SUSANA QUIROS COGNUCK

**Interação do sexo e envelhecimento no controle neuroendócrino da
homeostase metabólica, cardiovascular e hidromineral.**

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Ribeirão Preto-SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Quirós Cognuck, Susana

Interação do sexo e envelhecimento no controle neuroendócrino da homeostase metabólica, cardiovascular e hidromineral. Ribeirão Preto, 2019.

208 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Antunes-Rodrigues, Jose.

1. Homeostase metabólica. 2. Homeostase hidromineral.
3. Envelhecimento. 4. Sexo. 5. Função renal e cardíaca.

QUIROS COGNUCK, S. Interação do sexo e envelhecimento no controle neuroendócrino da homeostase metabólica, cardiovascular e hidromineral.
2019. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

REFERÊNCIA AO APOIO RECEBIDO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP- Temático Proc. # 2013/0799-1**).

AGRADECIMENTOS

A Deus, de quem venho e a onde eu vou, minha guia, sustento, força e companhia, quem me compraze os desejos mais profundos de meu coração, permitindo fazer este meu almejo uma realidade.

A minha mãe, por sempre ter optado por mim, por acreditar em mim e me apoiar em todas minhas ideias, aventuras e demais.

A minha família, que embora estão longe seu carinho e apoio tem estado sempre presente.

Ao professor Dr. Jose Antunes Rodrigues, por ter me aceitado para ser sua estudante e ter atrasado sua saída do departamento para me esperar terminar o doutorado. Por sua paciência, compressão e apoio em cada nova ideia que eu tinha. Por ser o melhor chefe e exemplo a seguir na minha vida profissional. Por abrir as portas no só do laboratório senão de sua família junto com a Elisa, que nos acolheram a minha mãe e a mim em seu lar.

A professora Dra. Lucila Leico K. Elias por seu apoio, por ser a luz que a vezes precisei, por ter ser muito tempo minha parceira de trabalho até muito tarde no laboratório, me fazia sentir confiante o saber que você estava ai no laboratório nesses horários, por sua paciência e carinho, por seus concelhos e sugestões que foram sempre acertados.

Ao professor Dr. Wagner Luis Reis por ter tido a paciência de me ensinar, por ter sacado o tempo para me ajudar nos experimentos, por estar sempre disposto a escutar.

Ao professor Dr. Francisco José Albuquerque de Paula e a técnica Rita de Cássia Cocenza Varrichio do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP-USP, por ter me ajudado durante o processo longo com os DEXA dos ratos.

Ao professor Dr. Sergio Britto e a técnica Erika Delloiagono do CEMEL, por aportar no processo de pesquisa e me ensinar novas técnicas.

A professora Dra. Terezila Machado Coimbra e as técnicas Cleonice Giovanini e Heloísa Della Coletta Francescato, por colaborar constantemente e de diferentes formas neste projeto.

Ao professor Dr. Celso Rodrigues Franci e a técnica Marina Holanda, por nos ajudar com a dosagem da prolactina.

A professora Dra. Janete A. Ancelmo Franci e ao técnico Ruither de Oliveira Gomes

Carolino, por seus aportes no processo desta pesquisa.

Ao professor Dr. Hélio Cesar Salgado, ao postdoc Fabio Gava e ao técnico Carlos Alberto Aguiar da Silva, por aportar e enriquecer o projeto de pesquisa.

Ao departamento por aportar as ferramentas e o capital humano para a gente crescer tanto como persona como profissionalmente.

As técnicas Maria Valci Santos e Milene Mantovani as quais mais que me dar o peixe servido me ensinaram a pescar, por sua paciência para com isso e por saber que sempre podia contar com vocês.

Ao senhor Leonardo Fidelis Filho, por ser de muita ajuda no biotério em todo momento, por saber que sempre contava com ele em qualquer coisa que precisara do biotério e por meio do riso me ajudar a lidar com cada dia do trabalho no biotério.

Ao senhor Rubens Fernando de Melo, por ser um grande colaborador neste projeto e sempre estar disposto a me ensinar e ajudar em todo o que precisei na salinha de histologia.

Aos bolsistas Daniel Barbeiro, Luara e Raul Suarez Mantovani por ter me ajudado na árdua tarefa de cuidar meus animais e em alguns experimentos.

Aos colegas do laboratório por ter sido um grande apoio em cada momento que precisei deles durante o período de trabalho e os momentos compartilhados nos cafés e nas festas do laboratório.

A Fabiana Lucio de Oliveira e André Mecawi, quem foram os que me ajudaram nos primeiros passos aqui no Brasil.

As minhas amigas e amigos da Costa Rica e aos que conheci aqui em RP, por ter sido esse apoio psicológico, por me escutar e me abraçar quando eu mais necessitei.

RESUMO

QUIRÓS COGNUM, Susana. **Interação do sexo e envelhecimento no controle neuroendócrino da homeostase metabólica, cardiovascular e hidromineral**. 2019. 208f. Teses (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O envelhecimento altera a composição corporal, balanço energético e a rede de sinais que controlam a homeostase. Os objetivos são caracterizar o envelhecimento dos ratos Wistar em relação a composição corporal e na homeostase energética segundo o sexo, determinar as alterações produzidas pelo envelhecimento na função renal e cardiovascular, e comparar as alterações hormonais e comportamentais dipsogênicas e natriorexigênicas que decorrem do envelhecimento, tanto no estado normoidratado quanto durante a privação hídrica e identificar se esses efeitos agem igualmente em machos e fêmeas. Como modelo experimental foram usados ratos machos e fêmeas Wistar nas idades entre 2 e 18 meses. Se determinou o teste de tolerância à glicose oral e o perfil lipídico em condição de jejum. Com alimentação *ad libitum*, foram determinados o perfil lipídico, ácidos graxos livres, glicemia e a dosagem de leptina, adiponectina, insulina, corticosterona (CORT) e prolactina (PRL). Se determinou a função renal e cardíaca em repouso. A ingestão de água e apetite ao sódio, as concentrações plasmáticas de ocitocina (OT), arginina vasopressina (AVP), CORT, peptídeo natriurético atrial (ANP) e angiotensina II (ANGII) em resposta a privação hídrica. Os machos idosos apresentaram alteração no metabolismo da glicose. Na condição prandial os machos idosos apresentaram maiores níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, HDL e ácidos graxos livres. Segundo a idade, os animais idosos aumentaram a leptina, os machos a adiponectina e as fêmeas a PRL e CORT. Segundo o sexo, insulina foi maior nos machos idosos. A adiponectina e CORT foi maior nas fêmeas de 3 meses, e nas idosas foram a PRL e CORT. As fêmeas apresentaram disfunção diastólica sem mudar a fração de ejeção e os machos alteração da taxa de filtração glomerular. Os animais desidratados idosos bebem menos água e salina isotônica do que os ratos jovens. As fêmeas desidratadas de 6 meses ingeriram mais salina do que água e aos 18 meses elas beberam mais água do que salina. Os ratos beberam em todas as idades mais água do que salina. Durante a desidratação os ratos de 3 meses tiveram aumento na concentração plasmática de AVP, OT, ANGI e CORT, enquanto o ANP diminuiu. Nos machos de 3 meses, quando desidratados o ANP foi maior do que nas fêmeas de 3 meses desidratadas. Os animais idosos desidratados tiveram menor concentração plasmática de ANGI do que os animais de 3 meses. A CORT foi maior nos animais idosos do que nos animais de 3 meses. A concentração plasmática de OT e CORT foi maior nas fêmeas de idosas do que nos machos idosos. Concluindo, no envelhecimento, as maiores alterações do metabolismo energético se observam nos machos, entanto que as fêmeas conseguem manter a homeostases energética. Os ratos Wistar envelhecidos podem ser utilizados para o estudo de disfunção renal e cardíaca. A resposta comportamental dipsogênica e neuroendócrina na manutenção da homeostase hidromineral sofre influência do envelhecimento, tendo o sexo um fator preponderante nestas respostas.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sexo. Metabolismo energético. Função cardíaca. Função renal. Homeostases hidromineral.

ABSTRACT

QUIRÓS COGNUM, Susana. **Sex and aging interaction in the neuroendocrine control of metabolic, cardiovascular and hydromineral homeostasis.** 2019. 208f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aging changes body composition, energy balance and the network of signs that control homeostasis. Objectives are: to characterize the aging of Wistar rats in relation to body composition and energetic homeostasis according to sex, to determine the changes produced by aging in renal and cardiovascular function, and to compare the hormonal and behavioral dipsogenic and natriorexigenic effects of aging, both in the normohydrate state and during water deprivation, and to identify whether these effects act equally on males and females. As experimental model was used male and female Wistar rats between 2 and 18-month-old. The oral glucose tolerance test and the fasting lipid profile were determined. With ad libitum feeding, the lipid profile, free fatty acids, glycemia and the dosage of leptin, adiponectin, insulin, corticosterone (CORT) and prolactin (PRL) were determined. Cardiac and renal function was determined at rest. Intake of water and sodium appetite, plasma concentrations of oxytocin (OT), arginine vasopressin (AVP), CORT, atrial natriuretic peptide (ANP) and angiotensin II (ANGII) in response to water deprivation. Old males presented alterations in glucose metabolism. In the prandial condition, the elderly males had higher serum levels of triglycerides, total cholesterol, HDL and free fatty acids. According to age, the elderly animals increased leptin, males increased adiponectin and females increased PRL and CORT. According to sex, insulin was highest in older males. Adiponectin and CORT were highest in 3 month-females, and elderly had highest PRL and CORT. The females presented diastolic dysfunction without changing the ejection fraction and the males altered the glomerular filtration rate. Old dehydrated animals drink less water and isotonic saline than young rats. Dehydrated 6 month-old-female ingested more saline than water, and 18 month-old-female drank more water than saline. Male drank at all ages more water than saline. During dehydration 3-month- rats had an increase in the plasma concentration of AVP, OT, ANGII and CORT, while the ANP decreased. In the 3-month males, when dehydrated the ANP was higher than in the dehydrated 3-month females. Dehydrated elderly animals had lower plasma concentrations of ANGII than 3 - month - old animals. CORT was higher in older animals than in 3-month old animals. The plasma concentration of OT and CORT was higher in females than in older males. In conclusion, the major changes in energy metabolism are observed in old males, although old females can maintain energy homeostasis. Aged Wistar rats can be used for study renal and cardiac dysfunction. The dipsogenic and neuroendocrine behavioral response in the maintenance of the hydromineral homeostasis is influenced by aging, with sex being a preponderant factor in these responses.

Keywords: Aging. Sex. Energy metabolism. Cardiac function. Renal function. Hydromineral homeostasis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1: Efeito do envelhecimento na composição corporal e na homeostase energética segundo o sexo em ratos Wistar	16
1. Resumo.....	16
2. Abstract	16
3. Introdução	17
4. Material e métodos.....	23
4.1 Animais.....	23
4.2 Determinação de sobrevida, peso corporal e consumo de alimento	23
4.3 Determinação do BMI, índice de Lee, circunferência abdominal, BMC, BMD, massa magra, massa gordurosa e porcentagem de gordura	23
4.4 Teste de tolerância à glicose oral	24
4.5 Determinação do perfil lipídico, ácidos graxos livres, glicerol e glicemia	24
4.6 Determinação plasmática de hormônios.....	25
4.7 Determinação de neurotransmissor dopamina e seu metabolito DOPAC na eminência mediana e na adenohipófise.....	25
4.8 Análises estatísticas.....	26
5. Resultados.....	27
5.1 Sobrevida dos animais, mudanças do peso corporal e consumo de alimento ao longo da vida	27
5.2 Indicadores de obesidade ao longo da vida dos animais	28
5.3 Mudanças na composição corporal com a idade	29
5.4 Alterações no metabolismo de carboidratos ao longo da vida dos animais....	31
5.5 Variações no metabolismo lipídico dos animais nas diferentes idades	32
5.6 Mudanças hormonais no envelhecimento	34
5.6 Variações no conteúdo de DA e DOPAC no envelhecimento	36
5.7 Resumo dos resultados	37
6. Discussão	40
7. Conclusão.....	50
CAPÍTULO 2: Alterações produzidas pelo envelhecimento na função renal e no sistema cardiovascular	51
1. Resumo.....	51
2. Abstract	51

3. Introdução.....	52
4. Material e métodos.....	56
4.1 Animais.....	56
4.2 Determinação da ingesta espontânea de água e solução salina isotônica	57
4.3 Determinação de parâmetros renais	57
4.3.2 Avaliação de mRNA por PCR em tempo real do córtex do rim.....	58
4.4 Determinação de parâmetros cardiovasculares	59
4.5 Análises estatísticas.....	62
5. Resultados	62
5.1 Ingestão espontânea de água e solução salina isotônica	62
5.2 Função renal nas diferentes idades	63
5.3 Morfologia e função cardiovascular nas diferentes idades	65
5.4 Resumo dos resultados	72
6. Discussão	76
CAPÍTULO 3: Resposta hormonal e comportamental dipsogênica altera-se em função da idade e do sexo dos ratos	81
1. Resumo	81
2. Abstract	81
3. Introdução.....	82
4. Material e métodos.....	88
4.1 Animais.....	88
4.2 Privação hídrica	88
4.3 Dosagens de hormônios	89
4.4 Avaliação de mRNA por PCR em tempo real em diferentes tecidos	90
4.5 Análise estatística.....	92
5. Resultados.....	92
5.1 Privação hídrica em machos.....	92
5.2 Privação hídrica em fêmeas	103
5.3 Privação hídrica 24 horas segundo o sexo.....	114
5.4 Privação hídrica 48 horas segundo o sexo.....	116
6. Discussão	132
7. Conclusão.....	139
CONCLUSÃO.....	141
Perspectivas	141
REFERENCIAS	143

ANEXO A- Sexual differences and aging in the drinking behavior and hormone release induced by water deprivation.....	177
APENDICE A- Hematócrito, osmolalidade e sódio plasmático em fêmeas e ratos adultos e idosos normoidratados e desidratados	228

INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população é um fenômeno que vem acontecendo no mundo todo há milênios. A redução bem-sucedida da mortalidade infantil, juventude e dos adultos, eventualmente, muda as distribuições de idade, de modo que as pessoas mais velhas se tornam uma parte cada vez maior nas populações.¹ Sendo assim, no ano 2017, a população maior de 60 anos foi de 962 milhões de pessoas, correspondendo a 13% da população mundial. O número de pessoas idosas (acima de 60 anos) no mundo é projetado para ser de 1,4 bilhões em 2030 e 2,1 bilhões para o ano 2050.² No Brasil, a população maior de 60 anos no ano 2017 foi de 26.990.872 milhões de pessoas, com projeção para 2030 de 42.122.847 milhões de pessoas e para o 2050 de 66.265.645 milhões.³

Depois de se alcançar a maturidade sexual, ocorrem declínios graduais e progressivos da estrutura e função de moléculas, células, tecidos e órgãos durante o envelhecimento.⁴ Assim, o envelhecimento tem consequências sistêmicas que podem ser classificadas em quatro processos: composição corporal, balanço entre disponibilidade e demanda de energia, rede de sinais que controlam a homeostase e a neurodegeneração.^{5,6}

No envelhecimento há uma diminuição da taxa metabólica basal, que resulta em ganho de peso corporal e adiposidade, mesmo sem mudar a ingestão alimentar e o hábito de fazer exercício.⁷ Mudanças grandes na composição corporal podem ser os efeitos mais evidentes e inevitável do envelhecimento.^{5,6} Assim, o envelhecimento produz aumento do índice de massa corporal, da massa adiposa e porcentagem da gordura corporal, da circunferência abdominal e da circunferência do quadril, e a diminuição da estatura, a perda de massa e força muscular e de massa óssea.⁶⁻⁹

