P<0,0001); (iii) Fêmeas SHR metaestro/diestro vs. Fêmeas SHR proestro/estro (0,009±0,0005 vs. 0,012±0,0007, P<0,05); (iv) Fêmeas SHR metaestro/diestro vs. Fêmeas Wistar metaestro/diestro (0,009±0,0005 vs. 0,012 ± 0,0006, P<0,05).

Nesse gráfico vimos que o índice uterino foi influenciado pela linhagem e pela fase do ciclo estral, sendo que as fêmeas Wistar apresentaram maior índice uterino, independentemente da fase do ciclo estral.



**Avaliações das concentrações hormonais de ocitocina, vasopressina, angiotensina 2 e peptídeo natriurético atrial em animais da linhagem SHR e Wistar de 4 semanas de idade**

Apresentamos a seguir as avaliações das concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANG 2 e ANP de acordo com as variáveis do estudo. Mostramos a seguir as avaliações hormonais em função das diferenças de linhagem e de diferenças entre machos e fêmeas.

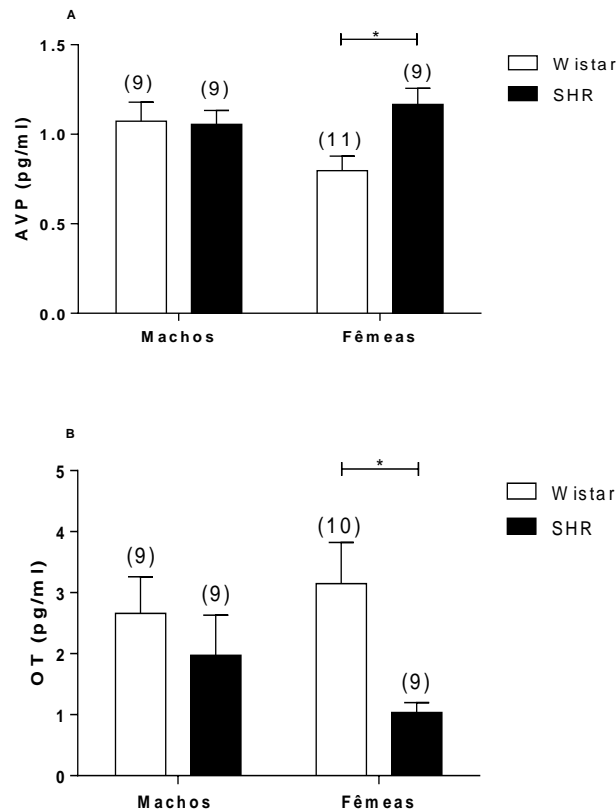
A seguir mostramos as concentrações hormonais de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) nas 4 semanas de idade.

A análise estatística do hormônio vasopressina mostrou uma tendência para o efeito da linhagem [F(1,34)=3,877, P=0,0571], mas não mostrou efeito do dimorfismo [F(1,34)=0,8605, P=0,3601], e mostrou interação entre os fatores linhagem x dimorfismo [F(1,34)=4,694, P=0,0374].

Na avaliação do hormônio vasopressina (Fig. 29A), comparando as linhagens, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Fêmeas SHR vs. Filhotes Fêmeas Wistar (1,17±0,09 vs. 0,80±0,08 pg/ml, P<0,05).

A análise estatística do hormônio ocitocina mostrou efeito do dimorfismo [F(1,33)=6,000; P=0,0198], mas não mostrou efeito do linhagem [F(1,33)=0,1553; P=0,6960], e não houve interação entre os fatores (dimorfismo x linhagem) [F(1,33)=1,550; P=0,2219].

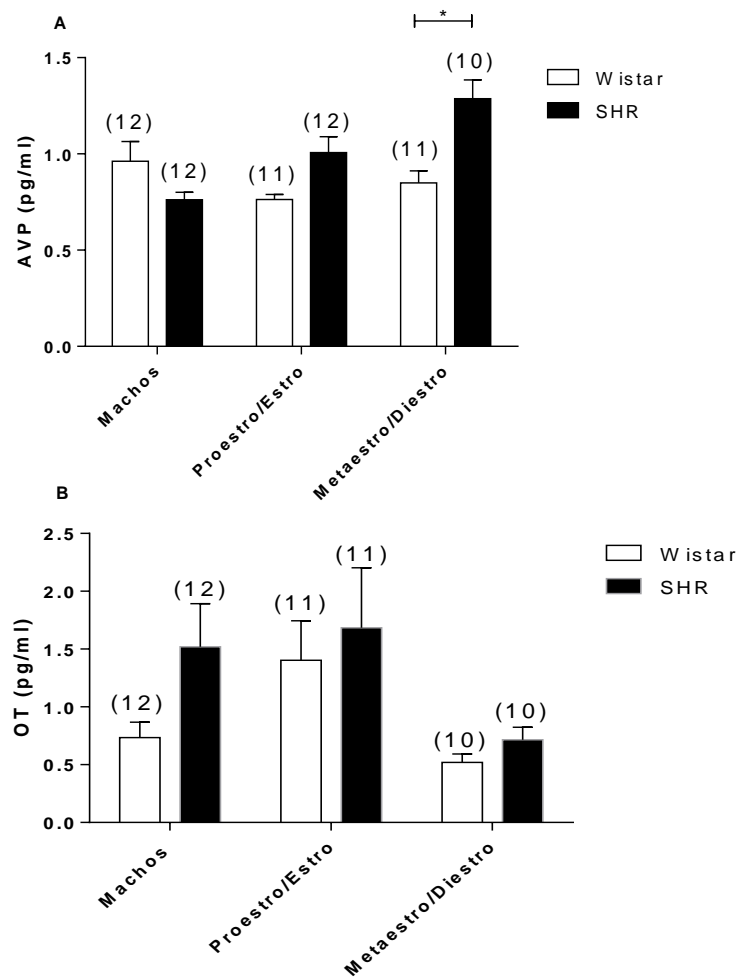
Na avaliação do hormônio ocitocina (Fig. 29B), comparando as duas linhagens, também observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Fêmeas SHR vs. Filhotes Fêmeas Wistar (1,04±0,16 vs. 3,15±0,7 pg/ml, P<0,05).



**Fig. 35-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) sob condições animais de 4 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Os gráficos A e B em conjunto mostram que as fêmeas SHR 4 semanas de idade apresentaram menor concentração de vasopressina plasmática, porém maior concentração de ocitocina plasmática em relação às fêmeas Wistar de 4 semanas de idade, enquanto que os machos SHR e Wistar filhotes apresentaram igual concentração de AVP e OT.

O objetivo da figura a seguir (Fig. 30) foi comparar as concentrações hormonais de vasopressina e ocitocina dos machos e das fêmeas adultos de 12 semanas de idade e linhagens diferentes. A análise estatística do hormônio vasopressina evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,61)=6,261$ ,  $P= 0,0150$ ], demonstrou efeito do dimorfismo [ $F(2,61) = 3,855$ ,  $P=0,0265$ ], e demonstrou interação entre os fatores [ $F(2,61)=9,176$ ,  $P=0,0003$ ].



**Fig. 36-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em SHR e Wistar adultos de 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Na avaliação do hormônio vasopressina (Fig. 30A), comparando as linhagens, não observamos diferenças significativas na comparação (i) Fêmeas SHR metaestro/diestro vs. Fêmeas Wistar metaestro/diestro ( $1,29 \pm 0,1$  vs.  $0,85 \pm 0,06$  pg/ml,  $P < 0,001$ ).

A análise estatística do hormônio ocitocina não mostrou efeito da linhagem [ $F(1,60) = 2,678$ ,  $P = 0,1050$ ], mas evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(2,60) = 4,152$ ,  $P = 0,0205$ ], e não evidenciou interação entre os fatores [ $F(2,60) = 0,5350$ ,  $P = 0,5884$ ].

Na avaliação do hormônio ocitocina (Fig. 30B), comparando as linhagens não observamos diferenças significativas entre os grupos estudados.

Os gráficos A e B em conjunto nos permitem concluir que a concentração plasmática de vasopressina variou em função da linhagem ao comparar na mesma fase do ciclo (metaestro/diestro) as fêmeas adultas, sendo que as fêmeas SHR apresentaram maior concentração plasmática deste hormônio. Em relação à concentração plasmática de ocitocina não houve nenhuma influencia da linhagem.

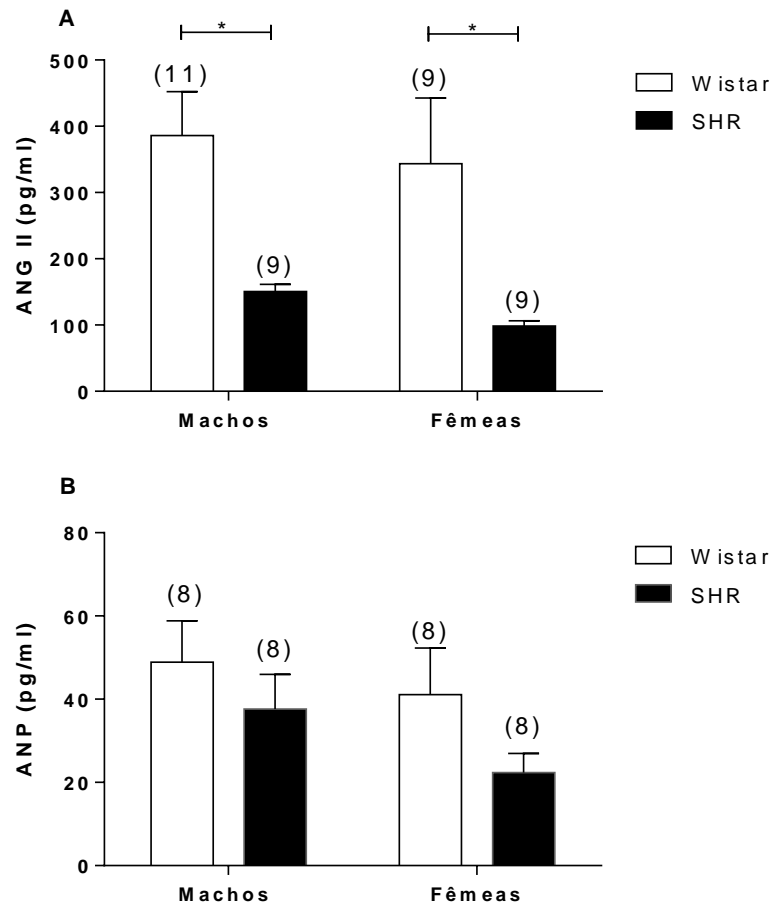
A seguir mostramos as concentrações hormonais de angiotensina 2 (ANG 2) e peptídeo natriurético atrial (ANP) nas 4 semanas de idade.

A análise estatística do hormônio angiotensina 2 (Fig.31) mostrou efeito da linhagem [F(1,34)=15,37, P=0,0004], mas não mostrou efeito do dimorfismo [F(1,34)=0,5918, P=0,4470], e não mostrou interação entre os fatores linhagem x dimorfismo [F(1,34)=0,006286, P=0,9373].

Na avaliação do hormônio ANG 2 (Fig. 31A), comparando as linhagens, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Fêmeas SHR vs. Filhotes Fêmeas Wistar (98,6±7,92 vs. 343,6±98,99 pg/ml, P<0,05) e na comparação (ii) Filhotes Machos SHR vs. Filhotes Machos Wistar (150,6±11,03 vs. 385,8±66,34 pg/ml, P<0,05).

A análise estatística do hormônio peptídeo natriurético atrial (Fig. 31B) não mostrou efeito do dimorfismo [F(1,28)=1,687; P=0,2046], não mostrou efeito da linhagem [F(1,28)=2,852; P=0,1024], e não houve interação entre os fatores (dimorfismo x linhagem) [F(1,28)=0,1765; P=0,6776].

Na avaliação do hormônio ANP, comparando as duas linhagens, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.



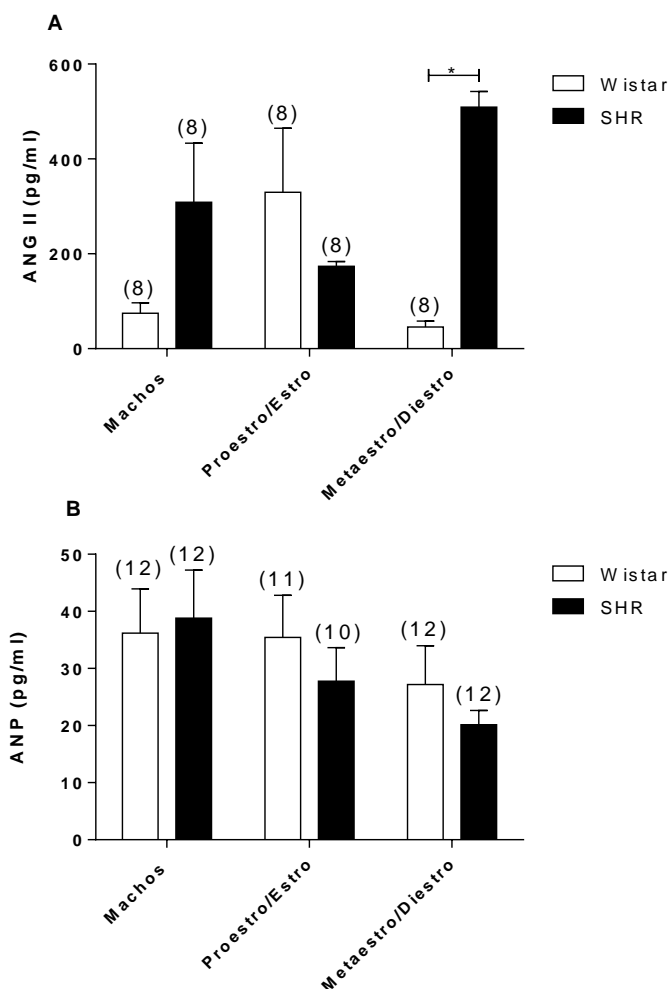
**Fig. 37-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) sob condições animais de 4 semanas de idade SHR e Wistar normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo

Os gráficos 31A e 31B em conjunto mostram que desde a idade de 4 semanas, uma fase de desenvolvimento da hipertensão, existem diferenças nas concentrações hormonais de angiotensina 2 devido à linhagem dos animais, sendo que os animais Wistar apresentaram maior concentração plasmática de angiotensina 2, independente do sexo dos animais, enquanto que a avaliação do ANP não foi influenciada pela diferença de linhagem.

**Avaliações das concentrações hormonais de ocitocina, vasopressina, angiotensina 2 e peptídeo natriurético atrial em animais da linhagem SHR e Wistar de 12 semanas de idade**

Comparamos a seguir as concentrações hormonais de angiotensina 2 e de peptídeo natriurético atrial na idade de 12 semanas em linhagens diferentes.

A análise estatística do hormônio angiotensina 2 (Fig. 32A) evidenciou efeito da linhagem [F(1,42)=8,279; P=0,0063], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(2,42)=0,6544; P=0,6544], e demonstrou interação entre os fatores [F(2,42)=8,289; P=0,0009].



**Fig. 38-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) peptídeo natriurético atrial (B) em SHR e Wistar adultos de 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Na avaliação do hormônio angiotensina 2 (Fig.32), comparando as linhagens, observamos diferenças significativas na comparação (i) Fêmeas SHR metaastro/diestro vs. Fêmeas Wistar metaastro/diestro ( $509,5 \pm 32,64$  vs.  $45,54 \pm 12,69$  pg/ml,  $P < 0,001$ ).

A análise estatística do hormônio peptídeo natriurético atrial (Fig. 32B) não mostrou efeito da linhagem [ $F(1,63)=0,5262$ ;  $P=0,4706$ ], não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(2,63)=2,197$ ;  $P=0,1196$ ], e não evidenciou interação entre os fatores [ $F(2,63) = 0,3667$ ;  $P=0,6945$ ].

Na avaliação do hormônio peptídeo natriurético atrial, comparando as linhagens não observamos diferenças significativas entre os grupos estudados.

Os gráficos 32A e 32B em conjunto nos permitem concluir que a concentração plasmática de angiotensina 2 variou em função da linhagem apenas em fêmeas na fase de metaastro/diestro. E a concentração plasmática de ANP não sofreu influência da linhagem dos animais.

### **Avaliações das concentrações hormonais de ocitocina, vasopressina, angiotensina 2 e peptídeo natriurético atrial em animais da linhagem SHR e Wistar em função das diferenças de idade**

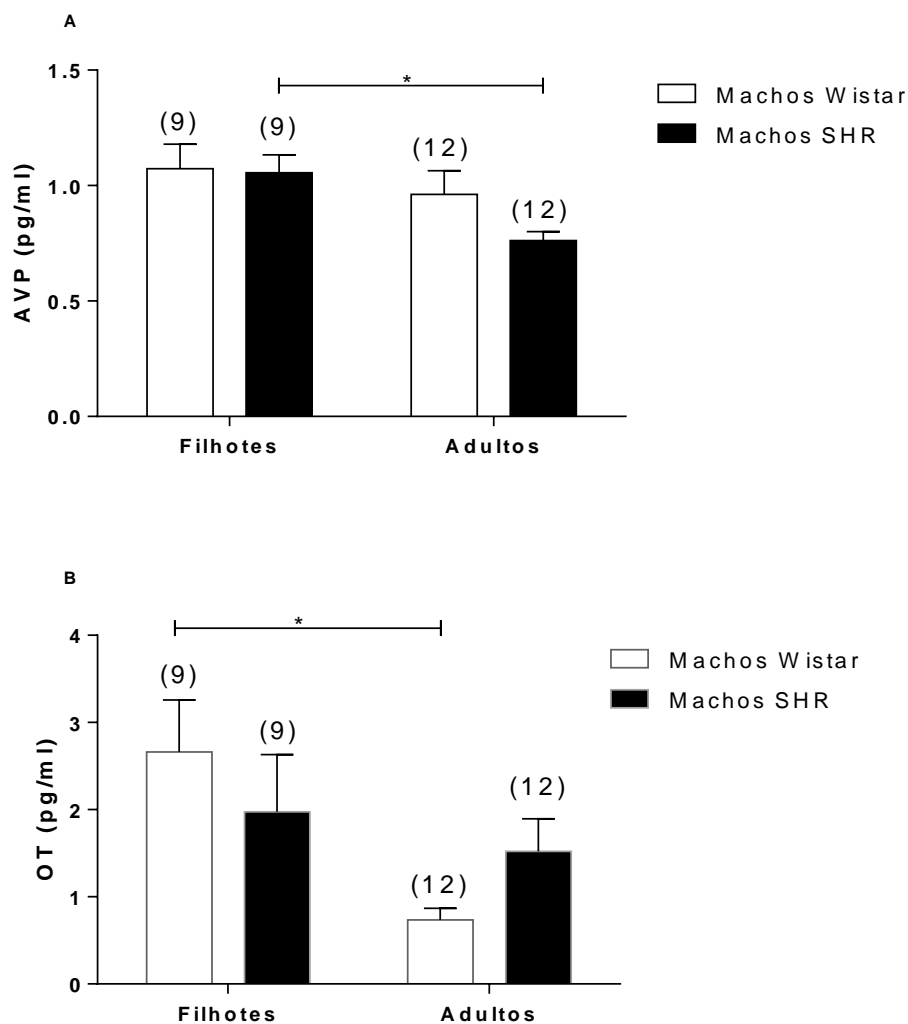
O objetivo da figura a seguir (Fig.33) foi comparar as concentrações hormonais de vasopressina e ocitocina em filhotes e adultos machos de uma mesma linhagem.

A análise estatística do hormônio vasopressina (Fig. 33A) não mostrou efeito da linhagem [ $F(1,38)=1,649$ ;  $P=0,2069$ ], mas demonstrou efeito da idade [ $F(1,38)= 5,683$ ;  $P=0,0222$ ], e não mostrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,38)=1,158$ ,  $P=0,2887$ ].

Na avaliação do hormônio vasopressina (Fig. 33A), comparando as idades, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Machos SHR vs. Adultos machos SHR ( $1,06 \pm 0,08$  vs.  $0,76 \pm 0,04$  pg/ml,  $P < 0,05$ ).

A análise estatística do hormônio ocitocina não mostrou efeito da linhagem [ $F(1,38)=0,01188$ ,  $P=0,9138$ ], mostrou efeito da idade [ $F(1,38)=7,134$ ,  $P=0,0111$ ], e não houve interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,38)=2,733$ ,  $P=0,1065$ ].

Na avaliação do hormônio ocitocina (Fig. 33B), comparando as duas idades observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Machos Wistar vs. Adultos Machos Wistar ( $2,66 \pm 0,6$  vs.  $0,73 \pm 0,13$  pg/ml,  $P < 0,01$ ).



**Fig. 39-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em machos de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado, \* $P < 0,05$ .

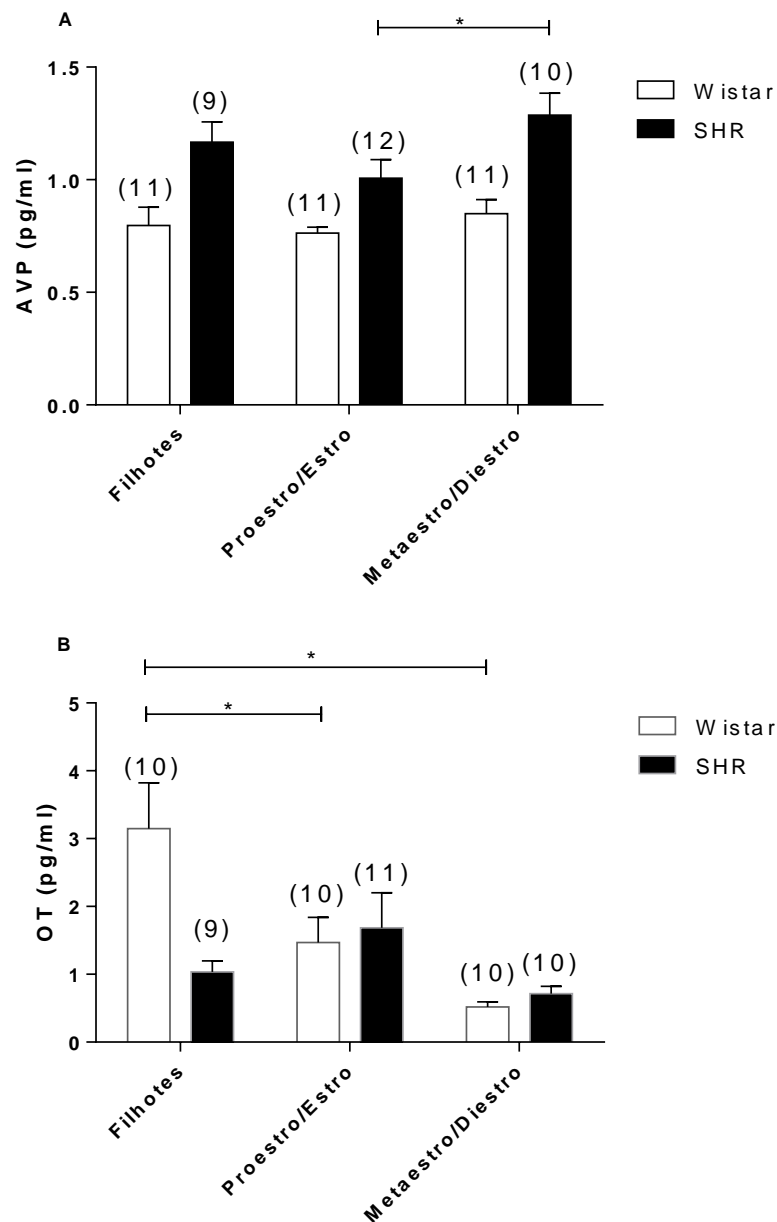
Os gráficos 33A e 33B em conjunto mostram que os machos SHR de 4 semanas de idade apresentaram maior concentração de vasopressina plasmática e igual concentração de ocitocina plasmática em relação aos machos SHR adultos. Os Machos Wistar



apresentaram igual concentração de vasopressina na idade de 4 semanas e na idade adulta, no entanto quando adultos os machos Wistar apresentaram menor concentração de ocitocina em relação à idade de 4 semanas.

O objetivo da figura a seguir (Fig.34) foi comparar as concentrações hormonais de vasopressina e ocitocina das fêmeas em função das idades em uma mesma linhagem.

A análise estatística do hormônio vasopressina (Fig. 34A) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,58)=31,92$ ,  $P<0,0001$ ], demonstrou uma tendência para o efeito da idade [ $F(2,58) =3,017$ ,  $P=0,0567$ ], e não houve interação entre os fatores [ $F(2,58)=0,8652$ ,  $P=0,4263$ ].



**Fig. 40-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Na avaliação do hormônio vasopressina, comparando as fases do ciclo estral, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Fêmeas SHR metaestro/diestro vs. Fêmeas SHR proestro/estro ( $1,29 \pm 0,1$  vs.  $1,01 \pm 0,08$  pg/ml,  $P < 0,05$ ). As comparações

entre as fêmeas Wistar adultas e filhotes não demonstraram diferenças estatísticas na análise da vasopressina.

