



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS  
SUBMETIDOS AO MODELO DE SOBRECARGA DE SÓDIO PÓS-  
NATAL**

**LAIZA ALENCAR SANTOS BARROS**

**GOIÂNIA-GO**

**2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

Laiza Alencar Santos Barros

#### 3. Título do trabalho

MARCADORES BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE SOBRECARGA DE SÓDIO PÓS-NATAL

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
  - b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Andre Henrique Freiria De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2021, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LÁIZA ALENCAR SANTOS BARROS, Usuário Externo**, em 30/11/2021, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

**LAIZA ALENCAR SANTOS BARROS**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS  
SUBMETIDOS AO MODELO DE SOBRECARGA DE SÓDIO PÓS-  
NATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. André Henrique Freiria Oliveira

**GOIÂNIA-GO**

**2021**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barros, Laiza Alencar Santos  
MARCADORES BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS  
SUBMETIDOS AO MODELO DE SOBRECARGA DE SÓDIO PÓS  
NATAL [manuscrito] / Laiza Alencar Santos Barros. - 2021.  
xvi, 87 f.

Orientador: Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Goiânia, 2021.

Bibliografia.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de tabelas.

1. dieta hipersódica. 2. alterações metabólicas. 3. citocinas. 4.  
hipertensão. I. Freiria-Oliveira, André Henrique, orient. II. Título.

CDU 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº 95 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que confere a **Laiza Alencar Santos Barros** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos dezessete dias do mês de setembro de 2021, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “MARCADORES BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE SOBRECARGA DE SÓDIO PÓS-NATAL”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Andre Henrique Freiria de Oliveira (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Roberto Lopes de Almeida (Centro Universitário FMABC), membro titular externo; Professor Doutor Clayson Moura Gomes (PUC Goiás), membro titular externo; Professor Doutor Daniel Alves Rosa (ICB - UFG), membro titular interno; Professor Doutor Diego Basile Colugnati (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Andre Henrique Freiria de Oliveira, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos dezessete dias do mês de setembro de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Clayson Moura Gomes, Usuário Externo**, em 17/09/2021, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Henrique Freiria De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 17/09/2021, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 17/09/2021, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior**, em 17/09/2021, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Coordenador de Pós-graduação**, em 20/09/2021, às 14:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

## Dedicatória

*Para meus melhores amigos, meus parceiros no projeto da vida, aqueles que me deram raízes profundas o bastante para ter coragem de abrir as asas, Reginaldo e Letícia.*

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFG, pela oportunidade;

Às agências de fomento, FAPEG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para execução deste trabalho;

Aos professores e alunos do CPNFC, pelo apoio; aos colegas do LCCPE, especialmente à Me. Aryanne Batista Soares de Melo, pelo comprometimento, apoio genuíno e por me ensinar a amar os animais. Jamais teria conseguido sem sua ajuda;

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Henrique Freiria Oliveira, por acreditar em mim;

À Profa. Dra. Graziela Torres Blanch, mulher de inúmeros adjetivos, e a quem tenho a sorte de chamar de amiga;

À PUC Goiás, especialmente ao diretor da EMFB, Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel e à coordenadora do curso de Biomedicina, Prof. Dra. Karlla Greick Batista Dias Penna, e ao coordenador do Laboratório de Análises Clínicas, Prof. Dr. Frank Sousa Castro, pelo apoio no uso da estrutura da Escola;

Aos colegas professores e alunos do Laboratório de Fisiologia Aplicada da PUC Goiás, em especial à Me. Monatha Nayara Guimarães Teófilo, pela amizade, disponibilidade e ajuda impagável nas Elisás;

Ao Prof. Dr. Clayson Moura Gomes pela ajuda preciosa nas análises, por ser um exemplo profissional e, principalmente, por não me deixar desistir, por duas vezes;

Aos profs. Dr. Daniel Rosa Alves, Dr. Clayson Moura Gomes e Dra. Elizabeth Pereira Mendes pelas correções na qualificação;

Aos meus pais, seu Lázaro e dona Deusina, por me ensinarem o valor do estudo e do trabalho duro, concomitantes;

À família que estou construindo, Reginaldo e Leticia, por me darem motivos para continuar e tentar ser melhor;

Finalmente, mas não por último, ao único que tudo sabe, àquele para quem a sabedoria humana é loucura. A Deus, o autor da vida, toda a honra e toda a glória.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	vii
Lista de Gráficos e Tabelas .....	ix
Resumo.....	xii
Abstract .....	xiv
Impacto e relevância da pesquisa para a sociedade.....	xvi
1. Introdução.....	18
1.1 Mecanismos de regulação de volume e osmolaridade .....	19
1.2 Consumir muito sal é prejudicial?.....	22
1.3 Hipertensão e imunidade.....	23
1.4 Análises clínicas e sua relevância .....	27
2. Justificativa.....	28
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. Metodologia.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Tratamento com sobrecarga de sódio na fase pós-natal.....	30
4.3 Pletismografia de cauda.....	30
4.4 Coleta de urina.....	31
4.5 Coleta de sangue .....	31
4.6 Análises bioquímicas e hematológicas.....	31
4.6.1 Avaliação dos eletrólitos na urina.....	31
4.6.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma.....	32
4.7 Pesquisa de citocinas.....	32
4.8 Pesquisa de óxido nítrico (NO) no plasma pelo método de Griess .....	33
4.9 Análise estatística.....	33
5. Resultados.....	34

5.1 Ganho de peso e consumo de ração em ratos Holtzman submetidos a tratamento com dieta hipersódica.....	34
5.2 Ingestão de líquidos de ratos Holtzman submetidos ao tratamento hipersódico pós-natal.....	35
5.3 Pletismografia de cauda de ratos Holtzman.....	37
5.4 Análise bioquímica de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica.....	37
5.5 Avaliação hematológica em ratos Holtzman tratados com salina hipertônica.....	40
5.6 Dosagem de citocinas e de óxido nítrico (NO) em ratos Holtzman tratados com dieta hipersódica.....	42
5.7 Análise de urina de ratos Holtzman em tratamento com salina hipersódica.....	44
5.7.1 Volume urinário e de ingestão.....	44
5.7.2 Análise química da urina de Holtzman tratados com salina hipertônica, usando urofito com 10 parâmetros.....	46
5.7.3 Análise bioquímica da urina de 24h, colhida em gaiola metabólica, de ratos Holtzman em tratamento com salina hipertônica.....	47
5.7.4 Avaliação de ureia, creatinina e eletrólitos na urina de ratos Holtzman sob tratamento hipertônico.....	49
5.8 Acompanhamento de ganho de peso e consumo de ração em ratos Wistar submetidos a tratamento com dieta hipersódica.....	50
5.9 Ingestão de líquidos em ratos Wistar sob tratamento hipersódico.....	52
5.10 Pletismografia de cauda de ratos Wistar.....	53
5.11 Análise Bioquímica de ratos Wistar tratados com salina hipertônica.....	54
5.12 Dosagem das citocinas em ratos Wistar tratados com dieta hipersódica.....	57
6. Discussão.....	59
7. Conclusão.....	69

Referências Bibliográficas.....71

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADH: hormônio antidiurético

ALT: alanina aminotransferase

ANGII: angiotensina II

ANP: peptídeo natriurético atrial

AP: área postrema

AST: aspartato aminotransferase

AV3V: região anteroventral do terceiro ventrículo

AVP: arginina vasopressina

Cl<sup>-</sup>: íon cloreto

CVO: órgãos circumventriculares

ECA: enzima conversora de angiotensina

IL: interleucina

K<sup>+</sup>: íon potássio

LEC: líquido extracelular

LIC: líquido intracelular

LT: lâmina terminal

MnPO: núcleo pré-óptico mediano

Na/K ATPase: enzima sódio-potássio ATPase

Na<sup>+</sup>: íons sódio

NO: óxido nítrico

NTS: núcleo do trato solitário

OT: ocitocina

RAS: sistema renina-angiotensina

ROS: espécies reativas de oxigênio

SFO: órgão subfornical

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1: Ganho de peso, em gramas, de ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15), em tratamento com salina hipertônica por 60 dias, após o desmame.....	34
Gráfico 2: Quantidade média de ração ingerida, em gramas, por ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15), em tratamento com salina hipertônica por 60 dias, após o desmame.....	35
Gráfico 3. Ingestão média semanal de líquidos de ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15) tratados com salina hipertônica, após o desmame.....	36
Gráfico 4. Pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica, após o desmame.....	37
Gráfico 5. Resultados de creatinina sérica de ratos Holtzman controle (n=9) e experimentais (n=8) tratados com salina hipertônica, após o desmame.....	39
Gráfico 06. Resultados de sódio sérico de ratos Holtzman controle (n=9) e experimentais (n=7) tratados com salina hipertônica, após o desmame.....	40
Gráfico 07: Dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess, em soro de ratos Holtzman.....	42
Gráfico 08 - Análise das interleucinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF) por ELISA em soro de ratos Holtzman.....	43
Gráfico 09 - Análise das interleucinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) por ELISA, no soro de ratos.....	44
Gráfico 10. Volume de urina em 24 horas de ratos Holtzman, aos 30, 45 e 60 dias de tratamento com salina hipertônica.....	45

Gráfico 11. Volume de líquidos ingeridos em 24h, em gaiola metabólica, de Holtzman, em tratamento com dieta hipersódica.....	46
Gráfico 12. Média dos valores de pH urinário de ratos Holtzman em protocolo com salina hipertônica, aos 30, 45 e 60 dias de tratamento.....	48
Gráfico 13. Valores da média da densidade, em urina de 24h, nos dias 30, 45 e 60 do tratamento, para ratos Holtzman.....	49
Gráfico 14. Peso corporal de ratos Wistar controles e experimentais, submetidos ao tratamento com salina hipertônica.....	51
Gráfico 15. Ingestão média de ração de ratos Wistar, durante o tratamento e recuperação.....	52
Gráfico 16. Ingestão diária de fluídos durante o tratamento e recuperação, de ratos Wistar.....	53
Gráfico 17. PAS e FC dos ratos Wistar ao final do período da recuperação do tratamento com salina hipertônica.....	54
Gráfico 18. Dosagem de IL-6 e TNF sérica em ratos Wistar controles e experimentais tratados com salina 0,3M.....	57
Gráfico 10. Dosagem de IL-10 em ratos Wistar tratados com salina 0,3M.....	58
Tabela 1. Análise bioquímica do soro e plasma de ratos Holtzman, tratados com salina hipertônica, ao desmame.....	38
Tabela 2. Parâmetros hematológicos da série vermelha de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica (Experimentais) e seus controles ( $p > 0,05$ ).....	41
Tabela 3. Parâmetros hematológicos da série branca de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica (Experimentais) e seus controles ( $p > 0,05$ ).....	41
Tabela 4. Resultados dos parâmetros da urofita Bayer Multistix® 10SG em urina de 24h, em ratos Holtzman.....	47
Tabela 5. Eletrólitos urinários em ratos Holtzman tratados com salina hipertônica, após o desmame.....	50

Tabela 6. Marcadores bioquímicos para função renal dos animais Wistar experimentais e controles, sob tratamento com salina hipertônica, após o desmame.55

Tabela 7. Perfil metabólico, com lipidograma e glicemia dos animais experimentais e controles, em protocolo de ingestão de salina hipertônica, após o desmame.....55

Tabela 8. Perfil bioquímico para função hepática dos ratos Wistar experimentais e controles, que foram submetidos a tratamento com salina hipertônica, pós-natal.....56

## RESUMO

Marcadores bioquímicos e inflamatórios em ratos submetidos ao modelo de sobrecarga de sódio pós-natal

Dados da OMS mostram que o consumo de sal pela população excede o indicado, o que pode se tornar uma preocupação em saúde pública, porque, apesar de a ingestão de altos teores de sal ser classicamente associada com a instalação de hipertensão arterial, um ambiente hipersalino leva a uma perturbação osmótica que resultam em múltiplas alterações fisiológicas, nos sistemas renal, nervoso central e imunológico. Apesar de as pesquisas relacionarem aumento da ingestão de sal com disfunções metabólicas, pouco se sabe sobre as consequências de uma dieta hipersódica nas primeiras fases da vida. Esse trabalho teve por objetivo avaliar como a sobrecarga crônica de sódio em ratos jovens, após desmame, interfere em parâmetros cardiovasculares, bioquímicos e imunológicos em duas linhagens de ratos. Grupos experimentais de ratos Wistar e Holtzman foram tratados com salina 0,3 M, enquanto os controles tiveram acesso a água, durante 60 dias. Durante o tratamento, foi feita pletismografia de cauda, para avaliação de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Após o tratamento, um período de recuperação (15 dias) foi realizado com a oferta de água para todos os animais. Em seguida foram colhidas amostras biológicas para análise de parâmetros hematológicos, em sangue total, e parâmetros bioquímicos e imunológicos, em soro e plasma. Contrariamente ao esperado, os ratos Holtzman não apresentaram aumento de PA, nem de FC, após o tratamento com salina hipertônica. E, além de não apresentarem elevação de citocinas inflamatórias, mostraram normalidade para todos os parâmetros bioquímicos pesquisados, exceto pela creatinemia, que foi diminuída (Experimental:  $0,27 \pm 0,07$  mg/dl vs Controle:  $0,46 \pm 0,04$  mg/dl,  $p < 0,05$ ). Já os ratos Wistar desenvolveram hipertensão arterial (Experimental Wistar:  $159,9 \pm 5,2$  mmHg vs. Controle Wistar:  $149,7 \pm 3,2$  mmHg,  $p < 0,05$ ) e aumento da FC (Experimental Wistar:  $412,9 \pm 7,7$  bpm vs. Controle Wistar:  $375,7 \pm 12,9$  bpm,  $p < 0,05$ ), além de apresentarem alterações em parâmetros bioquímicos para função renal, como ureia (Controle:  $44,39 \pm 0,32$  mg/dl e Experimentais:  $49,5 \pm 0,69$  mg/dl), apesar da creatinina baixa (Controle:  $0,96 \pm 0,02$  mg/dl e Experimentais:  $0,68 \pm 0,004$  mg/dl), e função hepática, onde ALT (Controle:

16,26 ± 0,43 mg/dl e Experimentais: 32.63 ± 0,6 mg/dl), e bilirrubinas total e indireta elevadas, elevação nos componentes do lipidograma, e, ainda, hiperglicemia (Controles: 83,63 ± 0,42 mg/dl e Experimentais: 124.2 ± 7,2 mg/dl). Diante disso, podemos reforçar que há variações metabólicas entre linhagens animais, explicando porque os ratos Holtzman não foram sensíveis ao protocolo salino. E, para além disso, as alterações nos parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar nos permitem afirmar que uma dieta hipersódica provoca alterações metabólicas diversas, com envolvimento das funções renal e hepática, além de alterações no metabolismo de lipídeos e carboidratos.

**Palavras-chave:** dieta hipersódica; alterações metabólicas; citocinas; hipertensão

## ABSTRACT

Biochemical and inflammatory markers in rats submitted to the postnatal sodium overload model

WHO data shows that the consumption of salt by the population exceeds what is indicated, which can become a public health concern, because although the ingestion of high salt levels is classically associated with the installation of hypertension, saline environment leads to an osmotic disorder which results in multiple physiological changes in the renal, central nervous and immune systems. Even studies have linked salt overload to metabolic disorders, little is known about the consequences of a hypersodium diet in the early stages of life. Experimental groups (E) of Wistar and Holtzman male rats were treated with 0.3M saline, while the control group (C) had access to water, for 60 days. During the treatment, plethysmography was performed for blood pressure (BP) and heart rate (HR) measurements. After a recover period, when both groups received water, biological samples were taken for analysis of hematological parameters, in blood, and biochemical and immunological parameters, in serum and plasma. Contrary to expectations, the Holtzman rats showed no increase in BP or HR, after hypertonic saline treatment. In addition, they do not increased inflammatory cytokines, and were normal for all biochemical parameters surveyed, except for serum creatinine, with was decreased (E:  $0.27 \pm 0.07$  vs C:  $0.46 \pm 0.04$  mg/dl,  $p < 0.05$ ). On the other hand, Wistar rats developed hypertension (E:  $159.9 \pm 5.2$  mmHg vs. C:  $149.7 \pm 3.2$  mmHg,  $p < 0.05$ ) and increased HR (E:  $412.9 \pm 7.7$  bpm vs. C:  $375.7 \pm 12.9$  bpm,  $p < 0.05$ ). In addition, we found differences in biochemical parameters for renal function, with elevated urea (C:  $44.39 \pm 0.32$  mg/dl and E:  $49.5 \pm 0.69$  mg/dl), and low creatinine (C:  $0.96 \pm 0.02$  mg/dl and E:  $0.68 \pm 0.004$  mg/dl); also differences for liver function, with increased ALT (C:  $16.26 \pm 0.43$  mg/dl and E:  $32.63 \pm 0.6$  mg/dl) and total and indirect bilirubin. Furthermore, components of lipidogram and serum glucose (C:  $83.63 \pm 0.42$  mg/dl and E:  $124.2$  mg/dl) were elevated. Therefore, we can reinforce that there are metabolic variations between animal strains, explaining why the Holtzman rats were not sensitive to the saline protocol. In addition, changes in the biochemical parameters of Wistar rats allow us to state that sodium overload causes

several metabolic diseases, with involvement of renal and liver function, besides to alterations in the metabolism of lipids and carbohydrates.

Keywords: salt overload; metabolic diseases; biochemical markers; cytokines; hypertension

## IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Nesse trabalho, nós estudamos as consequências de se adotar uma dieta rica em sal. Para conseguir isso, trabalhamos em experimentos com animais de duas linhagens diferentes em laboratório, seguindo todas as regras para garantir o bem-estar desses animais.

Depois que os ratos ingeriram salina por 60 dias, nós analisamos o sangue e a urina desses animais e avaliamos os resultados neste documento.

Nossos resultados mostraram que uma dieta rica em sal é capaz de causar hipertensão arterial em um grupo de animais, mas não em todos: alguns não ficaram hipertensos, mesmo ingerindo salina. Isso prova que cada indivíduo tem um metabolismo próprio e responde de forma distinta aos estímulos.

Também analisamos o sistema imunológico dos animais, pois existem provas que a hipertensão se estabelece com o auxílio de algumas células e moléculas da imunidade. Mas, nossos exames não foram capazes de associar alterações na resposta imunológica dos animais com pressão alta.

Os ratos que desenvolveram hipertensão passaram por outros exames laboratoriais no sangue e na urina e os resultados desses exames mostraram que os animais estavam com diabetes e com mal funcionamento nos rins e no fígado.

Sabemos que pessoas com pressão alta podem ter complicações, como infarto e AVC (acidente vascular cerebral), mas nosso trabalho mostra que existem outras complicações, envolvendo vários órgãos e se associando a outras doenças, como o diabetes. Portanto, este estudo é muito importante para ajudar a entender como a hipertensão se estabelece e quais as suas consequências

A partir de nossos dados, a hipertensão deve ser abordada como uma doença metabólica.

Nossos resultados apontam para que diferenças fisiológicas entre as linhagens dos ratos foi protetora para o efeito prejudicial do excesso de sal após o desmame,

assim nosso trabalho contribui para futuras investigações que possam nos indicar tratamentos direcionados para patologias provocada por ingestão exagerada de sal

## 1. Introdução

Os relatos de uso do sal aparecem juntamente com os primeiros registros das civilizações. Sua importância está registrada na História não apenas como conservante e saborizante de alimentos, mas também como ativo econômico capaz de movimentar o comércio entre fronteiras (Grabner *et al.*, 2007).

Quimicamente, o sal de cozinha contém cloreto de sódio, composto resultante da ligação iônica entre íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), mas que se apresentam nas suas formas iônicas, quando em solução, sendo importante fonte de sódio para o organismo (Tito and Canto, 2015).

O sódio ( $\text{Na}^+$ ) é um íon vital na fisiologia humana, pois participa de eventos importantes, como a transmissão de impulsos nervosos, e determina a pressão osmótica nos fluidos orgânicos, uma vez que é o principal íon constituinte do compartimento extracelular (Neto and Neto, 2003; Silverthorn, 2010).

Devido à importância do sódio, a manutenção de sua concentração envolve diversos eventos como ativação do eixo neuroendócrino, com estímulo para produção de hormônios e estímulo dos mecanismos de sede, além de várias interferências na atividade renal, controlando a excreção de água e de sódio (Stricker *et al.*, 2002; Neto and Neto, 2003).

Contudo, níveis aumentados de sódio podem provocar disfunções como a elevação da pressão arterial, de forma pontual ou persistente, alteração na função do sistema imunológico, modificações na atividade do sistema nervoso e até mesmo interferência em vias bioquímicas, como a do metabolismo do colesterol (Martinez-Maldonado, 1991; Binger *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2019).