Sabe-se que o pico máximo da massa muscular é atingido aproximadamente aos 30 anos e depois diminui de forma gradual. Aos 70 anos, a redução da massa muscular é aproximadamente de 20 a 40%, levando à sarcopenia, sendo esta redução mais pronunciada em mulheres do que em homens.⁷

A densidade mineral óssea, que é usada para avaliar o risco de fratura, declina com a idade a partir dos 50 anos. As mulheres podem perder até 20% de massa óssea durante os primeiros 5-7 anos após a menopausa, e depois disto, a perda continua numa taxa de 0,5-1% por ano. O homem, também, perde massa óssea, mas se inicia mais tarde na vida e persiste por aproximadamente na mesma taxa que a mulher, 0,5-

1% por ano.⁷

O metabolismo da glicose também se deteriora com a idade. A alteração da captação de glicose, utilização ou armazenamento do músculo esquelético, impacta no metabolismo de glicose, podendo levar a doenças como a resistência à insulina e/ou diabetes. A prevalência da resistência à insulina, tolerância a glicose reduzida e diabetes tipo 2 aumenta com a idade. Além disso, a secreção de insulina diminui com a idade (~0.7% por ano iniciando na idade de 20 anos).¹⁰ Em comparação com os homens, as mulheres têm maior deterioração do metabolismo da glicose com a idade. Assim, as mulheres têm maior desenvolvimento de resistência à insulina do que os homens, sendo este efeito parcialmente dependente das mudanças dos hormônios sexuais femininos. Por outro lado, os homens idosos, ao ter diminuição da testosterona apresentam reduzida a sensibilidade de insulina.¹⁰

O metabolismo de lipídeos também é afetado pelos hormônios sexuais no envelhecimento. A oxidação dos ácidos graxos diminui nos idosos, mas são as mulheres quem têm a menor taxa de oxidação.¹⁰

Com o envelhecimento, também mudam a estrutura e a função cardíaca.¹¹ Em indivíduos sem doenças cardiovasculares, o envelhecimento resulta no aumento de hipertrofia ventricular esquerda, declínio da função diastólica com a função sistólica relativamente preservada no repouso.¹²

A homeostenose cardíaca, uma alteração fisiológica associada a idade, refere-se ao conceito de que, da maturidade a senescência, as reservas miocárdicas para enfrentar os desafios da homeostase diminuem. Este conceito foi reconhecido pela primeira vez por Walter Cannon na década de 1940. A homeostenose cardíaca leva ao aumento da vulnerabilidade as doenças cardiovasculares que ocorre com o envelhecimento. Essas alterações associadas a idade devem ser interpretadas como fatores de risco específicos para doenças cardiovasculares.¹³

O envelhecimento cardíaco é caracterizado por uma série de mudanças patofisiológicas complexas que afetam o miocárdio no nível estrutural, celular, molecular e funcional. Estas mudanças fazem que o miocárdio envelhecido seja mais susceptível ao estresse, o que desencadeia a uma alta prevalência de doenças cardiovasculares na população idosa como a insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, hipertrofia do ventrículo esquerdo e doença da artéria coronária.¹³

A nível funcional, o gasto cardíaco, o volume de ejeção e a fração de ejeção não mudam em sujeitos saudáveis em repouso. Porém, no exercício contrações de

duração prolongadas produzem diminuição da frequência cardíaca, fazendo que cada batimento cardíaco apresente um aumento no volume de enchimento final e uma prolongação no tempo de contração.¹⁴⁻¹⁶ A diminuição da frequência cardíaca também foi observada como resultado da redução gradual no número de células marcapasso funcionais do átrio, o que contribui com o aumento na incidência da fibrilação atrial no idoso. Além disso, se reduz no envelhecimento a capacidade do coração para se recuperar do estresse isquêmico transitório.¹⁶

O processo de envelhecimento é geneticamente programado, mas o fator ambiental pode modifica-lo, fazendo que a taxa de envelhecimento seja alterada amplamente entre as pessoas.¹³

Padrões específicos do sexo no envelhecimento cardíaco e vascular desempenham um papel importante. Há diferenças entre os sexos nos padrões de remodelação cardíaca segundo a idade, tendo as mulheres maior prevalência de remodelação do que os homens com insuficiência cardíaca com a fração de ejeção preservada. Fatores hormonais e não-hormonais fundamentam as diferenças sexuais no envelhecimento cardiovascular. A retirada do estrogênio endógeno, na menopausa, parece estar relacionada com o aumento do risco cardiovascular na pós-menopausa. No entanto, quando se analisa as diferenças biológicas intrínsecas entre homens e mulheres ao longo da vida, parecem haver outros fatores, além da menopausa, que determinam os desfechos cardiovasculares.¹⁷

O envelhecimento normal é acompanhado por uma diminuição da água corporal total.⁸ Assim, a água corporal total diminui a partir dos valores aproximados de 60% do peso corporal em homens jovens e 52% em mulheres jovens para 54% e 46% respectivamente. Também na velhice o volume plasmático pode diminuir 21% aproximadamente em relação ao peso corporal e a área de superfície corporal.^{8,18}

Com o envelhecimento, o indivíduo torna-se mais vulnerável às perturbações ambientais, o que pode acarretar em alterações da homeostases fisiológica.⁴ Em condições normais, as pessoas idosas conseguem manter o equilíbrio de água e eletrólitos, porém este estado pode ser alterado por uma doença, perda da capacidade cognitiva ou por uso de medicamentos. Entre as alterações eletrolíticas que sofrem as pessoas idosas, as disnatremias são as mais frequentes, fazendo que a idade seja o principal fator de risco para desenvolver hiponatremia ou hipernatremia.¹⁹

Outro problema que enfrentam as pessoas idosas é a desidratação, a qual é um problema clínico significativo, que se origina pela inabilidade do rim de concentrar

a urina e pela diminuição da sensação de sede. O diagnóstico de desidratação está associado com a presença de comorbidades, estadia hospitalar, futuras hospitalizações e mortalidade.¹⁹⁻²³

Contudo, sabe-se que alterações hormonais relacionadas com a idade e que agem na homeostase hidromineral predispoem os idosos a alterações no sódio plasmático.²⁴⁻²⁶ Um exemplo é a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que como consequência do envelhecimento do rim, produção de renina diminui e consequentemente se reduz a produção de angiotensina II e aldosterona.²⁷⁻³⁰ Outro exemplo é a anemia normalmente encontrada nas pessoas idosas como consequência da diminuição de testosterona, no homem, e de estrogênio, na mulher.³⁰⁻³⁸ Esta alteração no hematócrito faz com que esse parâmetro não reflita o estado de desidratação dos animais.³⁰

O envelhecimento populacional altera os tipos de problemas que enfrentam os sistemas de saúde e prestadores de serviços, já que os gastos em saúde aumentam com a idade e incrementam mais com as incapacidades e são ainda mais altos no último ano de vida.⁵

Ter uma melhor qualidade de vida e reduzir as possibilidades de sofrer doenças agudas e crônicas, não só beneficia a pessoa idosa, mas também os sistemas de saúde. Assim, pesquisas relacionadas com a área de envelhecimento são importantes por ajudar na comunidade em geral. Ao ter as pessoas idosas alterados alguns determinantes fisiológicos relacionados com homeostase do metabolismo energético, cardíaco e/ou hidroeletrolítica, nosso objetivo foi determinar as interações entre o envelhecimento e o sexo que age na homeostase do metabolismo energético, cardíaco e hidromineral.

Para cumprir este objetivo e para que os resultados ficassem melhor expostos, organizamos o estudo em três capítulos. Assim, o primeiro capítulo descreve o efeito do envelhecimento e o sexo no metabolismo energético, o segundo capítulo inclui as mudanças na função renal e cardíaca com o envelhecimento, e o terceiro capítulo descreve a resposta do animal envelhecido à alteração da homeostase hidromineral.

CAPÍTULO 1: Efeito do envelhecimento na composição corporal e na homeostase energética segundo o sexo em ratos Wistar

1. Resumo

As consequências sistêmicas de envelhecer afeta a composição corporal e balanço do metabolismo energético. O nosso objetivo foi caracterizar o envelhecimento dos ratos Wistar em relação a composição corporal e na homeostase energética segundo o sexo. Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, nos quais se determinou a sobrevivência e o peso corporal. Nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foi determinado o consumo de alimento, o BMI, o índice de Lee, a circunferência abdominal, o BMC, o BMD, a massa magra e gordurosa, a porcentagem de gordura, o teste de tolerância à glicose oral e o perfil lipídico em condição de jejum. Em ratos nas idades de 3 e 18 meses, com alimentação *ad libitum*, foram determinados o perfil lipídico, ácidos graxos livres, glicerol e glicemia e as concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, insulina, corticosterona (CORT), prolactina (PRL), hormônio estimulante da tireoide (TSH), triiodotironina (T3) e de dopamina (DA) na eminência mediana e na adenohipófise e o ácido diidroxifenilacético (DOPAC) na eminência mediana. Os animais apresentaram baixa porcentagem de mortalidade, foram classificados como obesos segundo o BMI e índice de Lee, a composição corporal mudou nas diferentes idades principalmente em machos os quais tiveram maior massa corporal, magra, gordura e BMC que as fêmeas. Somente os machos de 12 e 18 meses apresentaram alteração de glicemia após duas horas de uma carga glicêmica e nos 18 meses na curva a tolerância a glicose. Aos 2 meses de idade, sub a condição de jejum os machos apresentaram as concentrações de triglicerídeos maiores do que as fêmeas. Não foram observadas mudanças nos níveis de colesterol total e HDL segundo a idade e o sexo. Na condição prandial os machos de 18 meses apresentaram maiores níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, HDL e ácidos graxos livres. Segundo a idade, os animais de 18 meses apresentaram aumentados os níveis de leptina, os machos de adiponectina e as fêmeas de PRL, CORT e T3. Segundo o sexo, os níveis de T3 foram maiores nos machos de 3 meses e a insulina nos de 18 meses. Os níveis de adiponectina, CORT e TSH foram maiores nas fêmeas de 3 meses, e os de PRL, CORT e TSH nas de 18 meses. Na eminência mediana, o conteúdo de DA diminuiu nas fêmeas de 18 meses e de DOPAC no macho de 18 meses, enquanto que na adenohipófise o conteúdo de DA se manteve. Em conclusão, no envelhecimento, as maiores alterações do metabolismo energético se observam nos machos, enquanto que as fêmeas parecem ativar diferentes mecanismos endócrinos que ajuda a manter a homeostase energética.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sexo. Sobrevida. Metabolismo de glicose. Metabolismo lipídico. Composição corporal. Leptina. Adiponectina. Insulina. CORT. PRL. TSH. T3. DA.

2. Abstract

Systemic consequences of aging affect the body composition and balance of energy metabolism. Our objective was to characterize the aging of Wistar rats in relation to body composition and energetic homeostasis according to the sex. Male and female Wistar rats were used in which survival and body weight were determined. At the ages of 2, 6, 9, 12 and 18 months, food intake, BMI, Lee index, waist circumference, BMC, BMD, lean and fat mass, fat percentage, oral glucose tolerance test and lipid profile in fasting condition. It was determined in 3 and 18 month rats, both sex, with *ad libitum* feeding, lipid profile, free fatty acids, glycerol and glycemia, and the dosage of leptin, adiponectin, insulin, corticosterone (CORT), prolactin (PRL), thyroid stimulated hormone (TSH), triiodothyronine (T3), dopamine (DA) in the median eminence and adenohypophysis, and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the median eminence. The animals had a low percentage of mortality, were classified as obese according to the BMI and Lee index, body composition changed at

different ages mainly in males which had higher body mass, lean, fat, and BMC than females. Only 12 and 18-month males showed glycemia after two hours of glycemic load and in the 18-month glucose tolerance curve. 2-month male rats on fasting showed higher triglycerides than females and total cholesterol and HDL no changes were observed in the aging and sex. In the feeding condition, the 18-month males presented higher serum levels of triglycerides, total cholesterol, HDL and free fatty acids. According to age, 18-month animals showed leptin increased, 18-month male adiponectin was highest, and 18-month female PRL, CORT and T3 were highest. According to sex, T3 was highest in 3-month male and insulin in 18-month male. Adiponectin, CORT and TSH were highest in 3-month female, and in 18-month female were highest PRL, CORT and TSH. At median eminence, DA content decreased in 18-month females and DOPAC in the 18-month male, however, in adenohypophysis DA content was maintained. In conclusion, in aging the major changes in energy metabolism are observed in males, though females appear to activate different endocrine mechanisms that help maintain energy homeostasis.

3. Introdução

É sabido que machos e fêmeas apresentam diferenças na fisiologia metabólica básica e na susceptibilidade a várias patologias clínicas, como a obesidade, a resistência à insulina e a diabetes mellitus tipo II.³⁹ Desde certo ponto de vista, as diferenças sexuais são complexas e mudam ao longo da vida ou como uma função do estilo de vida.⁴⁰ As diferenças sexuais surgem dos efeitos da expressão dos genes dos cromossomos X e Y, também como da participação dos hormônios gonadais, estrogênio e progesterona, no caso das fêmeas e os andrógenos nos machos.^{41,42}

Medidas antropométricas, tais como a circunferência da cintura e a proporção cintura-quadril, são comumente usadas para estimar a obesidade central em homens e mulheres, enquanto que a obesidade periférica é tipicamente medida pela circunferência do quadril ou por meio da absorptometria de raio X de dupla energia (DEXA).⁴⁰ Embora o índice de massa corporal (BMI) seja um forte preditivo de mortalidade em seres humanos, a adiposidade central é um fator importante de risco para o desenvolvimento de desordens metabólicas, incluindo resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II e doenças cardiovasculares.⁴³

A composição corporal de homens e mulheres é diferente. As mulheres adultas geralmente têm maior porcentagem de gordura corporal total e menos massa magra e mineral óssea do que os homens adultos.^{42,44} Por outro lado, o homem tende a ter mais tecido adiposo visceral e inter e intramuscular. Entretanto as mulheres têm mais tecido adiposo subcutâneo, particularmente no quadril e nas coxas, e mais tecido adiposo marrom.⁴⁴

Uma das principais funções do tecido adiposo branco é a armazenagem e liberação de triglicerídeos (TG) para prover energia em forma de ácido graxo livre

(AGL).⁴⁵ A estimulação do sistema nervoso simpático favorece a liberação de TG do tecido adiposo em forma de AGL, o qual é utilizado durante o exercício ou jejum. Por outro lado, no estado pós-prandial, a insulina suprime a liberação de TG do tecido adiposo. O armazenamento de TG no tecido adiposo branco, derivado do AGL circulante, depende do nível de expressão e atividade da lipase lipoproteína (LPL) no adipócito, já que ela é o passo limitante da captura de TG-AGL desde a circulação.⁴⁰

No tecido adiposo, a lipólise é aproximadamente 40% maior nas mulheres do que nos homens, mas o mecanismo que provoca esta diferença sexual não é completamente entendido. Acredita-se que parte da diferença é por ter as mulheres mais oxidação de gorduras e a maior eficiência na utilização e eliminação dos AGL.⁴⁵

Em geral, os homens têm um plasma aterogênico maior do que as mulheres na pré-menopáusia. Assim, tanto durante na condição prandial como no jejum, os homens tem menor concentração plasmática de lipoproteína de alta densidade (HDL) e maior concentração de lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e triglicerídeos do que as mulheres.^{46,47}

Durante o jejum, as mulheres adultas têm níveis de glicose plasmática mais baixos e AGL mais altos do que os homens, já que, no jejum possivelmente as mulheres são protegidas da resistência à insulina induzida por AGL.⁴⁸