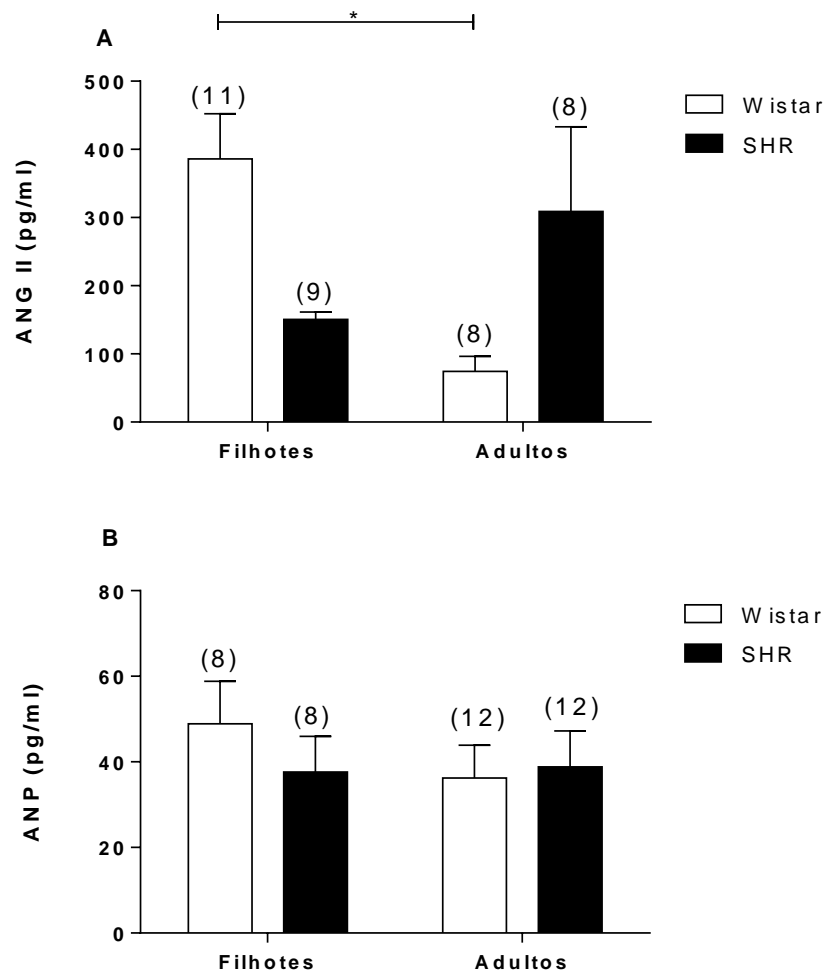
A análise estatística do hormônio ocitocina (Fig. 34B) mostrou efeito da linhagem [F(1,54)=3,010, P=0,0884], mostrou efeito da idade [F(2,54)=6,872, P=0,0022], e interação entre os fatores [F(2,54)=5,440, P=0,0070].

Na avaliação do hormônio ocitocina, comparando as duas idades observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Fêmeas Wistar vs. Fêmeas Wistar proestro/estro ( $3,15 \pm 0,67$  vs.  $1,4 \pm 0,34$  pg/ml,  $P < 0,05$ ) e (ii) Filhotes Fêmeas Wistar vs. Fêmeas Wistar metaestro/diestro ( $3,15 \pm 0,67$  vs.  $0,52 \pm 0,07$  pg/ml,  $P < 0,05$ ).

Os gráficos A e B em conjunto mostram que as fêmeas SHR apresentaram concentrações plasmáticas semelhantes de vasopressina e de ocitocina independentemente da idade dos animais. As fêmeas Wistar, quando filhotes, apresentaram maior concentração plasmática de ocitocina em relação à idade adulta, mas a concentração plasmática de vasopressina não variou com a idade. As fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro apresentaram maior concentração de vasopressina plasmática em relação à fase de proestro/estro e igual concentração de ocitocina plasmática em ambas as fases do ciclo estral.

O objetivo da figura a seguir (Fig. 35) foi comparar as concentrações hormonais de angiotensina 2 e de ANP em filhotes e adultos machos de uma mesma linhagem.

A análise estatística do hormônio angiotensina 2 (Fig.35A) não mostrou efeito da linhagem [F(1,32)=0,04703; P= 0,9946], não demonstrou efeito da idade [F(1,32)=1,195; P=0,2825], e mostrou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(1,32)=11,27, P=0,0020].



**Fig. 41-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) em machos de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicos e normohidratados. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Na avaliação do hormônio angiotensina 2, comparando as idades, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes Machos Wistar vs. Adultos Machos Wistar ( $385,8 \pm 66,34$  vs.  $74,58 \pm 21,96$  pg/ml,  $P < 0,01$ ).

A análise estatística do hormônio peptídeo natriurético atrial (Fig. 35B) não mostrou efeito da linhagem [ $F(1,36) = 0,2422$ ,  $P = 0,6256$ ], não mostrou efeito da idade [ $F(1,36) = 0,4282$ ,  $P = 0,5170$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,36) = 0,6233$ ,  $P = 0,4350$ ].

Na avaliação do hormônio peptídeo natriurético atrial, comparando as duas idades não observamos diferenças significativas entre os grupos.

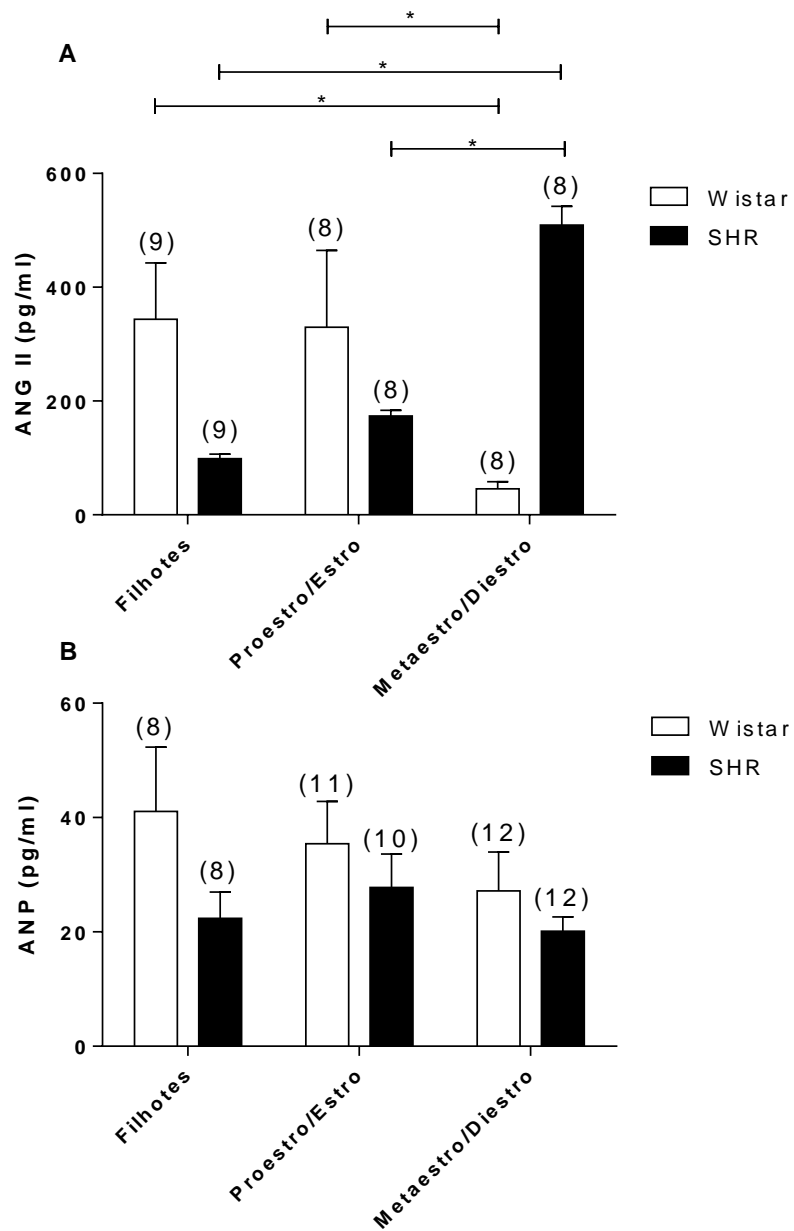
Os gráficos A e B em conjunto mostram que os filhotes machos Wistar apresentam concentrações plasmáticas de angiotensina 2 mais altas do que na idade adulta, enquanto que os filhotes machos SHR apresentaram iguais concentrações de ambos os hormônios independente da idade, no desenvolvimento da hipertensão e após o estabelecimento dessa condição.

A análise estatística do hormônio angiotensina 2 (Fig. 36A Comparação das concentrações hormonais de angiotensina 2 e de peptídeo natriurético atrial das fêmeas nas 4 semanas e 12 semanas de idade) não evidenciou efeito da linhagem [F(1,44)=0,1341; P=0,7160], não demonstrou efeito da idade [F(2,44)=0,3306; P=0,7203], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(2,44)=14,93; P<0,0001].

Na avaliação do hormônio angiotensina 2, comparando as idades na linhagem Wistar, observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Filhotes fêmeas Wistar vs. Fêmeas Wistar adultas metaestro/diestro (343,6±98,99 vs. 45,54±12,69 pg/ml, P<0,05) e (ii) Fêmeas Wistar adultas proestro/estro vs. Fêmeas Wistar adultas metaestro/diestro (329,8±135,2 vs. 45,54±12,69 pg/ml, P<0,05). E comparando as idades na linhagem SHR, observamos diferenças significativas entre os grupos: (iii) Filhotes fêmeas SHR vs. Fêmeas SHR adultas metaestro/diestro (98,58±7,92 vs. 509,5±32,64 pg/ml, P<0,001) e (iv) Fêmeas SHR adultas proestro/estro vs. Fêmeas SHR adultas metaestro/diestro (173,9±9,93 vs. 509,5±32,64 pg/ml, P<0,01).

A análise estatística do hormônio peptídeo natriurético atrial (Fig. 36B) mostrou efeito da linhagem [F(1,55)=4,170; P=0,0460], não mostrou efeito da idade [F(2,55)=1,060; P=0,3534], e não houve interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(2,55)=0,4359; P=0,6489].

Na avaliação do hormônio peptídeo natriurético atrial, comparando as duas idades não observamos diferenças significativas entre os grupos.

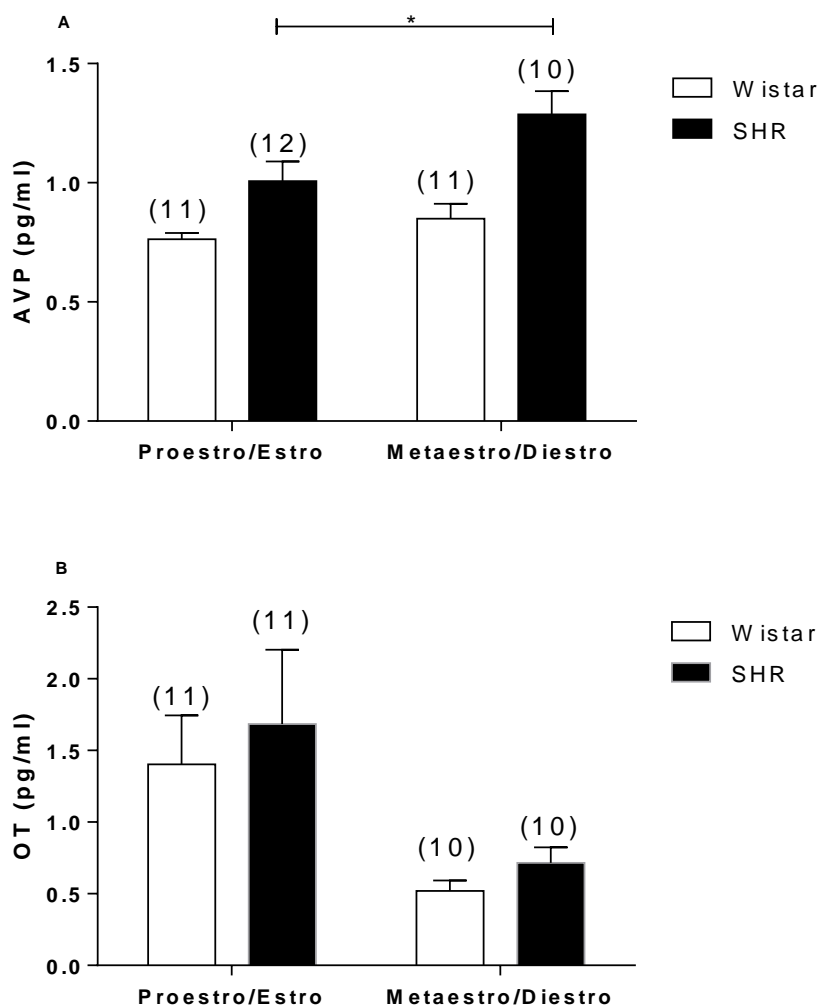


**Fig. 42-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) e peptídeo natriurético atrial (B) em fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Os gráficos 36A e 36B em conjunto mostram que as concentrações de angiotensina 2 no plasma sofrem influência da idade em ambas as linhagens. Já a concentração plasmática do peptídeo natriurético atrial não sofreu influência da idade independente da linhagem dos animais.

**Avaliações das concentrações hormonais de ocitocina, vasopressina, angiotensina 2 e peptídeo natriurético atrial em animais da linhagem SHR e Wistar em função das fases do ciclo estral**

O objetivo da figura a seguir (Fig.37) foram avaliadas as concentrações hormonais, comparando as diferentes fases do ciclo estral e uma mesma linhagem para observar se haveria diferença nos níveis plasmáticos de vasopressina ou ocitocina em função das diferentes fases do ciclo estral.



**Fig. 43-** Concentrações hormonais de vasopressina (A) e ocitocina (B) em fêmeas adultas da linhagem SHR em relação às Fêmeas Wistar adultas normovolêmicas e normohidratadas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

A análise estatística do hormônio vasopressina (Fig. 37A) evidenciou efeito da linhagem [F(1,40)=22,94, P<0,0001], demonstrou efeito da fase do ciclo estral [F(1,40)=6,630, P= 0,0138], e não demonstrou interação entre os fatores [F(1,40)=1,837, P=0,1830].

Na avaliação do hormônio vasopressina, comparando as fêmeas adultas, observamos diferenças significativas na comparação (i) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas SHR metaestro/diestro (1,01±0,08 vs. 1,29±0,1 pg/ml, P<0,05).

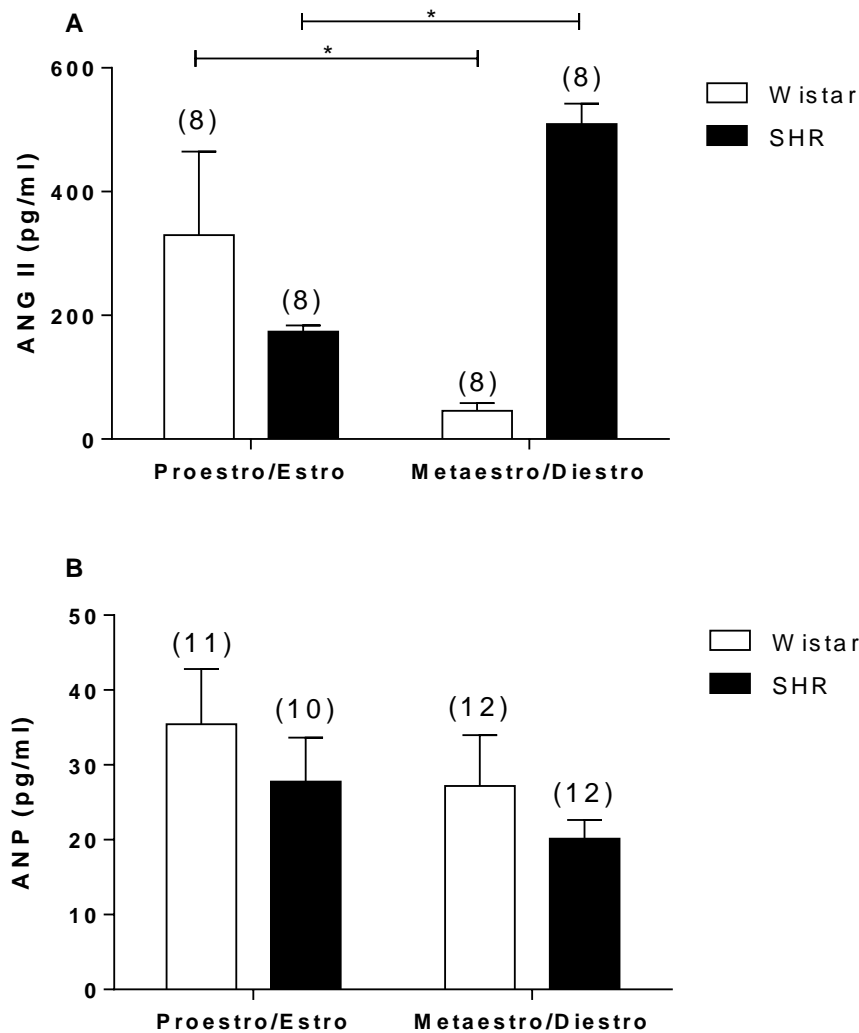
A análise estatística do hormônio ocitocina (Fig. 37B) não evidenciou efeito da linhagem [F(1,38)=0,5083, P=0,4802], demonstrou efeito da fase do ciclo estral [F(1,38)=7,718, P=0,0084], e não demonstrou interação entre os fatores [F(1,38)=0,01655, P=0,8983]. Na comparação das médias das concentrações de ocitocina plasmática não observamos diferenças significativas entre os grupos.

Os gráficos A e B em conjunto nos permitem concluir que a concentração plasmática de vasopressina variou em função da fase do ciclo estral apenas nas fêmeas da linhagem SHR, enquanto que a concentração plasmática de ocitocina não variou em função da fase do ciclo estral, independente da linhagem.

O objetivo da figura a seguir (Fig.38) foi avaliar as concentrações hormonais, comparando as diferentes fases do ciclo estral e uma mesma linhagem para observar se haveria diferença nos níveis plasmáticos de angiotensina 2 ou peptídeo natriurético atrial em função das diferentes fases do ciclo estral.

A análise estatística do hormônio angiotensina 2 (Fig. 38A) evidenciou efeito da linhagem [F(1,28)=4,843; P=0,0362], não demonstrou efeito da fase do ciclo estral [F(1,28)=0,1341; P=0,7170], e demonstrou interação entre os fatores [F(1,28)=19,60, P=0,0001].





**Fig. 44-** Concentrações hormonais de angiotensina 2 (A) peptídeo natriurético atrial (B) em fêmeas adultas da linhagem SHR em relação às Fêmeas Wistar adultas. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Na avaliação do hormônio angiotensina 2, comparando as fêmeas adultas, observamos diferenças significativas nas comparações (i) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas SHR metaestro/diestro ( $173,9 \pm 9,93$  vs.  $509,5 \pm 32,64$  pg/ml,  $P < 0,01$ ) e (ii) Fêmeas Wistar proestro/estro vs. Fêmeas Wistar metaestro/diestro ( $329,8 \pm 135,2$  vs.  $45,54 \pm 12,69$  pg/ml,  $P < 0,05$ ).

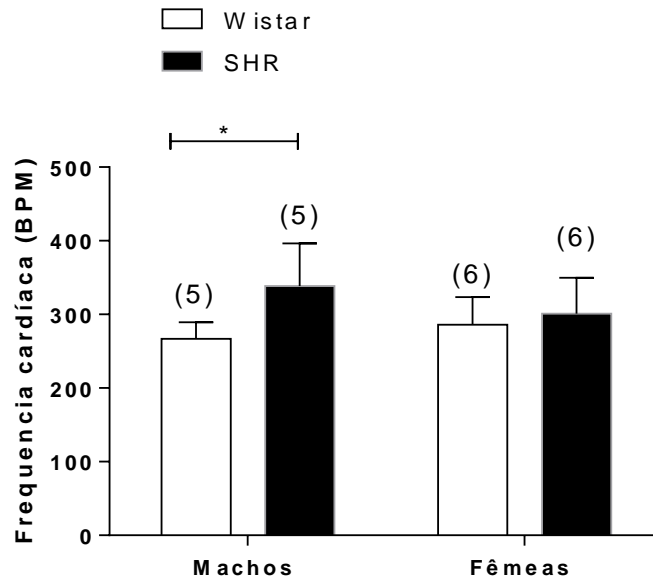
A análise estatística do hormônio peptídeo natriurético atrial (Fig. 38B) não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,41)=1,546$ ;  $P=0,2207$ ], não demonstrou efeito da fase do ciclo estral [ $F(1,41)=1,816$ ,  $P=0,1852$ ], e não demonstrou interação entre os fatores [ $F(1,41)=0,002838$ ,  $P=0,9578$ ]. Na comparação das médias das concentrações de peptídeo natriurético atrial não observamos diferenças significativas entre os grupos.

Os gráficos 38A e 38B em conjunto nos permitem concluir que a angiotensina 2 e de peptídeo natriurético atrial não são influenciados pela fase do ciclo estral e que as concentrações hormonais de angiotensina 2 são influenciadas pela linhagem dos animais, sendo que a linhagem SHR apresentou maior concentração de ANG 2 no metaestro/diestro, enquanto que a linhagem Wistar apresentou maior concentração deste hormônio no proestro/estro. A concentração plasmática de ANP, quando em condições fisiológicas, não é modificada pela hipertensão nas fêmeas.

### **Experimento 3 – Avaliações da pressão sistólica em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

Nesta análise, os experimentos de avaliação de pressão foram realizados separadamente em relação ao experimento de gaiolas metabólicas. A seguir mostramos o acompanhamento diário da pressão arterial em animais de 4 semanas de idade. Considerarmos nesta análise apenas os animais adaptados no teste, o que foi observado pelo comportamento do animal durante o teste e pela frequência cardíaca.

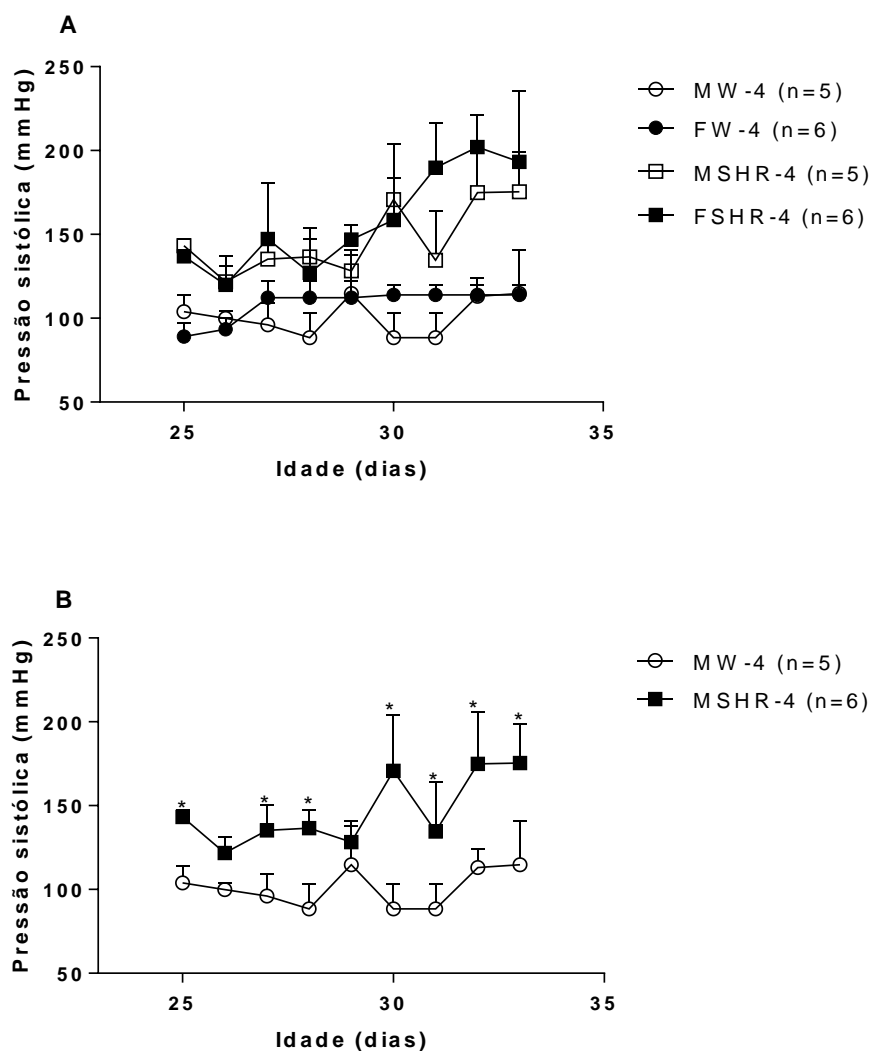
**Avaliações da pressão sistólica em animais da linhagem SHR e Wistar de 4 semanas de idade**



**Fig. 45**– Avaliação da frequência cardíaca em machos e em fêmeas SHR e Wistar durante a semana de avaliações com 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados, considerando apenas os animais adaptados ao teste. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

A análise estatística da frequência cardíaca em machos e em fêmeas de 4 semanas de idade (Fig. 39) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,16)=4,875$ ;  $P=0,0422$ ], não demonstrou efeito da dimorfismo [ $F(1,16)=0,2127$ ,  $P=0,6508$ ], e não demonstrou interação entre os fatores [ $F(1,16)=2,076$ ,  $P=0,1689$ ].

A frequência cardíaca nos machos SHR de 4 semanas de idade foi maior do que nos machos da linhagem Wistar ( $338,4 \pm 58,18$  vs.  $267,04 \pm 22,43$  batimentos por minuto (BPM),  $P < 0,05$ ). Ao comparar as fêmeas não foram verificadas diferenças. Machos e fêmeas não foram diferentes entre si na avaliação da frequência cardíaca.