Apesar do sal de cozinha ser a principal fonte de sódio, condimentos a base de sal e, principalmente, o consumo de alimentos processados industrialmente vem ganhando importância na ingestão de sal pela população brasileira (Sarno *et al.*, 2013).

O sódio participa de processos fisiológicos importantes como controle da osmolaridade, sinalizações celulares de membrana, contração muscular e transmissão de impulsos nervosos (Neto and Neto, 2003). O sódio está em grande quantidade no líquido extracelular (LEC), na concentração de 140 mEq/L, juntamente com íons cloro (100 mEq/L) e potássio ( $\text{K}^+$ ) em menor concentração, ao contrário, do

meio intracelular (LIC), rico em  $K^+$  (140 mEq/L) e pobre em  $Na^+$  e  $Cl^-$ . Essa diferença nas concentrações iônicas entre os compartimentos intra e extracelular é mantida graças à permeabilidade seletiva da membrana plasmática, caracterizando a osmolaridade de cada fluido (Silva and Araújo Costa, 2020).

Desse modo, uma perturbação no estado de repouso da membrana celular origina um fluxo de íons entre os meios intra e extracelular, passando através da membrana. Em células do tecido nervoso, chamadas neurônios, essa perturbação origina um potencial de ação. Devidamente estimulados, canais que permitem a passagem de íons  $K^+$  para fora dos neurônios se abrem, e íons potássio deixam o meio intracelular, ao mesmo tempo que íons sódio entram na célula, por diferença de gradiente, devido à sua alta concentração no LEC. Esse movimento de íons causa desregulação de cargas elétricas nos meios intra e extracelular, e o equilíbrio precisa ser restaurado. Para tanto, entra em ação a sódio-potássio-ATPase, uma proteína que faz transporte através da membrana, com gasto de energia, ou seja, a  $Na^+/K^+$  ATPase transporta esses íons contra seus gradientes de concentração (Krueger-Beck *et al.*, 2011).

Por ser o principal cátion no LEC, o sódio desempenha papel importante na manutenção da osmolaridade dos líquidos corporais. A osmolaridade dos fluidos orgânicos se refere às concentrações de solutos e determina sua capacidade de promover transporte iônico através das membranas celulares, que são semipermeáveis, a fim de manter ou restabelecer o equilíbrio tônico ou osmótico. Desse modo, o volume celular não sofre grandes interferências quando o líquido extracelular se torna hipo ou hipertônico (Neto and Neto, 2003; Silva and Araújo Costa, 2020).

### 1.1 Mecanismos de regulação de volume e osmolaridade

Para que as concentrações iônicas sejam mantidas dentro de valores que garantam o equilíbrio das funções fisiológicas, ou seja, para manter a homeostase, existem mecanismos de controle das concentrações de sódio, como a diurese e o estímulo da sede, envolvendo o controle das quantidades de soluto, e ainda mecanismos de perda e ganho específicos para o sódio, como a natriurese e o apetite ao sódio (Stricker *et al.*, 2001, 2002; Neto and Neto, 2003).

A ativação desses mecanismos depende da sensibilização de grupo celulares especializados em identificar alterações de osmolaridade e volume (osmoreceptores e barorreceptores, respectivamente). Osmoreceptores são encontrados no sistema nervoso central e em regiões periféricas, como vasos renais, intestinais e hepáticos. Já os barorreceptores estão presentes no arco da artéria aorta, em regiões mais delicadas das artérias carótidas internas chamadas seio carotídeo, além dos barorreceptores cardiopulmonares e renais (Bourque and Oliet, 1997; Liard et al., 1984; Mai et al., 2017; Ninomiya et al., 1988; Souza, 2016; Stricker et al., 2001).

Quando esses receptores identificam alterações nas concentrações iônicas ou no volume dos fluidos corporais, esta informação é integrada em regiões centrais chave para o controle da osmolaridade e volume plasmáticos. Órgãos circumventriculares (CVO) são desprovidos de barreira hematoencefálica e por isso tem suas células expostas e sensibilizadas pelas alterações plasmáticas. Assim, órgão subfornical (SFO), núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) são regiões centrais que, quando sensibilizadas por variações osmóticas, atuam nos controles da sede e do apetite ao sódio, pois fazem conexões com hipotálamo, sistema límbico e tronco encefálico (Fitzsimons, 1998; Leib, Zimmerman and Knight, 2016).

Alterações nas taxas de sódio também estimulam o núcleo do trato solitário (NTS), a área postrema (AP) e a lâmina terminal (LT); nesta última, além do MnPO e do SFO, já citados, há envolvimento e do órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2013; Menani *et al.*, 2014; McKinley *et al.*, 2019).

Além de estimularem a sede, osmoreceptores sensibilizados por alterações de tonicidade do LEC ativam conexões encefálicas relacionadas com a produção endócrina (Mahon *et al.*, 1995; Fitzsimons, 1998; dos-Santos *et al.*, 2017). Desse modo, neurônios magnocelulares presentes no hipotálamo são estimulados a liberar arginina vasopressina (AVP), conhecido como hormônio antidiurético (ADH) na fisiologia humana, que atua no sistema renal. A principal ação renal do AVP é aumentar a reabsorção de água, através do aumento da permeabilidade nos túbulos contorcidos distais do néfron e nos ductos coletores da medula renal (Stricker *et al.*, 2002; Aires, 2012; Menani *et al.*, 2014).

Além do AVP, a ocitocina (OT) é outro hormônio hipotalâmico liberado em resposta ao aumento da concentração de sódio. Classicamente associado à fisiologia endócrina da reprodução, agindo no parto e na lactação, a ocitocina também está

relacionada com controle da concentração de sal (Stricker et al., 2002; Molina, 2014). Em 2002, Ventura e cols. encontraram aumento não só de AVP, mas também de ocitocina em resposta à ingestão aumentada de sódio, enquanto Bernal, Mahía & Porto (2007) explicaram que a ocitocina regula o sódio corporal participando do controle da excreção renal desse íon e do estímulo da sede. Esses dados foram reafirmados em uma revisão de literatura, publicada em 2018, por Skinner e cols. Já, Amaral e cols. (2014) demonstraram que, quando há hipernatremia, os nervos renais atuam em conjunto com a ocitocina para provocar vasodilatação renal e natriurese.

Aumento da concentração de sódio também se relaciona com aumento do volume sanguíneo circulante (Mora-Rodriguez and Hamouti, 2012). Esse volume aumentado causa um estiramento nas paredes dos átrios do coração, o que estimula a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), que uma vez lançado na circulação, tem efeitos múltiplos. Causa diminuição do débito cardíaco, pois estimula vasodilatação periférica; inibe a síntese de aldosterona, no córtex das glândulas adrenais; e nos rins, estimula a natriurese por diminuir a reabsorção de sódio nos túbulos renais, além de provocar vasodilatação nas arteríolas aferentes glomerulares, o que termina por aumentar o fluxo sanguíneo nessa região e inibe a secreção da enzima renina (Unger et al., 1990; Epstein et al., 1998; Volpe et al., 2015; Idzikowska & Zielinska 2018; Cannone et al., 2019).

A enzima renina está envolvida em outro mecanismo de controle homeostático, também solicitado nos distúrbios hidroeletrólíticos, o sistema renina-angiotensina (RAS). Aqui, temos um conjunto de células diferenciadas, localizadas na região em que o epitélio dos túbulos contorcidos distais está em contato com a cápsula do glomérulo e com as arteríolas que acessam esse glomérulo, as quais são sensíveis a osmolaridade do fluido tubular e à pressão sanguínea; trata-se da mácula densa. Assim, diminuição na pressão arterial ou diminuição na concentração de sódio, sensibilizam a mácula densa, que estimula a produção de renina pelas células justaglomerulares, na região cortical dos rins (Mulrow, 1989). Lançada na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio, que é um decapeptídeo produzido principalmente pelo fígado, mas também encontrado no tecido adiposo, cérebro, coração, rins, pulmões e vasos sanguíneos (Campbell & Habener, 1987; Sparks et al., 2014). A lise do angiotensinogênio libera angiotensina I, na circulação. Esta sofre ação de outra enzima, a enzima conversora de angiotensina (ECA), resultando em angiotensina II (ANG II), cujas ações são antagônicas às ações do ANP, comentadas anteriormente.

Isso significa que ANG II promove vasoconstrição periférica, estímulo de áreas encefálicas, com aumento de atividade simpática, estímulo da liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, diminuição da taxa de excreção de sódio, e retenção de água, restaurando a pressão arterial (Aires, 2012; Gonzalez-Vicente et al., 2018; Guyton, 2017; Hodge et al., 2002; Meng et al., 1995; Ressler, 2010).

ANG II também participa do estímulo à sede, agindo principalmente sobre o SFO em condições de hipovolemia e hipotensão (Leib, Zimmerman and Knight, 2016).

Estudos mais recentes revelaram um outro eixo do RAS, com efeito regulatório sobre as suas ações já conhecidas. Há evidências que há uma enzima tipo 2 conversora de angiotensina (ECA2), que age sobre angiotensina I e II, resultando em peptídeos chamados ANG (1-7) e ANG (1-9), respectivamente, estruturalmente semelhantes e com meia-vida curta. Esse eixo não clássico do RAS parece agir de forma a regular as ações sistêmicas do RAS, uma vez que a ativação da ECA2 está associada, em modelos experimentais, a diminuição da liberação de citocinas e inibição das vias inflamatórias que resultam em fibroses (Rodrigues Prestes *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2020; Paz Ocaranza *et al.*, 2020);

A atividade reguladora da ECA2 se faz importante na homeostasia, pois a ativação crônica do sistema renina-angiotensina está relacionada com a gênese de doenças como diabetes, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (Sparks *et al.*, 2014; Rein and Bader, 2017).

## 1.2 Consumir muito sal é prejudicial?

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), o consumo de sal deve ser de até 5 g diárias, contudo, mudanças nos hábitos alimentares estão resultando em aumento nesse consumo, devido à incorporação de alimentos processados na dieta (Gillespie *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Teixeira, 2018; Arcand *et al.*, 2019).

Apesar da importância do sódio para a homeostase, níveis aumentados desse íon nos fluidos orgânicos estão associados a distúrbios fisiológicos, como a hipertensão arterial. Contudo, esse não é o único evento; disfunções da glândula tireóide (Leung and Braverman, 2014), alterações na composição da microbiota

intestinal (Smiljanec and Lennon, 2019) e obesidade (Ma, He & MacGregor, 2015; Wójcik & Koziol 2021) foram associados a sódio elevado.

### 1.2.1. Consumo de sal e hipertensão

Segundo a *International Society for Hypertension* (ISH, 2020), a hipertensão arterial é uma doença crônica não transmissível caracterizada quando a medida da pressão arterial sistólica for  $\geq 140$  mmHg e/ou a pressão diastólica for  $\geq 90$  mmHg. Está elencada como uma das principais causas de óbito no mundo, sendo responsável por mais de dez milhões de mortes anuais, em sua maioria resultado de complicações cardiovasculares, segundo dados do *Global Burden of Disease Risk Factor Collaborators* (Stanaway *et al.*, 2018).

A relação entre consumo elevado de sal e desenvolvimento de hipertensão arterial já foi observado até mesmo em crianças, quando Costa & Machado (2010) fizeram essa constatação ao avaliarem crianças em idade escolar, na região Sul do Brasil.

Variações na pressão arterial são, na verdade, mecanismos fisiológicos que tentam reestabelecer a homeostase, sendo, portanto, multifatoriais. Quando ocorre um desequilíbrio na fisiologia circulatória, de qualquer grandeza, vários mecanismos são ativados concomitantemente a fim de restabelecer esse equilíbrio, alguns deles já abordados anteriormente. Assim, temos o importante papel de barorreceptores e osmorreceptores que, uma vez estimulados, solicitam mecanismos de controle da pressão arterial, através de atuação hormonal, promovendo alteração na excreção renal de água ou sódio (Aoyagi *et al.*, 2008; Augustine, Lee and Oka, 2020), com o envolvimento do sistema renina/angiotensina, culminando com vasoconstrição endotelial periférica (Silverthorn, 2010; Aires, 2012). Há também participação de mecanismos de controle central, onde áreas do tronco encefálico são estimuladas e controlam a sede e o apetite ao sódio (Stricker *et al.*, 2001; Andrade-Franzé *et al.*, 2010; Blanch *et al.*, 2013).

### 1.3 Hipertensão e imunidade

O organismo humano possui um conjunto de células e moléculas que atuam na proteção contra agressões, como micro-organismos patogênicos e lesões teciduais. É o chamado sistema imunológico, que é constituído por um componente inato e outro componente adquirido (Sattler, 2017).

A imunidade inata é formada por vários elementos, como barreiras epiteliais que recobrem as partes do corpo em contato com o meio ambiente; esse epitélio possui características histológicas e de acidez próprias de cada sítio anatômico, o que dificulta a entrada, instalação e disseminação de patógenos. A imunidade inata conta também com células capazes de identificar e fagocitar proteínas consideradas não-próprias, ou estranhas ao organismo; são representadas por linhagens de leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, presentes nos tecidos e na circulação. E, finalmente, pertencem à imunidade inata os fatores do Sistema Complemento; são proteínas presentes na superfície de células ou no soro que são ativadas pela presença de estruturas estranhas, e agem em efeito cascata, a fim de causar lise de células infectadas (Parkin and Cohen, 2001; Nicholson, 2016; Fernandez, Gomes, Vegas 2019).

Já a imunidade adquirida se desenvolve após um estímulo específico: uma célula da imunidade inata, que fagocitou e processou o agente estranho, apresenta uma pequena porção antigênica desse estranho (chamado epítipo), exposto em sua proteína de membrana. Esse complexo proteína/epítipo é capaz de estimular leucócitos do tipo linfócitos, que uma vez ativados, proliferam e produzem imunoglobulinas específicas, se forem linfócitos do tipo B (LB), ou, se forem linfócitos do tipo T (LT), estimulam a atividade de outros linfócitos, como as células *natural killer* (NK) (Nicholson, 2016; Bugya *et al.*, 2021).

Os LT são classificados em subpopulações de acordo com o tipo de proteína marcadora expressa em sua superfície e com a ação que executam: linfócitos T *helper* (LTh) são células com uma proteína de superfície do tipo CD4; agem produzindo citocinas (IL) para estimular ou suprimir a reação imunológica. Os linfócitos T citotóxicos (LTc), possuem o marcador CD8 e agem estimulando a lise de células infectadas por parasitas intracelulares. Após remissão da ameaça antigênica, as populações de linfócitos diminuem, resguardando as células de memória, capazes de iniciar mais rápida e eficazmente uma reação imune, caso haja um outro contato com o antígeno que iniciou a reação original (Nicholson, 2016; Bugya *et al.*, 2021).

Citocinas são proteínas produzidas pelas células do sistema imunológico, que agem modulando a ação de outras células ou moléculas, quer sejam do componente inato ou do específico da imunidade. A ação das IL é de complexa classificação, onde cada família (IL1, IL2, IL4, IL10, TNF, INF, etc.) possui múltiplos membros que podem estimular ou restringir a reação imune, e isso pode se alterar, dependendo de cada contexto (Palomo *et al.*, 2015; Braddock *et al.*, 2018; Rose-John, 2018; Neumann, Scheffold and Rutz, 2019).

Entretanto, a ação do sistema imunológico não envolve apenas a proteção do organismo contra agentes estranhos e potencialmente patogênicos. Existem evidências que há um componente imunológico na gênese da hipertensão, envolvendo tanto componentes da imunidade inata, quanto da adquirida.

Analísaram as subpopulações de macrófagos (M1 e M2) em ratos SHR, e observaram o predomínio de macrófagos do tipo M1, associados, portanto, à elevada pressão arterial nesses animais (Harwani, 2018).

Os mecanismos da remodelação tecidual do miocárdio, observada na hipertensão, foram descritos como consequência da ação de mastócitos sobre fibroblastos e outras células inflamatórias, resultando na fibrose cardíaca (Levick *et al.*, 2009). Outros leucócitos, como eosinófilos, basófilos e neutrófilos também já foram associados à hipertensão arterial (Belen *et al.*, 2015; Wenceslau *et al.*, 2015; Sag *et al.*, 2017; Withers *et al.*, 2017).

Os componentes da imunidade adquirida também estão comprovadamente envolvidos na etiologia da hipertensão. Foi demonstrado que a inibição dos receptores capazes de ativar linfócitos T citotóxicos resultou em diminuição da pressão sistólica, em experimentos com hipertensão induzida por Ang II (Vinh *et al.*, 2010). Kirabo *et al.*, (2014) descreveram uma via de ativação dos LT CD8+, por células dendríticas, em ratos hipertensos, e observaram a mesma correspondência em humanos com hipertensão resistente ao tratamento. Nessa via, as células dendríticas ativadas por modificações bioquímicas, resultantes da hipertensão, estimulam a proliferação de células LT CD8+ e produção de IFN e IL-17.

Estudos mostram que sistema imune, através da ativação de citocinas pró-inflamatórias e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), se relaciona com etiologia da hipertensão neurogênica, que é a hipertensão provocada por estímulo do sistema nervoso simpático, e também da hipertensão secundária à ativação do sistema renina-angiotensina (Colombari *et al.*, 2010; Gouraud *et al.*, 2011; Freiria-

Oliveira *et al.*, 2013; Trott and Harrison, 2014; Bomfim *et al.*, 2015; McCarthy *et al.*, 2015; Winklewski *et al.*, 2015).

A citocina IL-4 foi associada à hipertensão pulmonar e à fibrose cardíaca e a transferência de soro com alto teor de IL-17 acelerou o desenvolvimento de hipertensão em ratos SHR (Kassem, Ali and Rhaleb, 2020; Kim *et al.*, 2021). Já Loperena *et al.*, (2018) concluíram que o aumento de IL-6 e de ROS são responsáveis pela ativação dos monócitos que danificam o endotélio, na hipertensão. Shi *et al.* (2010) mostraram que a ativação da micróglia no hipotálamo tem um papel importante na hipertensão neurogênica e a administração de minociclina, um antibiótico com função anti-inflamatória, foi capaz de diminuir a expressão de IL-6 e TNF e aumentar IL-10 no hipotálamo, reduzindo a hipertensão. Ademais, utilizando um adenovírus associado, a superexpressão de IL-10 em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo causou o mesmo efeito anti-hipertensivo da minociclina.

Todas essas evidências comprovam a participação do sistema imune na gênese da hipertensão. Contudo, o estímulo para o início do processo inflamatório traz atualizações interessantes.

Há evidências que as células do sistema imune podem ser ativadas não só pela presença de antígenos, mas também por um ambiente extracelular com alto teor de sódio.

Um ambiente hipersódico cursa com comprometimento de células dendríticas e macrófagos, que participam da imunidade inata; essas células aumentam a expressão de moléculas classicamente pró-inflamatórias, como IL-1, e reduz a produção das anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) (Binger *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2019).

Altos índices de sal também são capazes de interferir na imunidade específica, pois também existe uma relação entre essa condição e a ativação de linfócitos secretores de citocinas pró-inflamatórias, inclusive a interleucina-17. Esses linfócitos, chamados de células Th-17, estão envolvidos em processos de apoptose de células da glia, com aumento de eventos inflamatórios (Giachello *et al.*, 2010); quando Th-17 são ativados sob condições hipersódicas, assumem atividade relacionada à gênese de doenças, como o desenvolvimento de doenças autoimunes, pois sódio elevado é capaz de ativar uma via imunológica importante, a p38/MAPK, envolvendo o fator nuclear 5 de ativação de células T, ou NFAT5 (Wenzel *et al.*, 2019; Kleinewietfeld *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012).

Esse dado é ratificado pelos resultados de pesquisas em modelos experimentais, quando dieta rica em sal é associada a doenças autoimunes, como o desenvolvimento de encefalite autoimune e agravamento da esclerose múltipla (Kleinewietfeld *et al.*, 2013; Farez *et al.*, 2015).

Portanto, além de estar envolvidos na etiologia da hipertensão arterial, níveis de sódio também se associam a alterações no funcionamento do sistema imunológico de forma sistêmica, seja em seu componente inato ou adquirido.

Contudo, não só hipertensão arterial e alterações nas respostas imunológicas são consequências de dieta hipersódica; também encontramos estudos que relacionam alta ingestão de sódio com disfunções em outros sistemas.

Existem evidências de que consumo elevado de sal durante a gestação tem relação com o desenvolvimento de autismo, uma condição do desenvolvimento neurológico, sem causa definida, mas associada a fatores genéticos e ambientais. A relação entre sal e autismo também foi associada a alterações da microbiota intestinal da gestante, em consequência à dieta hipersódica dessa mãe (Choi *et al.*, 2016; Afroz and Alviña, 2019).