A leptina é um hormônio chave na regulação central do metabolismo.⁴⁹ Ela é produzida no tecido adiposo branco em proporção direta ao conteúdo de gordura e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, agindo diretamente nos neurônios pré-sinápticos GABAérgicos e reduzindo o tônus inibitório dos neurônios pós-sinápticos que produzem proopiomelanocortina (POMC), localizados no núcleo arqueado do hipotálamo.⁵⁰ A leptina inibe a via orexigênica mediada por neurônios que expressam o peptídeo relacionado a agouti e o neuropeptídeo Y e como consequência, se inibe a ingestão de alimentos e se estimula o gasto de energia.^{51,52}

A concentração plasmática de leptina é quatro vezes maior na mulher do que no homem de idades similares e pesos normais.⁵³ Esta diferença segundo o sexo pode ser explicados pelos hormônios gonadais, de forma que a testosterona suprime enquanto os estrogênios estimulam a produção de leptina.^{54,55} Assim, em ratos intactos o estradiol, a níveis fisiológicos, estimula a secreção de leptina no tecido adiposo *in vitro*.^{56,57}

A adiponectina é outro hormônio produzido no tecido adiposo e se encontra diminuído na obesidade e em estados de resistência à insulina.⁵⁸ A adiponectina

regula o metabolismo da glicose ao reduzir a gliconeogênese no fígado e melhorar a sensibilidade à insulina no fígado e no músculo, aumentando a oxidação dos AGL.^{59,60} A concentração plasmática de adiponectina é maior em mulheres do que em homens, e está relacionada com a inibição que exerce os andrógenos na adiponectina plasmática.^{61,62}

A insulina, secretada pelas células β dos ilhotas pancreáticas, é o principal regulador da concentração da glicose plasmática. A sensibilidade da insulina em todo o corpo reflete a sensibilidade deste hormônio no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético juntos.⁴⁰ As mulheres têm menor prevalência de resistência à insulina e de sofrer diabetes mellitus tipo II do que os homens. Esta diferença se deve ao fato de as mulheres terem maior sensibilidade à insulina que os homens, removendo a glicose do soro.^{63,64} Contudo, ainda não se tem clareza da relação entre a concentração plasmática de estrogênio e a sensibilidade à insulina, mas é conhecido que a deficiência de andrógenos está associado a resistência da insulina e a obesidade. Estudos em roedores mostraram que a testosterona induz a expressão do gene da insulina nas ilhotas pancreáticas e a posterior liberação de insulina na corrente sanguínea.⁴⁰

Os glicocorticoides (GC) são os efetores finais do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e participam do controle da homeostases metabólica, uma vez que, são em geral de natureza catabólica e liberam substratos de energia durante períodos de estresse, fornecendo o aumento da demanda metabólica do corpo.^{65,66} Assim, no metabolismo de carboidratos os GC neutralizam a insulina ao diminuir a captação de glicose periférica e estimular a gliconeogênese hepática, induzindo assim a resistência à insulina.⁶⁷⁻⁶⁹ Além disso, vários estudos *in vitro* mostraram que os GC têm efeito inibitório na secreção de insulina pelas células β do pâncreas.⁷⁰⁻⁷³

Os GCs participam no metabolismo de lipídeos ao estimular a ingestão calórica e de gorduras. Também, aumenta a hidrólises de TG circulantes, a quantidade de ácidos graxos na circulação e a produção de novo de lipídeos nos hepatócitos. Além disso, contribui com a hipertrofia do adipócito, a hiperplasia do tecido adiposo e um efeito antilipolítico nos adipócitos. Não obstante, foi observado que uma exposição aguda de 48 horas de GC facilita o aumento da lipólises.⁶⁶

A secreção de GC em condição de estresse é inibida por andrógenos e estimulada por estrogênios, os quais agem no PVN via receptor estrogênico do tipo β (ER- β).⁷⁴⁻⁷⁷ Por outro lado, foi reportado que na tarde do proestro, quando os níveis

de estrógeno e de progesterona estão aumentados, a expressão de mRNA de CRH no PVN aumentam.⁷⁸

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico que é sintetizado e secretado pelos lactotrofos adeno-hipofisários, sendo produzida por várias outras células e tecidos. A PRL tem muitos efeitos caracterizados como reprodutivos, metabólicos, osmorregulatórios e imunoregulatorios.^{65,79,80} A PRL age nos sistemas orexigênicos e anorexigênicos do hipotálamo, estimulando e inibindo respectivamente cada sistema, induzindo a ingestão de alimentos, de fato hiperprolactinemia é frequentemente associada com ganho de peso nos seres humanos e ratos.⁸⁰⁻⁸²

O efeito da PRL no tecido adiposo branco tem resultados contraditórios. Assim, por um lado se descreve que a PRL aumenta a concentração de leptina em soro e inibe a lipólise e a liberação de adiponectina, do outro lado há autores que descrevem que a PRL favorece a lipogênese, inibe a leptina, mas não a adiponectina e que ao contrário, aumenta a concentração de adiponectina no soro.⁸³⁻⁸⁸ Além disso, Nilsson *et al* (2009) descreveram que a PRL diminui a expressão mRNA dos transportadores de glicose 4 (GLUT4), mas Ruiz-Herrera *et al* (2017) encontraram uma correlação direta entre PRL plasmática e produzido no tecido adiposo e a expressão de GLUT4.^{85,88} Desta forma, se revela que a PRL age no tecido adiposo, mas a resposta depende dos mecanismos ativados. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer as vias em que a PRL age que faz ter resultados tão variáveis.

No tecido adiposo branco, a PRL incrementa o receptor de adiponectina 1 (AdipoR1), a quinase piruvato desidrogenase 4 (PDK4), a qual diminui a oxidação de glicose, a adipogênese e inibe a produção de interleucina 6 (IL-6).^{83-85,89} Além disso, a PRL no tecido adiposo marrom potencializa o efeito estimulador da insulina na expressão e liberação de leptina.⁹⁰

A PRL participa na regulação da insulina, aumentando os níveis de mRNA de preproinsulina e transportador de glicose 2 (GLUT2) em células de insulinoma de rato (INS-1).⁹¹ Além disso, a PRL induz a proliferação de células β pancreáticas e a secreção de insulina estimulada por glicose, suprimindo os níveis de mRNA da piruvato carboxilase, PDK2 e PDK4, e incrementando a atividade da piruvato desidrogenase.⁹²

O receptor de PRL (PRL-R), que é uma proteína ligada a membrana e tem as isoformas curta, intermediária e longa, se encontra em muitos tecidos do corpo, entre eles o hipotálamo, fígado, pâncreas, músculo esquelético, rim, glândula adrenal,

tecido adiposo branco e marrom.^{79,87,90,93} A testosterona e os estrogênios alteram a expressão de PRL-R segundo o tecido e o tamanho do receptor. Assim, o PRL-R longo é estimulado por testosterona, não se alteara com a progesterona e aumenta a expressão no músculo esquelético quando as ratas estão na fase do proestro.^{80,93} Por outro lado, a expressão da forma curta do PRL-R aumenta no fígado, pâncreas e glândula adrenal de ratas em proestro, e no fígado de ratos e camundongos fêmeas a expressão de PRL-R curto é maior do que nos machos.⁹³⁻⁹⁵

Os neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibular (TIDA), que tonicamente inibem a liberação de PRL na pituitária, exibem uma oscilação robusta que é sincronizada entre as células via gap junction e são modulados pela serotonina, hormônio liberador de tirotrofina (TRH) e pela mesma PRL, que produzem mudanças no comportamento elétrico das células TIDA. A dopamina também é liberada na pituitária por neurônios dopaminérgicos tuberohypofiseal (THDA) e hipofiseal periventricular (PHDA), os quais alcançam os lobos posterior e intermediário, respectivamente, por meio de projeções neuronais diretas.⁹⁶

O TRH faz que os neurônios TIDA se despolarizem, abolindo a oscilação elétrica e fazendo que a descarga fásica seja substituída por uma descarga tónica.⁹⁶ O TRH, pertence ao eixo hipotálamo-hipófise-tiroide (HPT), que determina o ponto de ajuste da produção do hormônio tireoidiano (TH). O TRH estimula a síntese e secreção do hormônio estimulante da tiroide (TSH), que age na tiroide estimulando todas as etapas da biossíntese e secreção de TH. A função do TH é vital para o desenvolvimento do sistema nervoso, crescimento linear, metabolismo energético e termogênese. Além disso, regulam o metabolismo hepático de nutrientes, o equilíbrio de fluidos e o sistema cardiovascular.^{97,98}

As consequências sistêmicas do envelhecimento podem ser classificadas em quatro processos: composição corporal, balanço entre disponibilidade e demanda de energia, rede de sinais que controlam a homeostase e a neurodegeneração. Mudanças grandes na composição corporal podem ser o efeito mais evidente e inevitável do envelhecimento.^{5,99}

As alterações na composição corporal no envelhecimento tanto no ser humano quanto na maioria dos mamíferos, incluem aumento do tecido adiposo, BMI, circunferência abdominal e do quadril e diminuição da massa magra e densidade mineral óssea (BMD).^{6,7,100} Ainda assim, as mulheres exibem maior quantidade de gordura corporal e menor quantidade de massa magra ao longo da vida do que os

homens, indicando que as diferenças sexuais permanecem através da vida.^{6,101} Por outro lado, homens idosos tem maior gordura abdominal, índice de centralidade, nível de triglicerídeos e índice aterogênico e menor nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) colesterol do que as mulheres idosas.^{9,99,102-104}

Igualmente, existem diferenças importantes na regulação da glicose pós-prandial segundo a idade e o sexo das pessoas.¹⁰⁵ Sabendo que o estrogênio e seus receptores regulam vários aspectos do metabolismo de glicose e lipídeos, e que a ausência de estrógenos na menopausa é um fator chave no início de doenças cardiovasculares associadas à síndrome metabólica.¹⁰⁶

O envelhecimento e o sexo modificam são os hormônios relacionados com o metabolismo energético, tais como os glucocorticoides. Ratas idosas sem estresse apresentam maior concentração plasmática de CORT do que os machos e o estresse não tem efeito nos níveis de CORT em ambos sexos.¹⁰⁷ Por outro lado, no ser humano idoso foi reportado que a atividade do eixo HHA aumenta, enquanto que a amplitude diurna de liberação se encontra diminuída. Também foram observadas diferenças segundo o sexo; mulheres idosas apresentam maior concentração plasmática de cortisol e ACTH do que os homens quando foram estimulados por uma injeção de hCRH.^{108,109}

Outros exemplos são a insulina, leptina, adiponectina e prolactina (PRL), os quais ao ter seus níveis modificados podem contribuir no desenvolvimento de diferentes doenças relacionadas com a obesidade, a diabetes e à síndrome metabólica.^{80,105,109-118} Além disso, o eixo HPT em mulheres idosas parece estar alterado já que a concentração circulante da triiodotironina (T3) diminui sem alterar a secreção pulsátil de TSH.¹¹⁹ Esta disfunção da tireoide produz um aumento no risco cardiovascular, fraturas de ossos, problemas cognitivos, depressão e mortalidade.¹²⁰

Neste contexto, ter um melhor conhecimento das diferenças sexuais na composição corporal e no metabolismo energético no envelhecimento deve ajudar aos profissionais da saúde entender o que está acontecendo nos pacientes idosos, para escolher a melhor forma de abordar as diferentes situações que se lhes apresentem, o nosso objetivo é caracterizar o envelhecimento dos ratos Wistar em relação a composição corporal e na homeostase energética segundo o sexo.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período de luz: 06h às 18h). Os animais foram alimentados com uma dieta padrão (QuintiaNuvilab® - 3,86 kcal/g sendo 4% lipídeos, 22% proteínas e 60% carboidratos) e água *ad libitum*.

Foram mantidos 5 animais por caixa, sendo que ao atingirem o peso de 500 g, estes foram realojados em 2 ratos por caixa mantendo-se separados por sexo. Quando alguns deles morria o sobrevivente era realojado com outro sobrevivente, evitando até onde puder a habitação individual.

A manipulação dos animais e os procedimentos experimentais foram submetidos à Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sendo realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicado por US National Institutes of Health (NIH, Publication No. 85-23, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal (protocolo # 014/2014-1).

4.2 Determinação de sobrevivência, peso corporal e consumo de alimento

Para determinar a sobrevivência por semana se contabilizou o número de animais mortos iniciando na idade de sete semanas. O peso corporal foi avaliado cada semana através da vida do animal. Para determinar a ingestão alimentar, se utilizou outro grupo de ratos machos e fêmeas, os quais nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses permaneceram 3 dias em gaiolas metabólicas para adaptação, e logo após, determinou-se a ingestão de alimento por 24 horas.

4.3 Determinação do BMI, índice de Lee, circunferência abdominal, BMC, BMD, massa magra, massa gordurosa e porcentagem de gordura

Os animais nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram anestesiados com ketamina e xilaxina, numa proporção de 1:1 (0,1mL/100g peso corporal i.p.). A circunferência abdominal e o comprimento naso-anal (CNA) foram medidos, para posterior cálculo do índice de massa corporal (BMI) e Índice de Lee. Em seguida, foi

determinado a quantidade mineral óssea (BMC), densitometria óssea (BMD), massa magra e gordurosa e porcentagem de gordura, por meio da DEXA (Hologic Discovery™ QDR Series, Software: Hologic Discovery Wi Small animals), realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP-USP, sob supervisão do Professor Dr. Francisco José Albuquerque de Paula.

4.4 Teste de tolerância à glicose oral

Para realizar o teste de tolerância à glicose oral, os animais nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram mantidos sem dieta padrão por 12 horas, mas com acesso à água *ad libitum*. Uma gota de sangue colhida por meio de uma incisão feita na ponta da cauda do animal, determinou-se a glicemia de jejum. Após isso, os animais receberam por meio de gavagem oral, 2 g/kg de glicose diluída em água destilada.

Novamente a partir de uma gota de sangue da cauda, a glicemia foi determinada aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após administração de glicose. Um glicosímetro (Accu-Check Performa) e tiras reativas para glicosímetro (Accu-Check Performa) foram utilizadas, sendo os valores utilizados para realizar o cálculo das áreas sob as curvas de glicose.

4.5 Determinação do perfil lipídico, ácidos graxos livres, glicerol e glicemia

Para a determinação plasmática do perfil lipídico, os animais foram mantidos sem dieta padrão por 12 horas, mas com acesso a água *ad libitum*. Após deste tempo, a partir de uma incisão feita na ponta da cauda do rato, o sangue foi coletado num tubo de 1,5 mL para posterior separação do soro.

Em outro grupo de animais, machos e fêmeas nas idades de 3 e 18 meses que se encontravam com água e ração *ad libitum*, foram eutanasiados por decapitação, uma gota de sangue foi tomada para determinar a glicemia e o sangue do troco foi coletado em tubos para obter o soro.

As determinações de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL foram realizadas seguindo as orientações do fabricante dos kits comerciais (Triglicérides Liquiform (Ref. 87), Colesterol Liquiform (Ref. 76), Colesterol HDL (Ref. 13), Labtest Diagnóstica, S.A, Brasil). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

Para a dosagem de ácido graxo livre utilizou-se o kit comercial colorimétrico (EnzyChrom™ Free Fatty Acid Assay (EFFA-100), BioAssay Systems) e para a

dosagem de glicerol foi utilizado o kit comercial colorimétrico (Glycerol Assay Kit (MAK117), Sigma-Aldrich-®), seguindo as especificações do fabricante.

4.6 Determinação plasmática de hormônios

Para a determinação hormonal, foram utilizados animais de 3 e 18 meses de vida com água e ração *ad libitum*, sendo eutanasiados por decapitação. Amostras de sangue do troco foram coletadas em tubos, contendo ou não, heparina (10 µL de heparina por cada mL de sangue) para obtenção de plasma e do soro, respectivamente. Todas as dosagens hormonais foram realizadas em duplicata.