**Fig. 46**– Avaliação diária da pressão arterial sistólica em machos SHR e Wistar de 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados.(A) Insert gráfico em tamanho aumentado: avaliação das diferenças entre machos e fêmeas e (B) avaliação da pressão sistólica entre as linhagens. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

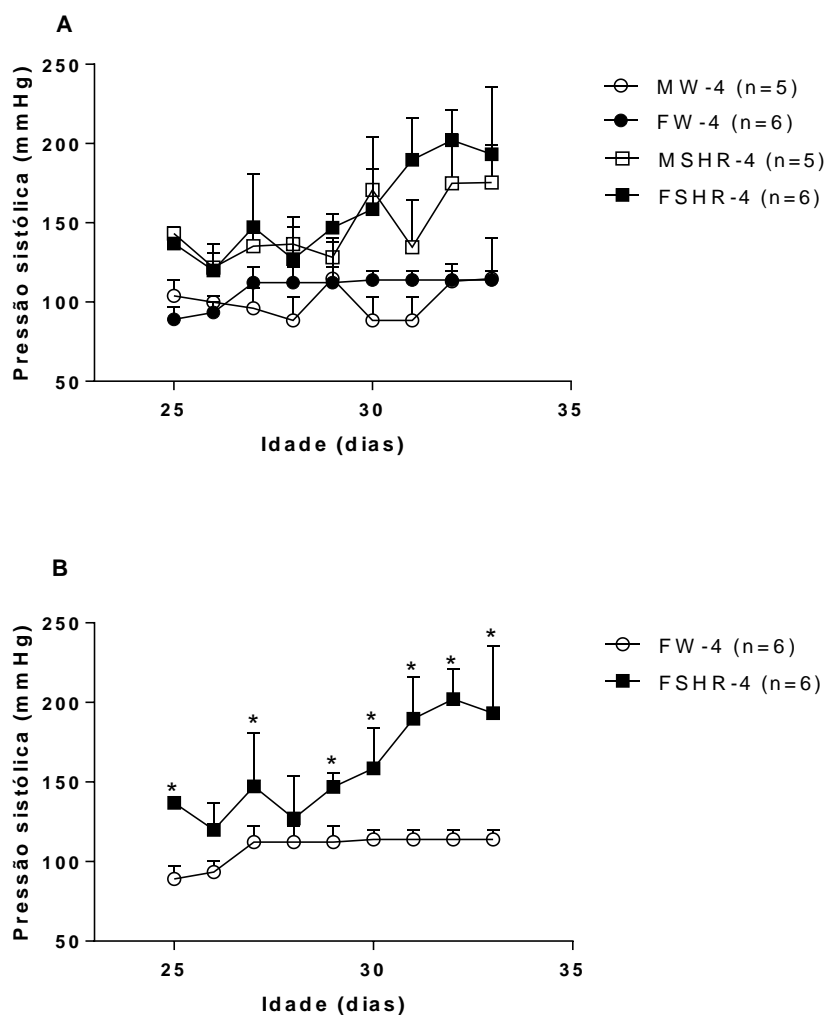
A análise estatística da pressão arterial sistólica em machos e fêmeas de 4 semanas de idade (Fig. 40A) evidenciou efeito da dimorfismo [ $F(3,162)=111,9$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(8,162)=12,88$ ,  $P < 0,0001$ ], e demonstrou interação entre os fatores [ $F(24,162)=3,952$ ,  $P < 0,0001$ ].

A análise estatística da pressão arterial sistólica em machos (Fig. 40B) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,72)=132,3$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade

[F(8,72)=4,934, P<0,0001], e demonstrou interação entre os fatores [F(8,72)=3,080, P=0,0048].

Foram observadas diferenças significativas aos 25 dias na pressão sistólica dos machos SHR em comparação aos machos Wistar (143,33±4,05 vs. 103,93±10,10 mmHg, P<0,05); aos 27 dias (135,2±15,16 vs. 96,07±13,08 mmHg, P<0,05); aos 28 dias (136,67±10,77 vs. 88,4±15,07 mmHg, P<0,01); aos 29 dias (128,2±9,45 vs. 114,8±25,72 mmHg, P<0,0001), aos 31 dias (134,6±29,55 vs. 88,4±15,07 mmHg, P<0,05), aos 32 dias (174,9±30,91 vs. 113,07±11,21 mmHg, P<0,001) e 33 dias de idade (175,4±23,45 vs. 114,8 ±25,72 mmHg, P<0,001).

Observamos que a pressão sistólica dos machos SHR é mais elevada do que na linhagem Wistar nas 4 semanas de idade.



**Fig. 47**– Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas de idade normonatremicos e normohidratados. (A) Insert gráfico em tamanho aumentado: avaliação das diferenças entre machos e fêmeas e (B) avaliação da pressão arterial sistólica entre as linhagens. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado, \* $P < 0,05$ .

A análise estatística da pressão arterial sistólica em machos e fêmeas (Fig. 43A) evidenciou efeito da dimorfismo [ $F(3,162)=111,9$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(8,162)=12,88$ ,  $P < 0,0001$ ], e demonstrou interação entre os fatores [ $F(24,162)=3,952$ ,  $P < 0,0001$ ].

A análise estatística da pressão arterial sistólica em fêmeas de semana de idade (Fig. 43B) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,90)=191,7$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito

da idade [F(8,90)=11,73, P<0,0001], demonstrou interação entre os fatores [F(8,90)=5,700, P<0,0001].

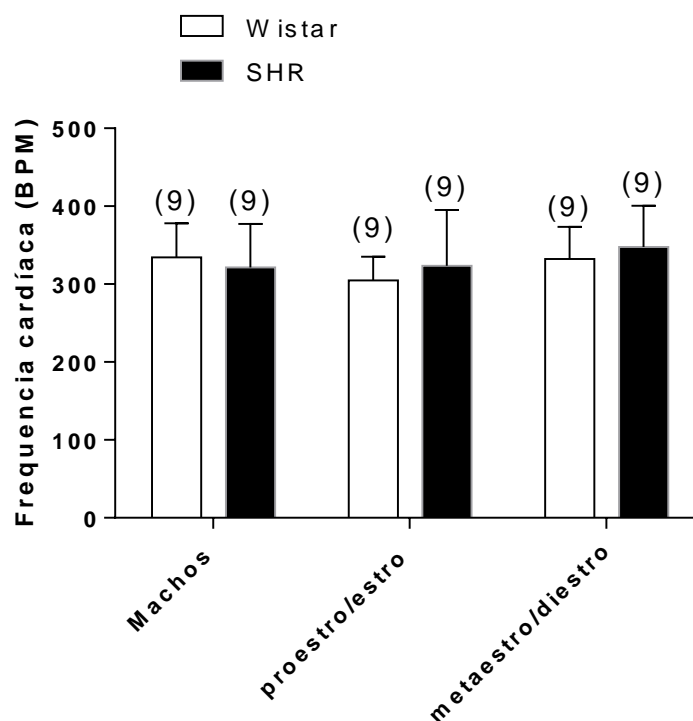
Observamos que houve diferenças significativas na pressão arterial média ao comparar as fêmeas SHR e as fêmeas Wistar aos 25 dias (136,83±2,47 vs. 89,17±7,74 mmHg, P<0,05); aos 27 dias de idade (147,22±33,44 vs. 112,28±10,21 mmHg, P<0,05); aos 29 dias de idade (146,89±8,73 vs. 112,28±10,21 mmHg, P<0,05); aos 30 dias de idade (158,5±25,33 vs. 113,94±5,56 mmHg, P<0,05); aos 31 dias de idade (189,72±26,53 vs. 113,94±5,56 mmHg, P<0,05); aos 32 dias de idade (202,17±18,88 vs. 113,94±5,56 mmHg, P<0,05) e aos 33 dias de idade (193,28±42,49 vs. 113,94±5,56 mmHg, P<0,05).

Observamos que a pressão sistólica das fêmeas SHR com 4 semanas de idade que é mais elevada em relação às fêmeas SHR.

### **Avaliações da pressão sistólica em animais da linhagem SHR e Wistar em função das diferenças de idade**

Analisamos a frequência cardíaca dos animais adultos, considerando apenas os animais treinados, análise estatística da pressão arterial média em machos e em fêmeas (Fig. 46) evidenciou não efeito do dimorfismo [F(2,48)=1,136; P=0,3295], não demonstrou efeito da linhagem [F(1,48)=0,2652, P=0,3295], e não demonstrou interação entre os fatores [F(2,48)=0,5260, P=0,5943].

Não observamos diferenças significativas entre os grupos, porém a frequência cardíaca observada estava próxima aos valores basais.

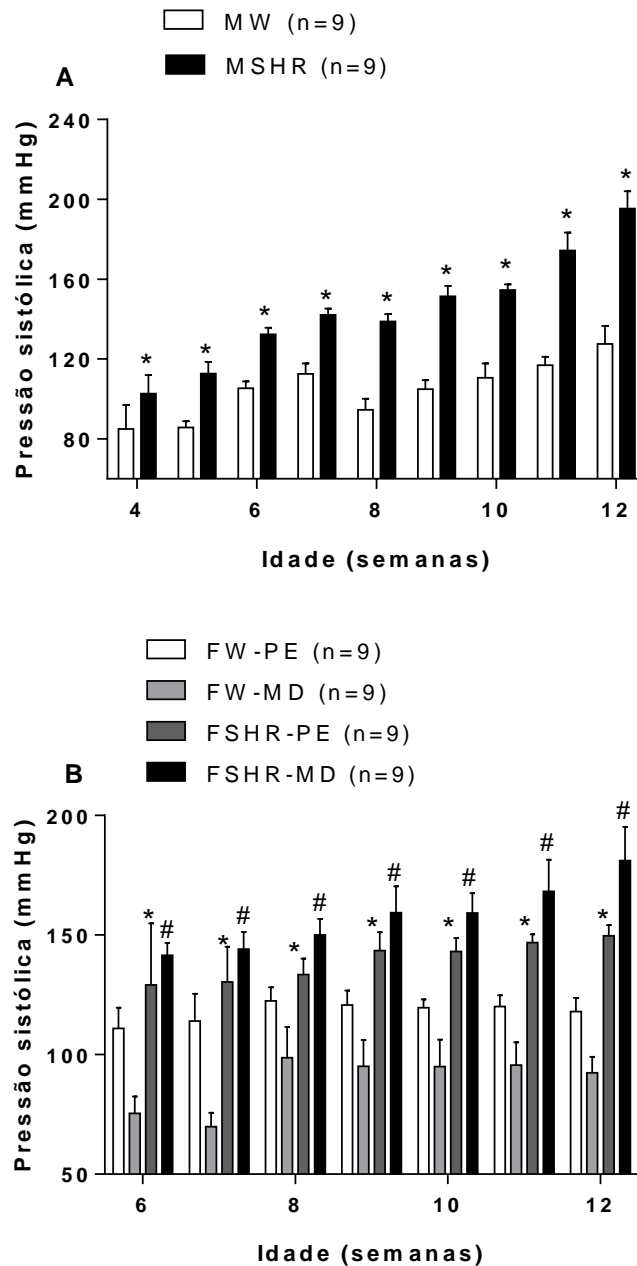


**Fig. 48**– Avaliação da frequência cardíaca em machos e em fêmeas SHR e Wistar da semana de avaliações com 12 semanas de idade normonatremicos e normohidratados, considerando apenas os animais adaptados ao teste. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0.05$ .

A seguir mostramos o acompanhamento semanal da pressão arterial em animais SHR e Wistar da 4ª semana até 12ª semana de idade, incluindo nas análises apenas os animais treinados no teste.

Para que fosse possível agrupar os dados, as fêmeas foram analisadas a partir da 6ª semana, considerando o período no qual o ciclo estral regular foi estabelecido.





**Fig. 49**– Avaliação semanal da pressão arterial sistólica em animais SHR e Wistar machos (A) e fêmeas (B) da 4ª semana até a 12ª semana de idade normonatremicos e normohidratados. Dados apresentados como média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni, \*P<0,05 para as diferenças de linhagem e #P<0,05 para as diferenças entre as fases do ciclo estral.

A análise estatística da pressão sistólica em machos de 12 semanas de idade (Fig. 47A) evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,144)=1598$ ;  $P<0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(8,144)=196,8$ ,  $P<0,0001$ ], e demonstrou interação entre os fatores [ $F(8,144)=29,07$ ,  $P<0,0001$ ].

Observamos que houve diferenças significativas na pressão sistólica ao comparar aos machos SHR com os machos Wistar 10<sup>a</sup> semana ( $154,56\pm 2,92$  vs.  $110,67\pm 7,11$ ) mmHg,  $P<0,05$ , 11<sup>a</sup> semana ( $174,44\pm 8,92$  vs.  $116,89\pm 4,2$  mmHg,  $P<0,05$ ) e 12<sup>a</sup> semana ( $195,44\pm 8,7$  vs.  $127,56\pm 8,96$  mmHg,  $P<0,05$ ).

A análise estatística da pressão sistólica em fêmeas de 12 semanas de idade (Fig. 47B) evidenciou efeito da linhagem [ $F(3,224)=569,9$ ;  $P<0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(6,224)=26,23$ ,  $P<0,001$ ], e demonstrou interação entre os fatores [ $F(18,224)=3,935$ ,  $P<0,0001$ ].

Observamos que houve diferenças significativas na pressão sistólica ao comparar a linhagem dos animais. As fêmeas SHR proestro/estro com as fêmeas Wistar proestro/estro na 10<sup>a</sup> semana apresentaram aumento da pressão diastólica ( $143,11\pm 5,55$  vs.  $119,56\pm 3,47$  mmHg,  $P<0,05$ ), as fêmeas SHR metaestro/diestro com as fêmeas Wistar metaestro/diestro na 11<sup>a</sup> semana ( $168,2\pm 13,3$  vs.  $95,57\pm 9,53$  mmHg,  $P<0,05$ ) e as fêmeas SHR metaestro/diestro com as fêmeas Wistar metaestro/diestro 12<sup>a</sup> semana ( $92,44\pm 6,62$  vs.  $118,0\pm 5,7$  mmHg,  $P<0,05$ ).

Considerando a fase do ciclo estral, foram observadas diferenças na pressão sistólica ao comparar as fêmeas SHR metaestro/diestro com as fêmeas SHR proestro/estro na 10<sup>a</sup> semana ( $159,22\pm 8,3$  vs.  $143,11\pm 5,55$  mmHg,  $P<0,05$ ), 11<sup>a</sup> semana ( $168,22\pm 13,33$  vs.  $146,89\pm 3,41$  mmHg,  $P<0,05$ ) e 12<sup>a</sup> semana ( $181,11\pm 14,07$  vs.  $149,67\pm 4,53$  mmHg,  $P<0,05$ ).

Com esses resultados verificamos que machos e fêmeas SHR apresentaram elevação pressão sistólica com o avanço da idade. Na fase do metaestro das fêmeas SHR foi observado aumento na pressão sistólica. As fêmeas da linhagem Wistar na fase de metaestro também apresentaram aumento da pressão sistólica.

#### **Experimento 4 – Avaliação do estoque tecidual de sódio na pele em animais machos e fêmeas das linhagens Wistar e SHR com 4 semanas e 12 semanas de idade.**

O experimento 4 foi executado simultaneamente ao experimento 2. Nesta etapa, o objetivo foi de mostrar o status fisiológico da reserva de sódio armazenada na pele.

#### **Tabelas de avaliações do conteúdo de Na<sup>+</sup> e água da pele em cada comparação do estudo**

A primeira etapa de demonstração dos dados consiste na apresentação de tabelas que possuem a função de apresentar os valores delta ( $\Delta$ ) específicos de cada comparação. Os valores delta (variação) de água relativa da pele e da razão Na<sup>+</sup>/água da pele foram obtidos a partir das diferenças entre as médias de água relativa da pele e de razão Na<sup>+</sup>/água da pele, sendo mostrados os valores relativos nas comparações de cada grupo do estudo (Tabelas 3 a 23-valores relativos). A obtenção do valor delta é parte do resultado do experimento.

Os valores relativos, uma vez obtidos foram utilizados numa nova análise, na qual a variação de água relativa da pele compõe a fórmula de sódio osmoticamente ativo acumulado e a variação da razão Na<sup>+</sup>/água da pele compõe a fórmula de sódio osmoticamente inativo acumulado.

**Avaliações dos valores relativos de água e de sódio da pele em função das diferenças entre as linhagens nos animais**

**Tabela 3:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MW-4 (n=12)	MHR-4 (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,70±0,015	0,69±0,007	0,01
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	0,14±0,025	0,08±0,006	0,06

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 4:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-4 (n=10)	FHR-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,7±0,015	0,69±0,006	0,01
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	0,18±0,020	0,096±0,009	0,08

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 5:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos com 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MSHR-12 (n=12)	MW-12 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,01	0,6±0,02	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,3±0,27	4,02±0,24	0,28

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 6:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas em proestro/estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-12-PE (n=12)	FSHR-12-PE (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,02	0,7±0,03	0,1
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	5,02±0,38	3,64±0,22	1,38

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 7:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas em metaestro/diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Varição
	FW-12-MD (n=12)	FSHR-12-MD (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,60±0,03	0,68±0,04	0,08
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	3,9±0,16	3,41±0,35	0,49

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Avaliações dos valores relativos de água e de sódio da pele em função das diferenças entre machos e fêmeas**

**Tabela 8:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em animais machos e fêmeas Wistar com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Varição
	FW-4 (n=10)	MW-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,70±0,015	0,70±0,015	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	0,18±0,02	0,14±0,025	0,04

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 9:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas SHR com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FSHR-4 (n=10)	MSHR-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,69±0,006	0,69±0,007	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	0,096±0,009	0,08±0,006	0,016

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 10:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas Wistar em proestro ou estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-12-PE (n=12)	MW-12 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,02	0,6±0,02	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	5,02±0,38	4,02±0,24	1,0

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 11:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e fêmeas Wistar em metaestro ou diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MW-12 (n=10)	FW-12-MD (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,02	0,6±0,03	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,02±0,24	3,9±0,16	0,12

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 12:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e em fêmeas SHR em proestro ou estro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MSHR-12 (n=12)	FSHR-12-PE (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,01	0,7±0,03	0,1
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,3±0,27	3,64±0,22	0,66

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.



**Tabela 13:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos e em fêmeas SHR em metaestro ou diestro nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MSHR-12 (n=12)	FSHR-12-MD (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,01	0,68±0,04	0,08
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,3±0,27	3,41±0,35	0,89

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Avaliações dos valores relativos de água e de sódio da pele em função das diferenças em função da fase do ciclo estral**

**Tabela 14:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas Wistar em função da fase do ciclo estral nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-12-PE (n=12)	FW-12-MD (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,02	0,6±0,03	0
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	5,02±0,38	3,9±0,16	1,12

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 15:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas SHR em função da fase do ciclo estral nas 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FSHR-12-PE (n=12)	FSHR-12-MD (n=12)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,7±0,03	0,68±0,04	0,02
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	3,64±0,22	3,41±0,35	0,23

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Avaliações dos valores relativos de água e de sódio da pele em função das diferenças entre as idades de animais Wistar e SHR**

**Tabela 16:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos Wistar de 12 semanas e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MW-12 (n=10)	MW-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,02	0,7±0,015	0,1
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,02±0,24	0,14±0,025	3,88

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 17:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em machos SHR de 12 semanas e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	MSHR-12 (n=12)	MSHR-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,01	0,69±0,007	0,09
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,3±0,27	0,08±0,006	4,22

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 18:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele em fêmeas SHR de 12 semanas de idade em proestro ou estro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FSHR-12-PE (n=12)	FSHR-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,7±0,03	0,69±0,06	0,01
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	3,64±0,22	0,096±0,009	3,54

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 19:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele nas fêmeas SHR de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FSHR-12-MD (n=12)	FSHR-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,68±0,04	0,69±0,006	0,01
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	3,41±0,35	0,096±0,009	3,31

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 20:** Avaliações de valores relativos de água e sódio da pele nas fêmeas Wistar de 12 semanas de idade em proestro ou estro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-12-PE (n=12)	FW-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,002	0,7±0,015	0,1
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	5,02±0,38	0,18±0,02	4,84

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

**Tabela 21:** Avaliações de valores relativos de água e sódio nas fêmeas Wistar de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro e 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

	Grupos		Variação
	FW-12-MD (n=12)	FW-4 (n=10)	$\Delta$
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6±0,003	0,7±0,015	0,1
R <sub>(SKNa+/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	3,9±0,16	0,18±0,02	3,72

Valores apresentados como média(DP). rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa+/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele.

A seguir apresentamos os demais parâmetros quantificados na pele dos animais espontaneamente hipertensos e normotensos em 4 semanas e 12 semanas de idade.

**Tabela 22:** Parâmetros avaliados na pele de animais com 4 semanas de idade em condições fisiológicas.

Parâmetros	Grupos				Estatística		
	MW-4 (n=12)	MHR-4 (n=12)	FW-4 (n=12)	FHR-4 (n=12)	Efeito da linhagem	Efeito do dimorfismo	Interação
SWW, g	3,3 ± 0,47	4,1 ± 0,27	2,0 ± 0,14	3,3 ± 0,44	F(1,44)=8,899 P=0,0046	F(1,44)=8,218 P=0,0063	F(1,44)=0,6176 P=0,4361
DW, g	1,00 ± 0,17	1,28 ± 0,11	0,59 ± 0,05(a)	1,184 ± 0,15	F(1,44)= 11,08 P=0,0018	F(1,44)=3,733 P=0,0603	F(1,44)=1,516; P=0,2252
SKW, mL	2,30 ± 0,32(b)	2,82 ± 0,16	1,4 ± 0,11(a)	2,51 ± 0,22	F(1,44)=14,30 P=0,0005	F(1,44)=7,642 P=0,0083	F(1,44)=2,003 P=0,1640
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,70 ± 0,015	0,69 ± 0,007	0,7 ± 0,015	0,69 ± 0,006	F(1,44)=0,8885 P=0,3510	F(1,44)=0,03005 P=0,8632	F(1,44)=0,008834 P=0,9255
R <sub>(SKNa<sup>+</sup>/SKW)</sub> , [mmol Na <sup>+</sup> (mLSKW) <sup>-1</sup> ]	0,14 ± 0,025	0,08 ± 0,006	0,18 ± 0,020 (a)	0,096 ± 0,009	F(1,44)=18,37 P<0,0001	F(1,44)=3,285 P=0,0768	F(1,44)=0,5555 P=0,4601
SKNa <sup>+</sup> , (mmol) mL <sup>-1</sup>	0,95 ± 0,05	0,85 ± 0,04	1,01 ± 0,04	0,87 ± 0,03	F(1,44)=9,724 P=0,0032	F(1,44)=0,4740 P=0,4948	F(1,44)=0,2772 P=0,6012
rSKNa <sup>+</sup> , [mmol Na <sup>+</sup> (g DW) <sup>-1</sup> ]	1,4 ± 0,29	0,71 ± 0,06	1,91 ± 0,21(a)	0,85 ± 0,12	F(1,44)=22,97 P<0,0001	F(1,44)=3,169 P=0,0820	F(1,44)=1,088 P=0,3026
[Na <sup>+</sup> ] <sub>plasma</sub> , (mEq) L <sup>-1</sup>	0,136 ± 0,001	0,138 ± 0,001	0,133 ± 0,001	0,138 ± 0,001	F(1,44)=6,881 P=0,0127	F(1,44)=0,06689 P=0,7974	F(1,44)=0,01229 P=0,9124

Valores apresentados como média(DP) e analisados por Anova de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni. SWW, peso úmido da pele; DW, peso seco da pele; SKW, água total da pele; rSKW, água relativa da pele; R<sub>(SKNa<sup>+</sup>/SKW)</sub>, razão sódio/água da pele; SKNa<sup>+</sup>, sódio total da pele; rSKNa<sup>+</sup>, sódio relativo da pele; [Na<sup>+</sup>]<sub>plasma</sub>, concentração plasmática de sódio. (a) FSHR vs. FW, (b) FW vs. MW, P<0,05.

Tabela 23: Parâmetros avaliados na pele em animais SHR e Wistar com 12 semanas de idade em condições fisiológicas.