Em 2018, um estudo mostrou associação entre teor elevado de sal e alterações nas glicoproteínas da membrana plasmáticas, nas células do músculo liso (Bkaily *et al.*, 2018), enquanto uma meta-análise conduzida por Jürgens & Graudal (2002) observou associação entre dieta rica em sal e variação nas taxas de colesterol sanguíneo, quando indivíduos que se submeteram a uma dieta com teor de sódio diminuído, tiveram mais êxito em reduzir sua colesterolemia do que indivíduos consumindo altos teores de sal. Até mesmo o desempenho acadêmico de estudantes da fase fundamental foi influenciado pela quantidade de sal ingerido (Bleiweiss-Sande *et al.*, 2019).

#### 1.4 Análises clínicas e sua relevância

Para avaliar o estado de saúde de um paciente ou para diagnosticar uma doença podemos realizar um conjunto de testes ou exames, que podem utilizar desde métodos invasivos, como se faz na videolaparoscopia, ou métodos pouco invasivos, como na obtenção de imagem (raios X, ressonância magnética, tomografia

computadorizada) ou nas análises clínicas (Denes *et al.*, 2008; Di Iorgi *et al.*, 2012; Rubin, 2014).

Análises clínicas são um conjunto de exames realizados a partir de uma amostra biológica do paciente (sangue, urina, líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano, etc.) que fornece informações sobre um processo metabólico do organismo, sobre o funcionamento de um órgão, sobre a capacidade de reação imunológica, sobre a presença de um agente patogênico ou mesmo sobre a presença de um tumor (De Castro *et al.* 2001; Di Iorgi *et al.*, 2012).

A diversidade de exames oferecidos também reflete a diversidade de princípios utilizados, que vão desde métodos clássicos, como a coloração de Gram, usada em microbiologia desde o século XIX, até métodos sofisticados em biologia molecular (Brasil, 2001; Morley, 2014).

De acordo com a diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia, o diagnóstico da hipertensão arterial se inicia com a aferição da pressão arterial, no consultório e fora dele, além da investigação de lesões a órgãos-alvo e da presença de doenças associadas. Portanto, os exames laboratoriais são imprescindíveis para o diagnóstico da hipertensão e para o acompanhamento do paciente hipertenso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2009).

Ainda, o acompanhamento de um paciente através de exames laboratoriais mostra-se importante especialmente quando ainda não há manifestação de sinais ou sintomas que façam o clínico suspeitar de alguma doença. A triagem laboratorial é eficaz e barata para apontar um dano futuro, um prognóstico, quando o dano ainda não aconteceu.

## 2. Justificativa

Sabemos, portanto, que a hipertensão arterial é uma doença historicamente conhecida, com desenvolvimento e abordagem terapêutica clássicos, mas continua sendo uma preocupação em saúde pública, talvez porque sua etiologia não esteja completamente compreendida. Ainda existem lacunas no conhecimento das alterações metabólicas da hipertensão, para além dos eventos cardiocirculatórios.

Sabemos, também, que a fisiologia é única para cada indivíduo e o porquê de diferentes reações a um mesmo estímulo não está completamente esclarecido.

Uma forma eficiente, economicamente acessível e minimamente invasiva de avaliar alterações metabólicas é através de exames em análises clínicas, onde testes de bioquímica, hematologia e sorologia podem apontar inconsistências na fisiologia de um órgão ou de uma via metabólica, mesmo antes do estabelecimento da doença.

Contudo, apesar de haver uma relação já bem estabelecida entre o consumo de sal e a hipertensão, são raras as publicações que avaliam as alterações metabólicas identificadas por dosagens séricas bioquímicas e imunossorológicas, em consequência da ingestão aumentada de sódio, especialmente comparando variações de resultados entre indivíduos.

Por isso, este estudo se propõe a realizar um protocolo já padronizado para induzir hipertensão em ratos recém desmamados, que é o procedimento experimental de sobrecarga de sódio, e a partir disso, investigar a relação entre os resultados das dosagens bioquímicas e imunossorológicas, em líquidos biológicos, e a relação com alterações metabólicas secundárias à condição hipersódica e suas possíveis variações entre linhagens diferentes de ratos.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o protocolo de ingestão de salina 0,3M, para instalação de hipertensão arterial em ratos recém desmamados interfere em parâmetros cardiovasculares, morfológicos, bioquímicos e imunológicos, nas linhagens Wistar e Holtzman.

#### 3.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, este trabalho objetiva avaliar se a sobrecarga de sódio, pós desmame, pode afetar:

- a pressão arterial média e a frequência cardíaca de animais;
- a produção de citocinas IL-4, IL-10, IL-6 e TNF em amostras biológicas;
- a dosagem bioquímica de marcadores de função renal (ácido úrico, ureia e creatinina) e função hepática (AST, ALT, bilirrubina total e frações) no sangue coletado;
- a avaliação bioquímica da glicemia plasmática.

## 4. Metodologia

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos das linhagens Holtzman e Wistar, fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) e pelo Biotério Central da UFG, respectivamente. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Goiás (CEUA-023/15).

Os animais foram mantidos com água e ração granulada *ad libitum* em ambiente com temperatura e umidade controlados e ciclo claro/escuro de 12:12 horas.

### 4.2 Tratamento com sobrecarga de sódio na fase pós-natal

Os animais com 21 dias de vida foram desmamados e divididos em dois grupos: controle (n=5) e experimental (n=10). O grupo controle recebeu água e o grupo experimental recebeu somente salina hipertônica (NaCl 0,3 M) durante 60 dias, caracterizando o período de tratamento.

Após esse tratamento, iniciou-se o período de 15 dias de recuperação, quando foi retirada a salina dos experimentais e foi ofertado água para ambos os grupos.

Logo após, ambos os grupos, controle e experimental, recebem oferta de água e salina hipertônica, por 5 dias, determinando o período onde se avalia o apetite ao sódio dos animais.

### 4.3 Pletismografia de cauda

Os animais foram acomodados em um contensor de madeira e um manguito de borracha, acoplado a um esfigmomanômetro, foi posicionado na porção proximal da cauda. Um transdutor de pulso foi posicionado próximo ao manguito e os sinais de pulso foram amplificados (PowerLab; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA) e digitalizados (LabChart; AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA), conforme descrito na literatura (Fink, 2017; Wilde *et al.*, 2017).

#### 4.4 Coleta de urina

Foram coletadas amostras de urina onde os animais acondicionados em gaiolas metabólicas, com livre oferta de ração e líquido (salina hipertônica para o grupo experimental e água para o grupo controle), permaneceram por um período de 24 h após aclimatação prévia. As urinas acumuladas em béqueres foram analisadas quanto ao volume e quanto aos parâmetros do EAS, com tiras próprias (tiras de urina Bayer Multistix® 10SG), de acordo com as normas do fabricante. A urina foi coletada aos 15, 45 e 60 dias de tratamento.

#### 4.5 Coleta de sangue

Ao final dos procedimentos, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (Thiopentax®) (80mg/por peso corporal) e, a seguir, eutanasiados para coleta de sangue, conforme protocolos em vigor à época do procedimento.

Amostras de sangue foram distribuídas em tubos sem anticoagulante (para obtenção de soro) e outros com anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) ou fluoreto de sódio. Os tubos com sangue foram centrifugados à 220G durante 10 minutos, em temperatura de 4°C, para a separação da parte líquida, que foi pipetada cuidadosamente e aliqüotada em eppendorf's, sendo estes acondicionados no freezer -80°C até as dosagens.

#### 4.6 Análises bioquímicas e hematológicas

O soro, o plasma, o sangue total e a urina dos animais foram analisados no Laboratório Análises Clínicas da PUC Goiás, na seção especial para análises animais.

##### 4.6.1 Avaliação dos eletrólitos na urina

A dosagem de eletrólitos cloreto, cálcio, magnésio e fosfato foi realizada na seção especial para análise animal, do Laboratório de Análises Clínicas da PUC Goiás, seguindo as instruções dos manuais dos kits reagentes e as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro, usando comprimentos de onda indicados em cada protocolo.

#### 4.6.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma

A determinação de glicemia, triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade glicose (LDL-c), bilirrubina total, bilirrubina não conjugada, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, ácido úrico e creatinina foram realizadas utilizando kits comerciais enzimáticos colorimétricos (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro 340 a 510 nm. Os testes foram realizados em duplicata.

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLc) foram determinadas de forma indireta conforme Friedewald (1972), semelhante à determinação em amostras humanas.

#### 4.7 Pesquisa de citocinas

As interleucinas (IL) foram pesquisadas por Elisás manufaturas, realizadas no Laboratório de Experimentação Animal, PUC Goiás. A dosagem das citocinas foi avaliada em placas de 96 poços (Jetbiofil) sensibilizadas com o anticorpo específico (anticorpo de captura) para cada citocina. Estes anticorpos foram diluídos em tampão de carbonato pH 9,0 e incubados por 24 horas a 4°C. Ao fim deste tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween e bloqueadas com solução de bloqueio (3% de Soro Bovino Fetal em PBS) à Temperatura ambiente (T.A) por 1 hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-Tween, seguindo-se da adição das amostras (plasma) e dos respectivos padrões de cada citocina analisada, que foram adicionados em duplicata na placa (80 µL/poço), sendo esses padrões diluídos em 80 µL de PBS1X/SBF 3% (diluição seriada) e incubados por 2 horas em T.A. Após esse período, as placas foram lavadas 5X com PBS-Tween, adicionados anticorpos biotilizados específicos de cada citocina e incubados por mais 1 hora.

Ao término do tempo, após lavagem da placa, acrescentou-se 80 µL/poço do conjugado estreptoavidina-peroxidase e incubou-se por mais 30 minutos em T.A. Em seguida, as placas foram lavadas 10X com PBS-Tween, e foi adicionado 50 µL/poço de tetrametilbenzida (TMB) e incubadas por 10 a 15 minutos em T.A.

A reação foi finalizada com a adição de 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Ácido Sulfúrico). A leitura das placas foi realizada em leitora de ELISA (MULTISKAN), no setor de

imunologia do LAC PUC Goiás, utilizando filtro a 450nm com filtro de referência 620nm.

#### 4.8 Pesquisa de óxido nítrico (NO) no plasma pelo método de Griess

A reação de Griess é um método colorimétrico indireto com medição espectrofotométrica de nitritos orgânicos, detectados e analisados pela formação de um produto de coloração vermelho rosado com adição do reativo de Griess. O método não permite a dosagem de nitratos diretamente na amostra, por isso, foi realizado nas amostras plasmáticas o processamento pelo sistema cádmio-cobre.

Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 50 µL de meio RPMI completo nas colunas 1 e 2. Na Linha H dessas colunas, adicionou-se mais 40 µL do meio completo e 10 µL da solução de estoque de nitrito. Foi feita então uma diluição seriada nesses poços, sendo que os poços A1 e A2 da placa foram utilizados como branco.

Nas demais colunas e linhas, adicionou-se 50 µL das amostras (processadas previamente) em duplicata. Em todos os poços da placa adicionou 50 µL do reativo de Griess (1,0% sulfanilamida, 0,1% Naphthyl ethylenediamina em 2,5% de ácido fosfórico). Agitou gentilmente a placa e aguardou 10 minutos. Posteriormente, em uma leitora de microplacas, a leitura foi feita em comprimento de onda de 550 nm.

#### 4.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e foram analisados usando o programa Graph-PadPrism Software versão 6.05 (Inc. San Diego, CA, USA), utilizando teste t não pareado, ANOVA de uma ou duas vias para medidas repetitiva, quando necessário. Os valores foram considerados significativos quando o p foi menor que 0,05.

## 5. Resultados

Todos os dados coletados durante e após o tratamento e recuperação, seguindo a metodologia já descrita, foram analisados e os resultados demonstrados a seguir.

### 5.1 Ganho de peso e consumo de ração em ratos Holtzman submetidos a tratamento com dieta hipersódica

O peso dos animais, a quantidade de ração e o volume de líquido ingeridos foram aferidos diariamente.

Ao final do tratamento, os animais Holtzman experimentais tiveram uma menor média semanal no ganho de peso, comparados aos controles, com significância estatística (Controles:  $8,933 \pm 0,383$  g e Experimentais:  $7,060 \pm 0,443$  g), como demonstrado no gráfico 1. Contudo, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quanto à quantidade média semanal de ração ingerida, apesar de os experimentais consumirem menos (Controles:  $33,91 \pm 2,542$ g e Experimentais:  $32,50 \pm 3,0$  g), conforme o gráfico 2.

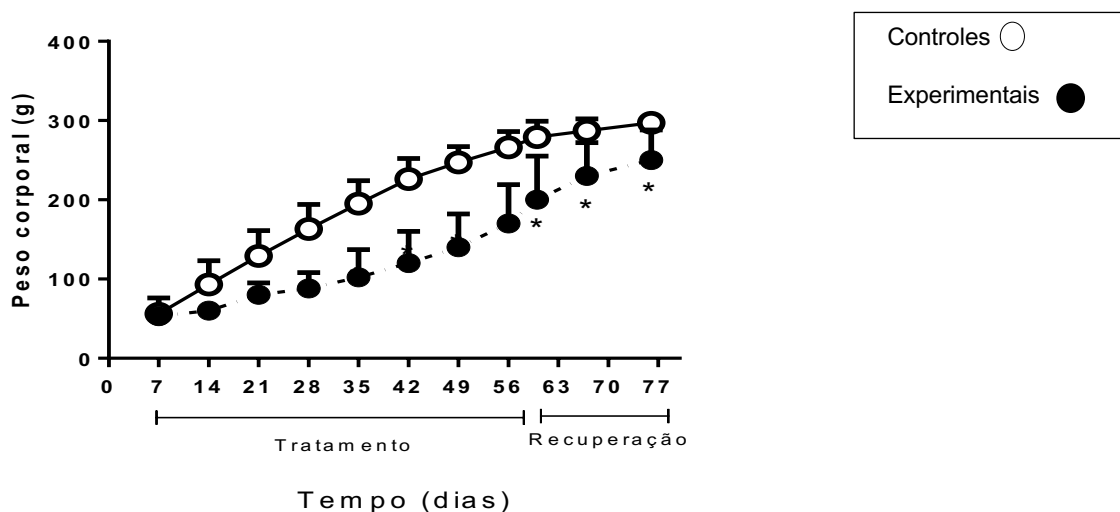


Gráfico 1: Ganho de peso, em gramas, de ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15), em tratamento com salina hipertônica por 60 dias, após o

desmame. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA. \* $p < 0,05$  quando comparados aos controles.

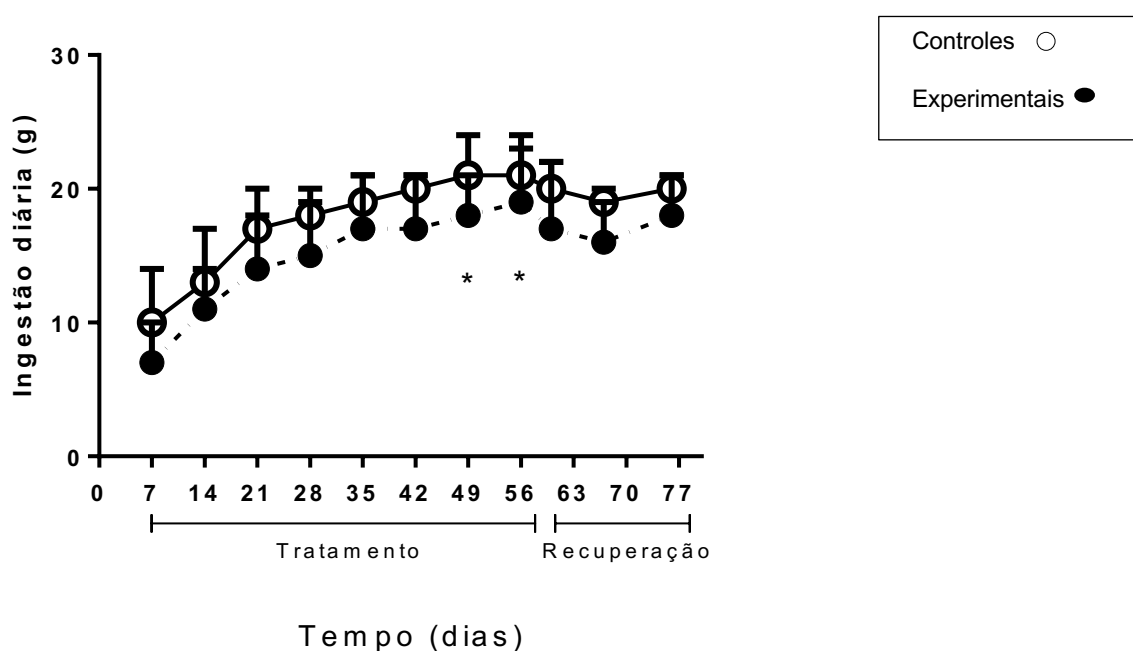


Gráfico 2: Quantidade média de ração ingerida, em gramas, por ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15), em tratamento com salina hipertônica por 60 dias, após o desmame. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA (\* $p < 0,05$ ).

## 5.2 Ingestão de líquidos de ratos Holtzman submetidos ao tratamento hipersódico pós-natal

O gráfico 3 abaixo mostra que os animais experimentais Holtzman ingerem, em média, maior quantidade de líquido que seus controles (Experimentais:  $94,92 \pm 5,99$  mL vs Controles:  $41,83 \pm 3,19$  mL,  $p < 0,001$ ).

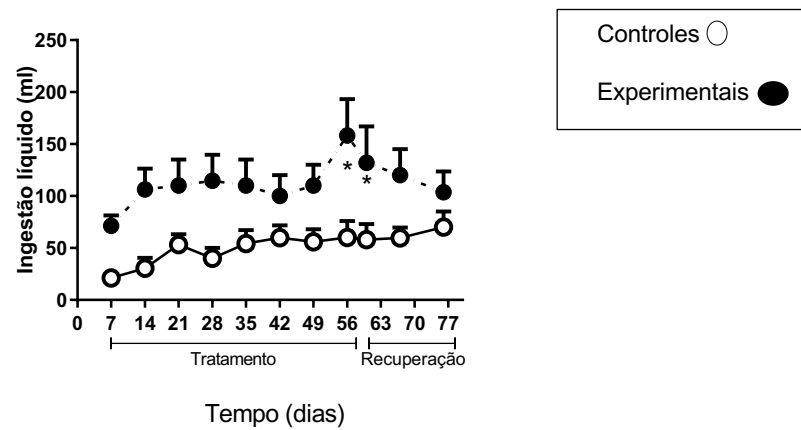


Gráfico 3. Ingestão média semanal de líquidos de ratos Holtzman controles (n=10) e experimentais (n=15) tratados com salina hipertônica, após o desmame. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA, \* $p < 0,05$ .

### 5.3 Pletismografia de cauda de ratos Holtzman

Ao término do tratamento, os animais da linhagem Holtzman foram submetidos a pletismografia de cauda, que revelou que os experimentais não apresentavam alteração significativa de pressão arterial, em relação aos controles (gráfico 4).

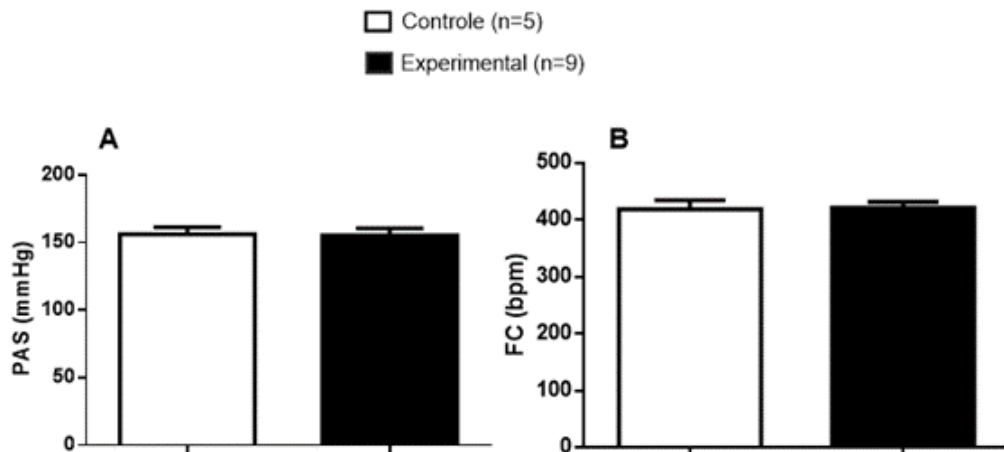


Gráfico 4. Pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica, após o desmame. Dados em média  $\pm$  EPM, analisados pelo teste t não pareado. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental.