O soro foi utilizado para as dosagens de leptina e adiponectina utilizando kits comercial de ELISA (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA; USA). Por meio de kits de ELISA foram determinadas as concentrações de insulina (Alpco, Salem, NH; USA), TSH (Crystal Chem, Grove Village, IL, USA) e T3 (MyBioSource, San Diego, CA; USA).

Para a dosagem de CORT e PRL o plasma foi obtido por meio da centrifugação por 20 min a 3000 rpm a 4°C, sendo armazenado a -20 °C até o dia da extração. A CORT foi extraída a partir de 25 µL de plasma com 1 mL de etanol, e determinada usando a técnica de radioimunoensaio descrita na literatura.¹²¹ A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra-ensaio foram 7,8 ug/dL e 4,62 %, respectivamente.

A concentração plasmática de PRL foi determinada usando o método de radioimunoensaio (RIA) de duplo anticorpo usando anticorpos fornecidos pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, CA, USA). O laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci produziu o hormônio iodado e o anticorpo secundário. O limite inferior de detecção foi de 0,10 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,5%.

4.7 Determinação de neurotransmissor dopamina e seu metabolito DOPAC na eminência mediana e na adenohipófise

Os conteúdos de dopamina (DA) bem como de seus respectivos metabólitos (DOPAC) na adenohipófise (AH) e na eminência mediana (EM) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector eletroquímico. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas a 4°C (Micro Ultrasonic Cell

Disrupter, Kontes, Vineland, USA) em solução de ácido perclórico (PCA) 0,15 M e EDTA 0,1mM contendo isoproterenol, o qual foi utilizado como padrão interno (PI). Os homogenatos foram centrifugados (17949g, 5min, 4°C) e os precipitados foram reservados para dosagem de proteína por método de Bradford (Biorad Labs, Hercules, USA). Já os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22 µm e injetados num sistema cromatográfico isocrático Ultimate3000 (Thermo Scientific, Germering, Germany) contendo coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm; Kinetex EVO, 5 µm) precedida por pré-coluna (4,6 mm; Kinetex EVO, C18), as quais foram mantidas a 32 °C. A fase móvel utilizada era constituída por NaH₂PO₄ 75 mM, NaCl 10 mM, EDTA 25 µM, ácido octanossulfônico 1,7 mM, acetonitrila 4 % e pH 3,0, sendo que o fluxo utilizado foi 0,8 mL/min. A detecção dos analitos foi realizada por Coulochem III (Thermo Scientific, Germering, Germany), onde a célula guarda teve potencial de oxidação (E_{ox}) ajustado para 500 mV e a célula de detecção foi configurada para E_{ox1} = -300 mV e E_{ox2} = 350 mV. A quantificação foi realizada no programa Chromeleon 6.8, o qual monitorou o E_{ox2}, utilizando o método do PI, considerando o tempo de retenção e a área dos picos. Todas as amostras foram analisadas no mesmo ensaio e o erro-intraensaio foi 1,32% na EM e 8,7 % na AH. Finalmente, todos os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína da amostra.

4.8 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). As análises de sobrevida foram realizadas utilizando o método de Kaplan-Meier. A significância estatística da diferença entre as médias dos grupos estudados foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) fatorial seguido de pós-teste Newman-Keuls quando as variâncias foram iguais, ou pela análise de Games-Howell quando as variâncias foram diferentes. Para os experimentos que foram realizados ao longo da vida dos animais ou aqueles que foram feitos ao longo de um tempo, utilizou-se o ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste Newman-Keuls, entretanto, quando os dados não se ajustaram a normalidade, foi usado o Friedman ANOVA e o Mann-Withney U test. Também se utilizou a análise t-student pareado para amostras dependentes e para amostras independentes. Foi adotado o nível de significância de $p < 0.05$ (bicaudal). O número de animais utilizado em cada experimento é indicado pela letra n.

5. Resultados

5.1 Sobrevida dos animais, mudanças do peso corporal e consumo de alimento ao longo da vida

Na figura 1 se apresenta o resultado da sobrevida dos machos e fêmeas a partir da sétima semana de nascimento até a semana setenta e oito. A porcentagem de 90% de sobrevida foi alcançada na semana 31 para os machos, sendo que para as fêmeas foi alcançado na semana 47.

Em relação a porcentagem de mortalidade não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas apresentaram um 36,4% de óbitos enquanto a porcentagem de mortes em machos foi de 32%.

Figura 1: Porcentagem de sobrevida dos machos e fêmeas a partir da sétima até a setenta e oitava semana de idade. O n inicial de machos foi 25 e de fêmeas 22.

O peso corporal dos animais foi registrado semanalmente e se apresenta na figura 2.

Figura 2: Peso corporal semanal dos machos e fêmeas a partir da sétima até a setenta e oitava semana de idade. O n inicial de machos foi 25 e de fêmeas 22.

Machos e fêmeas no início da vida apresentaram um maior ganho de peso e a partir da semana 40 se estabilizou. Além disso, foram observadas diferenças segundo

o sexo, onde os machos tiveram maior peso corporal do que as fêmeas (Sexo: $F_{1;48}=90,02$; $p<0,00001$). Na semana 78 os machos alcançaram um peso de 807 g enquanto as fêmeas 523 g (Interação Sexo x Idade: $F_{1;48}=18,423$; $p<0,00001$).

Como se observa na tabela 1.1 a ingestão alimentar e de energia corrigido pelo peso corporal dos animais diminui com o envelhecimento, onde a ingestão alimentar e de energia foi maior nos ratos na idade de 2 meses do que quando tinham 12 meses de idade (Idade: Ingestão alimentar: Machos: $t_6=3,307$; $p<0,05$ e Fêmeas $t_{13}=4,448$; $p<0,001$; Ingestão de energia: Machos: $t_6=3,307$; $p<0,05$ e Fêmeas $t_{13}=4,448$; $p<0,001$). Além disso, foi observada diferenças segundo o sexo na idade de 12 meses tanto na ingestão alimentar como de energia (Sexo: Ingestão alimentar: $t_{12}=2,938$; $p<0,05$; Ingestão de energia: $t_{12}=2,938$; $p<0,05$).

Tabela 1.1- Ingestão de alimento e energia em 24 horas corrigido pelo peso corporal dos machos (M) e fêmeas (F) nas idades de 2, 6, 9 e 12 meses, é só nas fêmeas de 18 meses. O n se apresenta nas duas últimas linhas.

Parâmetros	Sexo	Idade (meses)				
		2	6	9	12	18
Ingestão alimento (g/100g pc)	M	6,7±1,7	3,8±0,6	3,4±1,0	3,0±1,4 ^a	-
	F	8,0±1,3	5,6±1,2	5,8±2,4	5,1±1,3 ^{bc}	5,9±1,5
Ingestão energia (KJ/100g pc)	M	108,6±28	61,1±9,3	59,8±14,0	49,1±21,6 ^a	-
	F	129,0±21	89,7±19,5	94,2±38,1	83,0±21,3 ^{bc}	95,6±24
n	M	9	8	12	6	-
	F	11	9	8	8	4

Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M. ^a são diferentes com os machos de 2 meses $p < 0,05$, ^b são diferentes com as fêmeas de 2 meses $p < 0,05$, ^c são diferentes com os machos da mesma idade $p < 0,05$.

5.2 Indicadores de obesidade ao longo da vida dos animais

Indicadores do estado de obesidade em ratos se apresentam na figura 3. O BMI foi maior nos machos do que nas fêmeas na idade de 6, 9, 12 e 18 meses (Sexo: $F_{1;12}=37,973$; $p<0,00001$). Ratos na idade de 2 meses apresentaram o menor BMI do que as restantes idades analisadas (Idade: $F_{4;48}=5,877$; $p<0,001$; Fig 3A).

O índice de Lee foi maior nos machos do que nas fêmeas nas idades de 2, 6, 9 e 12 meses (Sexo: 2 meses: $Z=-3,323$; $p<0,001$; 6 meses: $Z=-3,556$; $p<0,001$; 9 meses: $Z=-2,903$; $p<0,01$; 12 meses: $Z=-2,985$; $p<0,01$; Fig 3B).

Segundo se observa na figura 3C, a circunferência abdominal foi maior nos

machos do que nas fêmeas na idade de 2, 6, 9, 12 e 18 meses (Sexo: 2 meses: $Z=-3,852$; $p<0,001$; 6 meses: $Z=-4,089$; $p<0,0001$; 9 meses: $Z=-4,172$; $p<0,0001$; 12 meses: $Z=-3,414$; $p<0,001$ e 18 meses: $Z=-2,267$; $p<0,05$).

Figura 3: BMI (A), índice de Lee (B) e circunferência abdominal (C) de machos e fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando segundo o sexo, $p < 0,05$ entre as idades indicadas para os machos. O n para as fêmeas segundo a ordem cronológica foi: 12, 9, 12, 11 e 9; para os machos foi 18, 18, 15, 11 e 5.

5.3 Mudanças na composição corporal com a idade

Os parâmetros utilizados para determinar a composição corporal nas diferentes idades segundo o sexo se apresentam na figura 4. Nela pode se observar que os machos apresentaram maior BMC do que as fêmeas nas idades de 6, 9 e 18 meses (Sexo: $F_{1;33}=25,975$; $p<0,001$). Além disso, machos apresentaram maior BMC na idade de 18 meses do que quando era mais novo, em tanto de que as fêmeas exibiram a maior BMC na idade de 12 meses e aos 18 meses o BMC diminuiu em relação aos 12 meses (Idade: $F_{3;33}=3,961$; $p<0,05$; Fig 4A).

Na BMD não se observou diferenças segundo o sexo, mas sim nas diferentes idades analisadas. Tanto machos como em fêmeas na idade de 6 meses apresentaram menor BMD do que quando eles tinham 12 e 18 meses (Idade:

$F_{3;33}=36,579$; $p<0,00001$). A maior BMD se observou nas fêmeas na idade de 12 meses e nos machos na idade de 18 meses (Fig 4B).

Na figura 4C são apresentados os resultados da massa magra (tecido muscular) dos animais nas diferentes idades. Os machos tiveram maior tecido muscular do que as fêmeas nas idades de 6, 9, 12 e 18 meses (Sexo: $F_{1;33}=82,172$; $p<0,00001$). Na idade de 12 meses, tanto os machos como as fêmeas tiveram a maior massa magra do que quando tinham 6 meses de idade, e aos 18 meses os machos apresentaram um declínio na massa muscular comparado aos 12 meses de idade (Idade: $F_{3;33}=5,441$; $p<0,01$).

Quando analisada a massa de gordura, apresentada na figura 4D, aos 9 meses, machos apresentaram maior massa de gordura do que as fêmeas (Sexo: $F_{1;33}=31,518$; $p<0,001$). Também, se mostra que na idade de 18 meses tanto os machos como as fêmeas tinham a maior massa de gordura (Idade: $F_{1;33}=158,309$; $p<0,00001$) em relação aos 9 meses de idade dentro do próprio grupo.

Em relação à porcentagem de gordura, não se observou diferença nenhuma segundo o sexo nem nas diferentes idades estudadas (Fig 4E).

Por outro lado, o peso corporal foi diferente em todas as idades estudadas segundo o sexo sendo que machos apresentaram maior massa corporal do que as fêmeas (Sexo: $F_{1;48}=90,020$; $p<0,00001$). O menor peso corporal foi registrado tanto para machos como para fêmeas na idade de 2 meses e maior foi na idade de 18 meses (Idade: $F_{4;48}=129,240$; $p<0,00001$; Fig 4F).

Na figura 4G se apresenta o resumo das mudanças da composição corporal dos machos e fêmeas nas idades de 6, 9, 12 e 18 meses.

Figura 4: BMC (A), BMD (B), massa magra (C), massa gordura (D), porcentagem de gordura (E), peso corporal (F) e composição corporal (G) de machos e fêmeas nas idades de 6, 9, 12 e 18 meses e só nos machos na idade de 2 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando segundo o sexo, $p < 0,05$ entre as idades indicadas para os machos, _____ $p < 0,05$ entre as idades indicadas para as fêmeas, _._._. $p < 0,05$ entre as idades indicadas para ambos sexos. O n para as fêmeas segundo a ordem cronológica foi: 12, 12, 11 e 9; para os machos foi 10, 17, 14, 10 e 5.

5.4 Alterações no metabolismo de carboidratos ao longo da vida dos animais

Na figura 5 se apresentam os resultados do metabolismo de carboidratos. Na condição de jejum de 12 horas (Fig 5A), a glicemia se manteve invariável nas diferentes idades e não se observou diferenças segundo o sexo dos animais.

A glicemia 120 minutos após uma carga de glicose foi maior na idade de 12 e 18 meses nos machos do que nas fêmeas (Interação Sexo x Idade: $F_{4;36}=12,988$;

$p < 0,00001$). Além disso, os ratos nessas mesmas idades apresentaram os maiores níveis de glicemia, sendo que a maior concentração de glicose no sangue foi observada na idade de 18 meses (Idade: $F_{4;36}=13,661$; $p < 0,00001$; Fig 5B).

Na figura 5C se observa que aos 18 meses, a área sob a curva de glicose dos machos foi maior área do que as fêmeas (Interação Sexo x Idade: $F_{4;48}=5,518$; $p < 0,001$).

Em relação à glicemia dos ratos com alimentação a vontade, as fêmeas de 3 meses apresentaram glicemias maiores do que as fêmeas de 18 meses e estas maiores do que os machos (Interação Sexo x Idade: $F_{1;51}=18,283$; $p < 0,01$; Fig 5D).

Figura 5: Glicemia em jejum (A), glicemia após duas horas duma carga de glicose (B) e a área sob a curva de glicose (C) de machos e fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Glicemia de machos e fêmeas com alimento *ad libitum* nas idades de 3 (adultos) e 18 meses (Idosos) (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando segundo o sexo, $p < 0,05$ entre as idades indicadas para os machos. O n para as fêmeas segundo a ordem cronológica foi: 7, 12, 12, 10 e 9; para os machos foi 5, 18, 16, 9 e 5. O n para os machos e as fêmeas de 3 e 18 meses se encontra dentro da coluna.

5.5 Variações no metabolismo lipídico dos animais nas diferentes idades

Os resultados do metabolismo lipídico quando os animais estiveram em jejum de 12 horas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses são apresentados na figura 6. Aos 2 meses de idade, os machos apresentaram a maior concentração de triglicerídeos

do que as fêmeas (Sexo: $Z=-2,598$; $p<0,01$). Ao longo do tempo estudado não foram observadas mudanças nos níveis de triglicerídeos de ambos grupos estudados (Fig 6A).

No caso do colesterol total e o colesterol HDL, não foram observadas diferenças segundo o sexo e entre as idades estudadas (Figs 6B e C).

Figura 6: Triglicerídeos (A), colesterol total (B) e colesterol HDL (C) de machos e fêmeas em jejum nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando segundo o sexo. O n para as fêmeas segundo a ordem cronológica foi: 7, 12, 12, 10 e 9; para os machos foi 5, 18, 16, 9 e 5.

A figura 7 apresenta o metabolismo lipídico de animais com dieta padrão e água *ad libitum*. Ratos machos têm maior concentração de triglicerídeos aos 18 meses do que aos 3 meses e do que fêmeas de 18 meses (Interação Sexo x Idade: $F_{1;48}=18,982$; $p<0,0001$; Fig 7A).

Quando foi feito a análise do colesterol total, os machos de 18 meses apresentaram maiores níveis de colesterol total do que machos de 3 meses e fêmeas de 18 meses (Interação Sexo x Idade: $F_{1;53}=13,289$; $p<0,001$; Fig 7B). No colesterol HDL (Fig 7C), machos de 18 meses apresentaram maior nível sérico do que machos de 3 meses (Idade: $F_{1;53}=4,331$; $p<0,05$).