Parâmetros	Wistar						SHR		Estatística	
	MW-12 (n=10)	FW-12-PE (n=12)	FW-12-MD (n=12)	MSEH-12 (n=12)	FSEH-12-PE (n=12)	FSEH-MD-12 (n=12)	Efeito do dimorfismo	Efeito da linhagem	Interação	
SWW, g	6,3 ± 0,22	5,88 ± 0,17	5,97 ± 0,24	5,8 ± 0,24	5,4 ± 0,31	5,82 ± 0,25	F(2,64)=2,411 P=0,0978	F(1,64)=3,945 P=0,0513	F(2,64)=0,4225 P=0,6572	
DW, g	2,50 ± 0,05	2,20 ± 0,16	2,38 ± 0,22	2,05 ± 0,27	1,73 ± 0,24	1,94 ± 0,30	F(2,64)=1,773 P=0,1780	F(1,64)=4,435 P=0,0391	F(2,64)=0,02259 P=0,9777	
SKW, mL	3,7 ± 0,25	3,67 ± 0,08	3,6 ± 0,15	3,79 ± 0,21	3,68 ± 0,14	3,88 ± 0,18	F(1,42)=0,3616 P=0,5508	F(1,42)=0,6510 P=0,4243	F(1,42)=0,3625 P=0,5504	
rSKW, [mL H <sub>2</sub> O (g SWW) <sup>-1</sup> ]	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,6 ± 0,01	0,7 ± 0,03	0,68 ± 0,04	F(2,64)=1,322 P=0,2738	F(1,64)=3,825 P=0,0549	F(2,64)=0,1107 P=0,8954	
R <sub>relativa</sub> SKW, [mmol Na <sup>+</sup> (mL SKW) <sup>-1</sup> ]	4,02 ± 0,24	5,02 ± 0,38(b)	3,9 ± 0,16	4,3 ± 0,27	3,64 ± 0,22	3,41 ± 0,35	F(1,42)=0,1400 P=0,7102	F(1,42)=4,381 P=0,0424	F(1,42)=9,922 P=0,0030	
SKNa <sup>+</sup> , (mmol) mL <sup>-1</sup>	0,1 ± 0,006	0,10 ± 0,003(c)	0,08 ± 0,004	0,1 ± 0,003(a)	0,09 ± 0,005	0,07 ± 0,004	F(2,64)=14,93 P=0,0001	F(1,64)=8,237 P=0,0056	F(2,64)=1,604 P=0,2092	
rSKNa <sup>+</sup> , [mmol Na <sup>+</sup> (g DW) <sup>-1</sup> ]	0,04 ± 0,002	0,06 ± 0,009	0,041 ± 0,007	0,06 ± 0,009	0,07 ± 0,009	0,054 ± 0,011	F(2,64)=2,595 P=0,0825	F(1,64)=3,562 P=0,0636	F(2,64)=0,2348 P=0,7914	
[Na <sup>+</sup> ] <sub>plasma</sub> , (mEq) L <sup>-1</sup>	0,140 ± 0,001	0,142 ± 0,0008	0,142 ± 0,006	0,144 ± 0,002	0,144 ± 0,002	0,140 ± 0,0009	F(2,64)=0,8209 P=0,4446	F(1,64)=1,436 P=0,2352	F(2,64)=1,713 P=0,1885	

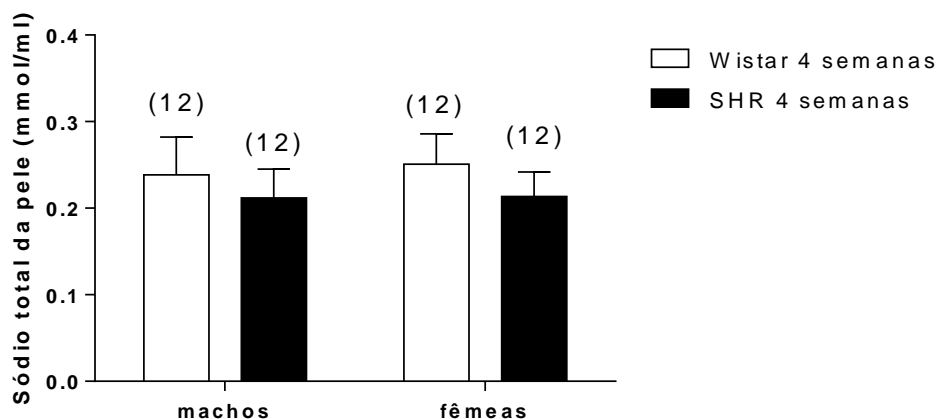
Valores apresentados como média(DP) e analisados por Anova de pós-teste de Bonferroni. SWW, peso seco da pele; DW, peso úmido da pele; SKW, água total da pele; rSKW, água relativa da pele; R<sub>relativa</sub>SKW, razão sódio/água da pele; SKNa<sup>+</sup>, sódio total da pele; rSKNa<sup>+</sup>, sódio relativo da pele; [Na<sup>+</sup>]<sub>plasma</sub>, concentração plasmática de sódio. (a) Machos SHR vs. Fêmeas SHR, menestros diestro; (b) Fêmeas Wistar proestro/estro vs. Fêmeas SHR, proestro/estro; (c) Fêmeas Wistar menestros diestro vs. Fêmeas Wistar proestro/estro, P<0,05.

### Avaliações do sódio total da pele, razão sódio/água da pele e sódio inativo total da pele em animais de 4 semanas e de 12 semanas de idade

Os parâmetros sódio total da pele e razão Na<sup>+</sup>/água da pele foram analisados separadamente pelo teste de ANOVA de duas vias por serem de relevância para a análise com dois fatores simultâneos, e incluímos nesse momento a análise de sódio inativo total da pele, porque é um parâmetro complementar aos demais citados.

#### ✓ Sódio total da pele

A seguir mostramos a análise estatística do sódio total da pele (Fig. 50) em filhotes machos e fêmeas SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,44)=9,724; P=0,0032], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,44)=0,4740; P=0,4948], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(1,44)=0,2772; P=0,6012].



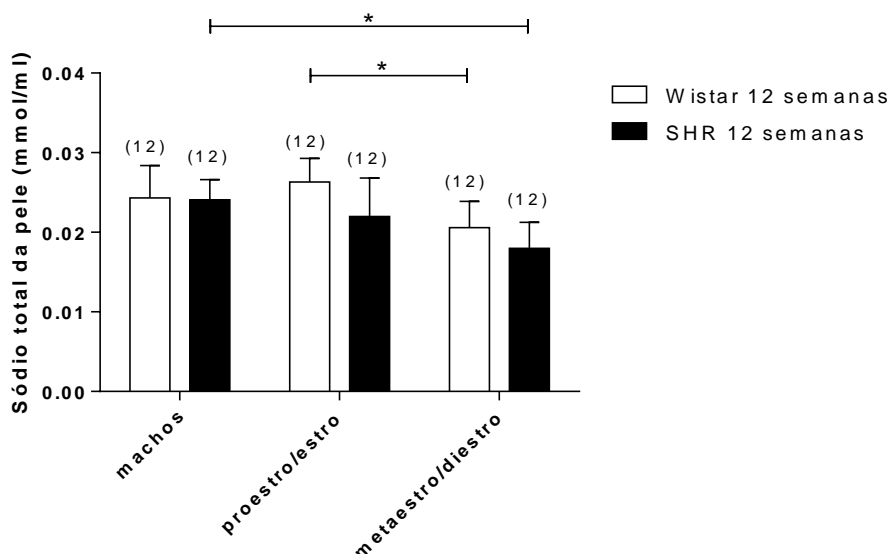
**Fig. 50-** Avaliação da concentração de sódio total na pele comparando machos e fêmeas de 4 semanas de idade, da mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

Na avaliação do sódio total da pele não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais Wistar e SHR de 28 a 30 dias. O resultado indica que na idade de 4 semanas machos e fêmeas de ambas as linhagens apresentaram igual



concentração de sódio tecidual total sob condições fisiológicas e que esse parâmetro é influenciado pela linhagem.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio total da pele (Fig. 51) em adultos machos e fêmeas SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,66)=8,098; P=0,0059], demonstrou efeito do dimorfismo [F(2,66)=15,12; P<0,0001], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(2,66)=1,985; P=0,1455].



**Fig. 51-** Avaliação da concentração de sódio total na pele comparando machos e fêmeas adultos da mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

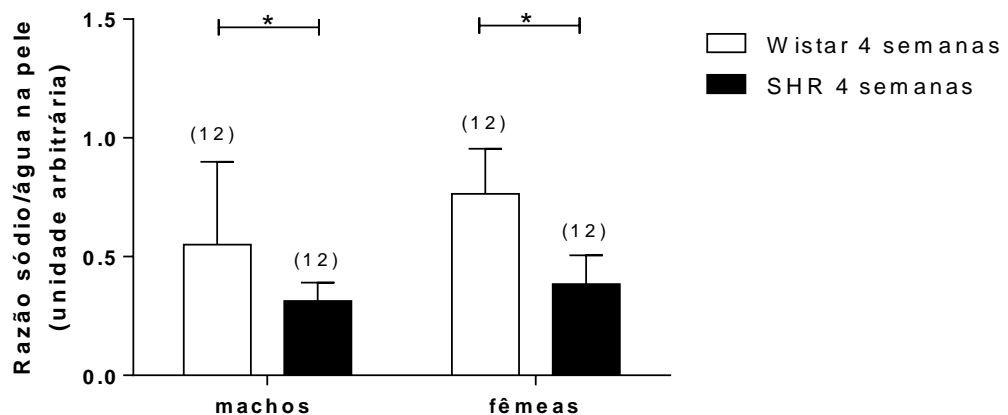
Na avaliação da concentração de sódio total na pele observamos diferenças significativas entre os grupos: (i) Fêmeas SHR metaestro/diestro vs. Machos SHR (0,018±0,003 vs. 0,024±0,003 mmol/mL, P<0,01); (iii) Fêmeas Wistar proestro/estro vs. Fêmea Wistar metaestro/diestro (0,026 ±0,003 vs. 0,021 ± 0,003 mmol/mL, P<0,01).

Nesta análise observamos que na linhagem Wistar foi observada menor concentração de sódio total na pele nas fêmeas em metaestro/diestro, em relação à fase de proestro/estro, o que indica que as oscilações hormonais fisiológicas influenciam a concentração de sódio na pele e provavelmente o estrógeno teria uma participação importante.

O dimorfismo sexual foi observado apenas na linhagem SHR e especificamente com as fêmeas SHR em metaestro/diestro em comparação aos machos. Esse resultado indicaria que no momento do metaestro/diestro essas fêmeas passam por um déficit transitório de sódio tecidual e que esse parâmetro foi influenciado pela linhagem.

✓ Razão Na<sup>+</sup>/água da pele

A seguir mostramos a análise estatística da razão sódio/água da pele (Fig. 52) em filhotes machos e fêmeas SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,44)=25,73; P<0,0001], demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,44)=5,496; P=0,0236], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(1,44)=1,337; P=0,2538].



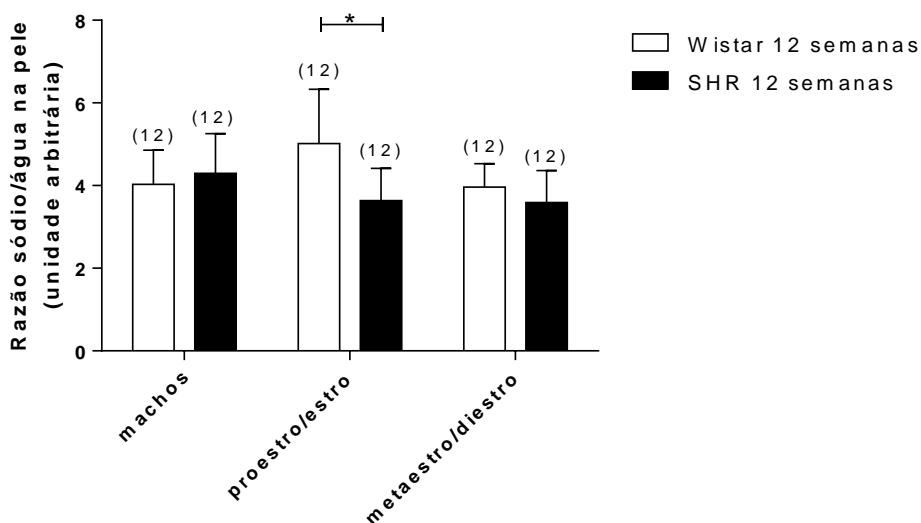
**Fig. 52-** Avaliação da razão sódio/água na pele dos filhotes sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Na avaliação da razão sódio/água da pele foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais: (i) Machos SHR vs. Machos Wistar (0,313±0,078 vs. 0,551±0,35, P<0,05); (ii) Fêmeas SHR vs. Fêmeas Wistar (0,385±0,12 vs. 0,764±0,190, P<0,001).

Assim, observamos aumento na razão sódio/água da pele nos animais machos Wistar em relação aos machos SHR e também maior razão sódio/água nas fêmeas Wistar em relação às fêmeas SHR de 28 a 30 dias de idade. O aumento da razão sódio/água da pele indica maior acúmulo de sódio inativo na pele e parece que animais Wistar de 4

semanas de idade apresentaram maior acúmulo de sódio inativo, sendo importante relacionar esse dado com o conteúdo de sódio osmoticamente inativo acumulado.

A seguir mostramos a análise estatística da razão sódio/água da pele (Fig. 53) em adultos SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,66)=5,418; P=0,0230], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(2,66)=2,392; P=0,0993], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(2,66)=5,121; P=0,0086].



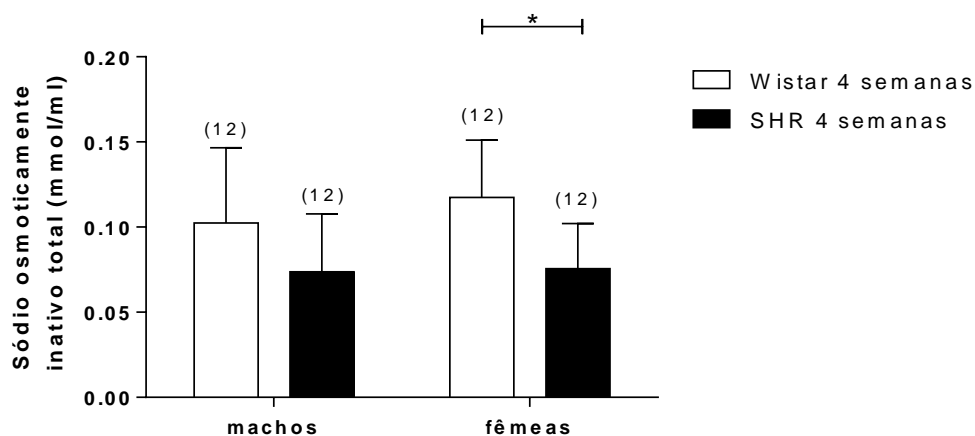
**Fig. 53-** Avaliação da razão sódio/água na pele dos animais adultos sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Nesta análise foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais: (i) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas Wistar proestro/estro ( $3,64 \pm 0,78$  vs.  $5,02 \pm 1,31$ , P<0,01).

O resultado indica que a influencia da linhagem foi mais relevante na razão sódio/água da pele e a diminuição da razão sódio/água da pele nesta fase do ciclo estral seria um indicativo de que a hipertensão na fêmea pode influenciar negativamente o armazenamento de sódio inativo na pele particularmente na fase de proestro/estro.

✓ Sódio osmoticamente inativo total da pele

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo total da pele (Fig. 54) em filhotes SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,44)=12,09; P=0,0012], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,44)=0,6942; P=0,4092], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(1,44)=0,4152; P=0,5227].

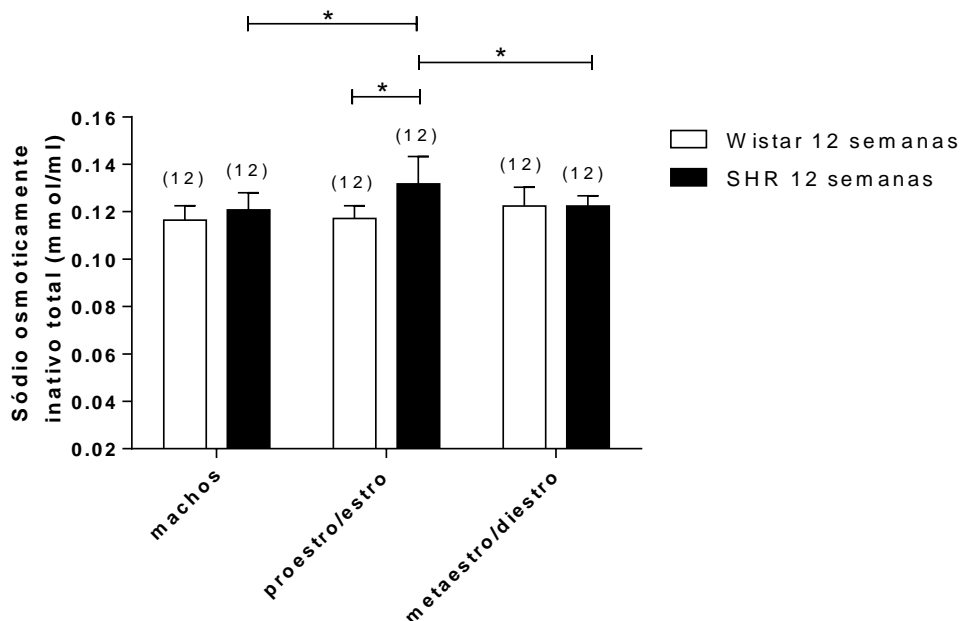


**Fig. 54-** Avaliação do sódio osmoticamente inativo total dos filhotes sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \*P<0,05.

Na avaliação do sódio osmoticamente inativo total foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais: (i) Fêmeas SHR vs. Fêmeas Wistar ( $0,076 \pm 0,026$  vs.  $0,117 \pm 0,336$  mmol/mL,  $P < 0,05$ ).

Assim, observamos aumento do sódio osmoticamente inativo da pele nas fêmeas Wistar em relação às fêmeas SHR de 28 a 30 dias de idade. Esse dado relacionado com o aumento da razão sódio/água da pele nas fêmeas Wistar indicam que essas fêmeas em 4 semanas de idade estão armazenando sódio inativo.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo total da pele (Fig. 54) em adultos SHR e Wistar, evidenciou efeito da linhagem [F(1,66) = 13,07; P = 0,0006], demonstrou efeito do dimorfismo [F(2,66)=3,817; P = 0,0270], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(2,66)=6,166; P=0,0035].



**Fig. 55-** Avaliação do sódio osmoticamente inativo total na pele dos animais adultos sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais: (i) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Machos SHR ( $0,13 \pm 0,003$  vs.  $0,12 \pm 0,002$  mmol/mL,  $P < 0,01$ ); (ii) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas Wistar proestro/estro ( $0,13 \pm 0,003$  vs.  $0,12 \pm 0,001$  mmol/mL,  $P < 0,001$ ) e (iii) Fêmeas SHR proestro/estro vs. Fêmeas SHR metaestro/diestro ( $0,13 \pm 0,003$  vs.  $0,12 \pm 0,001$  mmol/mL,  $P < 0,05$ ).

Nessa avaliação observamos que o sódio inativo total da pele varia em função da linhagem, quando as fêmeas SHR e Wistar foram comparadas na fase de proestro/estro, e que essas fêmeas SHR apresentariam um aumento transitório do sódio inativo total, enquanto que essas mesmas fêmeas apresentaram uma redução na fase de metaestro/diestro. O resultado indica que esse parâmetro está sendo influenciado por flutuações hormonais fisiológicas. O dimorfismo sexual foi observado apenas na linhagem SHR, e especificamente em relação às fêmeas na fase de proestro/estro. Como estamos avaliando animais intactos, o resultado indica que possivelmente hormônios gonadais, entre eles estrógeno, poderiam influenciar essa resposta e essa influencia seria

mais potente que a da testosterona nos machos sobre a quantidade de sódio inativo total, uma vez que não foi observada alteração nos machos.

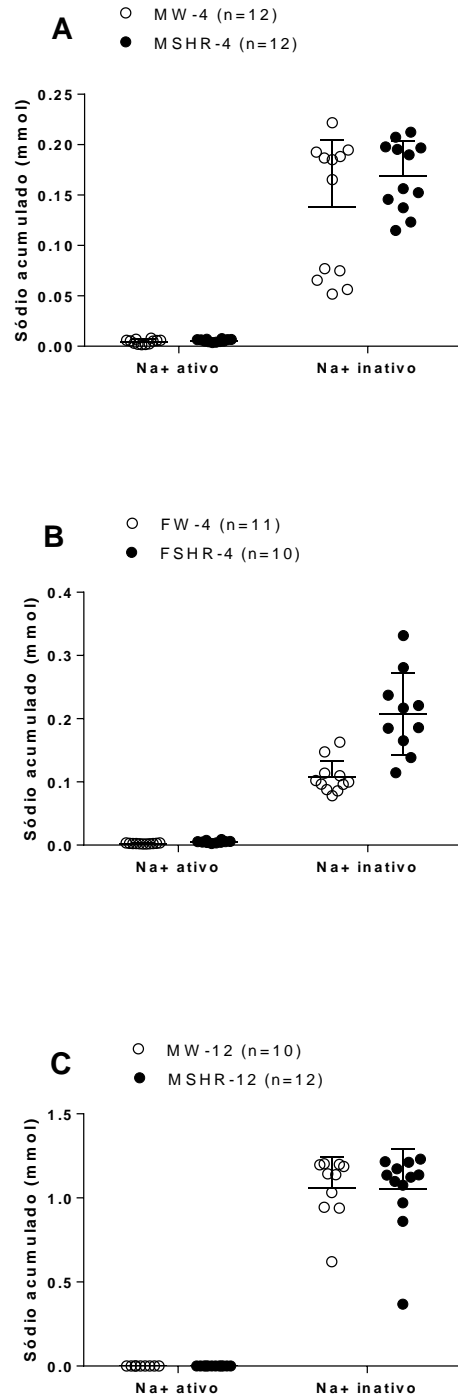
### **Avaliações do conteúdo de sódio acumulado na pele em animais SHR e Wistar de 4 semanas e de 12 semanas de idade**

Nesta etapa nós avaliamos o conteúdo de sódio osmoticamente ativo e osmoticamente inativo na pele dos animais, sejam filhotes ou adultos de ambas as linhagens.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente acumulado na pele (Fig. 56A) em machos SHR e Wistar de 4 semanas de idade, não evidenciou efeito da linhagem [F(1,44)=2,199; P=0,1452], demonstrou efeito do acúmulo de sódio [F(1,44)=190,2; P<0,001], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x acúmulo de sódio) [F(1,44)=1,886; P=0,1766].

Observamos diferenças significativas na comparação: (i) Na<sup>+</sup> ativo acumulado macho Wistar vs. Na<sup>+</sup> inativo acumulado macho Wistar (0,004±0,002 vs. 0,138±0,066 mmol, P<0,0001) e (ii) Na<sup>+</sup> ativo acumulado macho SHR vs. Na<sup>+</sup> inativo acumulado macho SHR (0,006±0,001 vs. 0,169±0,034 mmol, P<0,0001). O resultado indicou que na idade de 4 semanas, ambas as linhagens SHR e Wistar, apresentaram conteúdo de sódio inativo acumulado maior e que a reserva inativa já existe nesse momento da vida dos animais e conteúdo de sódio ativo igual a zero. Esse resultado igual a zero indica que o Na<sup>+</sup> ativo não se altera devido às diferenças entre as linhagens nas condições fisiológicas. Não houve diferenças entre as linhagens em relação ao sódio acumulado.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente acumulado na pele (Fig. 56B) em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas de idade, evidenciou efeito da linhagem [F(1,38)=23,53; P<0,001], demonstrou efeito do acúmulo de sódio [F(1,38)=209,0; P<0,0001], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x acúmulo de sódio) [F(1,38)=21,13; P<0,0001].



**Fig. 56-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo e inativo acumulados na pele, comparando as cargas de sódio acumulado e as linhagens dos animais de 4 semanas (A,B) e de 12 semanas de idade (C) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Na Fig. 56B, observamos diferenças significativas na comparação: (i) Na<sup>+</sup> ativo acumulado fêmea Wistar *vs.* Na<sup>+</sup> inativo acumulado fêmea Wistar (0,003±0,0006 *vs.* 0,107±0,026 mmol, P<0,0001), (ii) Na<sup>+</sup> ativo acumulado fêmea SHR *vs.* Na<sup>+</sup> inativo acumulado fêmea SHR (0,005±0,002 *vs.* 0,208±0,065 mmol, P<0,0001) e observamos diferenças entre as linhagens (iii) Na<sup>+</sup> inativo acumulado fêmea SHR *vs.* Na<sup>+</sup> inativo acumulado fêmea Wistar (0,208±0,065 *vs.* 0,107±0,026 mmol, P<0,0001).

O resultado indicou que na idade de 4 semanas, ambas as linhagens SHR e Wistar, apresentaram conteúdo de sódio inativo acumulado maior e que a reserva inativa já existe nesse momento da vida dos animais como havia sido observado nos machos de 4 semanas de idade. As fêmeas SHR e Wistar apresentam igual carga de sódio ativo acumulado nas 4 semanas de idade, porém houve maior acúmulo de sódio inativo na fêmea SHR em relação à fêmea Wistar. Assim, na idade de 4 semanas a fêmea SHR já exhibe maior reserva inativa acumulada.

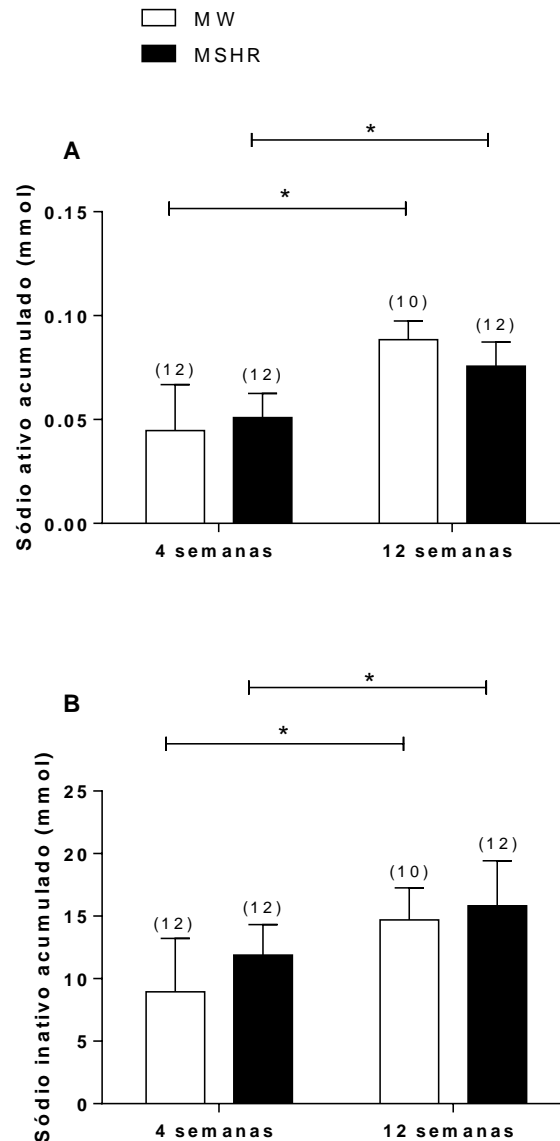
A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente acumulado na pele (Fig. 56C) em machos SHR e Wistar de 12 semanas de idade, não evidenciou efeito da linhagem [F(1,40)=0,01209; P=0,9130], demonstrou efeito do acúmulo de sódio [F(1,40)=516,6; P<0,0001], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x acúmulo de sódio) [F(1,40)=0,01209; P<0,0001].