### 5.4 Análise bioquímica de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica

Soro e plasma dos animais dos grupos Holtzman controle e experimental foram analisados para diversos parâmetros bioquímicos, quais sejam, glicemia, íons (magnésio, cálcio, cloro, ferro, sódio e potássio), proteínas totais, albumina, lipase, perfil lipídico, provas de função hepática, provas de função renal, além de Proteína C-reativa (PCR). Contudo, apenas sódio e creatinina se mostraram estatisticamente diferentes entre controles e experimentais. Sendo creatinina (Experimental:  $0,27 \pm 0,07$  mg/dl vs Controle:  $0,46 \pm 0,04$  mg/dl,  $p < 0,05$ ) e sódio sérico (Experimental:  $148,3 \pm 1,33$  mmol/L vs Controle:  $142,6 \pm 0,99$  mmol/L,  $p < 0,05$ ), como demonstrado na tabela 1 e nos gráficos a seguir.

Tabela 1. Análise bioquímica do soro e plasma de ratos Holtzman, tratados com salina hipertônica, ao desmame

Analito	Controle	Experimentais	p
	média ± EPM		
Glicose (mg/dL)	187 ± 25,0	150 ± 5,33	0,19
Colesterol total (mg/dL)	55,9 ± 3,51	54,1 ± 3,06	0,71
HDL (mg/dL)	12,0 ± 0,82	11,9 ± 0,61	0,9
LDL (mg/dL)	28,69 ± 2,50	26,25 ± 2,04	0,47
VLDL (mg/dl)	15,2 ± 2,05	16,0 ± 2,43	0,8
Triglicerídeos (mg/dL)	76,0 ± 10,3	80,0 ± 12,2	0,8
AST (U/L)	113,9 ± 8,12	128,1 ± 20,3	0,5
ALT (U/L)	51,44 ± 2,38	45,63 ± 2,52	0,11
Fosfatase alcalina (U/L)	444 ± 29,9	460,0 ± 31,1	0,72
Creatinina (mg/dl)	0,463 ± 0,04	0,272 ± 0,06	0,02*
Uréia (mg/dl)	48,33 ± 2,27	43,63 ± 2,06	0,15
Magnésio (mmol/L)	2,83 ± 0,13	2,81 ± 0,07	0,88
Cálcio (mmol/L)	10,79 ± 11,47	10,45 ± 0,19	0,36
Cloro (mmol/L)	96,33 ± 0,8	97,13 ± 0,93	0,52
Ferro (mmol/L)	168,2 ± 12,9	180,9 ± 7,34	0,42
Potássio (mmol/L)	5,17 ± 0,33	5,16 ± 0,15	0,98
Sódio (mmol/L)	142,6 ± 0,99	148,3 ± 1,39	0,03*
PCR (mg/dl)	0,23 ± 0,02	0,2 ± 0,0	0,2
Proteínas totais (g/dl)	6,49 ± 0,21	6,49 ± 0,6	0,99
Albumina (g/dl)	3,79 ± 0,07	3,65 ± 0,03	0,12
Amilase (U/L)	798,6 ± 33,5	744,0 ± 21,7	0,22

\*p < 0,05

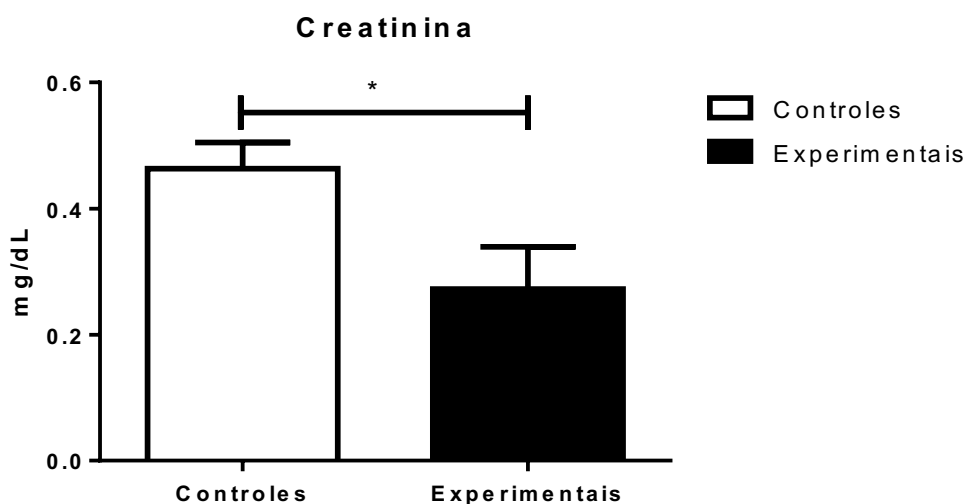


Gráfico 5. Resultados de creatinina sérica de ratos Holtzman controle (n=9) e experimentais (n=8) tratados com salina hipertônica, após o desmame. Média dos valores, com EPM representados por barras verticais. A média dos valores dos experimentais foi significativamente diferente da média dos controles, com  $p < 0,05$ .

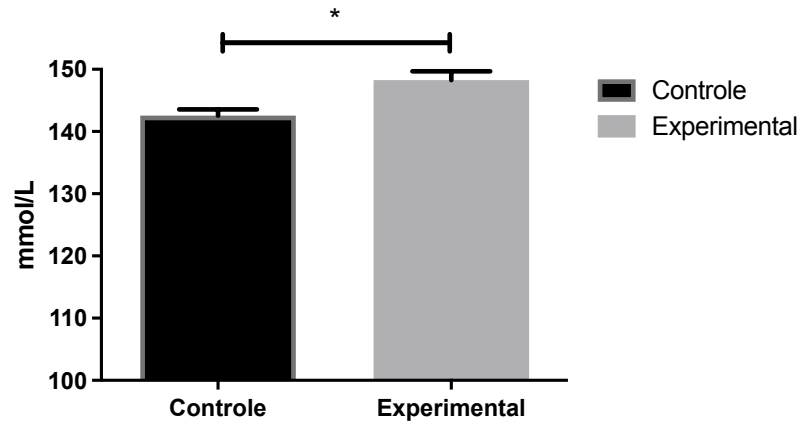


Gráfico 06. Resultados de sódio sérico de ratos Holtzman controle (n=9) e experimentais (n=7) tratados com salina hipertônica, após o desmame. Média dos valores, com EPM representados por barras verticais. A média dos valores dos experimentais foi significativamente diferente da média dos controles, com  $p < 0,05$ .

#### 5.5 Avaliação hematológica em ratos Holtzman tratados com salina hipertônica.

Ao final do período de recuperação, sangue total foi coletado do ventrículo cardíaco esquerdo, em seringa heparinizada, aliquotado e armazenado em geladeira, para realização do hemograma automatizado. Os parâmetros encontrados são demonstrados a seguir, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos da série vermelha de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica (Experimentais) e seus controles ( $p > 0,05$ )

	<b>Controles (n=7)</b>	<b>Experimentais (n=10)</b>
	Média $\pm$ EPM	Média $\pm$ EPM
<b>Hemácias (<math>10^6/ul</math>)</b>	7,890 $\pm$ 0,14	8,126 $\pm$ 0,17
<b>Hematócrito (%)</b>	43,66 $\pm$ 0,59	44,07 $\pm$ 0,92
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	15,06 $\pm$ 0,13	15,31 $\pm$ 0,29
<b>HCM</b>	7,890 $\pm$ 0,14	8,126 $\pm$ 0,17
<b>VCM</b>	55,14 $\pm$ 0,40	54,30 $\pm$ 0,67
<b>HCM</b>	19,07 $\pm$ 0,23	18,88 $\pm$ 0,22
<b>CHCM</b>	34,46 $\pm$ 0,26	34,80 $\pm$ 0,31
<b>RDW</b>	12,27 $\pm$ 0,24	12,27 $\pm$ 0,25
<b>Plaquetas (<math>10^3/ul</math>)</b>	797,9 $\pm$ 33,61	710,0 $\pm$ 59,87

Tabela 3. Parâmetros hematológicos da série branca de ratos Holtzman tratados com salina hipertônica (Experimentais) e seus controles ( $p > 0,05$ )

	<b>Controles (n=7)</b>	<b>Experimentais (n=10)</b>
	Média $\pm$ EPM	Média $\pm$ EPM
<b>Leucócitos (<math>10^3/mm^3</math>)</b>	6,829 $\pm$ 0,82	6,430 $\pm$ 0,84
<b>Linfócitos (%)</b>	83,26 $\pm$ 12,33	95,36 $\pm$ 0,38
<b>Monócitos (%)</b>	0,7429 $\pm$ 0,14	0,7800 $\pm$ 0,13
<b>Neutrófilos (%)</b>	3,343 $\pm$ 0,26	3,610 $\pm$ 0,27
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,2143 $\pm$ 0,04	0,100 $\pm$ 0,03
<b>Basófilos (%)</b>	0,1571 $\pm$ 0,02	0,1500 $\pm$ 0,05

## 5.6 Dosagem de citocinas e de óxido nítrico (NO) em ratos Holtzman tratados com dieta hipersódica

Em seguida foi avaliada a resposta inflamatória, em ratos Holtzman tratados, através da detecção da produção de NO e interleucinas: IL-4, IL-6, IL-10 e TNF.

Na dosagem sérica de NO, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo experimental. A média encontrada no grupo experimental foi de  $2,5722 \mu\text{M}$  ( $\pm 2,3171$ ) de nitrito, já a média do controle foi de  $1,7086 \mu\text{M}$  ( $\pm 0,5901$ ) com o valor de  $p= 0,59$ , demonstrado abaixo.

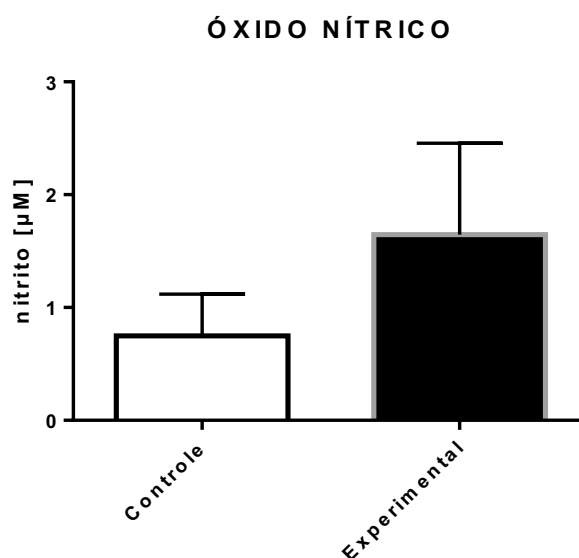


Gráfico 07: Dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess, em soro de ratos Holtzman, controles ( $n=8$ ) e experimentais ( $n=12$ ) expressos em média  $\pm$  EPM, com  $p>0,05$ .

A análise das interleucinas também evidenciou que não há alterações significativas entre o grupo controle e o experimental de ratos Holtzman tratados com salina 0,3 M. Em relação as interleucinas IL-6 e TNF, obtivemos os seguintes resultados: A média do grupo experimental da IL-6 foi de  $0,0294 \text{ ng/mL}$  ( $\pm 0,0536$ ), e a média do grupo controle foi  $0,01699 \text{ ng/mL}$  ( $\pm 0,0065$ ) sendo o valor de  $p= 0,31$ , não significativo. As concentrações detectadas de TNF, tanto no grupo controle como no

grupo experimental, são estatisticamente iguais, além de nenhuma concentração de TNF estar acima do limiar padrão (0,0016 *ng/mL*) (Gráfico 08).

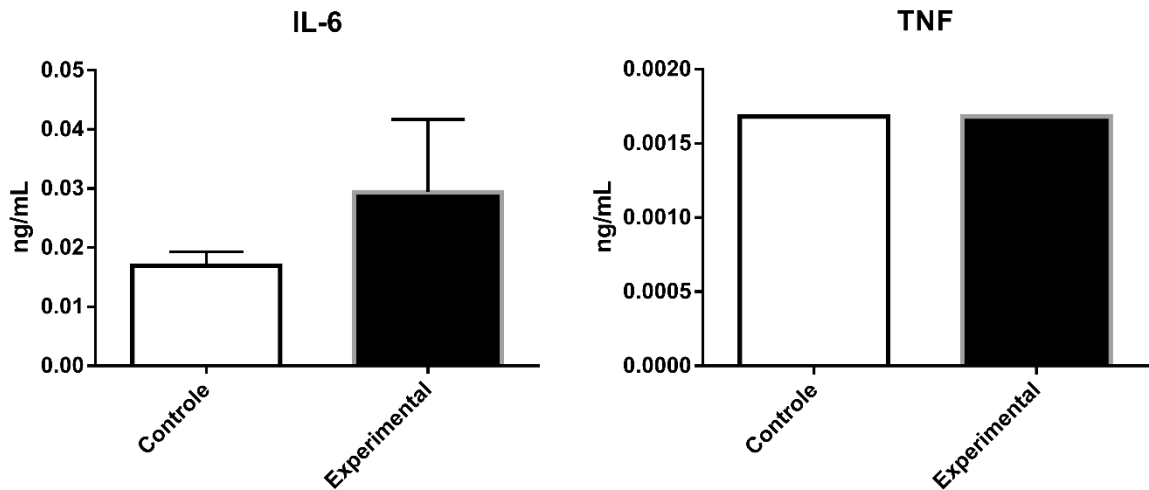


Gráfico 08 - Análise das interleucinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF) por ELISA em soro de ratos Holtzman, controle (n=6) e experimental (n=19), com  $p > 0,05$ .

As interleucinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4, resultaram nos seguintes dados: O grupo experimental da IL-10 obteve média de 0,0732 *ng/mL*, sendo que não houve detecção de nenhuma concentração superior ao limiar padrão (0,0732 *ng/mL*), já a média do grupo controle foi de 0,0849 *ng/mL* ( $\pm 0,0231$ ), com valor de  $p=0,19$ , não sendo significativo. O grupo experimental da IL-4 apresentou média de 0,0191 *ng/mL* ( $\pm 0,0175$ ), o grupo controle apresentou média de 0,0135 *ng/mL* ( $\pm 0,0041$ ), sendo  $p=0,94$ , não significativo (Gráfico 09).

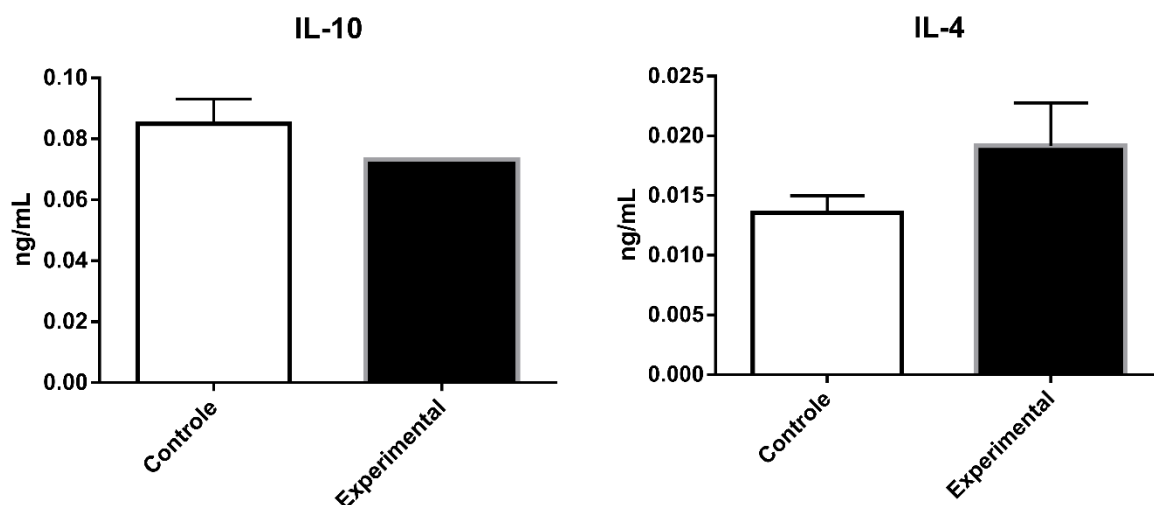


Gráfico 09 - Análise das interleucinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) por ELISA, no soro de ratos controle (n=8) e experimental (n=12), expressos em média  $\pm$  EPM, com  $p > 0,05$ .

## 5.7 Análise de urina de ratos Holtzman em tratamento com salina hipersódica

### 5.7.1 Volume urinário e de ingestão

Durante a fase de tratamento, foram coletadas amostras de urina de 24 horas em gaiola metabólica, aos 30, 45 e 60 dias. Foi feita a mensuração dos volumes, além da análise com fita para urina *Bayer Multistix® 10 SG* e a dosagem dos eletrólitos. O volume urinário dos animais está descrito no Gráfico 10, e comparado por intervalo de tempo de tratamento.

O volume médio de urina dos experimentais foi maior que dos controles para todos os intervalos de tempo analisados, com  $p < 0,05$ . Aos 30 dias de tratamento, o volume urinário médio do controle foi de  $8,67 \pm 2,404$  ml, enquanto o do grupo experimental foi  $34,57 \pm 6,838$  ml. Com 45 dias de tratamento, a média do volume de urina para o grupo controle foi de  $5,133 \pm 2,772$  mL e de  $85,71 \pm 11,10$  mL para o

grupo experimental, com  $p < 0,05$ . Já aos 60 dias de tratamento, a média do volume urinário do grupo controle foi de  $1,917 \pm 1,56$  mL, enquanto para o grupo experimental foi de  $152,9 \pm 14,09$  mL ( $p < 0,05$ ).

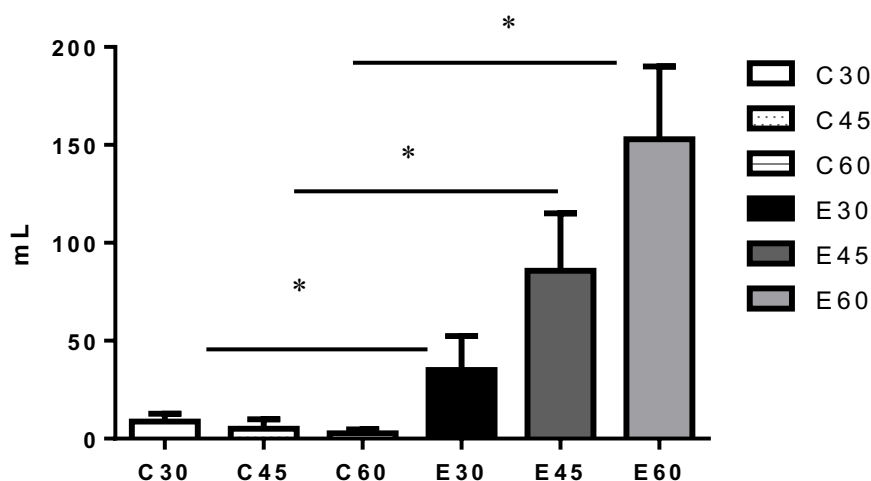


Gráfico 10. Volume de urina em 24 horas, de ratos Holtzman controles (C) e experimentais (E), aos 30, 45 e 60 dias de tratamento com salina hipertônica.

Durante a coleta de urina de 24h, em gaiola metabólica, também foi aferido o volume de líquido ingerido pelos animais. Conforme descrito no gráfico 11, a seguir, o volume médio ingerido pelos experimentais foi maior que o ingerido pelos controles, com  $p < 0,005$ , também em todos os períodos.

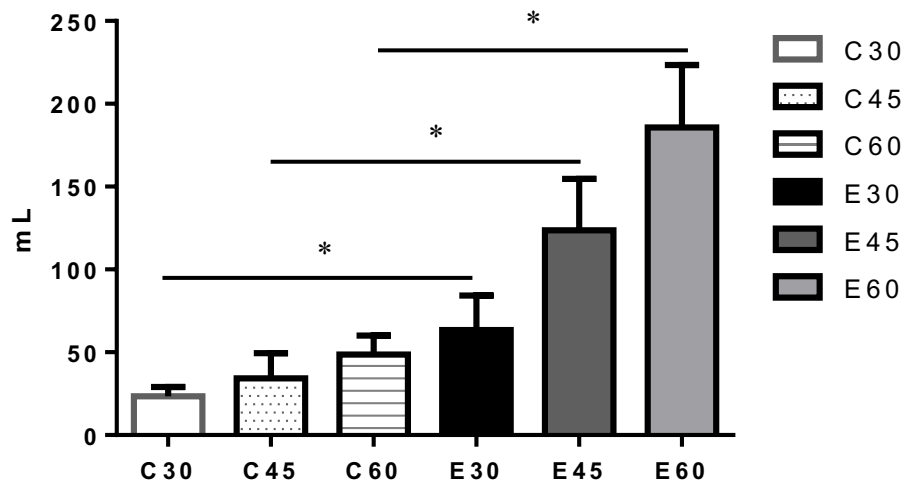


Gráfico 11. Volume de líquidos ingeridos em 24h, em gaiola metabólica, de animais controles (C) e experimentais (E) Holtzman, em tratamento com dieta hipersódica.