Para a avaliação de ácidos graxos livres, utilizou-se a quantificação de ácido palmítico, pois este ácido compõe majoritariamente no sangue a maior proporção dos

ácidos graxos livres. Foi observado que os níveis séricos de ácido palmítico nos machos de 18 meses foram maiores do que nos machos de 3 meses e nas fêmeas de 18 meses (Interação Sexo x Idade: $F_{1;24}=19,853$; $p<0,001$; Fig 7D). Não foram observadas diferenças segundo o sexo e a idade na concentração de glicerol sérico nos animais (Fig 7E).

Figura 7: Triglicerídeos (A), colesterol total (B), colesterol HDL (C), ácidos graxos livres (D) e glicerol (E) de machos e fêmeas com alimento *ad libitum* nas idades de 3 (adultos) e 18 meses (Idosos). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando segundo o sexo. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.6 Mudanças hormonais no envelhecimento

Na figura 8A apresenta-se a concentração plasmática de leptina. Tanto em machos como em fêmeas, a concentração plasmática de leptina foi maior aos 18 meses do que aos 3 meses (Idade: $F_{1;32}=26,785$; $p<0,0001$; Fig 8A). Quando analisado o nível plasmático de adiponectina, foi observado um maior nível deste

hormônio em fêmeas de 3 meses quando comparado aos machos de 3 meses (Sexo: $F_{1;32}=14,621$; $p<0,001$). Ratos machos de 18 meses apresentaram maior adiponectina plasmática do que a dos machos de 3 meses (Idade: $F_{1;32}=15,622$; $p<0,001$). Não foram observadas diferenças segundo a idade entre as fêmeas (Fig 8B).

A concentração plasmática de insulina, (Fig 8C) foi maior nos machos de 18 meses do que nas fêmeas de 18 meses (Sexo: $F_{1;27}=11,343$; $p<0,01$). Avaliando-se a concentração plasmática de CORT, observa-se que a CORT foi maior nas fêmeas de 18 meses do que nas de 3 meses (Idade: $F_{1;54}=40,005$; $p<0,0001$). Além disso, as fêmeas de 3 e 18 meses de idade apresentaram maior nível de CORT plasmática do que os machos de 3 meses e 18 meses respectivamente (Sexo: $F_{1;54}=52,893$; $p<0,0001$).

Na figura 8E se observa que a concentração plasmática de PRL foi maior nas fêmeas de 18 meses do que nas fêmeas de 3 meses (Idade: $F_{1;35}=72,856$; $p<0,00001$) e do que nos machos de 18 meses (Sexo: $F_{1;35}=41,936$; $p<0,00001$).

Por outro lado, o TSH é maior nas fêmeas tanto de 3 como de 18 meses que nos machos (Sexo: $F_{1;28}=134,500$; $p<0,0001$; Fig 8F). No entanto, o T3 plasmático é menor na fêmea de 3 meses do que no macho de 3 meses (Sexo: $F_{1;28}=27,503$; $p<0,0001$) e do que na fêmea de 18 meses (Idade: $F_{1;28}=5,767$; $p<0,05$; Fig 8G).

Figura 8: Concentrações plasmáticas de Leptina (A), adiponectina (B), insulina (C), CORT (D), PRL (E), TSH (F) e T3 (G) dos machos e fêmeas nas idades de 3 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre as os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.6 Variações no conteúdo de DA e DOPAC no envelhecimento

O conteúdo de DA na eminência média foi menor nos ratos fêmeas de 18 meses do que nas fêmeas de 3 meses (Idade: $F_{1;20}=17,563$; $p<0,0001$). Além disso,

os ratos machos de 18 meses apresentaram menor conteúdo de DA do que as fêmeas da mesma idade (Sexo: $F_{1;20}=5,984$; $p<0,05$; Fig 9A).

O conteúdo de DOPAC na eminência média foi maior nos ratos machos de 3 meses do que nos ratos machos de 18 meses (Idade: $F_{1;23}=16,219$; $p<0,001$). Também foi menor nos ratos machos de 18 meses do que nas fêmeas da mesma idade (Sexo: $F_{1;23}=17,559$; $p<0,0001$; Fig 9B). Não foi observado diferenças segundo o sexo e a idade no conteúdo de DA na adenohipófise (Fig 9C).

Figura 9: Conteúdo de DA (A) e DOPAC na eminência média (B) e DA na adenohipófise (C) dos machos e fêmeas nas idades de 3 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre as os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.7 Resumo dos resultados

Tabela 1.2- Resumo dos resultados da ingestão de alimento e energia em 24 horas, indicadores de obesidade, composição corporal dos machos (M) e fêmeas (F) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses.

Parâmetro	Sexo	Idade (meses)					Comparação segundo o sexo
		2	6	9	12	18	
Ingestão de alimento	M	Basal	=	=	↓	-	2 meses M = F
	F	Basal	=	=	↓	=	12 meses M < F
Ingestão de energia	M	Basal	=	=	↓	-	2 meses M = F
	F	Basal	=	=	↓	=	12 meses M < F
BMI	M	Basal	↑	↑	↑	↑	2 meses M = F
	F	Basal	=	=	=	=	6-18 meses M > F
Índice de Lee	M	Basal	=	=	=	=	2-12 meses M > F
	F	Basal	=	=	=	=	18 meses M = F
Circunferência abdominal	M	Basal	=	=	=	=	2-18 meses
	F	Basal	=	=	=	=	M > F
BMC	M	-	Basal	=	↑	↑	6,9,18 meses M > F
	F	-	Basal	=	↑	↑	12 meses M = F
BMD	M	-	Basal	↑	↑	↑	M = F
	F	-	Basal	=	↑	↑	
Massa magra	M	-	Basal	=	↑	=	M > F
	F	-	Basal	=	=	=	
Massa de gordura	M	-	Basal	↑	↑	↑	9 meses M > F
	F	-	Basal	=	↑	↑	6,12,18 meses M = F
Porcentagem de gordura	M	-	Basal	=	=	=	M = F
	F	-	Basal	=	=	=	
Peso corporal	M	Basal	↑	↑	↑	↑	M > F
	F	Basal	↑	↑	↑	↑	

Tabela 1.3- Resumo dos resultados do metabolismo de carboidratos e lipídeos dos machos (M) e fêmeas (F) nas diferentes idades.

	Parâmetro	Sexo	Idade (meses)					Comparação segundo o sexo
			2ou3*	6	9	12	18	
Glucosemia	Jejum	M	Basal	=	=	=	=	M = F
		F	Basal	=	=	=	=	
	Após 2 horas duma carga de glicose	M	Basal	=	=	↑	↑	2,6,9 meses M = F
		F	Basal	=	=	=	=	12,18 meses M > F
	Ração <i>at libitum</i> *	M	Basal	-	-	-	=	3 meses M < F
		F	Basal	-	-	-	↓	18 meses M = F
	Curva de tolerância a glicose	M	Basal	=	=	=	=	2 -12 meses M = F
		F	Basal	=	=	=	=	18 meses M > F
	Jejum de 12 horas	M	Basal	=	=	=	=	2 meses M > F
		F	Basal	=	=	=	=	6 -18 meses M = F
	Triglicerídeos	M	Basal	=	=	=	=	M = F
		F	Basal	=	=	=	=	
Ração <i>at libitum</i> *	Colesterol total	M	Basal	=	=	=	=	M = F
		F	Basal	=	=	=	=	
	Colesterol HDL	M	Basal	=	=	=	=	M = F
		F	Basal	=	=	=	=	
	Triglicéridos *	M	Basal	-	-	-	↑	3 meses M = F
		F	Basal	-	-	-	=	18 meses M > F
	Colesterol total*	M	Basal	-	-	-	↑	3 meses M = F
		F	Basal	-	-	-	=	18 meses M > F
	Colesterol HDL*	M	Basal	-	-	-	↑	3 meses M = F
		F	Basal	-	-	-	=	18 meses M = F
	Ácido palmítico *	M	Basal	-	-	-	↑	3 meses M = F
		F	Basal	-	-	-	=	18 meses M > F
	Glicerol *	M	Basal	-	-	-	=	3 meses M = F
		F	Basal	-	-	-	=	18 meses M = F

Tabela 1.4- Resumo dos resultados da concentração plasmática de hormônios e conteúdo de DA dos machos (M) e fêmeas (F) nas idades de 3 e 18 meses com alimentação a vontade.

Parâmetro	Comparação segundo a Idade (meses)		Comparação segundo o Sexo	
	Machos	Fêmeas	3 meses	18 meses
Leptina	3 < 18	3 < 18	M = F	M = F
Adiponectina	3 < 18	3 = 18	M < F	M = F
Insulina	3 = 18	3 = 18	M = F	M > F
CORT	3 = 18	3 < 18	M < F	M < F
PRL	3 = 18	3 < 18	M = F	M < F
TSH	3 = 18	3 = 18	M < F	M < F
T3	3 = 18	3 < 18	M > F	M = F
DA na adenohipófise	3 = 18	3 = 18	M = F	M = F
DA na EM	3 = 18	3 > 18	M = F	M < F
DOPAC em EM	3 > 18	3 = 18	M = F	M < F

6. Discussão

As ratas Wistar são uma das linhagem de ratas mais utilizadas na pesquisa, por ser um mamífero que serve como modelo animal para a análise de um inúmeras características biológicas, fisiológicas e farmacológicas.¹²² Assim, que, ter uma descrição das diferentes variáveis fisiológicas que são afetadas no processo de envelhecimento destes animais pode ajudar a entender melhor este processo.

Umas das características que são determinantes na pesquisa em animais, principalmente para o estudo de envelhecimento, é a expectativa de vida. Na literatura foi descrito que a duração da vida dos ratos é de 2 a 3.5 anos, e que, quando tratadas com dietas reduzidas em calorias, a expectativa de vida pode alcançar até a idade de 4,6 anos.¹²³ Além disso, a porcentagem de sobrevida em ratos Wistar machos varia segundo a pesquisa de 64 semanas a 160 semanas. Neste estudo, a porcentagem de 90 % de sobrevida foi alcançada na semana 31.^{123,124} No caso das fêmeas, a sobrevida de 90 % foi alcançado na semana 71 nas ratas de Wiesner e Sheard, ao passo que nossas fêmeas alcançaram essa porcentagem na semana 47.¹²⁴ A diferenças encontradas na porcentagem de sobrevida entre nossos resultados e os descritos na literatura, tanto em machos como em fêmeas, podem dever-se a diferentes condições que afetam a expectativa de vida dos animais, entre eles, o tipo de alimento e a facilidade dos animais para realizar atividade física, o qual pode estar

relacionado ao tamanho da caixa onde os animais foram mantidos ao longo do estudo. Estas duas condições poderiam favorecer ou não o desenvolvimento de obesidade nos animais, que desencadeia uma morte numa idade precoce ou tardia.

Segundo nossos resultados dos indicadores de obesidade, o BMI, cujo valor normal para um rato varia de 0,45 a 0,68 g/cm², estiveram por acima de 0,8 g/cm² indicando que os nossos animais machos eram obesos desde os 2 meses.¹²⁵ Por outro lado, as fêmeas, apresentaram obesidade a partir dos seis meses. O índice de Lee, o qual estabelece que valores acima de 300 indicam obesidade, confirma os resultados do BMI, sobre a obesidade de nossos animais.^{125,126} Em conjunto, estes resultados permitem assegurar que a obesidade foi uma dos fatores que diminuiu a sobrevida de nossos animais, como uma vez que já foi demonstrado que a obesidade regula positivamente as proteínas das vias apoptóticas em roedores e humanos.¹²⁷

Por outro lado, os nossos ratos não apresentaram diferenças na sobrevida segundo o sexo, de forma similar que os ratos Sprague-Dawley.¹²⁸ Esta ausência de diferença inter-sexual, corrobora a hipótese de que a variável obesidade, que foi observada em ambos sexos, foi mais determinante na sobrevida dos animais.

A circunferência abdominal, outro parâmetro utilizado para determinar obesidade, foi maior nos machos do que nas fêmeas e não apresentou diferenças segundo a idade. Novelli *et al* (2007) encontraram valores de circunferência abdominal médias muito por abaixo dos valores observados em nossos machos, que variaram entre 14,9 cm para animais de 60 dias até 17,5 cm para animais de 120 dias.¹²⁵ Confirmando uma vez mais de que os nossos ratos tem valores além da normalidade, produto de acúmulo de gordura armazenada na área abdominal.

O maior aumento de peso corporal dos ratos machos observados entre as idades de 2 e 6 meses pode estar associado com o crescimento somático, uma vez que em animais com idades maiores de 48 dias o ganho de peso está associado a adição de novas células e a ampliação do tecido adiposo e muscular.¹²⁹ Assim, a diferença observada entre machos e fêmeas no peso corporal se associa ao efeito dos hormônios sexuais, onde a testosterona favorece o desenvolvimento do tecido muscular.^{130,131} De fato nossos resultados da composição corporal, demonstraram que os machos apresentam maior massa magra do que as fêmeas nas idades estudadas.

À medida que o animal envelhece, a adição de novas células no corpo cai lentamente e a armazenagem de gordura aumenta progressivamente.¹²⁹ Assim,

podemos observar em nossos resultados que o aumento da massa de gordura aumenta com o envelhecimento, mas a massa magra diminui e o peso corporal se mantém constante. A diminuição da massa magra e o aumento de gordura na idade de 18 meses observada em nossos resultados pode estar relacionado com a diminuição de testosterona que acontece nos animais idosos, e com ele o estímulo no tecido muscular e a inibição no tecido adiposo.¹³⁰

Por outro lado, como já foi descrito anteriormente, o peso corporal depende de condições como possibilidade de fazer atividade física e tipo de alimentação que favorecem ou não o ganho de peso. Assim, o peso corporal dos ratos que foram utilizados por Nistiar *et al* (2012) chegaram a ter um peso corporal estável a partir da semana 108 até a 147 e o peso máximo foi de 668 g, enquanto que o peso corporal de nossos ratos estabilizou-se a partir da semana 40 de idade e alcançou pesos de mais de 800 g.¹²³ Por outra parte os ratos de Somogyi *et al* (2018) apresentaram o peso corporal muito semelhante aos nossos, além de manter as diferenças dos pesos segundo o sexo.¹³²

O peso corporal, também, é um indicador da valoração do estado nutricional não invasivo.¹²² O consumo de alimento e a ingestão de energia foi máxima na idade de dois meses, mas à medida que os animais envelhecem a ingestão diminui. Resultados similares já foram reportados na literatura por Passadore *et al* (2004) e por Novelli *et al* (2007). Estes autores descrevem que o máximo de ingestão acontece quando os animais têm 90 dias de idade e a partir de então começa a diminuir o consumo de alimento.^{123,125,133–135}

Aos 12 meses de idade, nossas fêmeas apresentaram maior ingestão de alimento e energia do que os machos. Como é sabido, os estrogênios e os androgênios contribuem na manutenção dos níveis normais de ingestão de alimento em ratos, mas de forma oposta, i.é., os estrogênios diminuem o tamanho da refeição enquanto a testosterona a aumenta.^{136–140} Por tanto, a maior ingestão de alimentos pelas fêmeas aos 12 meses pode estar relacionada com a diminuição dos estrogênios e da testosterona, associado à idade.