Observamos diferenças significativas na comparação: (i) Na<sup>+</sup> ativo acumulado macho Wistar *vs.* Na<sup>+</sup> inativo acumulado macho Wistar (0,000±0,00 *vs.* 1,06±0,18 mmol, P<0,0001) e (ii) Na<sup>+</sup> ativo acumulado macho SHR *vs.* Na<sup>+</sup> inativo acumulado macho SHR (0,000±0,000 *vs.* 1,05±0,24 mmol, P<0,0001). O resultado indicou que na idade de 12 semanas, ambas as linhagens SHR e Wistar, apresentaram conteúdo de sódio inativo acumulado maior e conteúdo de sódio ativo igual a zero. Esse resultado igual a zero indica que o Na<sup>+</sup> ativo não se altera devido às diferenças entre as linhagens nas condições fisiológicas. Não houve diferenças entre as linhagens nesses parâmetros.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 57A) em machos SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade, não evidenciou efeito da linhagem [F(1,42)=0,5676; P=0,4554], demonstrou efeito da idade [F(1,42)=61,76; P<0,0001], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(1,42)=4,690; P=0,0361].



Observamos diferenças significativas na comparação: (i) machos Wistar 12 semanas vs. machos Wistar 4 semanas ( $0,088\pm 0,009$  vs.  $0,045\pm 0,022$  mmol,  $P<0,0001$ ) e (ii) machos SHR 12 semanas vs. machos SHR 4 semanas ( $0,076\pm 0,012$  vs.  $0,051\pm 0,012$  mmol,  $P<0,001$ ).



**Fig.57-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele, comparando as idades dos machos de 4 semanas e 12 semanas de idade sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado  $*P<0,05$ .

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 57B) em machos SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade, evidenciou efeito da linhagem [F(1,42)=4,265; P=0,0451], demonstrou efeito da idade [F(1,42)=24,00; P <0,0001], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(1,42)=0,8432; P=0,3637].

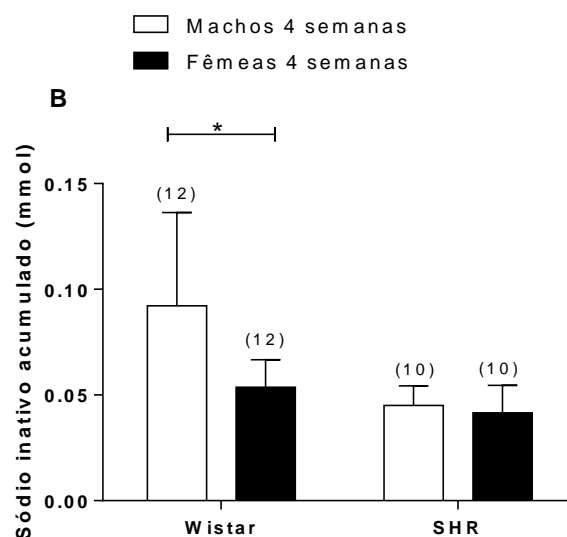
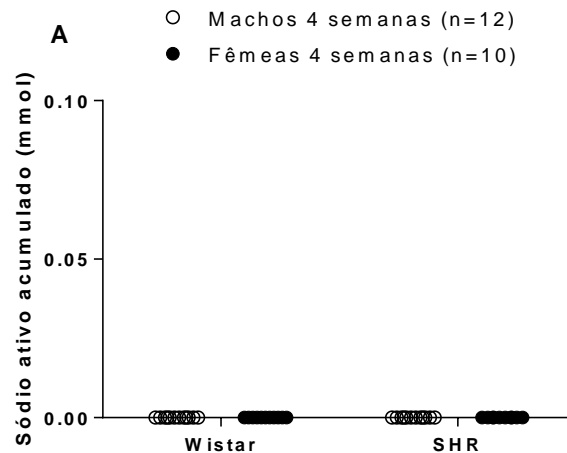
Observamos diferenças significativas na comparação: (i) machos Wistar 12 semanas vs. machos Wistar 4 semanas (14,69±2,57 vs. 8,94±4,28 mmol, P<0,001) e (ii) machos SHR 12 semanas vs. machos SHR 4 semanas (15,83±3,61 vs. 11,89±2,43 mmol, P<0,05).

Os resultados dos gráficos 57A e 57B demonstraram que a reserva osmoticamente ativa, assim como a reserva osmoticamente inativa aumentam com o avanço da idade nos machos e isso não está relacionado com o estabelecimento da hipertensão na idade adulta. E os machos adultos SHR não foram diferentes em relação aos Wistar como foi mostrado pelo resultado apresentado na idade de 4 semanas.

A seguir mostramos o gráfico do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 58A) em machos e fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas de idade, no qual mostramos apenas as médias encontradas, pois não houve variância nesta análise. Esse resultado indica que o parâmetro estudado não se altera devido às diferenças entre machos e fêmeas nas condições fisiológicas.

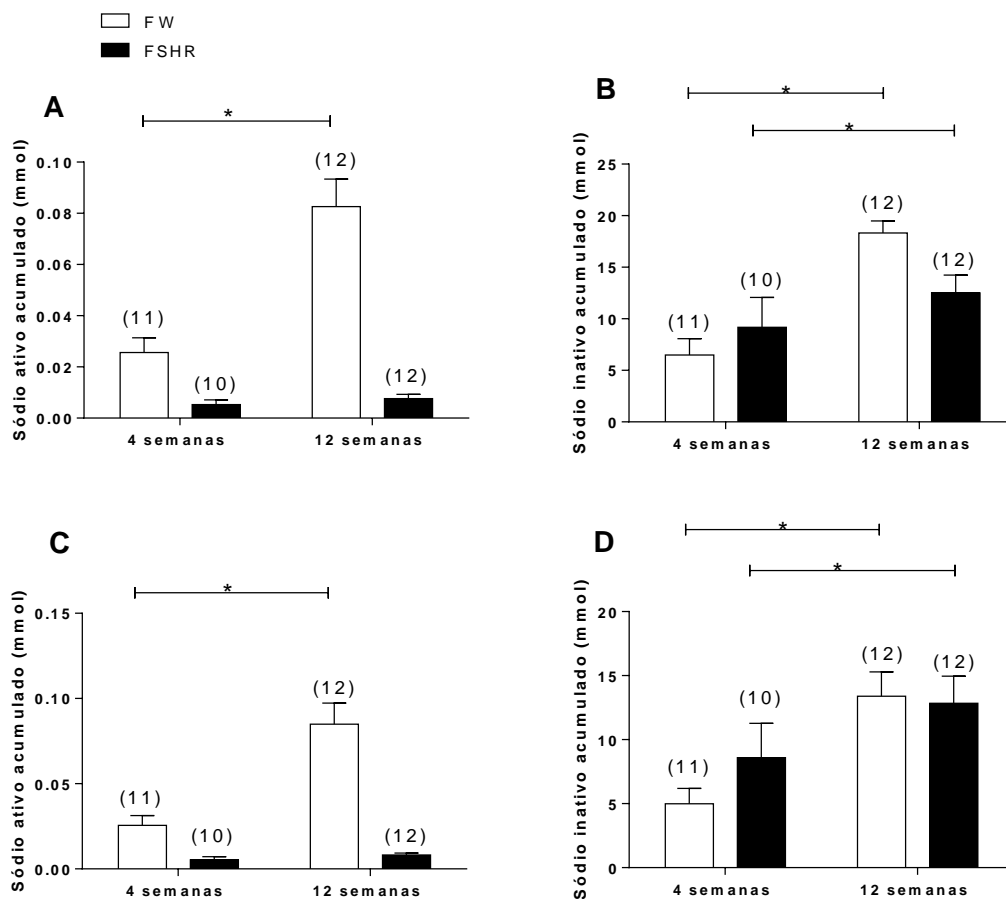
A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 58B) em machos e fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas de idade, evidenciou efeito da linhagem [F(1,41)=15,74; P=0,0003], demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,41)=7,968; P=0,0073], e evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [F(1,41)=5,497; P=0,0240].

Observamos diferenças significativas na comparação: (i) fêmeas Wistar 4 semanas vs. machos Wistar 4 semanas (0,054±0,013 vs. 0,092±0,044 mmol, P<0,01). O resultado indicou diminuição da reserva inativa na fêmea Wistar em relação ao macho de mesma linhagem. Essa diferença poderia ser atribuída às características do tecido, que nos machos pode conter maior quantidade de proteínas do que nas fêmeas.



**Fig. 58-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) inativo (B) acumulados na pele comparando machos e fêmeas de 4 semanas de idade sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 59A) em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade em proestro ou estro, evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,41)=622,3$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,41)=241,0$ ;  $P < 0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,41) = 204,5$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Fig. 59-** Avaliação do sódio osmoticamente acumulado, comparando as fêmeas de 4 semanas e 12 semanas de idade (A,B = proestro/estro) e (C,D = metaestro/diestro) sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni, sendo considerado \* $P < 0,05$ .

Observamos diferenças significativas na comparação do sódio ativo acumulado: (i) fêmeas Wistar 4 semanas vs. Fêmeas Wistar 12 semanas proestro ou estro ( $0,026 \pm 0,006$  vs.  $0,083 \pm 0,011$  mmol,  $P < 0,0001$ ).

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 59B) em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade em proestro ou estro, evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,41)=7,583$ ;  $P=0,0087$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,41)=179,9$ ;  $P < 0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,41)=56,57$ ;  $P < 0,0001$ ].

Observamos diferenças significativas na comparação do sódio inativo acumulado: (i) fêmeas Wistar 4 semanas vs. Fêmeas Wistar 12 semanas proestro ou estro ( $6,49 \pm 1,57$  vs.  $18,33 \pm 1,16$  mmol,  $P < 0,0001$ ) e (ii) fêmeas SHR 4 semanas vs. Fêmeas SHR 12 semanas em proestro ou estro ( $9,19 \pm 2,88$  vs.  $12,52 \pm 1,72$  mmol,  $P < 0,0001$ ).

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 59C) em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade em metaestro ou diestro, evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,41) = 516,7$ ;  $P < 0,0001$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,41) = 212,0$ ;  $P < 0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,41) = 174,3$ ;  $P < 0,0001$ ].

Observamos diferenças significativas na comparação do sódio ativo acumulado: (i) fêmeas Wistar 4 semanas vs. Fêmeas Wistar 12 semanas em metaestro ou diestro ( $0,026 \pm 0,006$  vs.  $0,085 \pm 0,012$  mmol,  $P < 0,01$ ).

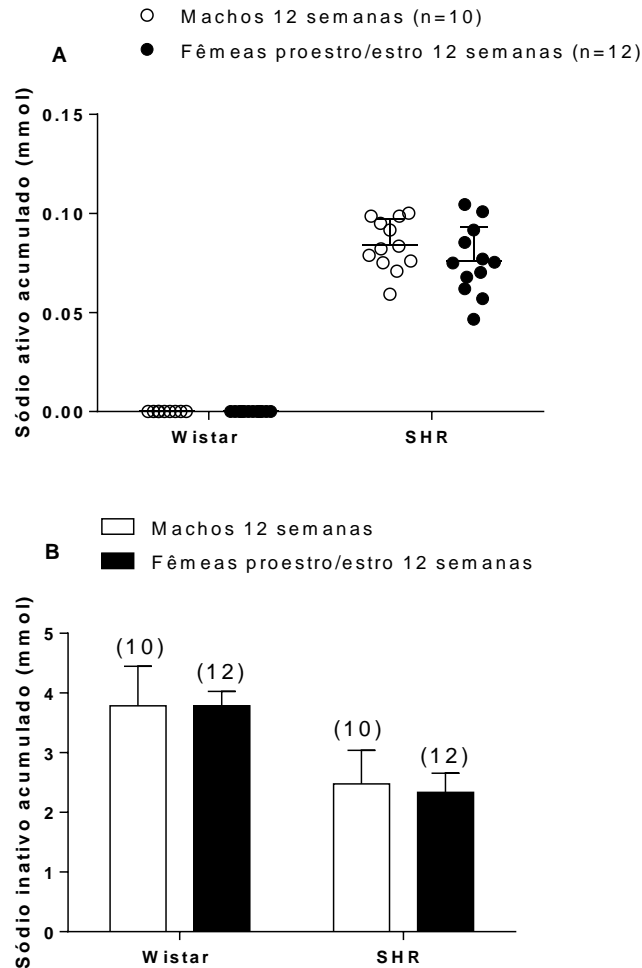
A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 59D) em fêmeas SHR e Wistar de 4 semanas e 12 semanas de idade em metaestro ou diestro, evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,41) = 6,309$ ;  $P = 0,0160$ ], demonstrou efeito da idade [ $F(1,41) = 108,3$ ;  $P < 0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x idade) [ $F(1,41) = 11,66$ ;  $P = 0,0014$ ].

Observamos diferenças significativas na comparação do sódio inativo acumulado: (i) fêmeas Wistar 4 semanas vs. Fêmeas Wistar 12 semanas em metaestro ou diestro ( $4,99 \pm 1,21$  vs.  $13,39 \pm 1,91$  mmol,  $P < 0,01$ ) e (ii) fêmeas SHR 4 semanas vs. Fêmeas SHR 12 semanas em metaestro ou diestro ( $8,59 \pm 2,69$  vs.  $12,84 \pm 2,12$  mmol,  $P < 0,01$ ).

Podemos concluir que a reserva osmoticamente ativa das fêmeas aumentou com o avanço da idade apenas na linhagem Wistar. Na idade adulta, mesmo sendo a fêmea SHR hipertensa, a reserva osmoticamente ativa não se altera, ficando igual a das 4 semanas de idade. E a reserva osmoticamente inativa aumentou com o avanço da idade em ambas as linhagens. Em ambos os casos, ocorrem oscilações hormonais fisiológicas ao longo do ciclo estral, pois são fêmeas intactas. Para as fêmeas SHR as oscilações hormonais levaram na direção do acúmulo da reserva inativa, favorecendo a ligação do  $\text{Na}^+$  com proteínas e não na direção do acúmulo da reserva ativa que leva  $\text{Na}^+$  ao plasma.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 60A) em machos e em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade em

proestro ou estro, evidenciou efeito da linhagem [F(1,42)=603,2; P<0,0001], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,42)=1,512; P=0,2257], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(1,42) =1,512; P=0,2257].

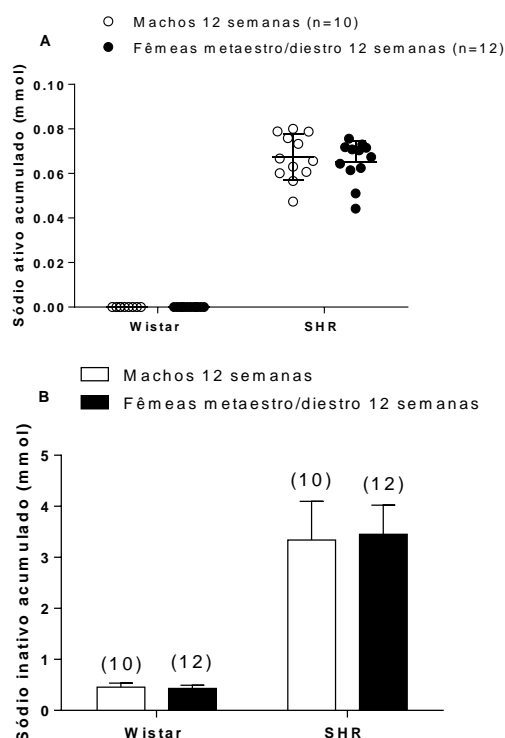


**Fig. 60-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele de fêmeas de 12 semanas na fase de proestro/estro em relação aos machos de mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 60B) em machos e em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade em proestro ou estro, evidenciou efeito da linhagem [F(1,42)= 99,52; P<0,0001], não demonstrou efeito do dimorfismo [F(1,42) = 0,2600; P =0,6128], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [F(1,42)=0,2609; P=0,6122].

O sódio acumulado na pele, seja ativo ou inativo, não sofreu influência do dimorfismo, especificamente em relação às fêmeas em proestro ou estro.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 61A) em machos e em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro, não evidenciou efeito do dimorfismo [ $F(1,42)=0,2086$ ;  $P=0,6502$ ], demonstrou efeito da linhagem [ $F(1,42)=984,2$ ;  $P<0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(1,42)=0,2086$ ;  $P=0,6502$ ].



**Fig. 61-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele de fêmeas de 12 semanas na fase de metaestro/diestro em relação aos machos de mesma linhagem sob condições basais. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 61B) em machos e em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade em metaestro ou diestro, evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,42)=416,1$ ;  $P<0,0001$ ], não demonstrou efeito do dimorfismo [ $F(1,42)=0,09994$ ;  $P=0,7535$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x dimorfismo) [ $F(1,42)=0,2229$ ;  $P=0,6392$ ]. O sódio

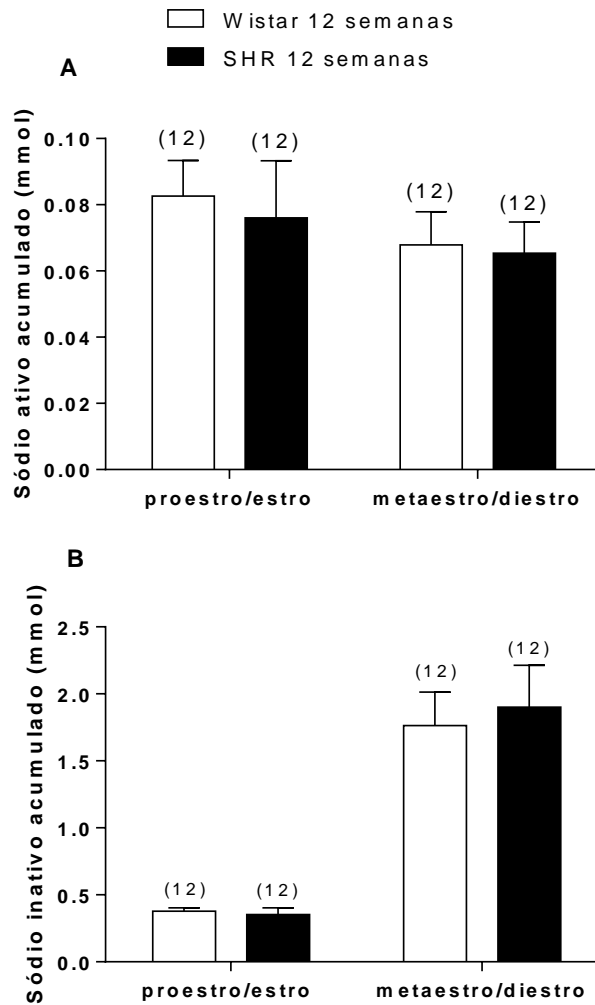
acumulado na pele, seja ativo ou inativo, não sofreu influência do dimorfismo, especificamente em relação às fêmeas em metaestro ou diestro.

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente ativo acumulado na pele (Fig. 62A) em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade, não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,44)=1,653$ ;  $P=0,2052$ ], demonstrou efeito da fase do ciclo estral [ $F(1,44)=12,86$ ;  $P=0,0008$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x fase do ciclo estral) [ $F(1,44)=0,3133$ ;  $P=0,5785$ ].

A seguir mostramos a análise estatística do sódio osmoticamente inativo acumulado na pele (Fig. 62B) em fêmeas SHR e Wistar de 12 semanas de idade, não evidenciou efeito da linhagem [ $F(1,44)=0,9153$ ;  $P=0,3439$ ], demonstrou efeito da fase do ciclo estral [ $F(1,44)=626,5$ ;  $P<0,0001$ ], e não evidenciou interação entre os fatores (linhagem x fase do ciclo estral) [ $F(1,44)=1,919$ ;  $P=0,1730$ ].

O sódio acumulado na pele, seja ativo ou inativo, sofreu influenciada fase do ciclo estral, embora não tenhamos encontrado diferenças significativas entre os grupos. Ao comparar a fase do ciclo estral, as fêmeas não foram diferentes entre si no parâmetro sódio acumulado ativo ou inativo por estarem sob condições fisiológicas.





**Fig. 62-** Avaliação do sódio osmoticamente ativo (A) e inativo (B) acumulados na pele, comparando as linhagens e fase do ciclo estral. Dados representados por média(DP) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni.

## 7.0 Discussão

### **Parte 1: Estudo realizado em animais SHR e Wistar de 4 semanas**

Os experimentos realizados com os animais de 23 a 33 dias tiveram o objetivo de localizar o momento no qual o padrão comportamental dos animais SHR se altera quando comparados aos animais Wistar que são normotensos. Verificamos que nessa faixa etária os animais SHR jovens não se encontravam hipertensos.

Com esse resultado nós verificamos que os machos SHR apresentam aumento no consumo de salina hipertônica aos 30 dias de idade e que as fêmeas tiveram alteração no consumo de salina hipertônica a partir de 29 dias de idade.

Considerando em conjunto os dados de ingestão de machos e fêmeas, concluímos que nesse estudo o estabelecimento do fenótipo comportamental de um animal espontaneamente hipertenso, seja macho ou fêmea, se inicia a partir dos 26 dias de idade, sendo mostrada uma flutuação importante, porém não significativa neste dia, quando observamos o aumento do consumo espontâneo de salina hipertônica e diminuição de ingestão de água, sob condições fisiológicas.

Os resultados indicam que ambos os machos e as fêmeas SHR apresentam maior consumo de salina hipertônica que os machos e fêmeas Wistar, respectivamente.

Considerando em conjunto os dados de ingestão nos machos, verificamos que os machos SHR seriam mais precoces na mudança de padrão comportamental de ingestão de salina hipertônica e que as fêmeas da mesma linhagem apresentaram essa modificação um pouco mais tarde.

Em nosso estudo demonstramos que as fêmeas seriam um pouco mais tardias em expressar esse comportamento natriorexigênico. Essa resposta poderia ser atribuída a diferenças na plasticidade dos sistemas neuroendócrinos reguladores do comportamento ingestivo, que poderiam resultar em mudança de padrão de ingestão e um exemplo é a resposta natriorexigênica encontrada no dia 26 para os machos de linhagem SHR e no dia 29 para as fêmeas SHR.

Os animais SHR machos e fêmeas apresentaram redução no volume urinário, redução na osmolalidade urinária (em alguns dias) e carga excretada de sódio sem alteração, ou seja, os animais produzem um volume menor de urina e redução da

osmolalidade urinária, como consequência da baixa ingestão e excreção de água. Parece que nesse momento da vida os animais já apresentavam um fenótipo de retenção de água e de elevada ingestão e palatabilidade ao sódio. Esses fatores juntos seriam facilitadores para o acúmulo de sódio corporal.

Esse resultado do comportamento ingestivo se relaciona com o acúmulo da reserva inativa acumulada na pele dos machos SHR. No experimento 4, ao compararmos as reservas acumuladas nos machos de 4 semanas de idade, dentro da mesma linhagem, observamos que houve maior estoque de sódio inativo acumulado em relação ao estoque de sódio ativo. Isso indica que na idade de 4 semanas a formação da reserva inativa acumulada na pele nos machos SHR é influenciada pela maior ingestão espontânea de cloreto de sódio e que na hipertensão em desenvolvimento a reserva inativa já existente pode estar contribuindo não só para a manutenção da hipertensão, mas para o crescimento ósseo na puberdade.

Em um estudo realizado em fetos humanos (24-40 semanas) foi constatado que durante a gestação ocorre acúmulo de reserva osmoticamente inativa nos fetos durante a gestação (SEGAR *et al.* 2020). Os autores discutem a possibilidade de essa reserva ser utilizada também no desenvolvimento ósseo na vida pós-natal.

É importante considerar que os dados comportamentais, de osmolalidade urinária e de carga excretada de sódio em condições fisiológicas, obtidos no protocolo 1 são novos na literatura para a faixa etária de 4 semanas de SHR machos e fêmeas. Neste caso, apenas as avaliações em gaiolas metabólicas representam uma informação nova na literatura, sendo assim não temos referências para essa parte da discussão.

Verificamos que as diferenças mostradas na avaliação do peso corporal, ocorreram em função da linhagem, pois estão representados dois tamanhos corporais distintos. Os animais da linhagem SHR apresentam menor desenvolvimento de carcaça em relação aos da linhagem Wistar, pois os SHR exibem diminuição na secreção de hormônios do crescimento como mostrado por AGUILAR *et al.* (1990). Neste estudo, Aguilar *et al.* (1990) demonstrou que aos 30 dias de idade os machos SHR apresentam menor concentração de hormônio do crescimento (GH) no plasma e na hipófise comparados aos machos da linhagem Wistar Kyoto.

De modo geral as medidas ponderais refletem características que diferem uma linhagem da outra pelo tamanho corporal, sendo importante realizar essas medidas para padronização do estudo.

Bassam *et al.* (2005) avaliou que na prenhez de fêmeas espontaneamente hipertensas ocorre um retardo no crescimento fetal e atraso no neurodesenvolvimento, considerando a fase embrionária, a partir do dia 20, e a fase pós-natal, como baixo peso corporal e microcefalia. Os autores reportam a possibilidade de haver injúrias na circulação placentária devido à hipertensão materna.