#### 5.7.2 Análise química da urina de Holtzman tratados com salina hipertônica, usando urofita com 10 parâmetros

A avaliação da urina, com urofita Bayer Multistix® 10SG, mostrou que os parâmetros nitrito, urobilinogênio, bilirrubina e glicose foram negativos para todos os animais. Dentre parâmetros que resultaram positivo temos leucócitos, proteína e cetonas. Já os valores para o pH e para densidade apresentaram valores variáveis, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados dos parâmetros da urofita Bayer Multistix® 10SG em urina de 24h, em ratos Holtzman controles (C) e experimentais (E) tratados com salina hipertônica

Animal	Leuc <sup>a</sup>	Nitr <sup>b</sup>	Ur <sup>c</sup>	Prot <sup>d</sup>	pH	Sangue	Densd <sup>e</sup>	Cetonas	Bilir <sup>f</sup>	Glic <sup>g</sup>
C <sub>4</sub>	1+	-	-	3+	8,0	-	1020	1+	-	-
C <sub>6</sub>	1+	-	-	3+	8,5	-	1010	1+	-	-
E <sub>3</sub>	2+	-	-	-	6,5	-	1030	-	-	-
E <sub>4</sub>	2+	-	-	-	6,5	-	1030	-	-	-
E <sub>5</sub>	2+	-	-	-	8,5	-	1015	-	-	-
E <sub>6</sub>	1+	-	-	-	6,5	-	1030	-	-	-
E <sub>8</sub>	2+	-	-	-	7,0	-	1030	-	-	-
E <sub>9</sub>	1+	-	-	-	7,0	-	1030	-	-	-
E <sub>10</sub>	2+	-	-	-	6,5	-	1030	-	-	-

a: leucócitos; b: nitrito; c: urobilinogênio; d: proteínas; e: densidade; f: bilirrubina; g: glicose; (-): negativo

### 5.7.3 Análise bioquímica da urina de 24h, colhida em gaiola metabólica, de ratos Holtzman em tratamento com salina hipertônica

O gráfico 12 mostra os valores médios de pH da urina de 24h, de ratos Holtzman, para grupos controle (C) e experimentais (E), tratados com salina hipertônica, aos 30, 45 e 60 dias. No primeiro intervalo de tempo, os valores para C e E foram, respectivamente,  $7,500 \pm 0,2887$  e  $7,143 \pm 0,09221$ , sem significância estatística. Aos 45 dias, os valores são  $7,833 \pm 0,4410$  e  $7,000 \pm 0,1890$  para C e E, com  $p > 0,05$ ; já aos 60 dias de tratamento, o pH do grupo controle foi  $8,250 \pm 0,2500$ , com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do pH dos experimentais que foi  $6,857 \pm 0,2103$ .

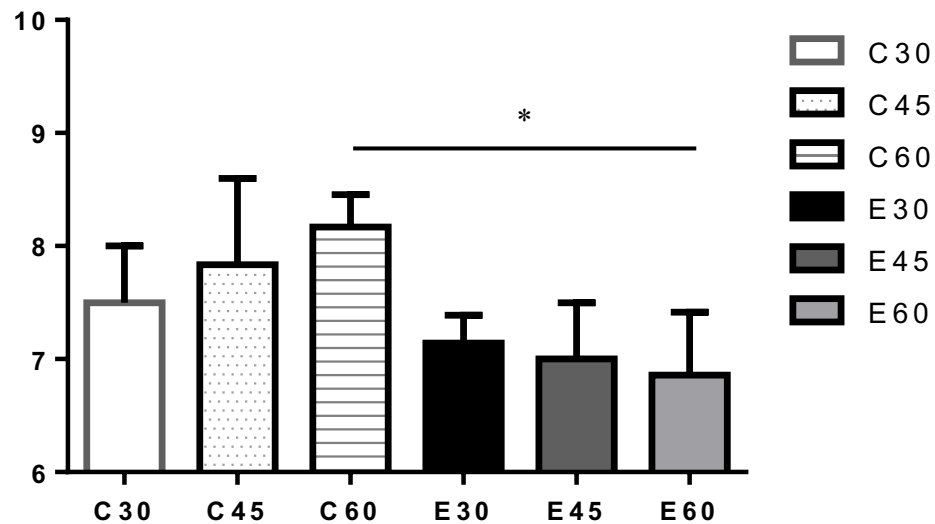


Gráfico 12. Média dos valores de pH urinário de ratos Holtzman C (controle) e E(experimental), em protocolo com salina hipertônica, aos 30, 45 e 60 dias de tratamento.

Quando foi avaliada a média da densidade urinária dos ratos tratados com salina hipertônica, foi encontrada variação significativa, com  $p < 0,05$ , entre controles ( $1023 \pm 3,333$  mg/dL) e experimentais ( $1029 \pm 0,7143$  mg/dL), logo aos 30 dias de tratamento. Aos 45 dias, a densidade do controle foi  $1013 \pm 4,410$  mL e dos experimentais  $1030 \pm 0,0$  mg/dL, com  $p < 0,01$ . Igualmente, aos 60 dias houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pois a densidade dos controles foi  $1015 \pm 5,0$  mg/dL e do grupo experimental foi  $1028 \pm 2,143$  mg/dL, como demonstrado no gráfico 13.

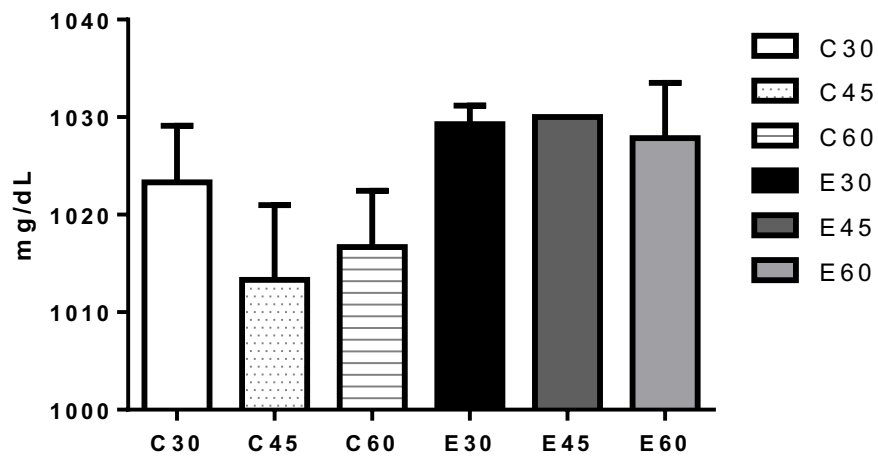


Gráfico 13. Valores da média da densidade, em urina de 24h, nos dias 30, 45 e 60 do tratamento, para ratos Holtzman, grupos controle (C) e experimental (E), em protocolo de salina hipertônica

#### 5.7.4 Avaliação de ureia, creatinina e eletrólitos na urina de ratos Holtzman sob tratamento hipertônico

Na sequência da análise urinária, a tabela a seguir compara as médias, e seus EPMS, dos eletrólitos cálcio, magnésio, fosfato e cloro dos Holtzman tratados, quando observamos que fosfato e cloro divergem entre controles e experimentais, de forma estatisticamente significativa.

Tabela 5. Eletrólitos urinários em ratos Holtzman tratados com salina hipertônica, após o desmame

Eletrólito (mmol/L)	Controles	Experimentais	<i>p</i>
	Média ± EPM		
Cálcio	2,20 ± 1,16	2,23 ± 0,47	0,93
Magnésio	1,75 ± 0,09	1,92 ± 0,08	0,17
Fosfato	8,17 ± 2,21	2,56 ± 1,17	0,05
Cloro	81,17 ± 15,1	193,0 ± 3,64	0,0004

Também para os ratos Wistar, foram coletados dados durante e após o tratamento e recuperação e os resultados estão descritos a seguir.

#### 5.8 Acompanhamento de ganho de peso e consumo de ração em ratos Wistar submetidos a tratamento com dieta hipersódica

Verificamos o ganho de peso corporal destes animais durante todo o protocolo, como pode ser observado no Gráfico 14. O grupo experimental apresentou peso médio menor que a média do grupo controle (Experimental Wistar: 133,0 ± 8,6 g vs. Controle Wistar: 175,9 ± 8,5 g,  $p < 0,05$ ). Durante o período de recuperação os animais experimentais tendem a recuperar o peso, mas não conseguem obter os mesmos valores dos animais controles (Experimental Wistar: 239,1 ± 11,8 g vs. Controle Wistar: 291,8 ± 4,7 g,  $p < 0,05$ ).

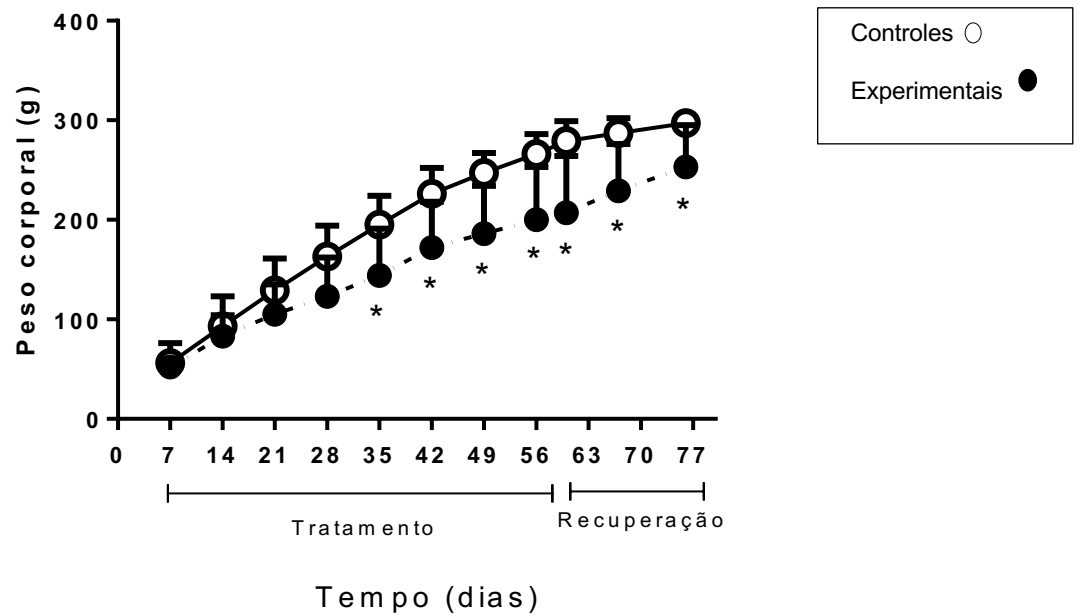


Gráfico 14. Peso corporal de ratos Wistar controles e experimentais, submetidos ao tratamento com salina hipertônica. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA. \* $p < 0,05$  quando comparados aos controles.

No Gráfico 15, podemos observar a ingestão de ração dos ratos Wistar. Os animais do grupo experimental ingerem menos ração em relação ao grupo controle no período do tratamento (Experimental Wistar:  $13,6 \pm 0,8$  g vs. Controle Wistar:  $17,9 \pm 0,8$  g,  $p < 0,05$ ), já no período de recuperação a ingestão se assemelha em ambos os grupos (Experimental:  $20,3 \pm 0,6$  vs. Controle:  $19,7 \pm 0,3$  g).

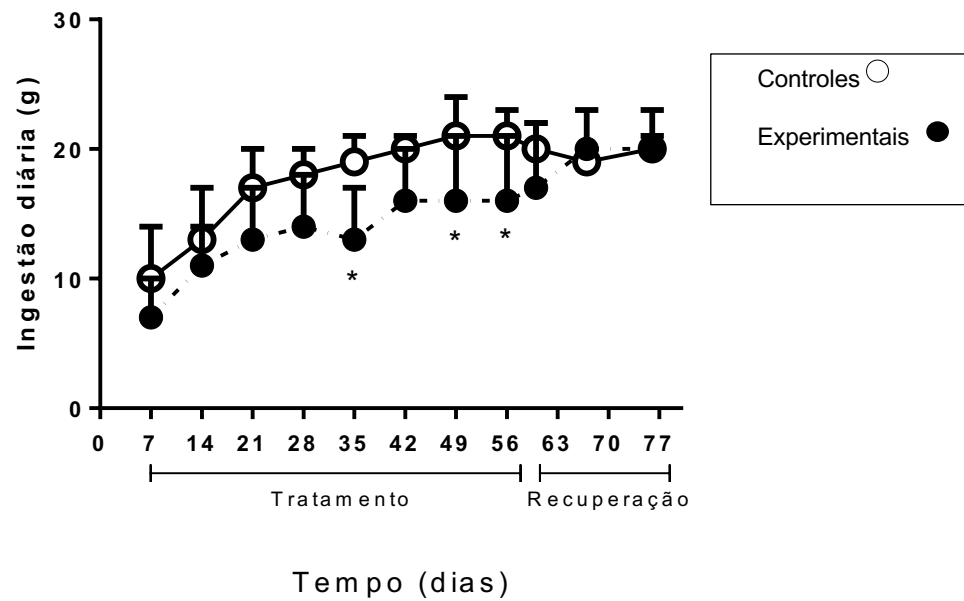


Gráfico 15. Ingestão média de ração de ratos Wistar, durante o tratamento e recuperação de controles (n=9) e experimentais (n=19). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA. \* $p < 0,05$  quando comparados aos animais controle.

### 5.9 Ingestão de líquidos em ratos Wistar sob tratamento hipersódico

Os animais Wistar submetidos a uma sobrecarga de sódio durante a fase pós-natal ingerem mais líquido durante o tratamento quando comparados com o grupo controle (Experimental Wistar:  $84,3 \pm 3,9$  ml vs. Controle Wistar:  $33,0 \pm 1,6$  ml,  $p < 0,05$ ), conforme observado no Gráfico 16. No período de recuperação, os valores não se diferem muito (Experimental Wistar:  $35,2 \pm 1,9$  ml vs. Controle Wistar:  $38,7 \pm 2,0$  ml,  $p < 0,05$ ). Estes dados foram apresentados em quantidade média ingerida por semana.

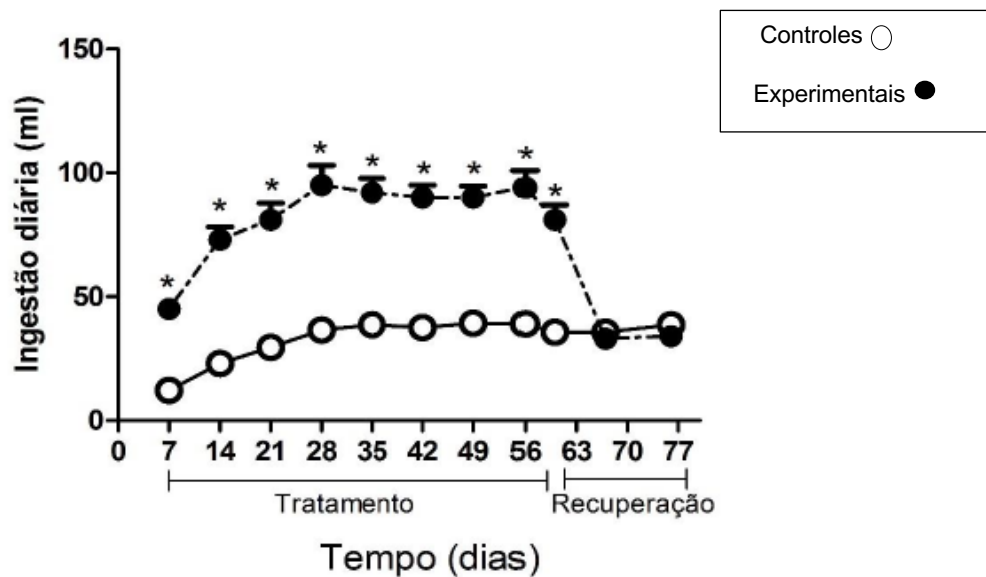


Gráfico 16. Ingestão diária de fluídos durante o tratamento e recuperação, de ratos Wistar controles (n=9) e experimentais (n=19). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados por Two Way ANOVA. \* $p < 0,05$  quando comparados aos animais controle.

#### 5.10 Pletismografia de cauda de ratos Wistar

Após o final do período de recuperação, também foi realizada a pletismografia de cauda do grupo Wistar, para verificar a pressão arterial (PAS) e a frequência cardíaca (FC) dos animais. Podemos observar, pelo gráfico 17, que os animais do grupo experimental apresentaram um aumento significativo na PAS (Experimental Wistar:  $159,9 \pm 5,2$  mmHg vs. Controle Wistar:  $149,7 \pm 3,2$  mmHg,  $p < 0,05$ ) e na FC (Experimental Wistar:  $412,9 \pm 7,7$  bpm vs. Controle Wistar:  $375,7 \pm 12,9$  bpm,  $p < 0,05$ ), quando comparados aos controles.

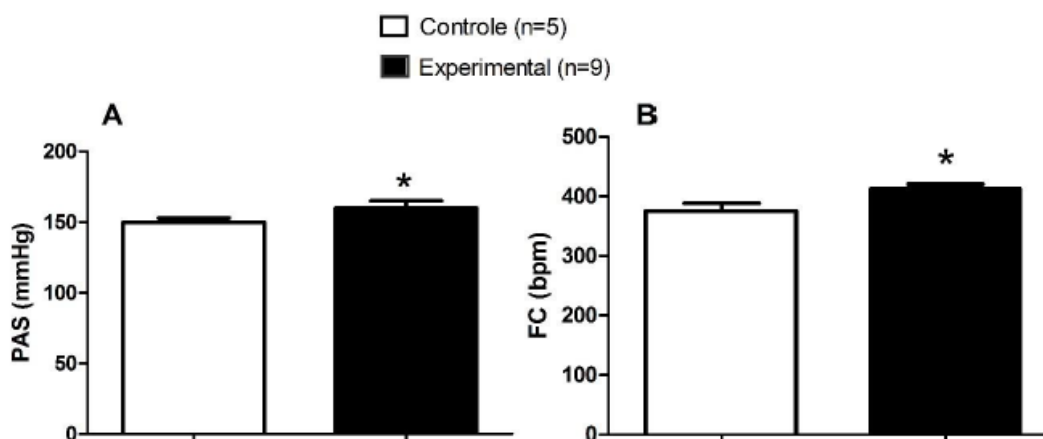


Gráfico 17. PAS e FC dos ratos Wistar ao final do período da recuperação do tratamento com salina hipertônica. Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste t não pareado. \* $p < 0,05$  quando comparados aos animais controle.

### 5.11 Análise Bioquímica de ratos Wistar tratados com salina hipertônica

O soro obtido dos animais Wistar também foi avaliado para diversos parâmetros bioquímicos e os resultados estão demonstrados a seguir.

Na Tabela 6, observam-se os marcadores bioquímicos para função renal dos animais Wistar dos grupos experimental e controle. Os animais experimentais apresentaram níveis significativamente menores de creatinina sérica em relação ao grupo controle (Controle:  $0,96 \pm 0,02$  mg/dl e Experimentais:  $0,68 \pm 0,004$  mg/dl), enquanto a ureia circulante, nos experimentais foi maior que os controles (Controle:  $44,39 \pm 0,32$  mg/dl e Experimentais:  $49,5 \pm 0,69$  mg/dl). Os valores médios de ácido úrico se mantiveram também elevados nos experimentais, contudo, sem diferença estatística (Controle:  $1,72 \pm 0,12$  mg/dl Experimentais:  $1,76 \pm 0,15$  mg/dl).

**Tabela 6.** Marcadores bioquímicos para função renal dos animais Wistar experimentais e controles, sob tratamento com salina hipertônica, após o desmame.

	Controles (n=5)	Experimentais(n=7)	<i>P</i>
	Média ± EPM	Média ± EPM	
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,96 ± 0,02	0,68 ± 0,004	< 0,001
<b>Ureia (mg/dl)</b>	44,39 ± 0,32	49,5 ± 0,69	< 0,001
<b>Ácidoúrico (mg/dl)</b>	1,72 ± 0,12	1,76 ± 0,15	0,83

A Tabela 7 traz o perfil lipídico dos ratos Wistar Controle e Experimentais, submetidos ao protocolo de salina hipertônica, revelando diferença com significado estatístico entre os grupos para todos os parâmetros analisados.

**Tabela 7.** Perfil metabólico, com lipidograma e glicemia dos animais experimentais e controles, em protocolo de ingestão de salina hipertônica, após o desmame.