Em relação às mudanças da composição corporal segundo o sexo e a idade (Fig 4), o BMC e o BMD dos nossos ratos aumentaram segundo os animais cresciam, sendo aos 18 meses, quando se observou o valor maior de BMC e BMD, os resultados foram semelhantes aos descritos por Grygorieva *et al* (2017).¹⁴¹ Os nossos ratos também apresentam valores maiores de BMC que os dos ratos estudados por

Karahan *et al* (2002) quando jovens.¹⁴²

Por outro lado, a diferença sexual encontrada em nossos ratos em relação ao BMC, acontece pela mediação da testosterona, que promove o crescimento dos ratos, produzindo um efeito tanto no tamanho como na massa do osso, enquanto os estrogênios limitam o crescimento do esqueleto apendicular das fêmeas.¹⁴³ Na idade de 18 meses as fêmeas diminuíram o BMC e o BMD, em relação aos 12 meses de idade. Esta diminuição pode ter acontecido devido ao fato de as fêmeas estarem no período da estropausa, onde os níveis de estrogênio decrescem. Consequências semelhantes são observadas em mulheres após a menopausa, uma vez que estudos mostraram que a menopausa e, conseqüentemente redução de estrogênio, está relacionada com uma diminuição no BMD e BMC.^{102,103,144}

Em relação com à homeostases do metabolismo da glicose, nossos animais não apresentaram diferenças segundo o sexo e a idade na glicemia em jejum, similarmente como já foi descrito na literatura.^{63,135,145-147} Porém, no ser humano, foi descrito que a mulheres adultas tem menor glicemia no jejum do que os homens.^{48,64,148} Além disso, duas horas após de uma carga de glicose as mulheres tem maior glicemia do que o homens, mas nossos animais não apresentaram estas diferenças segundo o sexo na vida adulta.^{48,63,64,148} Contudo, duas horas após uma carga de glicose, nossos animais na vida adulta (2, 6, e 9 meses) não apresentaram diferenças na glicemia, de forma similar ao descrito por van den Top *et al* (2017) e Ghezzi *et al* (2012), mas diferente do Yoshino *et al* (1979), quem observaram uma diminuição da glicemia.^{135,149,150}

Por outro lado, nas idades de 12 e 18 meses nossos machos apresentaram os maiores níveis de glicose duas horas depois duma carga de glicose e a maior área sob a curva de glicose, semelhante ao descrito por Gu *et al* (2012) e Laurato Sertié *et al* (2015), mas diferente de Yoshino *et al* (1979) e Ghezzi *et al* (2012) cujos ratos machos de 12 meses e mais velhos, não apresentaram um aumento nas glicemias após duas horas duma carga de glicose.^{135,145,147,150} A alteração na glicemia observada em nossos ratos de 12 e 18 meses, pode se dever possivelmente a interação de três fatores, os quais são a diminuição de produção de insulina, a diminuição da sensibilidade à insulina e o aumento na produção de glucagon. Assim, Gu *et al* (2012) detectaram que ratos idosos tem redução da proliferação e aumento da frequência de apoptoses das células β pancreáticas, o que se associa com uma disfunção das células β pancreáticas relacionadas com a idade.¹⁴⁵ Por sua vez, Muñoz

et al (2018), encontraram que os ratos Wistar de 17 meses de idade tem prejuízo da sensibilidade à insulina, enquanto que Yoshino *et al* (1979) observaram que machos de 17 e 18 meses de idade submetidos a uma carga de glicose oral apresentaram duas horas após, valores de glucagon plasmáticos aumentados.^{150,151}

Diferentes estudos realizados em ratas submetidas a ovariectomia, tem observado que elas apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose.^{152–154} É sabido que o estradiol modula a disposição de glicose ao agir em diferentes proteínas da via da sinalização de insulina e na expressão e translocação de transportador de glicose 4 (GLUT4), no músculo esquelético.¹⁵⁵ Além disso, no tecido adiposo o estradiol incrementa a expressão de receptores de insulina nos adipócitos e impede o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina, nas células β do pâncreas, o estradiol estimula a secreção de insulina e no fígado estimula a gliconeogênese.^{154–156} Embora o esperado fosse que as nossas fêmeas na idade de 18 meses apresentassem uma alteração no metabolismo da glicose, nossos resultados, que são reportados pela primeira vez, diferem do esperado, já que não foram observadas alterações na glicemia destas ratas após uma carga de glicose. Contudo, nós acreditamos que a ausência de alteração na glicemia nas ratas de 12 e 18 meses possa estar relacionada com a elevada concentração de PRL nas ratas idosas, uma vez que já foi descrito que a hiperprolactinemia moderada crônica está associada com um aumento na liberação de insulina induzida por uma carga de glicose.^{157,158} Além disso, também foi descrito que, ilhotas pancreáticas de ratos tratados previamente com dexametasona aumentaram a secreção de insulina estimulada por glicose.^{70,159} Assim, as concentrações plasmáticas elevadas de PRL e CORT nas ratas fêmeas de 18 meses, poderiam estimular a secreção de insulina após uma carga de glicose, contrapondo-se ao efeito da deficiência de estrogênios, não se observando aumento nos valores de glicemia nessa idade.

Por outro lado, o resultado da glicemia de nossas fêmeas de 3 meses com alimentação a vontade foi maior do que as fêmeas de 18 meses e do que os machos de 3 meses. Nós assumimos que estas diferenças poderiam ser consequência de uma diminuição da concentração plasmática de estrogênios, ao estar as ratas de 3 meses em diestro. Assim, a diminuição de estrogênios no plasma estaria diminuindo a sensibilidade de insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo branco, a expressão de GLUT4 no músculo esquelético e no tecido adiposo branco; e estimularia a ingestão de comida e a gluconeogenesis.¹⁵⁶ No caso do valor de glicemia

e a concentração plasmática de insulina nos machos com ração *ad libitum* não mudaram com o envelhecimento, situação já descrita na literatura tanto para ratos como para homens.^{113,150,160}

Nos animais com alimentação à vontade foi observado que a fêmeas de 18 meses apresentaram menor concentração plasmática de insulina do que os machos, o que pode ser o resultado da diminuição de estrogênios nas fêmeas de 18 meses, já que foi descrito na literatura que o estradiol, via receptores de estrogênios acoplados à proteína G (GPR30/GPER) nas células β pancreáticas, tem um efeito insulonorotrópico.^{161,162}

Segundo a idade e o sexo nossos animais não apresentaram alterações no colesterol total e no colesterol HDL após um jejum de 12 horas. Não obstante, na idade de 2 meses as fêmeas apresentaram menor nível de triglicerídeos do que os machos, possivelmente porque elas têm maior taxa de depuração de VLDL, o qual é rico em TG no estado de jejum.^{163,164} Porém, foi observado que a diferença sexual no TG desapareceu nos meses seguintes, o que pode ser porque as fêmeas ficaram obesas e nesta condição a taxa de depuração de VLDL-TG diminuiu, tornando valores de TG semelhantes entre fêmeas e machos.¹⁶⁵ Nossos resultados são similares aos descritos por Laurato Sertié *et al* (2015) e diferentes dos observados por Boudet *et al* (1988) e Bonzón-Kulichenko *et al* (2018), quem observaram diferenças segundo a idade no colesterol e triglicerídeos nos ratos, sendo maior nos animais mais velhos.^{146,147,166}

Quando os ratos de 3 (adultos) e 18 meses (idosos) foram mantidos com alimento e água a vontade, se observou que os níveis séricos dos triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e os ácidos graxos livres foram maiores nos ratos idosos do que nos ratos adultos, mostrando que com o envelhecimento estas variáveis mudam no macho, como já foi descrito na literatura.^{160,167,168} A diferença segundo o idade observada no colesterol total, pode dever-se a que com o avance da idade os níveis de LDL aumentam, já que com o envelhecimento a taxa de depuração de LDL da circulação diminui ao diminuir a expressão do receptor de LDL (LDLr) hepático.^{169,170} A deficiência de LDLr duplica o aumento do colesterol total.¹⁶⁹ Além disso, a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR), que é a enzima limitante para a biossíntese de colesterol, no envelhecimento aumenta sua ativação.¹⁷¹

Por outro lado, as fêmeas com ração e água *ad libitum* não foram observadas

diferenças segundo a idade nos triglicerídeos e colesterol total, similar aos resultados obtidos por Murawski *et al* (1989). No entanto, diferente deles, nossas fêmeas não apresentaram diferenças na concentração de ácido graxo livres, entanto que Muraswski *et al* (1989) descreveram um leve aumento segundo a idade.¹⁶⁸ Esta ausência de mudança nossas fêmea de 18 meses em relação às de 3 meses, pode-se dever à algum outro fator que pode estar alterado, como a PRL ou CORT, o que no ser humano não se observa, ou que ainda não foi estudado mas que está agindo no metabolismo de lipídeos nas fêmeas fazendo que os parâmetros estudados se mantenham sem alterar no envelhecimento, gerando assim algum tipo de proteção.

Na idade de 18 meses, os machos com alimentação à vontade, apresentaram maior concentração sérica de ácidos graxos livres, triglicerídeos e colesterol total do que as fêmeas. A diferença sexual encontrada nas concentrações séricas de TGs e ácidos graxos livre pode se dever ao fato de que as fêmeas tem maior depuração de ácidos graxos livres pelo músculo do que os machos e por conseguinte menor formação de TGs no fígado, como acontece no ser humano.¹⁶⁴ No caso do colesterol total, a diferença sexual pode se dever a maior densidade do receptor LDL no fígado de fêmeas.¹⁷²

Entre as características observadas durante o envelhecimento, tanto no humano como em modelo animal, especificamente ratos, está o desenvolvimento de hiperleptinemia, que ocorre em ambos os sexos, como foi observado em nossos resultados.^{173,174} Embora o aumento nos níveis de leptina nos animais adultos esteja associado ao aumento de gordura, nos ratos idosos a expressão do gene de leptina aumenta com a idade de forma independente do aumento na adiposidade.^{115,175} Tanto as pessoas como ratos idosos apresentam resistência periférica e central á leptina, a qual se manifesta pela incapacidade de inibir a ingestão de alimentos, esgotar o estoques de gordura, aumentar o gasto energético e regular sua própria expressão no tecido adiposo.^{173,176,177}

Em animais adultos, as concentrações plasmáticas de adiponectina apresentam-se maiores nas fêmeas do que nos machos, isto porque a testosterona seletivamente reduz a secreção de adiponectina de alto peso molecular dos adipócitos.^{62,178} A concentração de adiponectina plasmática foi maior nos machos idosos do que nos adultos. Entretanto não foram observadas diferenças em fêmeas ao longo do tempo. Estes dados são similares aos descritos em seres humanos, que mostram que nos homens, o nível de adiponectina aumenta de forma linear com a

idade, diferindo de mulheres que não apresentam mudanças segundo a idade.^{179–181} Este aumento de adiponectina nos ratos idosos poderiam ser como consequência da diminuição do andrógenos com a idade.¹⁷⁹

Alterações na expressão de receptores de adiponectina AdipoR1 e R2, alteram a união do ligando com seu receptor, produzindo aumento do conteúdo de triglicerídeos, inflamação e estresse oxidativo, levando a resistência à insulina e a intolerância à glicose.¹⁸² Embora o nível de adiponectina estivesse aumentado nos nossos machos idosos, eles apresentaram intolerância à glicose e conteúdo de triglicerídeos altos, refletindo uma alteração da união da adiponectina com seu receptor, o poderia se pensar que estes animais apresentaram resistência a adiponectina ou uma regulação negativa da sinalização da adiponectina através da endocitose do receptor de adiponectina.¹⁸³

A CORT plasmática de nossos animais foi maior nas fêmeas do que nos machos, e maior nas fêmeas idosas do que nas adultas, de forma similar ao descrito para o ser humano, nos quais foi demonstrado que as concentrações de CORT são maiores em mulheres do que em homens, e que mulheres idosas tem maior resposta secretora do eixo pituitária adrenal do que as mulheres jovens.^{109,184} Estas diferenças segundo o sexo são estabelecidas pela estrogenização neonatal das fêmeas que afeta diferentes substratos regulatórios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), entre eles a expressão do gene do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), arginina-vasopressina (AVP) e receptor de glicocorticoides (GR) hipotalâmicos.¹⁸⁵ Por sua vez, a diferença segundo a idade encontrada, se deve a perda da retroalimentação negativa das fêmeas idosas, provocada pela diminuição de GR em diferentes partes do cérebro relacionados com o controle do eixo HPA e pelo estímulo de PRL.^{184,186–188}

Os glicocorticoides e seus receptores foram caracterizados como pontos críticos no controle endócrino da homeostase energética nos mamíferos.¹⁸⁹ Os glicocorticoides podem produzir efeitos diabetogênicos sob condições de excesso ou ao longo prazo, tais como induzir resistência periférica à insulina, promover a obesidade abdominal e elevar os ácidos graxos e triglicerídeos plasmáticos.¹⁹⁰ No entanto, os nossos resultados utilizando fêmeas adultas e idosas não apresentaram nenhuma das condições anteriormente descritas, sugerindo que as fêmeas idosas poderiam ter também uma diminuição dos GR periféricos. Em adipócitos de camundongos deficientes de GR, o teste a tolerância a glicose foi melhorado por um

aumento na sinalização da insulina no músculo e no tecido adiposo. Além disso, estes camundongos atenuaram a obesidade associado a dieta e idade, a hipertrofia do adipócito e a esteatoses no fígado.¹⁹¹

A concentração de PRL plasmática foi maior nas fêmeas idosas do que nas fêmeas adultas e do que nos machos idosos, como foi descrito na literatura.^{184,188,192} O aumento de PRL em fêmeas idosas pode dever-se a falta de resposta dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibular hipotalâmico ou pela possível alteração de receptores de PRL.¹⁹³ Por outro lado, há estudos que demonstraram que a ciclicidade das atividades das catecolaminas, DA e norepinefrina, começa a ser atenuada na meia-idade e, eventualmente, desaparece completamente no período acíclico da velhice. Esta deficiência acentuada nas atividades das catecolaminas reflete em níveis aumentados de PRL em soro de fêmeas idosas em diestro permanente, como se apresentaram nossos resultados.^{118,194} Além disso, em nossos resultados pode se observar uma diminuição de DOPAC na eminência mediana, refletindo a diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos, diferente do sugerido por Demarest *et al* (1982), indicando que a atividade neuronal dopaminérgica não muda e que os neurônios DA remanentes são capazes de compensar a perda parcial, aumentando a atividade deles.¹⁹⁵

Por outro lado, a concentração de DA na adenohipófise não muda com o envelhecimento, confirmando que não existe correlação entre o conteúdo de DA na hipófise anterior e os níveis plasmáticos de PRL, e que possivelmente ela não participa no controle da liberação de PRL nos animais idosos.¹¹⁸

Hiperprolactinemia em fêmeas estimula a ingestão de comida, deposição de gordura branca e aumento de peso. Em mulheres na pré-menopausa, ela foi associada com hiperinsulinemia e resistência à insulina sem mudanças no colesterol total, os triglicerídeos e adiponectina.^{82,196–198} Contudo, os camundongos com hiperprolactinemia crônica tem intolerância à glicose, hiperinsulinemia, esteatoses hepática, expressão de genes lipogênicos diminuída e obesidade.¹⁹⁹ O exposto acima, somado aos nossos resultados que não demonstraram alterações no metabolismo da glicose, sugere que ainda há muito que se investigar neste tema com fêmeas idosas.