Neste contexto, outro estudo realizado por Lewis *et al.* (1997) avaliou as diferenças endócrino-metabólicas e no crescimento, sugerindo que haveria alterações metabólicas e genéticas em SHR, o que poderia influenciar o posterior desenvolvimento da hipertensão. Outros índices de crescimento desproporcional foram a hipertrofia do coração fetal e do rim, e diminuição do índice ponderal nos neonatos da linhagem SHR. Foram encontrados baixos níveis plasmáticos de glicose, nos neonatos de SHR em comparação aos neonatos de Wistar Kyoto, enquanto que o lactato sanguíneo estava mais alto nos SHR. Esses achados sugerem que houve desnutrição e insuficiência da placenta em fetos de SHR.

Esses fatores poderiam justificar porque, de forma geral, haveria diminuição nos índices ponderais de filhotes SHR em relação aos Wistar.

Os achados de sódio plasmático, osmolalidade plasmática e hematócrito não apresentaram diferenças entre os grupos na idade de 4 semanas e indicaram que os valores encontrados para esses parâmetros estavam compatíveis com a eunatremia em condições fisiológicas.

A diferença de linhagem influenciou as concentrações plasmáticas fisiológicas de vasopressina e de ocitocina nas fêmeas na idade de 4 semanas. A concentração plasmática de vasopressina estava aumentada, enquanto que a concentração de ocitocina estava reduzida nas fêmeas SHR comparadas às fêmeas Wistar.

Uma justificativa para que alterações fisiológicas produzidas pela vasopressina sejam evidenciadas em fêmeas é que o gene que codifica a vasopressina está localizado no cromossomo X. Cox *et al.* 2015 evidenciaram que fêmeas de camundongo, com apenas um cromossomo X presente, demonstraram aumento da expressão dos níveis de ARNm

de vasopressina na amígdala, além de verificar alterações no comportamento social dos animais.

Até o presente momento, a determinação da expressão gênica de vasopressina e ocitocina no núcleo paraventricular e supraóptico ainda não foi descrita em fêmeas SHR de 4 semanas.

Apesar disso, neste estudo não foram encontradas diferenças na concentração plasmática fisiológica de AVP nos machos de 4 semanas de idade. Burrell *et al.* (2013) demonstrou que a regulação dos níveis plasmáticos de vasopressina depende da idade dos animais. O estudo foi realizado em machos SHR de 6, 10 e 16 semanas, considerando que na sexta semana de vida os animais estavam normotensos. Na idade de 10 semanas, os níveis plasmáticos de AVP foram os mais elevados. Os autores demonstraram que o tratamento de SHR com antagonista do receptor V1a na sexta e na décima semana de vida reduziu a pressão arterial durante o tratamento e essa redução permaneceu na décima sexta semana. Esses resultados sugeriram que o sistema vasopressinérgico pode estar presente na gênese da hipertensão genética.

Morris *et al.* 1983 avaliou o conteúdo de AVP e OT no núcleo paraventricular de animais SHR machos na idade de 3 semanas. Na terceira semana de vida o conteúdo de ocitocina hipotalâmica estava reduzido, enquanto que o conteúdo de vasopressina hipotalâmica não foi modificado nessa faixa etária. Essa informação confirma o nosso resultado, no qual machos SHR de 4 semanas de idade não diferem dos machos da linhagem Wistar em relação aos níveis plasmáticos de vasopressina. Possivelmente a secreção fisiológica de vasopressina é igual em ambas as linhagens.

Van Tol *et al.* 1988 avaliaram a expressão de ARNm de vasopressina e de ocitocina nos núcleos supraóptico e paraventricular em animais machos SHR de 4 semanas de idade. A expressão de ARNm para AVP foi de aproximadamente duas a três vezes maior nos núcleos supraóptico e paraventricular nos animais SHR de 4 semanas, comparados aos controles. A expressão de ARNm para OT foi 35% mais baixa em ambos os núcleos nos SHR. Não houve diferença em relação ao conteúdo de AVP e de OT na hipófise, mas os níveis plasmáticos de AVP estavam mais elevados nos SHR. A elevação dos níveis plasmáticos de AVP encontrada por esses autores não corroboram com os dados de nosso experimento, uma vez que não encontramos diferenças nos níveis de AVP

plasmáticos entre os machos, ao comparar as linhagens. Na literatura existe a necessidade de evidenciar a expressão de AVP e OT nos núcleos supraóptico e paraventricular em fêmeas SHR de 4 semanas.

Na idade de 4 semanas observamos que a diferença de linhagem influenciou na concentração plasmática fisiológica de angiotensina 2, sendo que os animais da linhagem SHR machos e fêmeas apresentaram reduzida concentração plasmática desse hormônio, sendo esse resultado novidade na literatura. Ainda não foi demonstrada na literatura a concentração plasmática de ANG II em SHR com 4 semanas de idade.

A concentração plasmática fisiológica do peptídeo natriurético atrial não foi modificada entre os animais na idade de 4 semanas, sendo assim a diferença de linhagem ou a diferença entre machos e fêmeas não influenciou no parâmetro, sendo esse resultado novo na literatura.

Hsu *et al.* 2018 demonstraram que a pressão sistólica de machos SHR do grupo controle com 4 semanas de idade é cerca de 100 mmHg em animais conscientes pelo método de tail cuff. Em nosso experimento, a pressão sistólica encontrada foi em torno de 150 mmHg e a aferição também foi realizada pela metodologia de tail cuff. Encontramos, então, um resultado próximo ao encontrado por HSU *et al.* 2018. Não encontramos referência para a pressão sistólica das fêmeas SHR de 4 semanas de idade.

O teste tail cuff utilizado neste trabalho possui características de sensibilidade que podem levar ao erro na aquisição da pressão diastólica e da pressão arterial média, e desse modo, apenas os dados de pressão sistólica foram mais confiáveis para o estudo.

Na literatura podemos citar o estudo de Komolova *et al.* 2012, que avaliou a pressão arterial média e a resistência vascular em animais machos SHR de 2 e de 4 semanas. Os autores demonstraram que a pressão arterial média em animais SHR conscientes ( $113 \pm 5$  mmHg) e em ratos Wistar-Kyoto ( $110 \pm 6$  mmHg) não foi significativamente diferente em animais de 2 e 4 semanas de idade e que existe um aumento na resistência vascular em 30% quando comparados aos animais da linhagem Wistar Kyoto.

Esse aumento na resistência vascular pode ser associado ao aumento da frequência cardíaca que encontramos nos SHR machos de 4 semanas de idade. No entanto, não

encontramos referências que corroborem os dados de frequência cardíaca das fêmeas SHR de 4 semanas de idade, sendo essa informação nova na literatura.

Neste estudo os valores de pressão sistólica em machos e fêmeas de SHR estavam aumentados em relação à linhagem Wistar de 4 semanas de idade.

Os animais SHR são hipertensos a partir das 4 semanas de idade, e em condições fisiológicas, possuem a reserva ativa acumulada ausente. Neste sentido, o aumento da reserva osmoticamente inativa (complexo de  $\text{Na}^+$  com proteínas) nesta faixa etária e a ausência da reserva osmoticamente ativa ( $\text{Na}^+$  livre no fluido extracelular) parecem justificar, associando a outros fatores genéticos, o desenvolvimento da hipertensão nesse momento da vida e a sua evolução tardiamente.

Titze *et al.* (2002) reportaram que as linhagens de animais adultos com hipertensão sensível ao sal (SS) e resistente ao sal (SR) apresentaram aumento do conteúdo de sódio ativo total corpóreo e redução do conteúdo de sódio inativo total. Já os animais Sprague Dawley, que são normotensos toda a vida, apresentaram o oposto. Esses animais foram tratados com dieta hiperssódica por 4 semanas. Com esses dados os autores discutiram que quando a reserva ativa está alta, os animais apresentam hipertensão (TITZE *et al.* 2002).

Ao compararmos machos e fêmeas SHR e Wistar, verificamos, então, que em 4 semanas de idade, esses animais apresentaram características semelhantes em relação à reserva fisiológica de sódio acumulado. É importante considerar que na idade de 4 semanas, as fêmeas SHR apresentaram maior conteúdo de sódio inativo acumulado do que as fêmeas Wistar, o que poderia indicar um aparecimento precoce de um fenótipo de reserva inativa aumentada nas fêmeas SHR de 4 semanas.

Em resumo os animais SHR nas 4 semanas de idade são hipertensos. Nesta fase o sistema-renina-angiotensina-aldosterona parece estar imaturo na idade de 4 semanas, fato que foi demonstrado pela reduzida concentração plasmática de ANG II, porém seria interessante avaliar outros fatores para comprovar essa constatação, como a atividade de renina plasmática. Outro fator seria o sistema simpático que poderia estar com baixa atividade nas 4 semanas de idade, no entanto esse sistema não foi avaliado neste estudo. Por fim, é importante considerar que a reserva ativa de sódio acumulado está ausente

comparada aos animais da linhagem Wistar e também a concentração plasmática de sódio está normal para a condição fisiológica de eunatremia.

Comparando ambas as reservas, considerando a mesma linhagem verificamos que a reserva ativa de sódio acumulado está ausente nas 4 semanas de idade dos SHR, no entanto a reserva inativa acumulada está aumentada. Nesta fase da vida, poderíamos concluir que a reserva de sódio inativa representaria um indício para elevação da pressão arterial nos animais SHR de 4 semanas, ou seja, o sódio que leva ao aumento da pressão estaria vindo da matriz extracelular.

## **Parte 2: Estudo realizado em animais SHR e Wistar de 12 semanas**

Na avaliação realizada em gaiolas metabólicas verificamos que a linhagem SHR apresentou aumento do consumo espontâneo de salina hipertônica e redução da ingestão espontânea de água como já demonstrado na literatura (PEREIRA-DERDERIAN *et al.* , 2010, 2016, PEREIRA *et al.* 2019, KENSICKI *et al.* 2002).

Nosso estudo demonstrou que as fêmeas SHR tomam maior volume de salina na fase de metaestro/diestro enquanto que as fêmeas Wistar ingerem maior volume na fase de proestro/estro sob condições fisiológicas. Pereira *et al.* 2019 demonstraram que fêmeas SHR ovariectomizadas sem reposição estrogênica apresentam maior ingestão de salina hipertônica e maior palatabilidade à salina 0.3 M.

Esse dado sobre a ingestão de salina nas fêmeas Wistar é diferente em relação à literatura, mas consideramos como uma variação fisiológica dessa linhagem ou particularidade da colônia de animais.

A hipertensão não altera a ingestão de alimento nos animais em condições fisiológicas. Observamos que o consumo alimentar nos animais SHR machos ou fêmeas é inferior ao consumo dos animais Wistar. Observamos que a fase do ciclo estral de metaestro/diestro as fêmeas ingerem maior quantidade de alimento pela influência da baixa concentração plasmática de estrógeno sobre peptídeos orexigênicos, além de influenciar na palatabilidade da refeição (BUTERA *et al.* 2014, 2010).

Os machos SHR apresentaram baixa osmolalidade urinária e baixo conteúdo de sódio excretado.



O volume urinário foi igual em ambas as linhagens conforme demonstrado por Blagonravov *et al.* 2018 em relação à linhagem Wistar Kyoto na avaliação do perfil metabólico dos animais por 24 h. Neste mesmo estudo foi demonstrado que machos SHR excretam menor conteúdo de sódio durante a noite, enquanto que durante o dia os animais excretam equivalente conteúdo de sódio em relação à linhagem Wistar-Kyoto.

Em nosso estudo avaliamos que os machos da linhagem SHR possuem dificuldade em excretar sódio. Os mecanismos de retenção de sódio parecem estar mais estimulados nos SHR como o aumento da atividade simpática e secreção de renina, além de considerar nos SHR a superexpressão de ECA 2 no RVLM (bulbo rostralventrolateral) que pode atenuar a neurotransmissão autonômica (DENG *et al.* 2019).

Verificamos variações fisiológicas na osmolalidade urinária nas fêmeas SHR com redução da osmolalidade urinária na fase de proestro/estro e na fase de metaestro/diestro das fêmeas Wistar apenas aos 84 dias de idade. O aumento da osmolalidade urinária foi observado nas fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro e na fase de proestro/estro das fêmeas Wistar apenas aos 84 dias de idade.

Em relação ao conteúdo de sódio excretado foi observada uma variação fisiológica na carga excretada de sódio entre as linhagens nas fêmeas SHR e Wistar na fase de metaestro com 82 dias de idade.

Neste experimento, os machos SHR adultos parecem apresentar incapacidade de excretar sódio e reduzido volume urinário, sendo que Herlitz *et al.* (1982) encontrou redução da carga excretada de sódio e do volume urinário em machos SHR de 7 semanas submetidos a uma dieta com alto teor de sódio (56 mmol/100g de animal) e somente redução do volume urinário no grupo que recebeu a dieta padrão.

Em relação às fêmeas SHR, observamos uma variação fisiológica na carga excretada de sódio entre as linhagens nas fêmeas SHR e Wistar na fase de metaestro com 82 dias de idade. No entanto, as fêmeas SHR não parecem apresentar incapacidade em excretar sódio como os machos, possivelmente, por influência do estrógeno. Para entender melhor essa questão seria necessário outro estudo.

O tamanho de carcaça se relaciona com a linhagem, uma vez que todos os animais Wistar apresentaram maior peso corporal, sempre, em relação aos animais SHR de 12

semanas de idade. A diminuição no tamanho de carcaça é observada desde o início da vida pós-natal, conforme observado por AGUILAR *et al.* (1990).

Em geral, o ganho de peso na linhagem Wistar foi de 10 gramas por dia, enquanto que o ganho de peso na linhagem SHR foi cerca de 5 a 7 gramas por dia (dados não mostrados).

O estudo de Mandl *et al.* (1951) avaliou em ratas albinas o efeito trófico hormonal no útero, respectivo de cada fase do ciclo. Neste experimento foi demonstrado que as fases nas quais ocorreria um significativo aumento do tamanho e do peso uterino, considerando o conteúdo drenado, seriam desde o final do diestro até o final do estro. Neste presente estudo, foi observado aumento do peso uterino na fase de proestro/estro nas fêmeas de mesma linhagem e fase do ciclo estral diferentes, corroborando com a literatura.

Observamos maior secreção fisiológica de vasopressina nas fêmeas SHR metaestro/diestro.

A secreção de AVP não foi modificada em machos. Esse resultado corrobora com os dados de Magnusson & Meyerson (1996) no qual as concentrações basais de vasopressina não se alteram em função da linhagem em machos SHR e Wistar Kyoto de 10 semanas de idade.

Filep & Fejes-Tóth (1986) avaliaram a importância da vasopressina na manutenção da pressão arterial em animais espontaneamente hipertensos. Estes autores verificaram a resposta pressora à vasopressina exógena foi similar em animais hipertensos e normotensos. Os resultados sugerem que a vasopressina não é um hormônio pressor importante em animais SHR conscientes.

E a secreção de ocitocina não foi modificada em machos e fêmeas sob condições fisiológicas.

A ocitocina possui um papel relevante na resposta pressora. Wsol *et al.* 2014 demonstraram que o aumento da resposta pressora pela ocitocina exógena foi causado pela interação com o receptor V1aR e que a ocitocina endógena regula a magnitude da resposta pressora nos animais Wistar Kyoto pela interação simultânea com receptores para ocitocina e receptor V1aR para vasopressina.

O ritmo biológico dos animais SHR e os Wistar Kyoto, por exemplo, em relação ao comportamento animal (Minami *et al.* 1984) e em relação à pressão arterial (Blagonravov *et al.* 2013) são fatores que podem interferir na secreção hormonal sob condições fisiológicas.

Na linhagem SHR, alterações na pressão arterial e na expressão de neuropeptídeos como peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e vasopressina (AVP) são necessários para o adequado ritmo biológico e também são determinantes para o estabelecimento da hipertensão nos SHR (YILMÁZ *et al.* 2019).

Observamos maior secreção fisiológica de angiotensina 2 nas fêmeas SHR metaestro/diestro e os machos não sofreram modificações na concentração deste hormônio. Yannes *et al.* (2006) demonstraram que não existe dimorfismo sexual no angiotensinogênio plasmático ou na concentração de ANG II, ou na expressão renal de receptores AT1, na enzima conversora de angiotensina e na atividade de renina plasmática. No entanto, a expressão renal de ARNm angiotensinogênio e expressão proteica foi maior em machos do que em fêmeas mais velhas com 16 semanas de idade, enquanto que a expressão renal de ARNm de ANG II foi mais elevada nas fêmeas de 16 semanas de idade. Os autores demonstraram ainda que existe o dimorfismo sexual na resposta ao antagonismo do receptor AT1 e essa resposta pode envolver fatores como o estresse oxidativo e o avanço da idade.

Bahtia *et al.* (2012) demonstraram que a angiotensina 2 na hipertensão promove maior estresse oxidativo em machos do que em fêmeas SHR.

A secreção de peptídeo natriurético não foi modificada em machos e fêmeas neste presente estudo. Kato *et al.* (1988) evidenciaram que o aumento da forma livre do ANP suporta a hipótese de que a secreção desse hormônio pelo coração aumenta para compensar a elevação da pressão arterial nos SHR. Nossos resultados demonstraram que os machos SHR apresentam concentração plasmática fisiológica de ANP superior ao que foi encontrado por KATO *et al.* 1988.

Romero *et al.* (2015) avaliaram o papel da infusão intravenosa de ANP em machos e em fêmeas durante 14 dias no estresse oxidativo renal. As fêmeas SHR apresentaram menor lesão em órgão do que os machos. O tratamento crônico com ANP

poderia atenuar a hipertensão e evitar danos a órgãos no rim pela diminuição do conteúdo de colágeno e da apoptose em ambos os sexos.

Verificamos que ambos machos e fêmeas SHR apresentaram elevação pressão sistólica com o avanço da idade. É importante destacar que na fase do metaestro das fêmeas SHR foi observado aumento na pressão sistólica, assim como as fêmeas da linhagem Wistar na fase de metaestro.

É importante lembrar que com o avanço da idade ocorre fisiologicamente o remodelamento cardíaco e a alteração no diâmetro das câmaras cardíacas.

Li *et al.* 2019 demonstraram que ocorrem alterações no metabolismo cardíaco nos SHR com o avanço da idade. Esses autores demonstraram que aos dois meses de idade o coração dos SHR apresentavam elevados níveis de piruvato, de aminoácidos ramificados, de carnitina, estresse oxidativo e inflamação. Aos 5 meses de idade o coração dos SHR apresentou redução no índice ventricular e estresse oxidativo elevado no retículo endoplasmático.

Também observamos aumento da pressão diastólica em machos e em fêmeas da linhagem SHR em comparação aos animais Wistar

A ovariectomia altera a expressão de enzimas quimases no coração de fêmeas SHR e causa prejuízos na função diastólica (WANG *et al.* 2019). Esses autores demonstraram que a expressão de ARNm das enzimas rMCP-1e rMCP-5 ARNm está positivamente relacionada com a progressão da disfunção diastólica (aumento da razão de velocidade entre o influxo e o efluxo de sangue na válvula mitral e aumento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo).

A partir da 4<sup>a</sup> semana de vida ocorre aumento da pressão arterial sistólica nos machos e a partir da 6<sup>a</sup> semana de vida nas fêmeas SHR, sendo que a 5<sup>a</sup> semana foi considerada um período de transição.

Nossos dados de frequência cardíaca e pressão sistólica nos machos SHR adultos corroboram com o trabalho de BLAGONRAVOV *et al.* (2018).

Neste estudo não avaliamos os níveis de testosterona nos machos SHR ou Wistar adultos, embora tenhamos avaliado os animais até 12 semanas (84 dias de idade). Na literatura encontramos referências a respeito, conforme o que foi demonstrado por AGUILAR *et al.* (1990). Esse estudo reportou que a concentração basal plasmática de

testosterona em machos SHR aos 90 dias de idade é duas vezes mais elevada que em machos Wistar Kyoto.

Além disso, um efeito fisiológico da testosterona é de produzir aumento da pressão arterial. O estudo de Loh *et al.* (2017) mediu a concentração plasmática de testosterona e a pressão arterial média em machos e fêmeas de 16 semanas de idade, sob condições fisiológicas e demonstrou que machos sham (falso-operados) das linhagens SHR e Wistar Kyoto apresentaram elevadas concentrações plasmáticas de testosterona e também eleva pressão arterial média quando comparados, respectivamente, aos machos orquidectomizados, sendo que a pressão arterial média foi medida em animais anestesiados e submetidos à canulação da carótida. E também as fêmeas sham de ambas as linhagens apresentaram a mesma resposta, quando comparadas às fêmeas ovariectomizadas. No entanto, os níveis de testosterona e de pressão arterial média foram mais elevados nos animais da linhagem SHR comparativamente aos da linhagem normotensa, independente da diferença de gênero.

Ely *et al.* (2000) reportou que a adição do cromossomo y agrega de 15 a 20 mmHg de pressão sistólica a partir da linhagem parental em animais espontaneamente hipertensos e que esse cromossomo Y é também o responsável pelo aumento da pressão arterial média nos animais SHR. Esse efeito do cromossomo Y produz respostas também sobre o sistema nervoso autônomo simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, a sensibilidade ao sal, a liberação de norepinefrina pela medula renal e a deposição de colágeno nos vasos sanguíneos.

Loh *et al.* (2017) também mediu as concentrações plasmáticas de testosterona e avaliou a pressão arterial média de fêmeas intactas SHR e Wistar Kyoto de 16 semanas de idade, sob condições fisiológicas, nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro. Esses autores demonstraram que as flutuações hormonais durante o ciclo estral não influenciam na pressão sanguínea e que os níveis plasmáticos de testosterona e de pressão arterial não mudam durante o ciclo estral.

Ao avaliar o conteúdo de sódio total da pele observamos que na linhagem Wistar foi observada menor concentração de sódio total na pele nas fêmeas em metaestro/diestro, em relação à fase de proestro/estro, o que indica que as oscilações hormonais fisiológicas influenciam a concentração de sódio na pele e provavelmente o estrógeno teria uma

participação importante. Titze *et al.* (2003) demonstrou que a formação da reserva inativa de sódio acumulado depende de hormônios sexuais femininos.

Ainda em relação ao conteúdo de Na<sup>+</sup> armazenado na pele, o dimorfismo sexual foi observado apenas na linhagem SHR e especificamente com as fêmeas SHR em metaestro/diestro em comparação aos machos. Esse resultado sugere que no momento do metaestro/diestro essas fêmeas passam por um déficit transitório de sódio tecidual, cujo conteúdo se torna menor do que nos machos.

Na razão sódio/água da pele, parâmetro que se relaciona diretamente com o conteúdo de sódio inativo acumulado, foi observada maior influência da linhagem. Na fase do ciclo estral proestro/estro em fêmeas SHR foi observada a diminuição da razão sódio/água da pele, que seria um indicativo de que a hipertensão na fêmea pode influenciar negativamente o armazenamento de sódio inativo na pele, especificamente neste momento do ciclo estral, promovendo assim uma variação fisiológica da reserva inativa acumulada.

Verificamos que o sódio inativo total da pele varia em função da linhagem. Quando as fêmeas SHR e Wistar foram comparadas na fase de proestro/estro, observamos que as fêmeas SHR apresentariam um aumento transitório do sódio inativo total na fase de proestro/estro, enquanto que as fêmeas SHR apresentaram uma redução na fase de metaestro/diestro. Esse resultado indica que esse parâmetro está sendo influenciado por flutuações hormonais que existem no ciclo estral das ratas.

Titze *et al.* (2003) avaliou fêmeas ovariectomizadas sem reposição de estrógeno que apresentaram reserva osmoticamente inativa acumulada ausente, enquanto que as fêmeas intactas apresentaram aumento de ambas as reservas acumuladas. Esse resultado indicou que a presença ou a ausência de hormônios gonadais influenciam no estoque de sódio acumulado.

Por outro lado, o dimorfismo sexual foi observado apenas na linhagem SHR, e especificamente em relação às fêmeas na fase de proestro/estro que apresentaram conteúdo de sódio inativo total maior do que os machos da mesma linhagem.

Como estamos avaliando animais intactos, o resultado do sódio inativo total indica que possivelmente hormônios gonadais, entre eles estrógeno ou testosterona, poderiam influenciar essa resposta. Supomos que a influencia do estrógeno seria mais potente, em

condições fisiológicas, que a da testosterona nos machos sobre a quantidade de sódio inativo total, uma vez que não foi observada alteração nos machos, mas apenas nas fêmeas.

O sódio acumulado na pele, seja ativo ou inativo, não sofreu influencia do dimorfismo nas condições fisiológicas, independente da fase do ciclo estral nas fêmeas quando comparadas aos machos.

Considerando a discussão presente nos estudos de Titze *et al.* 2003, 2004, Hoffmeister *et al.* 2015 e Schafflhuber *et al.* 2007, a reserva ativa poderia ser mobilizada de forma mais rápida, uma vez que é mais dinâmica, enquanto que a reserva inativa acumulada seria mais estática e poderia ser mobilizada de forma mais lenta.

Considerando os resultados obtidos, a redução do conteúdo osmoticamente inativo representaria um fator tardio que poderia contribuir para que os animais SHR fossem hipertensos na vida adulta, e através da mobilização lenta, poderia acrescentar no aumento da concentração de sódio no plasma e contribuir com o aumento da pressão sistólica.

Com esse presente estudo não foi possível constatar essa evidência. Para esclarecer essa questão um novo estudo será necessário, colocando o modelo SHR frente a desafios osmóticos que envolvam situações de aumento, de redução ou de mobilização da reserva e, dessa forma, confrontar esses resultados com alterações de pressão.

Um modelo experimental já abordado pela literatura foi a dieta com alto teor de sódio. Tais experimentos foram realizados por Titze *et al.* (2004) no modelo de hipertensão sensível ao sal, após oferecer dieta hiperssódica aos animais, cronicamente, e observou que a reserva inativa de  $\text{Na}^+$  diminui neste grupo.