	Controles	Experimentais	<i>P</i>
	Média ± EPM	Média ± EPM	
<b>GLICOSE (mg/dl)</b>	83,63 ± 0,42	124,2 ± 7,2	< 0,005
<b>TRIGLICÉRIDES (mg/dl)</b>	71,63 ± 2,83	95,74 ± 0,82	< 0,001
<b>COLESTEROL (mg/dl)</b>	61,94 ± 6,57	75,48 ± 0,97	< 0,001
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	16,22 ± 0,07	17,18 ± 0,13	< 0,001
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	30,02 ± 1,18	39,49 ± 0,93	< 0,001
<b>VLDL-c (mg/dl)</b>	15,11 ± 0,50	19,08 ± 0,19	< 0,001

Já na Tabela 8, observa-se aumento significativo na atividade da alanina aminotransferase (ALT) dos experimentais Wistar em relação aos seus controles, mas não mostrou diferença significativa nos valores de aspartato aminotransferase (AST) na mesma comparação. Para os valores de bilirrubina e suas frações, observamos um aumento estatisticamente significativo da bilirrubina total nos experimentais, muito provavelmente devido ao aumento da bilirrubina indireta, apesar de  $p > 0,05$ , uma vez que a fração direta da bilirrubina foi menor nos experimentais que nos controles.

**Tabela 8.** Perfil bioquímico para função hepática dos ratos Wistar experimentais e controles, que foram submetidos a tratamento com salina hipertônica, pós natal.

	Controles(n=5)	Experimentais(n=7)	<i>P</i>
	Média ± EPM	Média ± EPM	
<b>AST/TGO (U/l)</b>	10,16 ± 0,29	9,15 ± 0,68	0,268
<b>ALT/TGP(U/L)</b>	16,26 ± 0,43	32,63 ± 0,6	< 0,001
<b>Bilirrubina total(mg/dl)</b>	1,78 ± 0,008	2,04 ± 0,024	< 0,001
<b>Bilirrubina direta(mg/dl)</b>	0,438 ± 0,005	0,19 ± 0,024	< 0,001
<b>Bilirrubina indireta(mg/dl)</b>	1,35 ± 0,006	1,70 ± 0,14	0,06

### 5.12 Dosagem das citocinas em ratos Wistar tratados com dieta hipersódica

Ao final do tratamento, o soro dos animais Wistar foi analisado para a pesquisa das citocinas TNF, IL-4, IL-6 e IL-10, pela técnica de Elisa, conforme descrito na metodologia.

A análise das interleucinas, contudo, não evidenciou alterações entre os grupos controle e experimental Holtzman tratados com salina 0,3 M, conforme os gráficos abaixo.

A Elisa para IL-6 revelou concentrações de  $0,099 \pm 0,0406$  ng/mL para os controles e de  $0,139 \pm 0,0627$  ng/mL para o grupo experimental, mas com  $p=0,44$ ; na pesquisa de IL-10 observamos valores de  $0,605 \pm 0,126$  ng/mL para os controles e de  $0,651 \pm 0,047$  para os experimentais (gráfico 17).

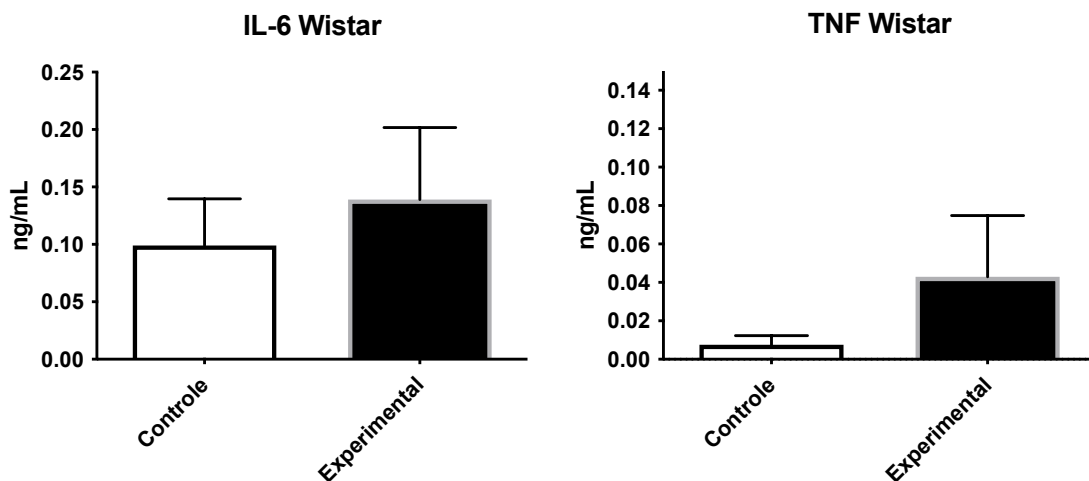


Gráfico 18. Interleucinas IL-6 e TNF no soro de ratos Wistar controles e experimentais tratados com salina 0,3M, expressos em média e EPM, com  $p > 0,05$ .

A seguir, procedeu-se a análise das interleucinas classicamente pró-inflamatórias. IL-4 apresentou valores abaixo do limiar de detecção do ensaio, para ambos os grupos, sendo, portanto, indetectável. Já IL-10 apresentou concentração média de  $0,605 \pm 0,126$  ng/mL para o grupo controle e de  $0,651 \pm 0,047$  ng/mL para o experimental, contudo sem relevância estatística ( $p=0,67$ ), conforme o gráfico 18 abaixo.

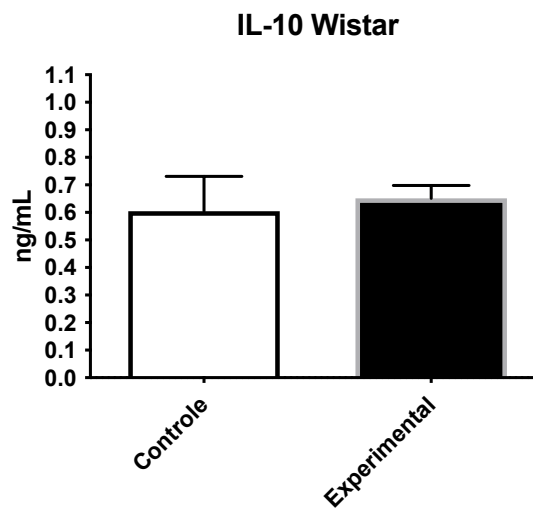


Gráfico 19. Dosagem de IL-10 sérica em ratos Wistar controles e experimentais tratados com salina 0,3M, expressa em média e EPM, com  $p > 0,05$ .

## 6. Discussão

Neste estudo, avaliamos o protocolo de instalação de hipertensão arterial em ratos Holtzman e Wistar, com a ingestão de salina hipertônica (0,3 M), e as consequências desse tratamento nos exames laboratoriais para função hepática, função renal, metabolismo de glicose e de lipídeos, além do perfil imunossorológico, com a dosagem de interleucinas.

Dentre os protocolos experimentais conhecidos para induzir hipertensão (Jr, Jos and Salgado, 2001; Iwamoto, Kita and Katsuragi, 2005; Moreira *et al.*, 2014), usamos um protocolo já validado, em ratos Wistar (Moreira *et al.*, 2014).

Como descrito nos resultados, observamos que os ratos Holtzman experimentais ingerem um volume maior de líquido, durante o tratamento, do que os controles, que têm oferta de água, reproduzindo os resultados, para Wistar, do protocolo (Moreira *et al.*, 2014; Melo, 2016). Isso porque a ingestão da salina aumenta a osmolaridade do líquido extracelular, induzindo a sede.

Essa maior ingestão de líquidos pode estar associada ao menor consumo de ração. Apesar de não observarmos diferença estatisticamente significativa entre experimentais e seus controles para a ingestão de ração, os experimentais Holtzman consomem, em média, menos ração que os controles, resultando em menor ganho de peso dos experimentais que dos controles.

Contudo, ao contrário do esperado com o protocolo, a instalação da hipertensão não foi observada quando submetemos ratos da linhagem Holtzman ao tratamento salino.

Apesar de não haver evidências na literatura de que ratos Holtzman sejam resistentes ao protocolo de sobrecarga de sódio, estudos demonstram que animais de espécies, ou mesmo de linhagens diferentes, apresentam respostas fisiológicas diferentes ao mesmo estímulo. Holtzman são amplamente usados em protocolos para estudo de outros modelos de hipertensão, como renovascular (Blanch *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2019) e hipertensão espontânea (Bergon, 1976; M. R. Melo *et al.*, 2019), além de experimentos de comportamento ingestivo (Melo, 2016; da Silva *et al.*, 2019). Mas, não encontramos relatos do uso desses animais

submetidos ao mesmo protocolo que usamos, quando a dieta hipersódica na fase pós-natal estimula hipertensão arterial.

Em estudo conduzido com várias linhagens de ratos submetidos a um ambiente de estresse, observaram que nem todas as linhagens desenvolveram hipertensão arterial; os autores concluem que as diferenças genéticas entre as linhagens provavelmente expressam reações neuroendócrinas distintas frente a um mesmo estímulo (Henry et al., 1993). Complementarmente, foram relataram diferenças na produção de angiotensina frente a estímulos de diferentes concentrações de NaCl, entre linhagens distinta de ratos (Meng *et al.*, 1995).

Também foi verificado que há respostas diferentes quando se observa a influência do estresse sobre a analgesia em linhagens distintas de ratos (Woolfolk and Holtzman, 1995); e que há uma interação parasita-hospedeiro diferente entre Wistar e Holtzman expostos ao mesmo agente patogênico (Fabrino *et al.*, 2011).

Portanto, podem existir diferenças no metabolismo de linhagens animais distintas, o que pode ser uma hipótese sobre a diferença comportamental em relação aos modelos animais usados (Woolfolk and Holtzman, 1995; Jr, Jos and Salgado, 2001; Broetto-Biazon *et al.*, 2009). O que nos leva a concluir que a linhagem Holtzman é resistente a esse protocolo de indução de hipertensão, e que esses animais têm um metabolismo diferenciado do sódio, confirmando Holtzman et al., (1988) que chamam a atenção para as diferenças do metabolismo e excreção do sódio entre linhagens distintas de ratos.

Complementarmente, a análise bioquímica do soro dos Holtzman apresentou variação entre experimentais e controles apenas para creatinina e sódio séricos. Este último se mostrou elevado nos experimentais muito provavelmente em consequência da ingestão de salina hipertônica (Experimental:  $148,3 \pm 1,33$  mg/dl vs Controle:  $142,6 \pm 0,99$ ,  $p < 0,05$ ), ratificando o que foi discutido acima sobre variações no metabolismo do sódio, nessa linhagem, e permitindo afirmar que Holtzman têm um metabolismo diferenciado para índices aumentados de sódio.

Desse modo, e ainda tentando compreender a relação entre a sobrecarga de sódio, os resultados da bioquímica do soro e o não desenvolvimento de hipertensão arterial, seguimos para a análise da urina dos Holtzman.

Avaliando as análises das urinas de 24h de ratos Holtzman, coletadas em várias etapas do tratamento com salina hipertônica, quais sejam, aos 30, 45 e 60 dias do tratamento, observamos, em primeiro lugar uma diferença importante nos volumes urinários obtidos: os experimentais tem um volume urinário maior que seus controles, em qualquer intervalo de tempo, sendo aos 30 dias, o volume médio de urina de 24h dos controles  $8,67 \pm 2,404$  ml e dos experimentais de  $34,57 \pm 6,838$  ml; aos 45 dias, controle  $5,133 \pm 2,772$  mL e experimentais  $85,71 \pm 11,10$  mL ( $p < 0,05$ ); e aos 60 dias, controle  $1,917 \pm 1,56$  mL, enquanto experimentais foi de  $152,9 \pm 14,09$  mL ( $p < 0,05$ ).

Os volumes urinários refletem o volume de líquido ingerido pelos ratos, enquanto estavam na gaiola metabólica, quando os experimentais ingerem um volume maior, em média, que os controles, com significância estatística para todos os períodos de tempo comparados. Esses dados repetem a situação observada durante todo o tratamento e discutida anteriormente, reforçando que animais em tratamento com solução NaCl 0,3 M como única fonte hídrica, ingerem volume maior que os controles, que tem acesso à água.

Procedemos então à análise da urina de 24h dos ratos Holtzman, inicialmente com uma triagem, através do uso de urofita com 10 parâmetros. A leitura desses resultados, contudo, foi de encontro às normas de controle de qualidade em análises clínicas (SBPC, 2014). De modo que, apesar de gaiolas metabólicas serem um modo eficiente, prático e não invasivo de obtenção de urina, o fato de as amostras ficarem um período tão longo sem refrigeração, fere o recomendado pelas normativas de coletas, além de influenciarem parâmetros como pH, proteínas, nitrito e bilirrubina (SBPC, 2014).

Um outro ponto importante ao se considerar urinas obtidas em gaiolas metabólicas é a contaminação com ração. Esse sedimento pode alterar parâmetros como densidade e pH, pela composição química da ração. Contudo, o jejum é desaconselhado por De Castro et al. (2014), pois a privação de alimento pode alterar a diurese.

Assim, ao contrário do que é estabelecido em rotina para avaliação de urina em humanos, a urofita não é um método confiável para examinar urinas de ratos, colhidas em gaiolas metabólicas.

Continuando as análises urinárias, foram realizadas análises bioquímicas das amostras dos animais Holtzman, quando observamos alterações na excreção de creatinina e fosfato, que estão diminuídos, enquanto ureia e cloreto se mostram aumentados, com diferenças significativas entre os experimentais e seus controles.

Para os íons fosfatos, observamos diminuição na urina de 24h dos experimentais Holtzman, comparados aos controles, com  $p < 0,05$ . O fosfato é encontrado no organismo participando da estrutura de moléculas importantes, como ATP (adenosina trifosfato), mas também é encontrado livre, em sua forma inorgânica, sendo a fonte para produção de macromoléculas que exigem esses íons em sua estrutura. Taxas diminuídas de fosfato, na urina, podem refletir valores séricos baixos (por ingestão ou absorção insuficientes) ou sinalizar distúrbios na reabsorção desse mineral nos túbulos proximais do rim (Stoff, 1982; Yu and Lee, 1987).

Sódio, potássio e cloreto são os eletrólitos mais relevantes na manutenção do metabolismo (Shrimanker and Bhattarai, 2020), mas a taxa de ureia fornece valores preditivos tão relevantes quanto a natriúria, com a vantagem de sofrer menor interferência dos índices de hidratação do organismo (Carvounis, Nisar and Guro-Razuman, 2002; Lima and Macedo, 2018). Em nossos resultados, os experimentais Holtzman excretam maiores taxas de ureia que os controles, com  $p < 0,05$ .

A ureia é produzida no fígado, a partir do metabolismo de proteínas. Valores urinários aumentados de ureia estão classicamente associados à ingestão aumentada de proteínas ou à deficiência de função renal, constituindo um dos marcadores de função dos rins (Murray *et al.*, 2003; Lima and Macedo, 2018). Portanto, a partir desse resultado com elevação da ureia excretada, podemos sugerir uma possível disfunção renal, ou o início do quadro.

Já, os valores diminuídos de creatinina na urina dos experimentais Holtzman refletem os valores plasmáticos desse analito, também diminuídos em relação aos controles. Similarmente, elevação da excreção de íons cloreto também reflete os valores circulantes, resultado da ingestão aumentada da solução de NaCl 0,3 M.

Animais Holtzman tratados também apresentaram variação nos resultados bioquímicos de creatinina sérica, que foram inferiores nos experimentais, comparados aos seus controles (Experimental:  $0,27 \pm 0,07$  mg/dl vs Controle:  $0,46 \pm 0,04$  mg/dl,

$p < 0,05$ ). A diminuição da creatinina sérica é relacionada com situações de lesão ou perda de tecido muscular (KAPLAN, PESCE and KAMIERCZAK, 2003), o que nos leva a observar a relação entre o peso e creatinemia dos ratos, quando o peso dos experimentais é significativamente menor que dos controles.

Assim, para os Holtzman, temos um painel de resultados com diminuição de pH, de creatinina e fosfato inorgânico, e concomitante aumento da ureia e do cloreto urinários, enquanto o soro tem diminuição de creatinina e aumento de  $\text{Na}^+$ . Esses valores reforçam que a sobrecarga de sódio do tratamento, interfere no balanço eletrolítico e na osmolaridade dos líquidos orgânicos desses animais, apesar não ter sido capaz de causar hipertensão. Reforçando que ratos Holtzman possuem mecanismos bioquímicos diferenciados para o sódio.

Além de examinar a urina e a parte líquida do sangue, também avaliamos os elementos celulares do sangue dos animais Holtzman, através do hemograma e do leucograma.

Quando analisamos os resultados do hemograma dos ratos Holtzman, tratados com salina hipertônica, percebemos que os valores médios para o hematócrito (Controles:  $43,66 \pm 0,59$  % e Experimentais:  $44,07 \pm 0,92$  %) são semelhantes àqueles encontrados por Moreira et al. (2014), quando o hematócrito dos controles foi  $43,1 \pm 0,8$  % e dos experimentais foi de  $41,1 \pm 1,3$ %, no mesmo protocolo experimental, embora trabalhando com ratos Wistar.

Nossos valores são também concordantes ao hematócrito de  $44,2 \pm 2,95$ %, encontrado em uma padronização de parâmetros hematológicos para ratos Wistar (Melo et al., 2012). Esses resultados sugerem que a sobrecarga de sódio não influencia nas várias populações de células do sangue, porque, além de não termos alterações na série vermelha, a análise da série branca também não mostrou diferença entre os grupos controle e experimental.

A relevância em estudar a série branca do sangue se explica pelo fato de o sistema imune ser um componente já estabelecido na patogênese da elevação da pressão arterial (Colombari et al., 2010; Gouraud et al., 2011; Bomfim et al., 2015; McCarthy et al., 2015). Além do mais, considerando o protocolo utilizado nesse estudo, o interesse aumenta sob a perspectiva de Kleinewietfeld et al. (2013), quando

demonstraram que altas concentrações de sódio proporcionam o desenvolvimento de linfócitos do tipo helper, que produzem citocinas do tipo 17 (Th-17), que se afirmam importantes na gênese de eventos autoimunes.

Contudo, avaliando óxido nítrico e citocinas séricas pró e anti-inflamatórias, \ não conseguimos estabelecer relação entre ambiente hipersódico e indução de resposta inflamatória nos ratos Holtzman.

Apesar de não encontramos na literatura estudos com metodologia semelhante, pesquisando citocinas séricas por Elisa em ratos Holtzman ou Wistar sob sobrecarga de sódio, exames do tipo Elisa são um excelente método no diagnóstico imunossorológico para identificação de antígenos, anticorpos e hormônios.

Speretta e cols. (2016) utilizaram ratos Holtzman para pesquisa, não de citocinas, mas da expressão de seus RNAm, em áreas cerebrais, avaliando o exercício físico como regulador das doenças cardiovasculares resultantes da obesidade, mas, majoritariamente, trabalhos que relacionam resposta inflamatória e consequências de sobrecarga de sódio usam ratos SHR ou camundongos geneticamente modificados (Fernández-Velasco *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2015; Itani *et al.*, 2016; Norlander *et al.*, 2017).

Contudo, o método Elisa foi utilizado com sucesso para dosar IL-4, IL-6, IL-8, na saliva humana na tese de Gregghi, S.L.A., em 2011.

Com isso em mente, podemos concluir que o limiar de detecção de nossos ensaios não foi sensível o bastante para detectar as citocinas nos soros dos ratos.

Não há evidências sobre o motivo de os ratos Holtzman serem resistentes ao modelo hipersódico. Contudo, diferenças no metabolismo de linhagens animais distintas, pode ser uma hipótese sobre a diferença comportamental em relação ao modelo animal usado (Woolfolk and Holtzman, 1995; Jr, Jos and Salgado, 2001; Broetto-Biazon *et al.*, 2009). O que podemos aventar é que ratos da linhagem Holtzman possuem mecanismos bioquímicos diferenciados para o metabolismo do sódio, conseguindo resistir ao desenvolvimento de hipertensão em ambiente hipersódico e, ainda, desenvolvendo vias imunológicas de compensação, para o controle inflamatório, com o aumento de sódio.

Procedemos, então, a avaliação da linhagem Wistar.

Quando analisamos os resultados dos Wistar, encontramos dados semelhantes àqueles encontrados por Moreira et al. (2014) e por Melo (2016), realizando o mesmo protocolo, com a mesma linhagem: animais experimentais, com oferta de solução de NaCl 0,3 M como única fonte hídrica, ingerem um volume maior de líquido, durante o tratamento, do que os controles, que tem oferta de água. Ainda, experimentais ingerem menos ração, resultando em menor ganho de peso que os controles.

Também concordante com os estudos citados, observamos elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, de forma estatisticamente significativa, mostrando que, ao contrário dos Holtzman, os Wistar são sensíveis ao protocolo de ingestão de salina.