As concentrações plasmáticas de TSH apontara diferenças segundo o sexo, tanto nas idades de 3 meses como de 18 meses, apresentando as fêmeas maior concentração plasmática de TSH do que os machos. A diferença sexual observada nos animais pode ser explicada pela soma de vários fatores como pelo estradiol e a

testosterona. Assim, tem se observado que os estrogênios estimulam na pituitária anterior a atividade da enzima deiodinase tipo 1, ao passo que a testosterona a reduz.²⁰⁰ Além disso, os estrogênios aumentam a densidade de T3 nuclear e os receptores de TRH na células tirotrofas.²⁰¹

A concentração plasmática de TSH, em nossos resultados, não variou segundo a idade nos machos e nas fêmeas, do mesmo modo como foi observado por Greeley *et al* (1982) utilizando ratos Sprague Dawley.²⁰² Entretanto, Donda *et al* (1987), observaram que as fêmeas idosas Long-Evans e Wistar apresentaram maior concentração plasmáticas de TSH do que as jovens, mas não encontraram diferenças segundo a idade nos machos.²⁰³ Além disso, no ser humano a concentração plasmática de TSH nos idosos parece que depende mais da disposição de iodo no médio, sendo assim que nas regiões onde há suficiente iodo, o TSH aumenta com a idade, tanto em homens como em mulheres, ao passo que nas áreas com deficiência de iodo, o TSH diminui com a idade.¹²⁰ Podemos inferir destes dados, que a alça de retroalimentação que mantém o eixo hipotálamo-hipófise-tiroide pode se alterar com a idade.²⁰²

A diferença sexual observada na concentração plasmática de T3 nos animais de 3 meses de idade, possivelmente se deveu ao efeito inibitório que exerce a CORT na produção de T3.⁶⁵ Como já foi discutido anteriormente e como são observados em nossos resultados, a concentração plasmática de CORT é maior nas fêmeas do que nos machos. Assim, na ausência do efeito inibitório da CORT, a concentração plasmática de T3 torna-se mais alta.

Por outro lado, foi observado que nas fêmeas de 18 meses de idade o T3 plasmático foi maior do que aos 3 meses. Embora as ratas de 18 meses tenham apresentado maior concentração plasmáticas de CORT, a expressão de GR periféricos está possivelmente diminuída, e assim, o efeito inibitório da CORT nas ratas de 18 pode se encontrar mais atenuado. Interessantemente, no ser humano foi descrito que a diminuição da concentração plasmática de T3 no envelhecimento parece ser consequência de um processo degenerativo do epitélio da glândula tiroide, que leva ao seu achatamento, produzindo problemas para captação de iodo. Além disso, há ainda uma diminuição dos folículos, que altera a formação dos hormônios tiroidianos.¹²⁰

7. Conclusão

A sobre vida dos ratos Wistar a partir da semana 7 até a idade de 18 meses, foi similar entre machos e fêmeas, mas foi menor se comparar com outros grupos de ratos de outros estudos.

O consumo de ração e/ou energia, normalizado pelo peso corporal muda segundo o sexo e a idade, sendo assim que à medida que os animais envelheciam, o consumo diminui e diferenças sexuais aparecem, apresentando as fêmeas maior ingestão alimentar.

Nossos ratos foram considerados obesos, segundo os indicadores utilizados para determinar obesidade. Porém, os animais não apresentaram alterações fisiopatológicas metabólicas relacionadas com a obesidade.

A composição corporal mudou segundo os animais envelheciam, sendo os machos os que apresentaram maiores mudanças nos diferentes parâmetros estudados. Segundo o sexo também foram observadas diferenças, onde os machos apresentaram maiores massas do que as fêmeas.

O metabolismo da glicose foi alterado pela idade e o sexo, apresentando os machos idosos maior alteração, enquanto nas fêmeas o metabolismo de glicose foi mantido ao longo da vida.

Alterações no metabolismo de lipídeos foram observadas nos machos, mas não nas fêmeas ao envelhecer.

A maioria dos hormônios que participam no metabolismo energético permanecem inalterados pelo envelhecimento, sendo o sexo o maior determinante nos hormônios que apresentaram alguma diferença, como no caso dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise e a glândula periférica, no qual as fêmeas idosas apresentam maior alteração.

No envelhecimento, as maiores alterações do metabolismo energético se observam nos machos, entanto que as fêmeas parecem ativar diferentes mecanismos endócrinos que ajuda a manter a homeostases energética.

Embora, muitos resultados já foram descritos sobre o efeito do envelhecimento no metabolismo energético em ratos, informações sobre fêmeas são escassas. Assim, nossos resultados fornecem novas informações que abrem portas para futuras pesquisas neste tema.

CAPÍTULO 2: Alterações produzidas pelo envelhecimento na função renal e no sistema cardiovascular

1. Resumo

O envelhecimento é um processo biológico complexo, com declínio gradual e progressivo da estrutura e função, que envolve moléculas, células, tecidos, órgãos e organismos. O rim e o coração são alterados pelo envelhecimento. O objetivo deste trabalho é determinar as alterações produzidas pelo envelhecimento na função renal e no sistema cardiovascular de ratos Wistar. A ingestão espontânea de água e solução salina isotônica em 24 horas foi realizada em machos nas idades de 2, 9, 12 e 18 meses, utilizando gaiolas metabólicas. A função renal foi determinada em machos nas idades de 2, 9 e 18 meses e fêmeas de 18 meses, para a coleta de urina de 24 horas utilizou-se a gaiola metabólica e o sangue se coletou por uma incisão na cauda. A expressão relativa do mRNA de Slc12a3 do córtex renal foi realizado em machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade. A determinação da pressão arterial se realizou em machos e fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses e se utilizou o sistema de manguito de cauda. No exame ecodopplercardiográfico se utilizaram ratos fêmeas nas idades de 6, 12 e 18 meses. A avaliação histológica do miocárdio foi realizada em ratos machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade. Se utilizou a área transversa ventricular e se utilizaram os anticorpos anti β -Gal (B-12) e anti-gamma H2A.X. Ratos machos na idade de 2 meses bebem mais água espontaneamente de que quando eles tinham 9, 12 e 18 meses de idade. A ingestão espontânea de solução salina não mudou com a idade. A osmolalidade urinária foi maior nos ratos de 2 meses do que nos ratos de 18 meses. A TFG foi menor nos ratos de 18 meses dos que nos 9 meses, o FeNa foi maior na idade de 9 meses do que nos 2 meses de idade dos machos. A expressão génica relativa de mRNA de Slc12a3 nos machos de 18 meses foi menor do que os ratos de 3 meses, e as fêmeas de 3 meses de idade apresentaram menor expressão génica relativa de mRNA de Slc12a3 do que os machos. As LVPW;d e LVPW;s foram maior na idade 18 meses. MV E foi maior na idade de 6 meses do que na idades de 12 e 18 meses de idade. MV IVS E'foi menos negativo na idade de 12 meses do que aos 6 e 18 meses. MV IVS E'/MV E foi mais negativa na idade de 18 meses do que aos 6 e 12 meses de idade. As fêmeas de 18 meses de idade apresentaram maior marcação com β -galactosidase do que os machos na mesma idade. Os ratos Wistar envelhecidos podem ser utilizados como modelo para o estudo das patologias relacionadas com o envelhecimento e a disfunção renal e cardíaca.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sexo. Ingestão de água e salina. Função cardíaca. Função renal.

2. Abstract

Aging is a complex biological process, with gradual and progressive decline of structure and function, involving molecules, cells, tissues, organs and organisms. The kidney and the heart are altered by aging. Objective is to determine the changes produced by aging in renal and cardiovascular function of Wistar rats. Spontaneous intake of water and isotonic saline in 24 hours was performed in 2, 9, 12 and 18-month-old males, using metabolic cages. Renal function was determined in 2, 9- and 18-month-old males and 18-month-old females. To collect 24-hour urine, metabolic cage was used and to collect the blood was made a tail incision.

Relative expression *Slc12a3* mRNA of renal cortex was performed in 3 and 18-month-old males and females. Determination of blood pressure was performed in 2, 6, 9, 12- and 18-month-old males and females by tail cuff system. Doppler examination was made in 6, 12 and 18-month-old female rats. Histological evaluation of the myocardium was performed in 3- and 18-month-old male and female rats. Ventricular transverse area was dyed with anti- β -Gal (B-12) and anti-gamma H2A.X antibodies. Male rats at the age of 2 months drank more water spontaneously than when they were 9, 12 and 18 months old. Spontaneous intake of saline did not change with age. Urinary osmolality was greater in 2-month-old rats than in 18-month-old rats. GFR was lower in the 18-month-old male than in the 9-month-old male, FeNa was greater at 9 month-old-male than in the 2-month-old male. Relative gene expression of *Slc12a3* mRNA in 18-month-old males was lower than 3-month-old rats, and 3-month-old females had lower relative gene expression of *Slc12a3* mRNA than males. LVPW; d and LVPW; s were greatest at age 18 months. MV E was greater at 6-month-old female than 12- and 18-month-old female. MV IVS E ' was less negative at 12-month-old than at 6- and 18-month-old female. MV IVS E ' / MV E was more negative at the age of 18-month-old than at 6 and 12-month-old. Females 18-month-old had higher β -galactosidase labeling than males at the same age. Aged Wistar rats can be used as a model for the study of pathologies related to aging and renal and cardiac dysfunction.

Key word: Aging. Sex. Water and saline ingestion. Cardiac function. Renal function.

3. Introdução

O envelhecimento é um processo biológico complexo, com declínio gradual e progressivo da estrutura e função, que envolve moléculas, células, tecidos, órgãos e organismos.⁴ O rim e o coração como órgãos, não fogem deste processo.

O rim, ao envelhecer exibe diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (TFG), este último como consequência da redução na taxa de fluxo plasmático capilar no glomérulo e no coeficiente de ultrafiltração no capilar glomerular.²⁹ A perda de néfrons funcionais se associam com a hipertrofia de podócitos, glomeruloesclerose, atrofia tubular e rarefação microvascular gradual.²⁰⁴ Além disso, a redução na resistência da arteríola aferente está associada com o aumento na pressão hidráulica capilar do glomérulo.²⁹

Entre as alterações estruturais provocadas no rim, associadas com mudanças hemodinâmicas, se encontram a perda de massa renal, hialinização das arteríolas aferentes, desenvolvimento de arteríolas aglomerulares, glomérulos escleróticos e fibrose tubulointersticial.²⁹

O túbulo renal, particularmente a porção proximal, consome muita energia no processo de reabsorver a maioria dos solutos filtrados, o que pode comprometer as

células do túbulo proximal, ao incrementar o estresse oxidativo e acumular macromoléculas, que são tóxicas para as células.²⁰⁴

O rim envelhecido também apresenta alteração de estímulos vasoativos, de tal forma que os estímulos vasoconstritores se encontram aumentados, enquanto as respostas vasodilatadoras estão comprometidas. Além disso, o sistema renina-angiotensina e óxido nítrico se encontram diminuídos.²⁹

Por outro lado, no sistema cardiovascular, o envelhecimento provoca alterações na estrutura e função dos vasos sanguíneos, que o leva a um aumento das incidências de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, doença arterial coronária, insuficiência cardíaca e hipotensão postural. Além disso, o envelhecimento altera as células endoteliais e, portanto, a regulação do tônus vascular, reduzindo os relaxamentos dependentes do endotélio. Porém, os relaxamentos independentes do endotélio são essencialmente inalterados, com a exceção dos agonistas dos receptores β , que geralmente são reduzidos.²⁰⁵

No envelhecimento o miocárdio sofre mudanças morfológicas e funcionais. O coração envelhecido apresenta uma progressiva perda de miócitos, associado a morte celular por apoptoses ou necroses, produzidos pelo aumento do estresse oxidativo ou diminuição da densidade capilar.¹¹

A perda de miócitos no miocárdio é acompanhada por uma hipertrofia dos miócitos restantes, correspondendo com o aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo (LVPW).¹¹ Além disso, em parte como resultado da diminuição da dimensão do eixo longo e parcialmente como resultado de um desvio para a direita da aorta ascendente dilatada, o septo ventricular basal se inclina para a esquerda, inchando na via de saída do ventrículo esquerdo (septo sigmoide). A consequência disto é que o septo ventricular basal incha na via de saída do ventrículo esquerdo e mimetiza a hipertrofia septal assimétrica da cardiomiopatia hipertrófica.²⁰⁶ Também, os fibroblastos cardíacos proliferam e produzem fibrose intersticial, que conduz a uma redução da complacência miocárdica, desenvolvendo um aumento na pressão ventricular durante a diástole, o que contribui a disfunção diastólica.¹¹

A massa do ventrículo direito (RV) também diminui com a idade, produzindo uma redução dos volumes ao final da sístole (ESV) e diástole (EDV).²⁰⁷

A valvopatia aórtica, valvar ou degenerativa, é considerada a lesão valvar mais comum encontrada em idosos. A doença valvar aórtica calcificada é um distúrbio de evolução lenta com continuidade da doença que varia do espessamento valvular

discreto, sem obstrução do fluxo sanguíneo, denominado esclerose aórtica, à calcificação grave com alteração do movimento da valva ou estenose aórtica.^{13,208}

A calcificação anular mitral (MAC), que incrementa com a idade, se desenvolve a partir da deposição progressiva de cálcio ao longo e abaixo do anel valvar mitral. A MAC se associa com a fibrilação atrial, doença do sistema de condução, doença aterosclerótica e eventos cardiovasculares adversos, incluindo acidente vascular cerebral e mortalidade.^{13,209,210}

O nodo sinoatrial (AS), responsável pelo controle da frequência cardíaca (FC), e a atrioventricular perde miócitos no processo de envelhecimento.²¹¹ Uma redução para menos de 10 % das células marcapasso em relação a adultos jovens, resulta na disfunção do nodo AS com aumento no tempo de condução nodal e diminuição da FC. Além disso, a FC é influenciada por alterações estruturais no coração, incluindo a fibrose e hipertrofia, que retardam a propagação do potencial de ação.²¹²

Durante a diástole, o enchimento do ventrículo acontece em duas fases: a fase passiva e a fase ativa.¹¹ Na fase passiva, a perda de tensão da parede ventricular no início da diástole, a contração do átrio esquerdo (LA) e a chegada do fluxo sanguíneo das veias pulmonares geram um gradiente de pressão atrioventricular, sendo maior a pressão atrial do que a ventricular, o que favorece o fluxo de sangue ao LV.^{11,213} Na fase ativa, a contração atrial expelle o restante do sangue do LA ao LV. A contribuição relativa feita pelas fases passiva e ativa na diástole ventricular são determinadas pela taxa função diastólica ventricular (MV E/A). Assim, o LA modula o débito cardíaco ao auxiliar no processo de enchimento do ventrículo esquerdo (LV).¹¹ Embora, o LA esteja aumentado pela idade, o enchimento ventricular passivo se encontra diminuído.^{214,215}

A reserva cardíaca da população idosa se encontra reduzida. Assim, os idosos na condição de repouso, a função sistólica, medida por a fração de ejeção (EF), permanece estável, mas durante o exercício a EF diminui.²¹⁶

Com o envelhecimento também aumenta o índice de desempenho miocárdico, indicando que uma grande fração da sístole é gasta para lidar com as mudanças de pressão durante as fases isovolumétricas, o que reflete a disfunção sistólica e diastólica do LV. Devido ao comprometimento do enchimento diastólico passivo e ao aumento da contribuição da contração atrial ao enchimento de LV, o pico de velocidade de enchimento passivo (MV E) e a MV E/A diminuem com a idade.²¹⁶

A pressão sanguínea aumenta com a idade, provocando aumento do trabalho cardíaco no momento de ejetar o sangue durante a sístole, o que resulta na remodelação ventricular, que é denominado enrijecimento do acople ventrículo-vascular.¹¹

A matriz extracelular adversa (ECM), que é uma coleção complexa de proteínas localizadas no exterior das células, alinha os cardiomiócitos e fornece suporte biológico e estrutural às células do coração, no entanto, a deposição excessiva de MEC aumenta a rigidez do miocárdio e favorece a disfunção diastólica.^{11,216,217}

O coração envelhecido tem alterações nas proteínas do miofilamento, como a mudança da cadeia pesada de α -miosina para β -miosina, resultando em uma diminuição da atividade da ATPase da miosina, o que faz que a contração do coração seja retardada.²¹⁸