### **Parte 3: Estudo realizado em animais SHR e Wistar pela comparação entre as idades**

O comportamento ingestão de fluidos de animais SHR filhotes e adultos é semelhante. Quando jovens ingerem maior volume de salina hipertônica e menor volume de água e esse mesmo comportamento permanece na fase adulta. Já os animais da linhagem Wistar possuem o comportamento oposto.

Os machos SHR de 4 semanas de idade apresentaram maior concentração de vasopressina plasmática e igual concentração de ocitocina plasmática em relação aos machos SHR de 12 semanas de idade. Os Machos Wistar apresentaram igual concentração de vasopressina na idade de 4 semanas, e na idade adulta, no entanto, os machos Wistar apresentaram menor concentração de ocitocina em relação à idade de 4 semanas.

Esses dados supracitados não possuem referências para que possamos relacionar com os dados obtidos, uma vez que as semanas escolhidas, referente à idade dos animais tornam a avaliação mais específica.

Magnusson & Meyerson (1996) avaliaram a secreção de vasopressina basal em animais machos e fêmeas SHR nas idades de 25 a 30 dias e de 60 a 70 dias. Os autores observaram que não existem diferenças associadas à linhagem ou ao dimorfismo sexual na liberação basal de vasopressina considerando o intervalo de 25 a 30 dias de idade. Aos 70 dias de idade (10 semanas) a secreção de vasopressina é mais alta tanto nos machos quanto nas fêmeas SHR em comparação à linhagem Wistar Kyoto.

As fêmeas SHR apresentaram concentrações plasmáticas semelhantes de vasopressina e de ocitocina independentemente da idade dos animais. As fêmeas Wistar, quando filhotes, apresentaram maior concentração plasmática de ocitocina em relação à idade adulta, mas a concentração plasmática de vasopressina não variou com a idade. As fêmeas SHR na fase de metaestro/diestro apresentaram maior concentração de vasopressina plasmática em relação à fase de proestro/estro e igual concentração de ocitocina plasmática em ambas as fases do ciclo estral. A idade não influenciou na concentração do hormônio peptídeo natriurético atrial nas fêmeas.

A concentração plasmática de angiotensina 2 sofreu influência da idade na avaliação dos machos Wistar, lembrando que as concentrações plasmáticas de angiotensina 2 foram mais altas na idade jovem do que na idade adulta. Na linhagem SHR, os filhotes machos apresentaram iguais concentrações de angiotensina 2 e de peptídeo natriurético atrial independente da idade.

Verificamos que machos e fêmeas SHR apresentaram elevação da pressão sistólica com o avanço da idade. Na fase do metaestro das fêmeas SHR e das fêmeas Wistar foi



observado aumento na pressão sistólica. Machos e fêmeas da linhagem SHR apresentaram aumento da pressão diastólica em comparação aos animais da linhagem Wistar.

Nas 4 semanas e nas 12 semanas de idade, o conteúdo de sódio total da pele foi igual nos machos, independentemente da linhagem. Com 12 semanas de idade o conteúdo de sódio total da pele foi maior nos machos SHR em relação às fêmeas SHR metaestro/diestro.

A reserva osmoticamente ativa, assim como a reserva osmoticamente inativa aumentam com o avanço da idade nos machos, sob condições fisiológicas. Acreditamos que esse resultado não está relacionado com o estabelecimento da hipertensão na idade adulta, uma vez que os machos Wistar também apresentaram aumento da reserva acumulada e não são hipertensos.

A reserva osmoticamente ativa das fêmeas aumentou com o avanço da idade apenas na linhagem Wistar, enquanto que nas fêmeas SHR não houve modificação, independentemente da fase do ciclo estral das fêmeas adultas. Na idade adulta, mesmo sendo a fêmea SHR hipertensa, a reserva osmoticamente ativa não se altera, ficando igual a das 4 semanas de idade.

Com o avanço da idade os animais comem mais ração, e com isso ingerem mais  $\text{Na}^+$  a partir da ração, o que pode contribuir para o acúmulo de reserva inativa.

E a reserva osmoticamente inativa nas fêmeas aumentou com o avanço da idade em ambas as linhagens. As oscilações hormonais fisiológicas ao longo do ciclo estral podem ter influenciado esse resultado. Para as fêmeas SHR as oscilações hormonais levaram na direção do acúmulo da reserva inativa, favorecendo a ligação do  $\text{Na}^+$  com proteínas e não na direção do acúmulo da reserva ativa que leva  $\text{Na}^+$  ao plasma com o avanço da idade.

## **8.0 Conclusões específicas**

### **-Experimento 1**

A ingestão de sódio e água é influenciada pela linhagem e pelo dimorfismo sexual.

### **-Experimento 2**

A maioria das variações hormonais ocorreram devido às diferenças de linhagem.

### **-Experimento 3**

Animais da linhagem SHR possuem como característica a elevação da pressão sistólica desde as 4 semanas de idade, considerando apenas os machos. As oscilações hormonais na fase de metaestro/diestro parecem ser importantes para promover aumento da pressão sistólica em fêmeas SHR. As fêmeas SHR se tornam hipertensas na 6ª semana de vida. A 5ª semana de vida das fêmeas SHR foi considerada um período de transição.

### **-Experimento 4**

A hipertensão não altera a reserva osmoticamente ativa ou inativa em condições fisiológicas, mas sim a idade e o dimorfismo sexual exercem papéis importantes.

## **9.0 Conclusão Geral**

Em condições fisiológicas, animais espontaneamente hipertensos possuem características fenotípicas que os diferem da linhagem Wistar, seja no comportamento ingestivo, nas variações hormonais e na pressão arterial. Na reserva corporal de sódio acumulado, em condições fisiológicas, a diferença entre as linhagens foi a principal influência na fase jovem, enquanto que na fase adulta a influência da linhagem não foi importante. A influência das diferenças entre as idades dos animais e a influência do dimorfismo sexual predominaram no status fisiológico da reserva de sódio.

Esse trabalho promoveu maior conhecimento sobre a fisiologia da linhagem de animais espontaneamente hipertensos (SHR) pela análise pioneira do status fisiológico da reserva de sódio corporal, além de gerar novos conhecimentos sobre alguns parâmetros da fase jovem dos SHR, que é ainda pouco estudada. E também promoveu a padronização da metodologia de avaliação do conteúdo de sódio e água da pele.

## **10.0 Perspectivas**

A avaliação do conteúdo de água e  $\text{Na}^+$  armazenado na pele é uma ferramenta interessante para entender melhor o balanço de  $\text{Na}^+$  e água corporal e oferece uma informação metabólica complementar, que pode ser associada à excreção renal de eletrólitos, à ingestão de sódio e água pelos animais e à pressão arterial.

Assim sendo, a metodologia de quantificação do sódio tecidual é promissora para estudos clínicos, avaliações de aspectos fisiológicos e farmacológicos da hipertensão e distúrbios endócrino-metabólicos.

## **11.0 Missão de investigação**

### **Resumo da Missão**

A missão de investigação foi realizada junto ao Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra pelo período de 7 de julho de 2018 a 7 de novembro de 2018, em Córdoba, Província de Córdoba, Argentina. Os recursos para essa missão foram obtidos a partir do I Edital de Apoio a Eventos e Missão de Pesquisa na UFRRJ e Bolsa CAPES do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. O projeto foi intitulado “Estúdio de la caracterización funcional de las neuronas sensibles a Aldosterona del Area Postrema em animales depletados de sódio” e executado no Laboratório de Balance Hidrossalino y Hipertensión, sob a supervisão da Dra. Laura Vivas e Dra. Andrea Godino.

O objetivo da missão foi de realizar uma das etapas experimentais necessárias para completar um artigo de interesse do laboratório, além do aprendizado de técnicas como imunistoquímica dupla, perfusão, análise e quantificação dos neurônios marcados por vídeo-microscopia, treinamento na técnica de western blot e acompanhamento dos seminários internos do Instituto.

Geerling *et al.* (2006) demonstraram a localização dos neurônios sensíveis a aldosterona marcados com 11  $\beta$ -HSD<sub>2</sub> (11  $\beta$ -hidroxi-esteróide-desidrogenase) na área postrema, que é um órgão circumventricular, que contém neurônios osmossensíveis que percebem variações de osmolalidade e de tonicidade do líquido céfalo-raquidiano.

A afinidade dos glicocorticoides pelo receptor mineralo-corticóide é de 10 vezes, em relação ao receptor glicocorticoide. A concentração plasmática de glicocorticoides é de 100 a 1000 vezes maior do que de aldosterona. Assim, os glicocorticoides ocupam o receptor mineralo-corticóide a maior parte do tempo, evitando que a aldosterona se ligue ao seu próprio receptor (FUNDER, 2004).

Os neurônios sensíveis à aldosterona são neurônios especiais únicos que expressam a enzima 11  $\beta$ -hidroxi-esteróide-desidrogenase, que inativa os glicocorticoides, permitindo que a aldosterona se ligue (EDWARDS *et al.* 1988).

Os neurônios sensíveis a aldosterona na área postrema fazem parte de um grande circuito que controla o apetite por sódio. A pergunta experimental se relaciona com o tempo necessário para que os animais expressem o comportamento natriurexigênico na depleção de sódio.

Durante esse período foram cortados 26 cérebros no total, sendo 6 cérebros para padronização dos cortes (Fig 5- Figura extraída de Geerling *et al.* 2006) e da imunistoquímica e 20 cérebros experimentais. Os cortes foram realizados em micrótomo a gás (dióxido de carbono) e inseridos em solução de PB 0,01 M até o início da imunistoquímica. Encontramos dificuldades em realizar a reação cromógena final com a DAB (diaminobenzidina). Após solucionarmos essa questão os protocolos seguiram normalmente. Para cada imunistoquímica dupla foram 7 dias de experimento. O período de incubação do anticorpo primário FOS foi de 72h e do anticorpo secundário (11- $\beta$ HSD<sub>2</sub>) também foi de 72h.

Foram utilizados ratos Wistar machos (300 g) do Biotério do Instituto Ferreyra, sob regime de ciclo claro escuro 12h/12h com temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C). Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para ambientação por 4 dias. Foram depletados de sódio com injeções subcutâneas de furosemida 20 mg/kg (Lasix, Sanofi-Aventis) e o grupo controle recebeu injeções de salina estéril (0,15 M, s.c.) com dieta pobre em sódio e água destilada.

Os grupos experimentais foram depletados de sódio de 24 h (DEP-24h), depletados de 2h (DEP-2h), controle de 2 h (CTR 2h) e controle de 24 h (CTL 24h). A perfusão intracardíaca ocorreu nos tempos de 2h e de 24 horas após a depleção de sódio. O n experimental obtido foi de 4 a 5 animais por grupo. Participar da Missão de investigação foi uma experiência excelente pela ampliação de conhecimentos acadêmicos, pela convivência acadêmica em um ambiente novo.

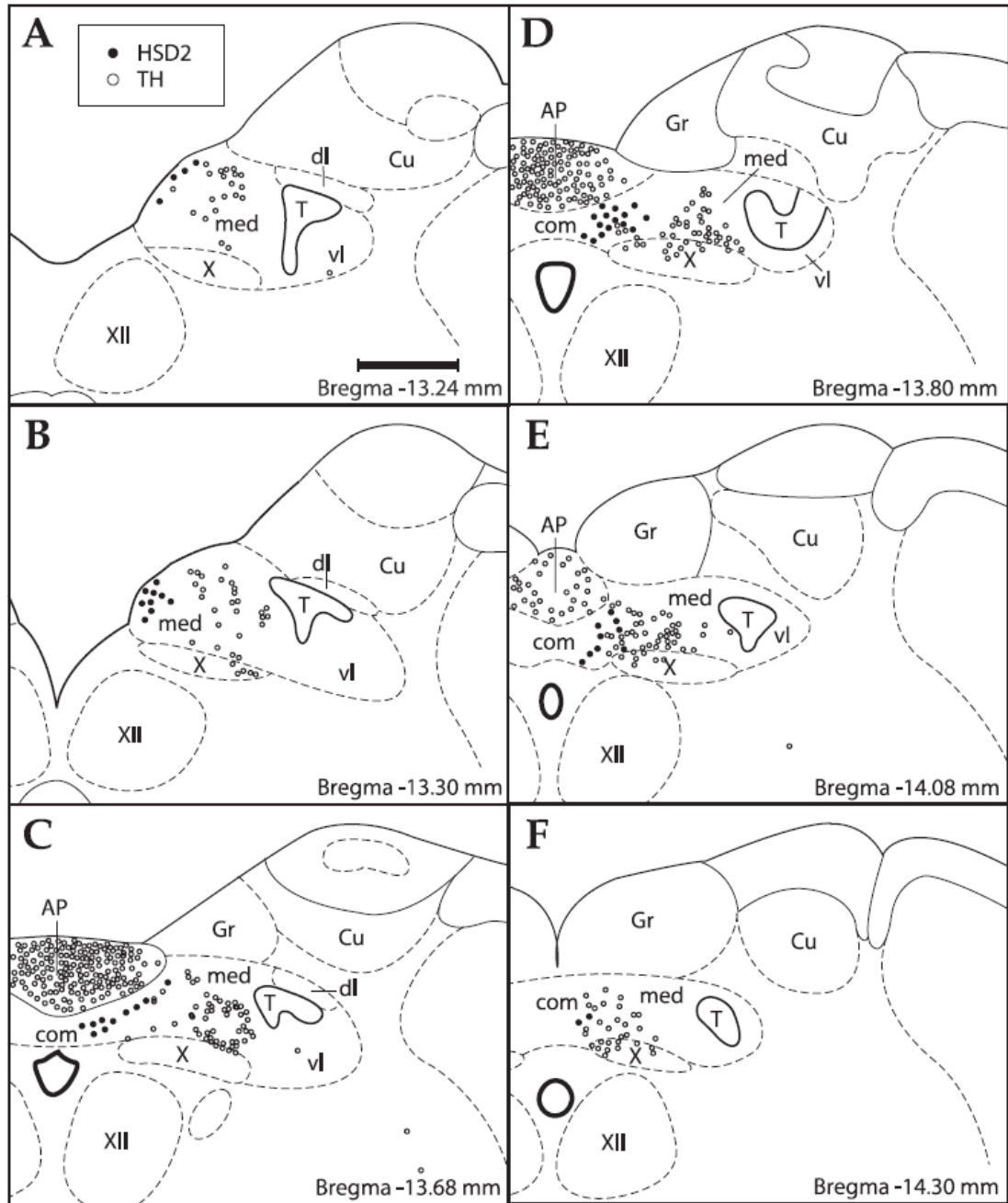


Fig 63- Figura 5 extraída de Geerling *et al.* (2006), conforme a legenda original. Padrões de expressão complementar de HSD2 e de tirosina hidroxilase (TH) no NTS (A-F). Notar que não ocorreu co-localização de imunoreatividade entre essas duas enzimas. Os neurônios HSD2 e que expressão TH (incluindo o grupo  $\alpha 2$  noradrenérgico) apresentam distribuições complementares nas seguintes regiões: com, subnúcleo comissural do NTS; cu, núcleo cuneato; dl, subnúcleo dorsolateral do NTS; Gr, núcleo grácil; med, subnúcleo medial do NTS; T, trato solitário; vl, subnúcleo ventrolateral do NTS; X, núcleo dorsal do nervo vago; XII, núcleo hipoglossal. Escala= 0,5 mm (A-F).

## 12.0 Referências bibliográficas

**AGUILAR, E.; RODRÍGUEZ M.L.; BELLIDO, C.; DE LA FUENTE, M.; PINILLA, L.** Changes in growth hormone secretion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroendocrinology*, 52(4):337-41, 1990.

**ALMEIDA-PEREIRA, G.; VILHENA-FRANCO, T.; COLETTI, R.; COGNUM, S.Q.; SILVA, H.V.P.; ELIAS, L.L.K.; ANTUNES-RODRIGUES, J.** 17 $\beta$ -Estradiol attenuates p38MAPK activity but not PKC $\alpha$  induced by angiotensin II in the brain. *J Neuroendocrinol*, 240:345-360, 2019.

**ANDERSSON, O.; MCCANN, S.M.** The Effect of Hypothalamic Lesions on the Water Intake of the Dog. *Acta Physiologica Scandinavica*, 35(3,4): 312–320,1955.

**ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R.** Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. *Acta Physiol Lat Am*, 13: 94-100, 1963.

**ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.** The neuroendocrine control of atrial natriuretic peptide release. *Mol Psychiatry*, 2(5):359-67, 1997.

**ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R.;** Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. *Acta Physiol Lat Am*, 13: 94-100, 1963.

**ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S.M.; ROGERS, L.C.; SAMSON, K.** Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(24):8720-3, 1985.

**ARAI, K.; CHOROUSOS, G.P.** Hormone-nuclear receptor interactions in health and disease. Glucocorticoid resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 8(2):317-31, 1994.

**AUGER, C.J.; COSS, D.; AUGER, A.P.; FORBES-LORMAN, R.M.** Epigenetic control of vasopressin expression is maintained by steroid hormones in the adult male rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 8;108(10):4242-7, 2011.

**BAE, O.K.; NOH, M.; CHUN, Y.J.; JEONG, T.C.** Keratinocytic vascular endothelial growth factor as a novel biomarker for pathological skin condition. **Biomol Ther**, 23(1): 12-18, 2015.

**BHATIA, K.; ELMARAKBY, A.A.; EL-REMESSY, A.B.; SULLIVAN, J.C.** Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 15;302(2):R274-82, 2012.

**BALMENT, R.J.; BRIMBLE, M.J.; FORSLING, M.L.** Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. **J Physiol**. 308:439-49, 1980.

**BASTOS, R.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.** Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Brain Res**. 895(1-2):80-8, 2001.

**BASSAM, H.; BASSAM M.; PINHASOV, A.; KARIV, N.; GILADI E.; GOZES I, HAREL S.** The pregnant spontaneously hypertensive rat as a model of asymmetric intrauterine growth retardation and neurodevelopment delay. **Hypertension in pregnancy**, 24(3), 201-211, 2005.

**BINGHAM, B.; WANG, N.X.; INNALA, L.; VIAU, V.** Postnatal aromatase blockade increases c-fos mRNA responses to acute restraint stress in adult male rats. **Endocrinology**, 153(4):1603-8, 2012.

**BLAGONRAVOV, M.L.; FROLOV, V.; AZOVA, M.M.; GORYACHEV, V.A.** Characteristics of circadian rhythm of blood pressure during longterm hypertension development in SHR rats. **Bull Exp Biol Med.** 155(5):612-4, 2013.

**BLAGONRAVOV, M.L.; MEDVEDEVA, E.V.; BRYK, A.A.; GORYACHEV, V.A.; RABINOVICH, A.E.; LETOSHNEVA, A. S.; DEMUROV, E. A.** 24-Hour Profile of Blood Pressure, Heart Rate, Excretion of Electrolytes, and Locomotor Activity in Wistar-Kyoto and SHR Rats Under Conditions of Free-Run Rhythm. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, 166(2), 192–196, 2018.

**BOTELHO, L.M.; BLOCK, C.H.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.** Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Pept**, 15(4):723-9, 1994.

**BROOKS, V.L.; OSBORN, J.W.** Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial pressure: an hypothesis. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, 268:R1343-R 1358, 1995.

**BURREL, L.M.; RISVANIS, J.; DEAN, R.G.; PATEL,S.K.; VELKOSKA, E.; JOHNSTON, C.I.** Age-dependent regulation of renal vasopressin V(1A) and V<sub>2</sub> receptors in rats with genetic hypertension: implications for the treatment of hypertension. **J Am Soc Hypertens.** 7(1):3-13, 2013.

**BUTERA, P.C.; CLOUGH, S.J.; BUNGO, A.** Cyclic estradiol treatment modulates the orexigenic effects of ghrelin in ovariectomized rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 124:356-60, 2014

**BUTERA, P.C. WOJCIK, D.M.; CLOUGH, S.J.** Effects of estradiol on food intake and meal patterns for diets that differ in flavor and fat content. **Physiol Behav.** 99(1):142-5, 2010.



**CABRAL, A.D.; KAPUSTA,D.R.; KENIGS, V.A.; VARNER, K.J.** Central alpha2-receptor mechanisms contribute to enhanced renal responses during ketamine-xylazine anesthesia. **American Journal of Physiology**. 275(6 Pt 2):R1867-74, 1998.

**CANNON, W.B.** The Wisdom of the Body. W. W. Norton & Company, Inc., p. 294, 1932.

**CERUTI, J.M.; LEIROS, G.J.; BALANA, M.E.** Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles. **Mol Cell Endocrinol**, 465:122-33, 2018.

**CHEN, P.; XU, B.; FENG, Y.; LI, K.X.; LIU, Z.; SUN, X.; LU, X.L.; WANG, L.Q.; CHEN, Y.W.; FAN, X.X.; YANG, X.L.; WANG, N.; QIAO, G.F.; LI, B.Y.**FGF-21 ameliorates essential hypertension of SHR via baroreflex afferent function. **Brain Res Bull**. 2019 Oct 15;154:9-20. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.10.003. [Epub ahead of print]

**CHEN, W.; THIBOUTOT, D.; ZOUBOULIS, C.C.** Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. **J Invest Dermatol**, 119(5):992-1007, 2002.

**CHOW, S.Y.; SAKAI, R.R., WITCHER, J.A. ADLER, N.T. EPSTEIN, A.N.** Sex and sodium intake in the rat. **Behav Neurosci**,106(1):172-80, 1992.

**COWLEY, A.W.** Long-term control of arterial blood pressure. **Physiol Rev** ., 72:23 1-300, 1992.

**COX, K.H.; QUINNIES, K.M.; ESCHENDROEDER, A.; DIDRICK, P.M.; EUGSTER, E.A.; RISSMAN, E.F.** Number of X-chromosome genes influences social behavior and vasopressin gene expression in mice. **Psychoneuroendocrinology**. 51:271-81, 2015.

**DALMASSO, C.; PATIL, C.N.; YANES CARDOSO, L.L.; ROMERO, D.G.; MARANON, R.O.** Cardiovascular and Metabolic Consequences of Testosterone Supplements in Young and Old Male Spontaneously Hypertensive Rats: Implications for Testosterone Supplements in Men. **J Am Heart Assoc**, 6, pii: e007074, 2017.

**DANIELSEN, J.; BUGGY, J.** Depression of ad lib and angiotensin-induced sodium intake at oestrus. **Brain Res Bull**, 5, 501–504, 1980.

**DE LANNOY, L. M., DANSER, A. H. J., BOUHUIZEN, A. M. B., SAXENA, P. R., SCHALEKAMP, M. A. D. H.** Localization and production of angiotensin II in the isolated perfused rat heart. **Hypertension**. v. 31, p. 1111 – 1117, 1998.

**DE LUCA JR. , L.A.; GALAVERNA, O.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N.** The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. **Brain Res Bull**., 28:73-87, 1992.

**DENG, Y.; TAN, X.; LI, M.L.; WANG, W.Z.; WANG, Y.K.** Angiotensin-Converting Enzyme 2 in the Rostral Ventrolateral Medulla Regulates Cholinergic Signaling and Cardiovascular and Sympathetic Responses in Hypertensive Rats. **Neurosci Bull**. 35(1):67-78, 2019.

**DOS-SANTOS, R.C.; MONTEIRO, L.D.R.N.; PAES-LEME, B.; LUSTRINO, D.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MECAWI, A.S.; REIS, L.C.** Central angiotensin-(1-7) increases osmotic thirst. **Exp Physiol**, 102:1397-1404, 2017.

**DU BOIS, D.; DU BOIS, E.F.** A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Nutrition**, 5:303-11, 1989.

**ECHEM, C.; COSTA, T.J.D.; OLIVEIRA, V.; GIGLIO, C.L.; LANDGRAF, M.A.; RODRIGUES, S.F.; FRANCO, M.D.C.P.; LANDGRAF, R.G.; SANTOS-EICHLER, R.A.; BOMFIM, G.F.; AKAMINE, E.H.; DE CARVALHO, M.H.C.** Mitochondrial

DNA: A new driver for sex differences in spontaneous hypertension. **Pharmacol Res**, 144:142-150, 2019.

**EDWARDS, C.R.; STEWART, P.M.; BURT, D.; BRETT, L.; MCINTYRE, MA.; SUTANTO, W.S.; KLOE, E.R.; MONDER, C.** Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. **Lancet**, 2: 986-989, 1988.

**EMANUELE, M.A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N.V** Alcohol's effects on female reproductive function. **Alcohol Res Health**, 26:274-81, 2002.

**ELIAS, P.C.L.; ELIAS, L.L.K.,; MOREIRA, A.C.** Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico de diabetes insípido com dosagem da vasopressina plasmática. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 42:198-204, 1998.

**ELY, D.; TURNER, M.; MILSTED A.** Review of the Y chromosome and hypertension. **Braz J Med Biol Res**, 33(6):679-91, 2000.

**EPSTEIN, A.N.** Control of salt intake by steroids and cerebral peptides. **Pharmacol Res**, 25(2):113-24, 1992.

**EVERED, M.D.; ROBINSON, M.M.; ROSE, P.A.** Effect of arterial pressure on drinking and urinary responses to angiotensin II. **Am J Physiol**, 254:269-274, 1988.

**FARBER, S.J.; SCHUBERT, M.; SCHUSTER, N.** The binding of cations by chondroitin sulfate. **J Clin Invest**, 36: 1715-1722, 1957.

**FALLER, C.E.; GUVENCH, O.** Sulfation and cation effects on the conformational properties of the glycan backbone of chondroitin sulfate disaccharides. **J Phys Chem B**, 119: 6063-6073, 2015.

**FILEP, J.; FEJES-TÓTH, G.** Does vasopressin sustain blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats? **Hypertension**, 8(6):514-9, 1986.