Também contrariamente aos Holtzman, o soro dos animais Wistar experimentais mostrou alterações em vários exames bioquímicos, com alterações de sódio, que foi aumentado, de creatinina, que foi diminuída, e também de ureia, de todas as frações do lipidograma, da bilirrubina direta, alanina aminotransferase e glicose, todos aumentados em relação aos animais controle.

Para os Wistar, a creatinina sérica foi menor nos experimentais, sendo Experimental:  $0,68 \pm 0,004$  mg/dl vs Controle:  $0,96 \pm 0,02$  mg/dl, com  $p < 0,05$ .

Os valores que encontramos na análise da creatinina sérica são diferentes dos valores de de Castro et al., em 2014, em um experimento de padronização de testes laboratoriais, quando a creatinina no soro de animais Wistar foi de  $0,62 \pm 0,02$  mg/dl e também distintos dos valores de Melo et al., (2012) quando a creatinina sérica média de  $0,5 \pm 0,05$  mg/dl foi encontrada também em uma padronização bioquímica em Wistar.

Diferenças entre valores bioquímicos acontecem devido ao uso de metodologias de dosagem diferentes, ou mesmo diferentes reagentes e equipamentos, levado ainda em consideração se a análise foi manual ou automatizada.

Apesar de a mensuração da creatinina sérica ser um valor tão ou mais importante que a medida do *clearance* de creatinina e da taxa de filtração glomerular, para avaliação da função renal (Toffaletti John G and Elizabeth H, 2008; Arnold *et al.*, 2019), nossos dados mostram hipocreatinemia.

Além da associação, já feita na análise dos Holtzman, entre creatinina diminuída e menor massa muscular, por menor ganho de peso dos experimentais, a literatura associa hipocreatinemia com risco aumentado do desenvolvimento de diabetes melito do tipo 2 (Harita *et al.*, 2009; Kashima *et al.*, 2017). O que se relaciona com nossos resultados de glicemia, quando os controles Wistar apresentaram taxa de glicose plasmática de  $83,63 \pm 0,42$  mg/dl e os animais tratados tiveram glicemia de  $124,2 \pm 7,2$  mg/dl, com  $p < 0,05$ .

A hiperglicemia nos Wistar tratados com salina 0,3 M nos permite afirmar que há um distúrbio no metabolismo de glicose secundário à dieta hipersódica, onde um ambiente salino talvez interfira em vias bioquímicas de produção da insulina ou mesmo na ação desse hormônio.

Continuando as análises bioquímicas no soro, foram realizadas dosagens de ureia e ácido úrico que, analisadas em conjunto com a creatinemia, avaliam a função renal. Nossos resultados mostram que, apesar de não ter se mantido a associação estatística, os valores de ácido úrico no soro dos ratos Wistar tratados foi ligeiramente maior ( $1,76 \pm 0,15$  mg/dl) que nos controles ( $1,72 \pm 0,12$  mg/dl), semelhante aos valores de ureia circulante, também aumentados experimentais (Controle:  $44,39 \pm 0,32$  mg/dl e Experimentais:  $49,5 \pm 0,69$  mg/dl), mas com  $p < 0,01$ .

Taxas aumentadas de ureia na circulação são associadas com aumento do metabolismo de proteínas e com disfunção renal, pela incapacidade de retirar esse metabólito do organismo, mas hiperuremia também interfere na produção e na função da insulina (Becker and Friedman, 2013; Xie *et al.*, 2018), reforçando o que já foi colocado.

O ácido úrico aumentado no sangue também pode se relacionar com disfunção renal e com diabetes. Nesta condição clínica, há aumento do metabolismo de proteínas, para gerar ATP, resultando em elevação do ácido úrico circulante, que pode

ser usado como preditor para a nefropatia diabética (Mauer and Doria, 2018; Suijk *et al.*, 2020).

Taxas elevadas de ácido úrico no sangue, foram associadas ao desenvolvimento de disfunção endotelial periférica, estabelecendo sua relação com doenças vasculares e hipertensão arterial (Kanellis and Kang, 2005; Khosla *et al.*, 2005; Otani *et al.*, 2018), enquanto hipouricemia já foi encontrada, em doenças degenerativas (Su *et al.*, 2017, 2019).

Essa associação reforça a relevância dos nossos achados, quando ratos tratados com salina hipertônica apresentam hiperglicemia, hiperuremia e hiperuricemia, em concordância com a relação ácido úrico/ glicemia/ hipertensão descrita na literatura (Mallat *et al.*, 2016; Mortada, 2017) e sugestivo de diminuição da função renal (Becker and Friedman, 2013).

Agora analisando os resultados do grupo de reações bioquímicas que avaliam a função hepática dos Wistar (ALT, AST, bilirrubina total e frações), percebemos que a enzima AST não varia entre os grupos controle e experimental, enquanto a enzima ALT está elevada nos experimentais (Controle:  $16,26 \pm 0,43$  mg/dl e Experimental:  $32,63 \pm 0,6$  mg/dl, com  $p < 0,001$ ). ALT ou alanina aminotransferase é uma enzima presente quase que exclusivamente no tecido hepático, sendo sua dosagem laboratorial útil para avaliar a função do fígado. Assim, aumento sérico dessa enzima está associado à dano nos hepatócitos (Corless, 1983). Especialmente quando esses resultados são associados aos resultados da dosagem de bilirrubina, um subproduto do metabolismo da proteína hemoglobina, também usado como marcador de função hepática nas frações total e indireta (Kaplan *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2003).

Nossos dados mostram que a bilirrubina total dos Wistar experimentais está aumentada (Controle:  $1,78 \pm 0,008$  mg/dl e Experimental:  $2,04 \pm 0,024$  mg/dl, com  $p < 0,001$ ) e sua fração indireta, apesar de o valor de  $p$  não se mostrar significativo, traz valores aumentados nos experimentais (Controle:  $1,35 \pm 0,006$  mg/dl e Experimentais:  $1,70 \pm 0,14$  mg/dl), sugerindo que há prejuízo na função hepática.

O fígado é uma glândula mista, relacionado ao sistema digestório, e também associado com controle da glicemia e da pressão arterial, (Bal *et al.*, 2019; Kanemoto *et al.*, 2019). Logo, disfunções dessa glândula podem ter relação com a instalação da

hipertensão nos ratos Wistar, corroborando estudos que também associam elevação de enzimas hepáticas e hipertensão arterial em humanos (Bonnet *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2020).

Uma outra medida do metabolismo hepático vem da análise do lipidograma, conjunto de exames laboratoriais que envolvem a dosagem de triglicerídeos, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL). Isso porque o fígado é um órgão importante na síntese das proteínas transportadoras de colesterol, além de ser o responsável pela produção do colesterol endógeno (Murray *et al.*, 2003).

Valores elevados de colesterol e suas frações estão associados a risco aumentado de doenças cardiovasculares (Ware, 2008; Chen *et al.*, 2020). Além disso, estudos associam hipercolesterolemia com aumento dos receptores AT1, para angiotensina II, e também com a ativação do sistema renina-angiotensina (Borghi *et al.*, 2007; Pizoñ *et al.*, 2018).

O lipidograma dos ratos Wistar mostrou resultados elevados nos experimentais, comparados aos seus controles, para todos os parâmetros. O que nos permite manter a relação entre níveis elevados de colesterol e estabelecimento da hipertensão nesses animais.

Portanto, o conjunto dos nossos resultados, em Wistar, sugere que a sobrecarga de sódio se relaciona a desordens metabólicas, afetando a função de vários órgãos. Aqui, observamos disfunção renal, evidências de disfunção hepática associada a elevação do colesterol circulante e disfunção no metabolismo de glicose. Como os ratos Wistar desenvolveram hipertensão arterial, nossos dados mostram, panoramicamente, a influência da ingestão aumentada de sal na gênese da hipertensão arterial e esta se apresenta como uma doença metabólica, com envolvimento de múltiplos órgãos e vias metabólicas.

## 7. Conclusão

Nesse estudo, avaliamos a influência da sobrecarga de sódio, na fase pós-natal, sobre os marcadores cardiológicos, bioquímicos e imunológicos, em ratos Wistar e Holtzman.

Conseguimos aqui reproduzir os resultados de outros estudos, onde a linhagem Wistar foi submetida ao mesmo protocolo hipersódico, resultando em menor ganho de peso, menor ingestão de ração e maior ingestão de líquidos, durante o tratamento, com desenvolvimento de hipertensão arterial (Moreira et al. 2014; Melo, 2016). Mas, além disso, os animais experimentais Wistar apresentaram hiperglicemia, elevação do ácido úrico e da ureia séricos, apesar da creatinina sérica diminuída; também apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos que avaliam função hepática (ALT elevada, bilirrubinas total e indireta elevadas e aumento em todos os itens avaliados no lipidograma, como triglicerídeos, colesterol total e frações HDL, LDL, VLDL) sugerindo alteração na função do fígado, reforçando que ingestão elevada de sódio resulta em alterações sistêmicas.

A partir desses dados, podemos reforçar que a ingestão aumentada de sal pode resultar não só em hipertensão arterial, mas também em alterações metabólicas sistêmicas, como comprometimento dos rins, fígado e interferência nas vias bioquímicas da glicose e do colesterol. O que reafirma Dekker et al. (2005) e Tanaka & Itoh (2019), quando descrevem a hipertensão arterial como uma desordem metabólica.

Essa abrangência sistêmica dos efeitos da alta ingestão de sal é reforçada quando Kleinewietfeld et al. (2013) estabelecem que altas concentrações de sódio estão relacionadas com distúrbios no sistema imunológico. Apesar de sua função ser classicamente a defesa do organismo, alterações imunológicas correspondem a disfunções metabólicas, como a hipertensão.

Entretanto, esses resultados não se repetiram quando avaliamos a linhagem Holtzman, submetida ao mesmo protocolo. A única alteração bioquímica no soro dos Holtzman tratados foi diminuição da creatinina sérica e urinária, provavelmente resultado do baixo peso dos animais, ao longo do tratamento e à dieta, pois os animais em tratamento hipersódico ingerem menos ração.

O grupo Holtzman experimental também não desenvolveu hipertensão arterial, com o protocolo de ingestão salina. Também manteve os parâmetros bioquímicos para pesquisa de função renal e hepática inalterados. Ainda, a sobrecarga de sódio, nos Holtzman, não foi capaz de causar alterações das proteínas inflamatórias pesquisadas no soro, pela técnica de Elisa; tampouco alterações no óxido nítrico foram encontradas.

O fato de os Holtzman não desenvolverem hipertensão, como esperado, pode ser resultado de alguma compensação homeostática, como um metabolismo diferenciado do sódio, ou de compensação de um ou mais perfis imunológicos, de modo a balancear o processo inflamatório que resultaria na hipertensão. Isso também explicaria a normalidade das citocinas circulantes.

Mesmo que diferenças no metabolismo entre linhagens animais distintas já tenham sido estabelecidas (Woolfolk and Holtzman, 1995; Jr, Jos and Salgado, 2001; Broetto-Biazon *et al.*, 2009), mais estudos, como culturas celulares in vitro onde fosse possível potencializar esses efeitos inflamatórios, seriam interessantes para tentar explicar essa questão.

Nossos dados, portanto, reforçam que linhagens animais diferentes reagem de modo diverso a uma mesma exposição, e que a hipertensão arterial deve ser avaliada como uma doença metabólica, com alterações em vários órgãos observando características que diferenciem certos grupos populacionais

Assim, nesse estudo conseguimos mostrar através de análises bioquímicas e imunossorológicas, que uma dieta hipersódica é capaz de provocar alterações funcionais, muito provavelmente secundárias à interferência hiperosmolar em vias bioquímicas envolvidas na produção e/ou função de citocinas, de insulina e de vias que determinam a função dos rins e do fígado.

## Referências Bibliográficas

- Afroz, K. F. and Alviña, K. (2019) 'Maternal elevated salt consumption and the development of autism spectrum disorder in the offspring', *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12974-019-1666-2.
- Aires, M. de M. (2012) *Fisiologia*. 4a. Edição. Guanabara Koogan.
- Amaral, N. O. *et al.* (2014) 'Efferent Pathways in Sodium Overload-Induced Renal Vasodilation in Rats', *PLoS ONE*. Edited by J.-C. Dussault, 9(10), p. e109620. doi: 10.1371/journal.pone.0109620.
- Andrade-Franzé, G. M. F. *et al.* (2010) 'Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake', *Neuroscience*, 165(3), pp. 633–641. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.011.
- Antunes-Rodrigues, J. *et al.* (2013) 'Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(4), pp. 327–338. doi: 10.1590/1414-431X20132788.
- Aoyagi, T. *et al.* (2008) 'Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(1), pp. F100–F107. doi: 10.1152/ajprenal.00088.2008.
- Arcand, J. *et al.* (2019) 'Sodium Levels in Packaged Foods Sold in 14 Latin American and Caribbean Countries: A Food Label Analysis', *Nutrients*, 11(2), p. 369. doi: 10.3390/nu11020369.
- Arnold, J. *et al.* (2019) 'Acute kidney injury calculated using admission serum creatinine underestimates 30-day and 1-year mortality after acute stroke', *Clinical Kidney Journal*, 13(1), pp. 46–54. doi: 10.1093/ckj/sfz049.
- Augustine, V., Lee, S. and Oka, Y. (2020) 'Neural Control and Modulation of Thirst, Sodium Appetite, and Hunger', *Cell*, 180(1), pp. 25–32. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.040.
- Bal, N. B. *et al.* (2019) 'Activation of Liver X Receptors by GW3965 Attenuated Deoxycorticosterone Acetate–Salt Hypertension-Induced Cardiac Functional and Structural Changes', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74(2), pp. 105–117.

doi: 10.1097/FJC.0000000000000693.

Barbosa, R. M. *et al.* (2017) 'Increased Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Nucleus of the Solitary Tract Attenuates Renovascular Hypertension in Rats', *American Journal of Hypertension*, 30(4), pp. 435–443. doi: 10.1093/ajh/hpx001.

Becker, J. and Friedman, E. (2013) 'Renal Function Status', *American Journal of Roentgenology*, 200(4), pp. 827–829. doi: 10.2214/AJR.12.9872.

Belen, E. *et al.* (2015) 'Increased Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Patients With Resistant Hypertension', *The Journal of Clinical Hypertension*, 17(7), pp. 532–537. doi: 10.1111/jch.12533.

BERGON, L. (1976) 'Adrenal Mitochondrial and Serum Corticosteroid Studies in Rats Resistant to Adrenal-Regeneration Hypertension (ARH)', *Endocrinology*, 99(4), pp. 1080–1084. doi: 10.1210/endo-99-4-1080.

Binger, K. J. *et al.* (2015) 'High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages', *Journal of Clinical Investigation*, 125(11), pp. 4223–4238. doi: 10.1172/JCI80919.

Bkaily, G. *et al.* (2018) 'High salt-induced hypertrophy of human vascular smooth muscle cells associated with a decrease in glycocalyx', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 125, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.10.006.

Blanch, G. T. *et al.* (2013) 'Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(7), pp. R531–R542. doi: 10.1152/ajpregu.00191.2012.

Blanch, G. T. *et al.* (2014) 'Increased Expression of Angiotensin II Type 2 Receptors in the Solitary–Vagal Complex Blunts Renovascular Hypertension', *Hypertension*, 64(4), pp. 777–783. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03188.

Bleiweiss-Sande, R. *et al.* (2019) 'Associations between Food Group Intake, Cognition, and Academic Achievement in Elementary Schoolchildren', *Nutrients*, 11(11), p. 2722. doi: 10.3390/nu11112722.

Bomfim, G. F. *et al.* (2015) 'Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats', *Life Sciences*, 122, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.001.

Bonnet, F. *et al.* (2017) 'Gamma-glutamyltransferase, fatty liver index and hepatic insulin resistance are associated with incident hypertension in two longitudinal studies', *Journal of Hypertension*, 35(3), pp. 493–500. doi: 10.1097/HJH.0000000000001204.

Borghetti, C. *et al.* (2007) 'Interaction between serum cholesterol levels and the renin-angiotensin system on the new onset of arterial hypertension in subjects with high-normal blood pressure', *Journal of Hypertension*, 25(10), pp. 2051–2057. doi: 10.1097/HJH.0b013e32827759a6.

Bourque and, C. W. and Oliek, S. H. R. (1997) 'OSMORECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM', *Annual Review of Physiology*, 59(1), pp. 601–619. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.601.

Braddock, M. *et al.* (2018) 'Potential Risks Related to Modulating Interleukin-13 and Interleukin-4 Signalling: A Systematic Review', *Drug Safety*, 41(5), pp. 489–509. doi: 10.1007/s40264-017-0636-9.

Brasil, T. M. da S. (2001) 'Técnica de Coloração de Gram'. Available at: <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>.

Broetto-Biazon, A. C. *et al.* (2009) 'Transformation and action of extracellular NAD<sup>+</sup> in perfused rat and mouse livers', *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(1), pp. 90–97. doi: 10.1038/aps.2008.7.

Bugya, Z. *et al.* (2021) 'Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination', *Vaccines*, 9(2), p. 174. doi: 10.3390/vaccines9020174.

CAMPBELL, D. J. and HABENER, J. F. (1987) 'Cellular Localization of Angiotensinogen Gene Expression in Brown Adipose Tissue and Mesentery: Quantification of Messenger Ribonucleic Acid Abundance Using Hybridization in Situ\*', *Endocrinology*, 121(5), pp. 1616–1626. doi: 10.1210/endo-121-5-1616.

Carvounis, C. P., Nisar, S. and Guro-Razuman, S. (2002) 'Significance of the

fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure', *Kidney International*, 62(6), pp. 2223–2229. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00683.x.

de Castro, B. B. A. bre. *et al.* (2014) 'Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony', *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 36(2), pp. 139–149. doi: 10.5935/0101-2800.20140023.

De Castro, J. J. *et al.* (no date) '[Asymptomatic hepatitis induced by propylthiouracil].', *Acta medica portuguesa*, 14(5–6), pp. 523–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11878166>.

Chen, H. *et al.* (2020) 'Prolonged hyperlipidemia exposure increases the risk of arterial stiffness in young adults: a cross-sectional study in a cohort of Chinese', *BMC Public Health*, 20(1), p. 1091. doi: 10.1186/s12889-020-09211-5.

Choi, G. B. *et al.* (2016) 'The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring', *Science*, 351(6276), pp. 933–939. doi: 10.1126/science.aad0314.

Colombari, E. *et al.* (2010) 'Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt', *Hypertension*, 56(5), pp. 956–963. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.155101.

Corless, J. K. (1983) 'Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease', *Archives of Internal Medicine*, 143(12), pp. 2291–2294. doi: 10.1001/archinte.143.12.2291.

Costa, F. P. and Machado, S. H. (2010) 'O consumo de sal e alimentos ricos em sódio pode influenciar na pressão arterial das crianças?', *Ciência & Saúde Coletiva*, 15(suppl 1), pp. 1383–1389. doi: 10.1590/S1413-81232010000700048.

Dekker, J. M. *et al.* (2005) 'Metabolic Syndrome and 10-Year Cardiovascular Disease Risk in the Hoorn Study', *Circulation*, 112(5), pp. 666–673. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516948.

Denes, F. T. *et al.* (2008) 'Laparoscopic diagnosis and treatment of nonpalpable

testis', *International braz j urol*, 34(3), pp. 329–335. doi: 10.1590/S1677-55382008000300010.

dos-Santos, R. C. *et al.* (2017) 'Central angiotensin-(1-7) increases osmotic thirst', *Experimental Physiology*, 102(11), pp. 1397–1404. doi: 10.1113/EP086417.

Fabrino, D. L. *et al.* (2011) 'Rat models to investigate host macrophage defense against trypanosoma cruzi', *Journal of Innate Immunity*, 3(1), pp. 71–82. doi: 10.1159/000320641.

Farez, M. F. *et al.* (2015) 'Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 86(1), pp. 26–31. doi: 10.1136/jnnp-2014-307928.

Fernández-Velasco, M. *et al.* (2012) 'NOD1 Activation Induces Cardiac Dysfunction and Modulates Cardiac Fibrosis and Cardiomyocyte Apoptosis', *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0045260.

Fink, G. D. (2017) 'Does Tail-Cuff Plethysmography Provide a Reliable Estimate of Central Blood Pressure in Mice?', *Journal of the American Heart Association*, 6(6), pp. 1–2. doi: 10.1161/JAHA.117.006554.

Fitzsimons, J. T. (1998) 'Angiotensin, Thirst, and Sodium Appetite', *Physiological Reviews*, 78(3), pp. 583–686. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.583.

Freiria-Oliveira, A. H. *et al.* (2013) 'Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR's', *Cardiovascular Research*, 97(1), pp. 153–160. doi: 10.1093/cvr/cvs297.