**FERREYRA, M.D.; CHIARAVIGLIO, E.** Changes in volemia and natremia and onset of sodium appetite in sodium depleted rats. **Physiol Behav**, 19:197-201, 1977.

**FITZSIMONS JT.** Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, 78: 583– 686, 1998.

**FORSLING, M.L.; BRIMBLE, M.J.; BALMENT, R.J.** The influence of vasopressin on oxytocin-induced changes in urine flow in the male rat. **Acta Endocrinol (Copenh)**. 100(2):216-20, 1982.

**FRINDT, G.; PALMER, L.G.** Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by adrenal steroids: mineralocorticoid and glucocorticoid effects. **Am J Physiol Renal Physiol**, 302(1): 20–26, 2012.

**FUNDER, J.W.** Aldosterone mineralocorticóide receptors and vascular inflammation. **Moll Cell Endocrinology**, 217:263-269, 2004.

**GAVRAS, H. & GAVRAS, I.** Endothelial Function in Cardiovascular Disease: The Role of Bradykinin. **London, England: Science Press**; 1996.

**GERRLING, J.C.; KAWATA, M.; LOEWY, A.D.** Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. **Comp Neurol**, 494(3):515-27, 2006.

**GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D.** Disorders of the testes and male reproductive tract. **Williams Textbook of Endocrinology**, 10 ed. P.R. Larsen, H.M. Kronenberg, S. Melmed and K.S. Polonsky, eds, Saunders, Phyladelphia, p. 709-769, 2003.

**GODIN, B.; TOUITOU, E.** Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Adv Drug Deliv Ver**, 59: 1152–1161, 2007.

**GOULD, E.M.** The effect of ketamine/xylazine and carbon dioxide on plasma luteinizing hormone releasing hormone and testosterone concentrations in the male Norway rat. **Laboratory Animals**. 42: 483-488, 2008.

**GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; JANUSZEWICZ, P.; CANTIN, M.; GENEST, J.** Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, 122(2):593-601, 1984.

**HAANWINCKEL, M.A.; ELIAS, L.K.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.** Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide 102 release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 92(17):7902-7906, 1995.

**HALL, J.E.; GRANGER, I.P.; HESTER, R.L.; COLEMAN, T.G.; SMITH Jr. M.I.; CROSS, R.B.** Mechanisms of escape from sodium retention during angiotensin II hypertension. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.**, 246:F627-F634, 1984.

**HERLITZ, H.; LUNDIN, S.; HENNINH, M.; AURELL, M.; KARLBERG, B.E.; BERGLUND, G.** Hormonal Pattern During Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). **Clin Exp Hypertens**. 4(6):915-35, 1982.

**HOFMEISTER, L.H.; PERISIC, S.; TITZE, J.** Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? **Pflugers Arch**. 467: 551–558, 2015.

**HOSFORD, P.S.; MILLAR, J.; RAMAGE, A.G.; MARINA, N.** Abnormal oxygen homeostasis in the nucleus tractus solitari of the spontaneously hypertensive rat. **Exp Physiol**, 102(4):389-396, 2017.

**HORST B T, CHOUHAN G, MOIEMEN NS, GROVER LM.** Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. **Adv Drug Deliv Ver**, 1;123:18-32, 2018.

**HSU, C.N.; LIN, Y.J.; LU, P.C.; TAIN, Y.L.** Early Supplementation of d-Cysteine or l-Cysteine Prevents Hypertension and Kidney Damage In Spontaneously Hypertensive Rats Exposed to High-Salt Intake. **Mol Nutr Food Res**. 62(2), 2018.

**IKEDA, I.; LIMUNA, K.;TAKAI, M.;YANAGAWA, Y.;KURATA, K.;OGIHARA, T.;KUMAHARA, Y.** Measurement of plasma renin activity by a simple solid phase radioimmunoassay. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 54, p. 423 – 428, 1982.

**JACQUES, J. M.; DEBETS, A.E.; CALLAHAN, M.F.; SMITH, T.L.** Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. **American Journal of Physiology**. 287: H1618–H1624, 2004.

**JASSEN, B.J.; DE CELLE, T.; DEBETS, J.J.; BROUNS, A.E.; CALLAHAN, M.F.; SMITH, T.L.** Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. **American Journal of Physiology**. 287(4):H1618-24, 2004.

**JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L.** The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, 18(3):292-353, 1997.

**JÖHREN, O.; GOLSCH, C.; DENDORFER, A.; QADRI, F.; HÄUSER, W.; DOMINIAK,P.** Differential expression of AT1 receptors in the pituitary and adrenal gland of SHR and WKY. **Hypertension**, 41(4):984-90, 2003.

**JULIUS, S.** Autonomic nervous system dysregulation in human hypertension. **Am J Cardiol.**, 67:B3-B7, 1991.

**JUNG, E.C.; MAIBACH, H.I.** Animal models for percutaneous absorption. **Appl Toxicol**, 35:1-10, 2014.

**KATO, J.; KIDA, O.; KITA, T.; NAKAMURA, S.; SASAKI, A.; KODAMA, K.; TANAKA, K.** Free and bound forms of atrial natriuretic peptide (ANP) in rat plasma: Preferential increase of free ANP in spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone SHR (SHRSP). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 153(3), 1084–1089, 1988.

**KENSICKI, E.; DUNPHY, G.; ELYJ, D.** Estradiol increases salt intake in female normotensive and hypertensive rats **Appl Physiol**, 93: 479–483, 2002.

**KLUSSMANN, E.; MARIC, K.; ROSENTHAL, W.** The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 141:33-95, 2000.

**KOMOLOVA, M.; FRIBERG, P.; ADAMS, M.A.** Altered vascular resistance properties and acute pressure-natriuresis mechanism in neonatal and weaning spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. 59(5):979-84, 2012.

**KOOP, C.; LINZ, P.; DAHLMANN, A.; HAMMON, M.; JANTSCH J.; MÜLLER, D.N.; SCHMIEDER, R.E; CAVALLARO, A.; ECKADT, K.U.; UNDER, M.; LUFT, F.C.; TITZE, J.** <sup>23</sup>Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**, 61: 635–640, 2013.

**KUMTORNRUT, C.; YAMAUCHI, T.; KOIKE, S.; AIBA, S.; YAMASAKI, K.** Androgens modulate keratinocyte differentiation indirectly through enhancing growth factor production from dermal fibroblasts. **J Dermatol Sci**, 93(3):150-158, 2019.

**LANKHORST,S.; SEVERS, D.; MARKÓ, L.; RAKOVA, N.; TITZE, J.; MÜLLER, D.N.; DANSER, A.H.; MEIRACKER, A.H.** Salt sensitivity of angiogenesis inhibition-induced blood pressure rise: role of interstitial sodium accumulation? **Hypertension**, 69(5):919-926, 2017.

**LEWIS, R.M.; BATCHELOR. D.C.; BASSETT, N.S.; JOHNSTON, B.M.; NAPIER, J.; SKINNER, S.J.** Perinatal growth disturbance in the spontaneously hypertensive rat. **Pediatr Res**, 42(6): 758-764, 1997.

**LI, J.; KEMP, B.A.; HOWELL, N.L.; MASSEY, J.; MINZUK, K.; HUANG, Q.; CHORDIA, M.S.; ROY, R.J.; PATRIE, J.T.; DAVOGUSTTO, G.E.; KRAMER, C.M.; EPSTEIN, F.H.; CAREY, R.M.; TAEGTMEYER, H.; KELLER, S.R.; KUNDU, B.K.** Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy. **J Am Heart Assoc**. 19;8(4):e010926, 2019.

**LIARD, J.F.** Effects of intra-arterial arginine-vasopressin infusions on peripheral blood flows in conscious dogs. **Clin. Sci. (Lond)**. v. 71, p. 713-721, 1986.

**LOLAIT, S.J.; O'CARROL, A.M.; MCBRIDE, O.W.; KONIG, M.; MOREL, A.; BROWNSTEIN, M.J.** Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. **Nature**. v. 357, p. 336-339, 1992.

**LOH, S.Y.; SALLEH, N.** Influence of testosterone on mean arterial pressure: A physiological study in male and female normotensive WKY and hypertensive SHR rats. **Physiol Int**, 104(1):25-34, 2017b.

**LOPES-MENEZES, V.C.; DOS-SANTOS, R.C.; FELINTRO, V.; MONTEIRO, L.R.N.; PAES-LEME, B.; LUSTRINO, D.; CASARTELLI, E.A.; VIVAS,L.; MECAWI, A.S.; REIS, L.C.** Acute body sodium depletion induces skin sodium mobilization in female Wistar rats. **Exp Physiol**, 104(12):1754-1761, 2019.



**MACHNIK, A.; NEUHOFER, W.; JANTSCH, J.; DAHLMANN, A.; TAMMELA, T.; MACHURA, K.; PARK, J.K.; BECK, F.X.; MÜLLER, D.N.; DERER, W.; GOSS, J.; ZIOMBER, A.; DIETSCH, P.; WAGNER, H.; ROOIJEN, N.; KURTZ, A.; HILGERS, K.F.; ALITALO, K.; ECKARDT K.U.; LUFT, F.C.; KERJASCHKI, D.; TITZE, J.** Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. **Nat Med**, 15(5):545-52, 2009.

**MACHNIK, A.; DAHLMANN, A.; KOOP, C.; GOSS, J.; WAGNER, H.; ROOIJEN, N.; ECKARDT, K.U.; MÜLLER, D.N.; PARK, J.K.; LUFT, F.C.; KERJASCHKI, D.; TITZE, J.** Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. **Hypertension**, 55(3):755-61, 2010.

**MANDL, A. M.** The phases of the estrous cycle in the adult white rat. **Experimental Biology**, 28: 576-584, 1951.

**MAGNUSSON, K.; MEYERSON, B.** Strain, age and sex differences in the release of vasopressin from the pituitary: A study in the spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rat. **Neuropeptides**, 30(5), 465–470, 1996.

**MANGIAPANE, M.L.; SIMPSON, J.B.** Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin. **Am J Physiol**. 239:382-389, 1980.

**MANZANO-GARCIA, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A.; TELLO-GARCÍA, I.A.; MARTINEZ-LORENZANA, G.; CONDÉS-LARA, M.** The role of peripheral vasopressin 1A and oxytocin receptors on the subcutaneous vasopressin antinociceptive effects. **Eur J Pain**, 22: 511-526, 2018.

**MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P.** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, 62:609-14, 2002.

**MICHELINI, L.C.; KRIEGER, E.M.** Importance of the time course of aortic diastolic calibre dilation for baroreceptor resetting in acute hypertension. **J. Hypertens.** 2:387-389, 1984.

**MINAMI, M.; TOGASHI, H.; SANO, M.; SAITO, I.; NOMURA, A.; KOIKE, Y.; KUROSAWA, M.; SAITO, H.** A chronobiological study of behavioral changes in rats. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, 83(4):363-71, 1984.

**MORRIS, M.; KELLER, M.; SUNDBERG, D.K.** Changes in paraventricular vasopressin and oxytocin during the development of spontaneous hypertension. **Hypertension.** 5(4):476-81, 1983.

**MÜLLER, D.N.; WILCK, N.; HAASE,S.; KLEINewIETFELD, M.; LINKER, R.A.** Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. **Nat Rev Immunol**, 19:243-254, 2019.

**NODA, M.** Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain **Exp Physiol**, 92.3:513–522, 2007.

**NOVOTNÝ, M.; VASILENKO, T.; VARINSKÁ, L.; SMETANA, K. JR.; SZABO, P.; SARISSKÝ, M.; DVORÁNKOVÁ, B.; MOJZIZ, J.; BOBROV, N.; TOPORCEROVÁ, S.; SABOL, F.; MATTHEWS, B.J.; GÁL, P.** ER- $\alpha$  agonist induces conversion of fibroblasts into myofibroblasts, while ER- $\beta$  agonist increases ECM production and wound tensile strength of healing skin wounds in ovariectomised rats. **Exp Dermatol**, 20:703-8, 2011.

**PAES-LEME, B.; DOS-SANTOS, R.C.; MECAWI, A.S.; FERGUSON, A.V.** Interaction between angiotensin II and glucose sensing at the subfornical organ. **J neuroendocrinol**, 30:e1265, 2018.

**PEREIRA-DERDERIAN, D.T.B.; VENDRAMINI, R.C.; MENANI, J.V.; A. DE LUCA JR, L.** Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 298: R1298–R1309, 2010.

**PEREIRA-DERDERIAN, D.T.B.; VENDRAMINI, R.C.; MENANI, J.V.; CHIAVEGATTO, S.; A. DE LUCA JR, L.** Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 310: R15–R23, 2016.

**PERZEOVA, V.; SABOL, F.; VASILENKO, T.; NOVOTNY, M.; KOVAC, I.; SLEZAK, M.; DURKAC, J.; HOLLY, M.; PILATOVA, M.; SZABO, P.; VARINSKA, L.; CRIEPOKOVA, Z.; KUCERA, T.; KALTNER, H.; ANDRÉ, S.; GABIUS, H.J.; MUCAJI, P.; SMETANA, K. JR.; GAL, P.** Pharmacological activation of estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$  differentially modulates keratinocyte differentiation with functional impact on wound healing. **Int J Mol Med**, 37: 21-28, 2016.

**PORCARI, C.Y.; ARAUJO, I.G.; URZEDO-RODRIGUES, L.; DE LUCA, L.A.; MENANI, J.V.; CAEIRO, X.E.; IMBODEN, H.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L.C.; VIVAS, L.; GODINO, A.; MECAWI, A.S.** Whole body sodium depletion modifies AT1 mRNA expression and serotonin content in the dorsal raphe nucleus. **J Neuroendocrinol**. 31:e12703, 2019.

**OKAMOTO K, AOKI K.** Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, 27:282-93,1963.

**OSTROWSKI, N.L.; LOLAIT, S.J.; BRADLEY, D.J.; O'CARROLL, A.M.; BROWNSTEIN, M.J.; YOUNG, W.S.** Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. **Endocrinology**. 131(1):533-5, 1992.

**RABELINK, T.J.; ROTMANS, J.I.** Salt is getting under our skin. **Nephrol Dial Transplant**, 24: 3282–3283, 2009.

**RAMSAY, D. J.** Posterior pituitary gland. In: GREENSPAN, F. S. & FORSHAN, P. H. **Basic and clinical endocrinology**. Los Altos, CS. Lange Medical Publications, p. 120-129, 1983.

**RECKELHOFF, J.F.; ROMERO, D.G.; YANES, C.L.L.** Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. **Physiology (Bethesda)**. 2019 May 1;34(3):178-188. doi: 10.1152/physiol.00035.2018.

**RENDELL, M.S.; MILLIKEN, B.K.; BANSET, E.J.; FINNEGAN, M.; STANOSHECK, C.; TERANDO, J.V.** The effect of chronic hypertension on skin blood flow. **J Hypertens**, 14(5):609-14, 1996.

**ROMERO, M.; CANIFFI, C.; BOUCHET, G.; COSTA, M.A.; ELESGARAV, R.; ARRANZ, C.; TOMAT, A.L.** Chronic treatment with atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats: beneficial renal effects and sex differences. **PLoS One**. 10(3):e0120362, 2015.

**SARANTEAS, T.; ZOTOS, N.; CHANTZI, C.; MOUROZIZ, C.; RALLIS, G.; ANAGNOSTOPOLOU, S.; TESSEROMATIS, C.** Ketamine-induced changes in metabolic and endocrine parameters of normal and 2-kidney 1-clip rats. **European Journal of Anaesthesiology**. 22(11):875-878.

**SANTOLLO, J.; DANIELS, D.** Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. **Front Syst Neurosci**, 9:25, 2015.

**SAXENA, T.; ALI, A.O.; SAXENA, M.** Pathophysiology of essential hypertension: an update. **Expert Rev Cardiovasc Ther.** 16:879-887, 2018.

**SCHAFFLHUBER, M.; VOLPI, N.; DAHLMANN, A.; HILGERS, K.F.; MACCARI, F.; DIETSCH, P.; WAGNER, H.; LUFT, F.C.; ECKARDT, K.U.; TITZE, J.** Mobilization of osmotically inactive Na<sup>+</sup> by growth and by dietary salt restriction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292:F1490-1500, 2007.

**SCHRECKENBERG, R.; HORN, A.M.; DA COSTA REBELO, R.M.; SIMSEKYILMAZ, S.; NIEMANN, B.; LI, L.; ROHRBACH, S.; SCHLÜTER, K.D.** Effects of 6-months Exercise on Cardiac Function, Structure and Metabolism in Female Hypertensive Rats-The Decisive Role of Lysyl Oxidase and Collagen III. **Front Physiol**, 3;8:556, 2017.

**SEGAR, J.L.; GROBE, C.C.; GROBE, J.L.** Fetal storage of osmotically inactive sodium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 318(3):R512-R514, 2020.

**SELVARAJAH, V.; CONNOLLY, K.; MCENIERY, C.; WILKISON, I.** Skin Sodium and Hypertension: a Paradigm Shift? **Curr Hypertens Rep.** 20(11): 94, 2018.

**SIMPSON, J.B.; ROUTTENBERG, A.** Subfornical organ: a dipsogenic site of action of angiotensin II. **Science**, 201:379-381, 1978.

**SOARES, B.D.** Estudo da produção de óxido de cálcio por calcinação do calcário: caracterização dos sólidos, decomposição térmica e otimização paramétrica. **Dissertação: Universidade Federal de Uberlândia**, 383 p., 2007.

**SOMPONPUN, J. S.** Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. **J Neuroendocrinol**, 19(10):809-18, 2007.

**STOKER, S.D.; STRICKER, E.M.; SVED, A.F.** Acute hypertension inhibits thirst stimulated by ANG II, hyperosmolality, or hypovolemia in rats. **Am J Physiol.**, 280:214-224, 2001.

**STRICKER, E.M.; WOLF, G.** Behavioral control of intravascular fluid volume: thirst and sodium appetite. **Ann N Y Acad Sci**, 157:553-568, 1969.

**STRIKER, E.M.; VERBALIS, J.G.** Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. **Am J Physiol.** 250(2 Pt 2):R267-75, 1986.

**STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G.** Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. **Regul Pept.** 66(1-2):83-5, 1996.

**SULLIVAN, J.M.; RATTS, T.E.** Sodium sensitivity in human subjects: Hemodynamic and hormonal correlates. **Hypertension.** 11:717-723, 1988.

**SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; SOBOCINSKA, J.; SADOWSKI, B.** Central dipsogenic effect of vasopressin. **Am J Physiol.** 242(3):R372-9, 1982.

**TANABE, A.; NARUSE, M.; ARAI, K.; NARUSE, K.; YOSHIMOTO, T.; SEKI, T.; IMAKI, T.; KOBAYASHI, M.; MIYAZAKI, H.; DEMURA, H.** Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. **J Endocrinol Invest.** v. 21, n. 10, p. 668 – 672, 1998.

**TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; DEMURA, M.; MIYAMORI, I.; MABUCHI, H.** Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. **Hypertension**. 36(4):495-500, 2000.

**TITZE, J.; KRAUSE, H.; HECHT, H.; DIETSCH, P.; RITTWEGER, J.; LANG, R.; KIRSCH, K.A.; HILGERS, K.F.** Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. **Am J Physiol Renal Physiol**, 283(1):F134-41, 2002.

**TITZE, J.; LANG, R.; ILIES, C.; SCHWIND, K.H.; KIRSCH, K.A.; DIETSCH, P.; LUFT, F.C.; HILGERS, K.F.** Osmotically inactive skin Na storage in rats **Am J Physiol Renal Physiol**, 285: F1108–F1117, 2003.

**TITZE, J.; SHAKIBAEI, M.; SCHAFFLHUBER, M.; SCHULZE-TANZIL, G.; PORST, M.; SHWIND, K.H.; DIERSCH, P.; HILGERS, K.F.** Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na storage in the skin **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 287: H203–H208, 2004.

**TITZE, J.; BAUER, K.; SCHAFFLHUBER, M.; SCHWIND, K.H.; LUFT, F.C.; ECKARDT, K.U.; HILGERS, K.F.** Internal sodium balance in DOCA-salt rats: a body composition study. **Am J Physiol Renal Physiol**, 289(4):F793-802, 2005.

**TITZE, J.** Sodium balance is not just a renal affair. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 23:101-5, 2014.

**VAN IJZENDOORN, M.; VAN DEN BORN J.; HIJMANS, R.; BODDE, R.; BUTER, H.; DAM, W.; KINGMA, P.; MAES, G.; VAN DER VEEN T.; ZIJLSTRA, W.; DIJKSTRA, B.; NAVIS, G.; BOERMA, C.** An observational study on intracutaneous sodium storage in intensive care patients and controls. **PLoS One**. 3;14(10):e0223100, 2019.

**VAN TOL, H.H.; VAN DEN BUUSE, M.; DE JONG, W.; BURBACH, J.P.** Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension. **Brain Res.** 464(4):303-11, 1988.

**VECSEI, P.** Glucocorticoids: Cortisol, Corticosterone and Compounds. Methods of Hormone Radioimmunoassay **Acad. Press**, pp. 767–792, 1979.

**VERBALIS, J.G.; HOFFMAN, G.E.;ROSENBAUM, L.C.;NILAVER, G.; LOH, Y.P.** Generation and characterization of an antiserum directed against neurohypophyseal prohormones. **J Neuroendocrinol.** 3(3):267-72, 1991.

**VERNEY EB.** The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 135(878):25-106,1947.

**VIJANDE, M.; COSTALES, M.; SCHIAFFINI, O. MARIN, B.** Angiotensin-induced drinking: sexual differences. **Pharmacol Biochem Behav**, 8(6):753-5, 1978.

**VISWANATHAN, M.; SAAVEDRA, J.M.** Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. **Peptides**, 13, 783-786, 1992.

**WAKABAYASHI, K.** Stress, Anesthesia and Blood Hormone Levels. **Shibayagi's Academic Information**, 1-10, 2001.

**WANG, H.; SUN, X.; AHMAD, S.; SU,J.; FERRARIO, C.M.; GROBAN, L.** Estrogen modulates the differential expression of cardiac myocyte chymase isoforms and diastolic function.**Mol Cell Biochem**, 456(1-2):85-93, 2019.



**WANG, K.; XU, Y.; YANG, W.; ZHANG, Y.** Insufficient hypothalamic angiotensin-converting enzyme 2 is associated with hypertension in SHR rats. **Oncotarget**, 8:12, 20244-20251, 2017.

**WEINSTEIN, G.D.; MCCULLOUGH, J.L.; ROSS, P.** Cell proliferation in normal epidermis, **J. Invest. Dermatol.** 82 (6) (1984) 623–628, 1984.

**WIIG, H.; SCHRÖDER, A.; NEUHOFER, W.; JANTSCH, J.; KOPP, C.; KARLSEN, T.V.; BOSCHMANN, M.; BRY, M.; RAKOVA, N.; DAHLMANN, A.; BRENNER, S.; TENSTAD, O.; NURMI, H.; MERVAALA, E.; WAGNER, H.; BECK, F.X.; MÜLLER, D.N.; KERJASCHKI, D.; LUFT, F.C.; HARRISON, D.G.; ALITALO, K.; TITZE, J.** Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. **J Clin Invest**, 123: 2803-15, 2013.

**WIIG, H.; LUFT, F.C.; TITZE, J.M.** The interstitium conducts extrarenal storage of sodium and represents a third compartment essential for extracellular volume and blood pressure homeostasis. **Acta Physiol (Oxf)**, 222(3), 2018.

**WOLF, G.; MCGOVERN, J.F.; DICARA, L.V.** Sodium appetite: some conceptual and methodologic aspects of a model drive system. **Behav Biol**, 10, 27-42, 1974.

**WSOL, A.; WOJNO, O.; PUCHALSKA, L.; WRZESIEN, R.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.K.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.** Impaired hypotensive effects of centrally acting oxytocin in SHR and WKY rats exposed to chronic mild stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2019 doi: 10.1152/ajpregu.00050.2019. [Epub ahead of print]

**WSOL, A.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E.; KOWALEWSKI, S.; KOWALEWSKI, S.; PUCHALSKA, L.; CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A.**

Oxytocin differently regulates pressor responses to stress in WKY and **SHR rats**: the role of central oxytocin and V1a receptors. **Stress**. 17(1):117-25, 2014.

**XU, C.; TANA, S.; ZHANG, J.; SEUBERT, C.N.; GRAVENSTEIN, N.; SUMNERS, C.; VASILOPOULOS, T.; MARTYNYUK, A.E.** Anesthesia with sevoflurane in neonatal rats: developmental neuroendocrine abnormalities and alleviating effects of the corticosteroid and Cl<sup>-</sup> importer antagonists. **Psychoneuroendocrinology**. 60:173–181, 2015.

**YAMAMOTO, T.; SASAKI, S.; FUSHIMI, K.; KAWASAKI, K.; YAOITA, E.; OOTA, K.; HIRATA, Y.; MARUMO, F.; KIHARA, I.** Localization and expression of a collecting duct water channel, aquaporin, in hydrated and dehydrated rats. **Exp Nephrol**. 3(3):193-201, 1995.

**YANES, L.L.; ROMERO, D.G.; ILES, J.W.; LLIESCU, R.; GOMEZ-SANCHEZ, C.; RECKELHOFF, J.F.** Sexual dimorphism in the renin-angiotensin system in aging spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 291(2):R383-90, 2006.

**YOUNG, M.; FULLERTON, M.; DILLEY, R.; FUNDER, J.** Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. **J Clin Invest**. v. 93, p. 2578 – 2583, 1994.

**YEN, J.; ADASHI, E.Y.** The ovarian life cycle. **Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999, USA.

**YILMÁZ, A.; BUIJS, F.N.; KASLSBEEK, A.; BUIJS, R.M.** Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus are associated with the development of hypertension. **Chronobiol Int**. 36(8):1072-1087, 2019.