Giachello, C. N. G. *et al.* (2010) 'MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity', *Journal of Cell Science*, 123(6), pp. 881–893. doi: 10.1242/jcs.056846.

Gillespie, C. *et al.* (2015) 'Sodium content in major brands of US packaged foods, 2009', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(2), pp. 344–353. doi: 10.3945/ajcn.113.078980.

Gonzalez-Vicente, A. *et al.* (2018) 'Dietary Fructose Increases the Sensitivity of Proximal Tubules to Angiotensin II in Rats Fed High-Salt Diets', *Nutrients*, 10(9), p.

1244. doi: 10.3390/nu10091244.

Gouraud, S. S. *et al.* (2011) 'Increased anti-apoptotic conditions in the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rat', *Autonomic Neuroscience*, 162(1–2), pp. 15–23. doi: 10.1016/j.autneu.2011.01.007.

Grabner, M. *et al.* (2007) 'Bronze age dating of timber from the salt-mine at Hallstatt, Austria', *Dendrochronologia*, 24(2–3), pp. 61–68. doi: 10.1016/j.dendro.2006.10.008.

Guyton, A. C. (2017) *Fisiologia Humana*. 6a. Guanabara Koogan.

Harita, N. *et al.* (2009) 'Lower Serum Creatinine Is a New Risk Factor of Type 2 Diabetes: The Kansai Healthcare Study', *Diabetes Care*, 32(3), pp. 424–426. doi: 10.2337/dc08-1265.

Harwani, S. C. (2018) 'Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension', *Translational Research*, 191, pp. 45–63. doi: 10.1016/j.trsl.2017.10.011.

HODGE, G., YE, V. Z. C. and DUGGAN, K. A. (2002) 'Dysregulation of angiotensin II synthesis is associated with salt sensitivity in the spontaneous hypertensive rat', *Acta Physiologica Scandinavica*, 174(3), pp. 209–215. doi: 10.1046/j.1365-201x.2002.00937.x.

Holtzman, E. J. *et al.* (1988) 'Kinetics of sodium homeostasis in rats: Rapid excretion and equilibration rates', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 254(6). doi: 10.1152/ajpregu.1988.254.6.r1001.

Hong, D. *et al.* (2020) 'Development and validation of a medication selection model under clinical application of renin-angiotensin inhibitor combined with calcium channel blocker for hypertension patients', *Medical Science Monitor*, 26, pp. 1–9. doi: 10.12659/MSM.923696.

Di Iorgi, N. *et al.* (2012) 'Diabetes Insipidus &#150; Diagnosis and Management', *Hormone Research in Paediatrics*, 77(2), pp. 69–84. doi: 10.1159/000336333.

ISH *et al.* (2020) '2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines', *Hypertension*, 75(6), pp. 1334–1357. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026.

- Itani, H. A. *et al.* (2016) 'Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans', *Hypertension*, 68(1), pp. 123–132. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07237.
- Iwamoto, T., Kita, S. and Katsuragi, T. (2005) 'Salt-Sensitive Hypertension, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger, and Vascular Smooth Muscle', *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(8), pp. 273–277. doi: 10.1016/j.tcm.2005.08.004.
- Jr, R. F., Jos, V. and Salgado, H. C. (2001) 'Modelos de hipertensão arterial', 8(1), pp. 19–29.
- Jürgens, G. and Graudal, N. (2002) 'Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterols, and triglyceride', in *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD004022.
- Kanellis, J. and Kang, D.-H. (2005) 'Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease', *Seminars in Nephrology*, 25(1), pp. 39–42. doi: 10.1016/j.semnephrol.2004.09.007.
- Kanemoto, N. *et al.* (2019) 'Antidiabetic and cardiovascular beneficial effects of a liver-localized mitochondrial uncoupler', *Nature Communications*, 10(1), p. 2172. doi: 10.1038/s41467-019-09911-6.
- KAPLAN, L. A., PESCE, A. J. and KAMIERCZAK, S. C. (2003) *Clinical chemistry: theory, analysis, correlations*. 4a edn.
- Kashima, S. *et al.* (2017) 'Low serum creatinine is a type 2 diabetes risk factor in men and women: The Yuport Health Checkup Center cohort study', *Diabetes & Metabolism*, 43(5), pp. 460–464. doi: 10.1016/j.diabet.2017.04.005.
- Kassem, K. M., Ali, M. and Rhaleb, N.-E. (2020) 'Interleukin 4: Its Role in Hypertension, Atherosclerosis, Valvular, and Nonvalvular Cardiovascular Diseases', *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 25(1), pp. 7–14. doi: 10.1177/1074248419868699.
- Khosla, U. M. *et al.* (2005) 'Hyperuricemia induces endothelial dysfunction', *Kidney International*, 67(5), pp. 1739–1742. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00273.x.

Kim, J. Y. *et al.* (2021) 'Transfer of Th17 from Adult Spontaneous Hypertensive Rats Accelerates Development of Hypertension in Juvenile Spontaneous Hypertensive Rats', *BioMed Research International*. Edited by K. Wada, 2021, pp. 1–13. doi: 10.1155/2021/6633825.

Kirabo, A. *et al.* (2014) 'DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension', *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp. 4642–4656. doi: 10.1172/JCI74084.

Kleinewietfeld, M. *et al.* (2013) 'Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH 17 cells', *Nature*, 496(7446), pp. 518–522. doi: 10.1038/nature11868.

Krueger-Beck, E. *et al.* (2011) 'Potencial de ação: do estímulo à adaptação neural', *Fisioterapia em Movimento*, 24(3), pp. 535–547. doi: 10.1590/S0103-51502011000300018.

Lee, Y. *et al.* (2012) 'Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells', *Nature Immunology*, 13(10), pp. 991–999. doi: 10.1038/ni.2416.

Leib, D. E., Zimmerman, C. A. and Knight, Z. A. (2016) 'Thirst', *Current Biology*, 26(24), pp. R1260–R1265. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.019.

Leung, A. M. and Braverman, L. E. (2014) 'Consequences of excess iodine', *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), pp. 136–142. doi: 10.1038/nrendo.2013.251.

Levick, S. P. *et al.* (2009) 'Cardiac Mast Cells Mediate Left Ventricular Fibrosis in the Hypertensive Rat Heart', *Hypertension*, 53(6), pp. 1041–1047. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123158.

Liard, J. F., Dolci, W. and Vallotton, M. B. (1984) 'Plasma Vasopressin Levels after Infusions of Hypertonic Saline Solutions into the Renal, Portal, Carotid, or Systemic Circulation in Conscious Dogs \*', *Endocrinology*, 114(3), pp. 986–991. doi: 10.1210/endo-114-3-986.

Lima, C. and Macedo, E. (2018) 'Urinary biochemistry in the diagnosis of acute kidney injury', *Disease Markers*, 2018. doi: 10.1155/2018/4907024.

Loperena, R. *et al.* (2018) 'Hypertension and increased endothelial mechanical

stretch promote monocyte differentiation and activation: roles of STAT3, interleukin 6 and hydrogen peroxide', *Cardiovascular Research*, 114(11), pp. 1547–1563. doi: 10.1093/cvr/cvy112.

Mahon, J. M. *et al.* (1995) 'The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin-(1–7) or carbachol', *Neuroscience*, 69(1), pp. 199–208. doi: 10.1016/0306-4522(95)00238-E.

Mai, T. H. *et al.* (2017) 'Hepatic and renal mechanisms underlying the osmopressor response', *Autonomic Neuroscience*, 203, pp. 58–66. doi: 10.1016/j.autneu.2017.01.007.

Mallat, S. G. *et al.* (2016) 'Hyperuricemia, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: an Emerging Association', *Current Hypertension Reports*, 18(10), p. 74. doi: 10.1007/s11906-016-0684-z.

Martinez-Maldonado, M. (1991) 'Pathophysiology of renovascular hypertension', *Hypertension*, 17(5), pp. 707–719. doi: 10.1161/01.HYP.17.5.707.

Martins, C. A. *et al.* (2015) 'Sodium content and labelling of processed and ultra-processed food products marketed in Brazil', *Public Health Nutrition*, 18(7), pp. 1206–1214. doi: 10.1017/S1368980014001736.

Mauer, M. and Doria, A. (2018) 'Uric Acid and Diabetic Nephropathy Risk', in, pp. 103–109. doi: 10.1159/000484284.

McCarthy, C. G. *et al.* (2015) 'Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats', *Cardiovascular Research*, 107(1), pp. 119–130. doi: 10.1093/cvr/cvv137.

McKinley, M. J. *et al.* (2019) 'From sensory circumventricular organs to cerebral cortex: Neural pathways controlling thirst and hunger', *Journal of Neuroendocrinology*, p. e12689. doi: 10.1111/jne.12689.

Melo, A. B. S. de (2016) *EFEITOS DA DIETA HIPERSÓDICA DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL SOBRE A INGESTÃO INDUZIDA DE ÁGUA E SÓDIO NA FASE ADULTA.*

- Melo, M. G. D. *et al.* (2012) 'Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe', *Scientia plena*, 8(4), pp. 1–6. Available at: <http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/295>.
- Melo, M. R. *et al.* (2019) 'Importance of the commissural nucleus of the solitary tract in renovascular hypertension', *Hypertension Research*, 42(5), pp. 587–597. doi: 10.1038/s41440-018-0190-6.
- Menani, J. V. *et al.* (2014) 'Preoptic–Periventricular Integrative Mechanisms Involved in Behavior, Fluid–Electrolyte Balance, and Pressor Responses. Chapter 4.', in *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Meng, Q. C. *et al.* (1995) 'Effects of dietary salt on angiotensin peptides in kidney.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 6(4), pp. 1209–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589288>.
- Mora-Rodriguez, R. and Hamouti, N. (2012) 'Salt and Fluid Loading: Effects on Blood Volume and Exercise Performance', in pp. 113–119. doi: 10.1159/000341945.
- Moreira, M. C. S. *et al.* (2014) 'High sodium intake during postnatal phases induces an increase in arterial blood pressure in adult rats', *British Journal of Nutrition*, 112(12), pp. 1923–1932. doi: 10.1017/S0007114514002918.
- Morley, A. A. (2014) 'Digital PCR: A brief history', *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), pp. 1–2. doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001.
- Mortada, I. (2017) 'Hyperuricemia, Type 2 Diabetes Mellitus, and Hypertension: an Emerging Association', *Current Hypertension Reports*, 19(9), p. 69. doi: 10.1007/s11906-017-0770-x.
- Müller, D. N. *et al.* (2019) 'Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis', *Nature Reviews Immunology*, 19(4), pp. 243–254. doi: 10.1038/s41577-018-0113-4.
- Mulrow, P. J. (1989) 'Adrenal renin: A possible local regulator of aldosterone production', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(5), pp. 503–510.

Murray, R. K. *et al.* (2003) *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26a. Ed. McGraw-Hill Companies.

Neto, O. M. V. and Neto, M. M. (2003) 'Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico', *Medicina*, 36(2–4), pp. 325–337.

Neumann, C., Scheffold, A. and Rutz, S. (2019) 'Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10', *Seminars in Immunology*, 44, p. 101344. doi: 10.1016/j.smim.2019.101344.

Nicholson, L. B. (2016) 'The immune system', *Essays in Biochemistry*, 60(3), pp. 275–301. doi: 10.1042/EBC20160017.

Ninomiya, I. *et al.* (1988) 'Effects of baroreceptor reflex on cardiac and renal sympathetic nerve activity before and after atropinization in awake cats at rest.', *The Japanese Journal of Physiology*, 38(4), pp. 491–506. doi: 10.2170/jjphysiol.38.491.

Norlander, A. E. *et al.* (2017) 'A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage', *JCI insight*, 2(13), pp. 1–13. doi: 10.1172/jci.insight.92801.

Otani, N. *et al.* (2018) 'Effects of uric acid on vascular endothelial function from bedside to bench', *Hypertension Research*, 41(11), pp. 923–931. doi: 10.1038/s41440-018-0095-4.

Palomo, J. *et al.* (2015) 'The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases', *Cytokine*, 76(1), pp. 25–37. doi: 10.1016/j.cyto.2015.06.017.

Parkin, J. and Cohen, B. (2001) 'An overview of the immune system', *The Lancet*, 357(9270), pp. 1777–1789. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.

Paz Ocaranza, M. *et al.* (2020) 'Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease', *Nature Reviews Cardiology*, 17(2), pp. 116–129. doi: 10.1038/s41569-019-0244-8.

Pizoń, T. *et al.* (2018) 'The relationship between plasma renin activity and serum lipid profiles in patients with primary arterial hypertension', *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 19(4), p. 147032031881002. doi:

10.1177/1470320318810022.

Rahman, S. *et al.* (2020) 'Association between serum liver enzymes and hypertension: A cross-sectional study in Bangladeshi adults', *BMC Cardiovascular Disorders*, 20(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12872-020-01411-6.

Rassler, B. (2010) 'The Renin-Angiotensin System in the Development of Salt-Sensitive Hypertension in Animal Models and Humans', *Pharmaceuticals*, 3(4), pp. 940–960. doi: 10.3390/ph3040940.

Rein, J. and Bader, M. (2017) 'Renin-Angiotensin System in Diabetes', *Protein & Peptide Letters*, 24(9). doi: 10.2174/0929866524666170728144357.

Rodrigues Prestes, T. R. *et al.* (2017) 'The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research', *Current Drug Targets*, 18(11). doi: 10.2174/1389450117666160727142401.

Rose-John, S. (2018) 'Interleukin-6 Family Cytokines', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), p. a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.

Rubin, G. D. (2014) 'Computed Tomography: Revolutionizing the Practice of Medicine for 40 Years', *Radiology*, 273(2S), pp. S45–S74. doi: 10.1148/radiol.14141356.

Sag, C. M. *et al.* (2017) 'Distinct Regulatory Effects of Myeloid Cell and Endothelial Cell NAPDH Oxidase 2 on Blood Pressure', *Circulation*, 135(22), pp. 2163–2177. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023877.

Santos, R. A. S. *et al.* (2019) 'The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(5), pp. H958–H970. doi: 10.1152/ajpheart.00723.2018.

Sarno, F. *et al.* (2013) 'Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009', *Revista de Saúde Pública*, 47(3), pp. 571–578. doi: 10.1590/S0034-8910.2013047004418.

Sattler, S. (2017) 'The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection', in, pp. 3–14. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8\_1.

SBPC-ML, S. B. de P. C. /Medicina L. (2014) *Coleta e preparo da amostra biológica, Barueri, SP : Manole : Minha Editora*. Ed. Manole. doi: 10.1111/j.1749-818X.2010.00216.x.Language.

Shi, P. *et al.* (2010) 'Brain Microglial Cytokines in Neurogenic Hypertension', *Hypertension*, 56(2), pp. 297–303. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150409.

Shrimanker, I. and Bhattarai, S. (2020) 'Electrolytes'. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541123/>.

da Silva, E. F. *et al.* (2019) 'Carotid bodies contribute to sympathoexcitation induced by acute salt overload', *Experimental Physiology*, 104(1), pp. 15–27. doi: 10.1113/EP087110.

Silva, W. A. and Araújo Costa, D. A. (2020) 'COMPARAÇÃO ENTRE SOLUÇÃO SALINA 0,9% E CRISTALOIDES BALANCEADOS: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA', *JOURNAL OF SURGICAL AND CLINICAL RESEARCH*, 11(2), pp. 113–127. doi: 10.20398/jscr.v11i2.20733.

Silverthorn, D. U. (2010) *Fisiologia Humana. Uma abordagem integrada. 7a.*

Smiljanec, K. and Lennon, S. L. (2019) 'Sodium, hypertension, and the gut: Does the gut microbiota go salty?', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 317(6), pp. H1173–H1182. doi: 10.1152/ajpheart.00312.2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (2009) '7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial', *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 93(6), pp. 110–178.

Available at:

[http://publicacoes.cardiol.br/2014/img/pockets/POCKETBOOK\\_2017\\_interativa.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/img/pockets/POCKETBOOK_2017_interativa.pdf).

Souza, M. C. da C. (2016) 'Interação entre barorreceptores cardiopulmonares e reflexo pressor do exercício no controle autonômico da frequência cardíaca em humanos'. Available at: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/22718>.

Sparks, M. A. *et al.* (2014) 'Classical renin-angiotensin system in kidney physiology', *Comprehensive Physiology*, 4(3), pp. 1201–1228. doi: 10.1002/cphy.c130040.

Stanaway, J. D. *et al.* (2018) 'Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks

or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study', *The Lancet*, 392(10159), pp. 1923–1994. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32225-6.

Stoff, J. S. (1982) 'Phosphate homeostasis and hypophosphatemia', *The American Journal of Medicine*, 72(3), pp. 489–495. doi: 10.1016/0002-9343(82)90520-4.

Stricker, E. M. *et al.* (2001) 'Osmoregulation in water-deprived rats drinking hypertonic saline: effect of area postrema lesions', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(3), pp. R831–R842. doi: 10.1152/ajpregu.2001.280.3.R831.

Stricker, E. M. *et al.* (2002) 'Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(6 51-6), pp. 1710–1717. doi: 10.1152/ajpregu.00548.2001.

Su, Q. *et al.* (2019) 'Low serum bilirubin, albumin, and uric acid levels in patients with Crohn's disease', *Medicine*, 98(19), p. e15664. doi: 10.1097/MD.00000000000015664.

Su, Z. *et al.* (2017) 'Low serum levels of uric acid and albumin in patients with Guillain–Barre syndrome', *Medicine*, 96(15), p. e6618. doi: 10.1097/MD.00000000000006618.

Suijk, D. L. *et al.* (2020) 'Plasma uric acid and renal haemodynamics in type 2 diabetes patients', *Nephrology*, 25(4), pp. 290–297. doi: 10.1111/nep.13645.

Tanaka, M. and Itoh, H. (2019) 'Hypertension as a Metabolic Disorder and the Novel Role of the Gut', *Current Hypertension Reports*, 21(8). doi: 10.1007/s11906-019-0964-5.

Teixeira, A. Z. A. (2018) 'Sodium content and food additives in major brands of Brazilian children's foods', *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(12), pp. 4065–4075. doi: 10.1590/1413-812320182312.21812016.

Tito and Canto (2015) *Química na abordagem do cotidiano*. Edited by Saraiva.

Toffaletti John G and Elizabeth H, M. (2008) 'Variation of serum creatinine, cystatin C, and creatinine clearance tests in persons with normal renal function', *Clin Chim*

*Acta*, 395((1-2)), pp. 115–119. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.020.

Trott, D. W. and Harrison, D. G. (2014) 'The immune system in hypertension', *Advances in Physiology Education*, 38(1), pp. 20–24. doi: 10.1152/advan.00063.2013.

Vinh, A. *et al.* (2010) 'Inhibition and Genetic Ablation of the B7/CD28 T-Cell Costimulation Axis Prevents Experimental Hypertension', *Circulation*, 122(24), pp. 2529–2537. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930446.

Ware, W. R. (2008) 'High cholesterol and coronary heart disease in younger men: The potential role of stress induced exaggerated blood pressure response', *Medical Hypotheses*, 70(3), pp. 543–547. doi: 10.1016/j.mehy.2007.06.031.

Wenceslau, C. F. *et al.* (2015) 'Mitochondrial N -formyl peptides induce cardiovascular collapse and sepsis-like syndrome', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 308(7), pp. H768–H777. doi: 10.1152/ajpheart.00779.2014.

Wenzel, U. O. *et al.* (2019) 'Salt, inflammation, IL-17 and hypertension', *British Journal of Pharmacology*, 176(12), pp. 1853–1863. doi: 10.1111/bph.14359.

Wilde, E. *et al.* (2017) 'Tail-Cuff Technique and Its Influence on Central Blood Pressure in the Mouse', *Journal of the American Heart Association*, 6(6). doi: 10.1161/JAHA.116.005204.

Winklewski, P. J. *et al.* (2015) 'Brain inflammation and hypertension: The chicken or the egg?', *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12974-015-0306-8.

Withers, S. B. *et al.* (2017) 'Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality', *Scientific Reports*, 7(1), p. 44571. doi: 10.1038/srep44571.

Woolfolk, D. R. and Holtzman, S. G. (1995) 'Rat strain differences in the potentiation of morphine-induced analgesia by stress', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 51(4), pp. 699–703. doi: 10.1016/0091-3057(94)00440-T.

Xie, Y. *et al.* (2018) 'Higher blood urea nitrogen is associated with increased risk of

incident diabetes mellitus', *Kidney International*, 93(3), pp. 741–752. doi:  
10.1016/j.kint.2017.08.033.

Yu, G. C. and Lee, D. B. N. (1987) 'Clinical disorders of phosphorus metabolism',  
*Western Journal of Medicine*, 147(5), pp. 569–576.