Com a idade se altera a expressão e função de canais iônicos, receptores, enzimas e vias de sinalização, que desempenham um papel fundamental na base fisiopatológica do coração, afetando as propriedades mecânicas e elétricas do miocárdio.¹³ Assim, a diminuição na capacidade de sequestrar cálcio por parte do retículo sarco/endoplasmático de Ca^{2+} -ATPase-2 (SERCA2a) pode prolongar o transiente de Ca^{2+} no citosol, produzindo aumento da rigidez dos miofilamentos, redução da sensibilidade ao cálcio das proteínas do miofilamento e alteração das propriedades da actina a miosina que podem levar ao relaxamento do cardiomiócito.^{218–220}

Os lisosomas também sofrem o efeito do envelhecimento, reduzindo a autofagia pelo acúmulo ao longo do tempo de muita lipofuscina, que é composta de lipídios insolúveis e resíduos de proteínas.²²¹ Os níveis de autofagia são regulados pela proteinase alvo da rapamicina (TOR), que por sua vez é sensível a estímulos nutricionais, como os níveis de glicose e aminoácidos.²²²

Diferentes mecanismos moleculares causam o envelhecimento cardíaco, entre eles o TOR e o fator de crescimento similar a insulina 1(IGF-1), os quais participam na hipertrofia cardíaca no envelhecimento.^{216,223} Além disso, baixos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento (GH) e IGF-1 se associam com aumento do estresse oxidativo mitocondrial nos vasos vasculares do coração, comprometendo a função contrátil.²²⁴ Também, no envelhecimento se encontra aumentado o nível do fator de crescimento transformante beta (TGF- β), que é um fator fibrótico e induz a expressão de proteínas ECM e inibe a degradação da matriz por metaloproteinases

(MMPs).^{225,226}

Com a idade aparecem alterações hormonais que afetam tanto a estrutura como a função do miocárdio. Assim, a ativação crônica do sistema renina-angiotensina-aldosterona, estimulado pelo aumento da enzima conversora de angiotensina no endotélio dos vasos do coração, age nos miócitos e fibroblastos e contribui a desenvolvimento de hipertrofia, fibroses e disfunção cardíaca.^{11,13}

O mecanismo de dessensibilização de β -adrenoreceptor, é outra alteração associada a idade. Ele é um processo caracterizado por alterações moleculares dos receptores β -adrenérgicos. Assim, a fosforilação das estruturas receptoras, potencializada pelo estado de ligação do receptor agonista induz a redução da densidade dos receptores e sua internalização.²²⁷ A dessensibilização do β -adrenoreceptor é responsável da redução da modulação autonômica do sistema cardíaco, especialmente durante o exercício físico.²²⁸ Além disso, as respostas cardiovasculares em repouso diminuem as infusões de agonistas adrenérgicos.²²⁹

Segundo como foi exposto, o envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.¹¹ Embora a taxa de sobrevivência associada a doenças cardiovasculares tem melhorado, a morbidez associada com a doenças cardiovasculares tem produzido um aumento nas hospitalizações.^{230,231} Além disso, a diminuição da função renal com o envelhecimento são de importância clínica ao aumentar o risco de desenvolver uma lesão renal aguda, por tanto o objetivo deste trabalho é determinar as alterações produzidas pelo envelhecimento na função renal e no sistema cardiovascular de ratos Wistar.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período de luz: 06h às 18h). Os animais foram alimentados com uma dieta padrão e água *ad libitum*.

A manipulação dos animais e os procedimentos experimentais foram submetidos à Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto-USP e foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicado por US National Institutes of Health (NIH, Publication No. 85-23, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal (protocolo # 014/2014-1).

4.2 Determinação da ingestão espontânea de água e solução salina isotônica

Para determinar a ingestão espontânea de água e solução salina isotônica se utilizou um grupo de ratos machos nas idades de 2, 9, 12 e 18 meses. Por três dias eles estiveram em gaiolas metabólicas com água, solução salina isotônica e ração *ad libitum* se adaptando e após este tempo se determinou a ingestão de água e salina por 24 horas, fazendo uso de bebedouros graduados.

4.3 Determinação de parâmetros renais

4.3.1 Determinação da função renal

Para determinar a função renal, se utilizou um grupo de ratos machos nas idades de 2, 9 e 18 meses e fêmeas de 18 meses. Eles foram colocados em gaiolas metabólicas por três dias com água, solução salina isotônica e ração *ad libitum* para se adaptarem e posteriormente, do dia 4 ao dia 5 coletou amostra de urina de 24 horas, e por meio de uma incisão na cauda se coletou sangue em tubos heparinizados para posterior separação do plasma.

Da urina e do sangue foi dosado a osmolalidade, o sódio e a creatinina.

Para a determinação da osmolalidade plasmática e urinária utilizou-se o método de redução do ponto de congelação da água através de um osmômetro (Advanced Instruments Inc. ®, modelo 3250), no qual foram utilizados 250 µL da amostra.

A concentração de sódio no plasma e na urina foi determinada com ajuda de um analisador de eletrólitos (9180 Analisador de Eletrólitos, Roche), para isto foi utilizado 90 microlitros da amostra de plasma e 40 de urina.

A determinação de creatinina plasmática e urinária foi realizada utilizando o kit comercial (Creatinina (Ref. 35) Labtest Diagnóstica, S.A, Brasil).

A TFG, a clearance osmolar e de sódio, e a fração de excreção de sódio (FENa) foram obtidas através do cálculo, usando as seguintes fórmulas:

$$TFG = \frac{\text{Creatinina em urina} \times \text{Fluxo urinário}}{\text{Creatinina em plasma}}$$

$$\text{Clearance osmolar} = \frac{\text{Osmolalidade urinária} \times \text{Fluxo urinário}}{\text{Osmolidade plasmática}}$$

$$\text{Clearance de Na} = \frac{[\text{Na}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo urinário}}{[\text{Na}]_{\text{plasma}}}$$

$$FENa = (\text{Clearance de Na} \times \text{Clarence de Creatinina}) \times 100$$

4.3.2 Avaliação de mRNA por PCR em tempo real do córtex do rim

4.3.2.1 Dissecção

Ratos machos e fêmeas Wistar na idade de 3 e 18 meses com água e alimentação *ad libitum*, foram sacrificados por decapitação e o rim direito foi dissecado. Se fez um corte sagital e com o auxílio de uma agulha estéril de microdissecção com 5 mm de diâmetro interno, uma amostra de córtex renal foi dissecado e colocado em tubo estéril e transferido a -70°C.

4.3.2.2 Extração do RNA total

O RNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se o RNeasy Mini kit-Qiagen®, para isto cada amostra foi colocada em tubos estéreis e foram homogeneizados com 1 mL de Qiazol, posteriormente deixou-se repousar por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo de agregar 200 µL de clorofórmio puro amostra foi agitada e posteriormente deixou repousar por 5 min a temperatura ambiente. A mostra foi centrifugada por 15 min a 1200 rcf a 4°C, da fase clara que se formou foi coletado 250 µL e colocado num tubo estéril.

No novo tubo com a mostra foi adicionado 250 µL de etanol 70% e misturado com a amostra e juntos foram colocados na coluna separadora, logo foi centrifugada a coluna por 1 min a 9600 rpm a temperatura ambiente, logo foi adicionado 700 µL de tampão RW1 na coluna e logo de centrifugar foi colocado 500 µL do tampão RPE na coluna, posterior a 5 min de repouso a coluna foi centrifugada novamente. Adicionou-se novamente 500 µL do tampão RPE e se centrifugou, esta vez por 2 min a 9600 rpm a temperatura ambiente, centrifugou-se outra vez por 1 min a 13200 rpm a

temperatura ambiente.

Depois, foram colocadas as colunas em tubos estéreis e se deixou evaporar o álcool residual por 5 min, posteriormente foi colocado 25 µL de água RNase free diretamente na coluna e se deixou repousar por 2 min. Finalmente, foram centrifugados colunas e tubos por 1 min a 9600 rpm a temperatura ambiente e os tubos com o RNA foram armazenadas a -70 °C.

4.3.2.3 Tratamento com DNase e quantificação do RNA

As amostras foram tratadas com DNase utilizando o kit DNA-free™ (ambion® de life technologies) segundo as especificações do fabricante.

A quantificação e a pureza do mRNA foram realizadas no espectrofotômetro (SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader). As relações das absorbâncias de 260/280, 260/230 nm foram utilizadas na determinação da pureza.

4.3.2.4 Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA), foi feita a partir de 250 ng de RNA, por *kit* comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). A transcrição reversa foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems®) nas seguintes condições: 10 min a 25°C e 120 min a 37°C, posteriormente as amostras foram armazenadas no freezer de -20°C.

4.3.2.5 PCR em tempo real (QT-PCR)

O QT-PCR foi feito em triplicata, para isto foram utilizados 4 µL de cDNA e 8 µL de uma mistura contendo 6,25 µL de solução Taqman® 2X Master Mix (Applied Biosystems®), 0,65 µL de sonda específica e 1,60 µL de água RNase free. A sonda utilizada foi: *Slc12a3* (Rn01531762_m1) adquirida da Applied Biosystems® e o equipamento utilizado foi 7500 QT-PCR System (Applied Biosystems®). A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no threshold cycle (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$.

4.4 Determinação de parâmetros cardiovasculares

4.4.1 Pressão arterial por pletismografia

Para a determinação da pressão arterial se utilizaram ratos machos e fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses, e o sistema de manguito de cauda de rato

CODA® (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT 06790, USA) que é uma medida indireta da pressão arterial. Os ratos foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico, onde permaneceram aquecidos e ventilados de maneira adequada para a realização das aferições de pressão arterial. Para tal procedimento, a porção proximal da cauda dos animais foi encaixada a um manguito de borracha e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente, em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. O manguito estava acoplado um transdutor de pulso (sensor), que captava os sinais e enviava ao computador onde se registrava. A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e a frequência cardíaca foram consideradas como a média de, no mínimo, 5 medidas por animal.

4.4.2 Exame ecodopplercardiográfico

Para o exame ecodopplercardiográfico se utilizaram ratos fêmeas nas idades de 6, 12 e 18 meses. Para isto foi utilizado o ecocardiógrafo Vevo 2100 System (Visual Sonics, Toronto, ON M4N 3N1, Canada), com sonda de 30 MHz. Os animais foram anestesiados com ketamina (58 mg/kg) e xilazina (11,5 mg/kg) (0,05 mL/100g peso corporal i.p.) e posicionados para obtenção do eixo longo e gravação de imagens (quatro e cinco câmaras). Com a visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo curto, foram obtidos: um vídeo para posterior aplicação da técnica de Speckle Tracking radial e uma imagem em modo-M, posicionando o cursor equidistante dos músculos papilares, em plano cordal. A partir dessa imagem, foram obtidos os seguintes parâmetros (em mm): espessura do septo interventricular em diástole, diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole, espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole, espessura do septo interventricular em sístole, diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole. A fração de encurtamento (%) foi calculada a partir da obtenção desses valores. Também foram obtidas imagens da aorta e do átrio esquerdo. As medidas dessas estruturas foram realizadas no modo bidimensional para posterior cálculo da relação átrio esquerdo/aorta. A seguir, foi obtida a imagem da via de saída do ventrículo direito, para mensuração do pico de velocidade do fluxo transpulmônico, com o Doppler pulsado. Por fim, foi obtida imagem apical (quatro câmaras) do coração. A fração de ejeção foi medida a partir dessa imagem, com o método de Simpson. Ainda nesse corte ecocardiográfico, foram obtidos os valores de velocidade de onda E e A do fluxo mitral e tricúspide e o fluxo transaórtico. Para a

mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico, o cursor do Doppler foi posicionado equidistante entre a via de saída do ventrículo esquerdo e o fluxo transmitral, determinando-se o tempo desde o término do fluxo transaórtico até o início do enchimento ventricular rápido (onda E).

O Doppler tecidual do VE foi realizado na imagem apical (quatro câmaras) do coração com a sonda posicionada às margens septal e lateral do anel mitral, para a mensuração das medidas de velocidade de enchimento rápido (Em) e a velocidade de enchimento na fase de contração atrial (Am). A partir disso foi calculada a relação Em/Am.

4.4.3 Exame imunoistoquímico do coração

A avaliação histológica do miocárdio foi realizada em ratos machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade. Se utilizou a área transversa ventricular. Após fixação em formol a 10% os fragmentos foram inclusos em blocos de parafina segundo o procedimento padrão. Cortes de 4 µm de espessura foram coletadas em lâminas histológicas. As lâminas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica anti β -Gal (B-12) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, USA) e anti-gamma H2A.X (Abcam, Cambridge, MA, USA).

As lâminas foram submetidas a recuperação antigênica, para isto elas foram tratadas primeiro com um tampão de citrato de sódio 10 mM por 30 minutos a 95° C, pH 6,0, posteriormente deixou-se esfriar no tampão por aproximadamente 20 minutos. Depois as lâminas foram lavadas três vezes por 2 minutos com água destilada.

Para parar a atividade endógena da peroxidase, as lâminas foram colocadas em tampão fosfato salino (PBS) por 3 minutos a temperatura ambiente, logo em peróxido de hidrogênio a 3% em PBS por 30 minutos e posteriormente foi lavado duas vezes com PBS por 5 minutos.

Depois de que o excesso de PBS foi aspirado, foi colocado nas lâminas soro bloqueador normal de cavalo em PBS (1:50) e deixou-se incubando por 1 hora. Logo de remover o soro bloqueador, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário β -Gal ou anti-gamma H2A.X em albumina de soro bovino (BSA) numa proporção de 1:200, em câmara úmida a 4° C e por overnight. Posteriormente, o anticorpo foi tirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos.

Para a detecção se utilizou o kit de Super Picture TM HRP polymer conjugate broad spectrum (Life Technologies, Frederick, MD, USA), que foi colocado sobre os

cortes, segurando que estivessem cobertos, por 15 minutos. Depois foi lavado com PBS três vezes por 2 minutos foi colocado o cromógeno de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) seguindo as especificações do fabricante (Ivitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Todas as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harrys, após desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e montadas em meio permanente Entellan new (Merck, Damstadt, Alemanha).

A marcação foi avaliada em secções teciduais do miocárdio, observou-se de 5 a 10 campos em aumento de 400x. Se contaram os núcleos azul e os marrom e se fez uma porcentagem do total de núcleos contados.

4.5 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). A significância estatística da diferença entre as médias dos grupos estudados foi avaliada pelo t-student para grupos independentes, ou pela análise de variância (ANOVA) duma via ou fatorial seguido de pós-teste Newman-Keuls quando as variâncias foram iguais e Games-Howell quando as variâncias foram diferentes. Para os experimentos que foram realizados nas diferentes idades dos animais utilizou-se o ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste Newman-Keuls, mas quando os dados não se ajustaram a normalidade, foi usado o Mann-Withney U test e o Kruskal-Wallis Anova. Foi adotado o nível de significância de $p < 0.05$ (bicaudal).

5. Resultados

5.1 Ingestão espontânea de água e solução salina isotônica

A ingestão espontânea de água e solução salina isotônica se apresenta na figura 1, nela se observa que os ratos machos na idade de 2 meses bebem mais água de forma espontânea de que quando eles tinham 9 meses, 12 meses e 18 meses (Idade: $F_{3;45}=15,575$; $p < 0,00001$).

A ingestão espontânea de solução salina apresentou uma tendência a diminuir o volume ingerido segundo aumentava a idade, sem se observar diferenças estaticamente significativas (Fig 1B).

Figura 1: Ingestão espontânea de água (**A**) e solução salina isotônica (**B**) dos ratos machos nas idades de 2, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, ----- $p < 0,05$, na ingestão de água comparando entre as idades indicadas. O n para ingestão de água nas idades de 2, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente: 15, 13, 11 e 11 e para ingestão de solução salina foram 15, 14, 11 e 8 respectivamente.

5.2 Função renal nas diferentes idades

Segundo como se observa tabela 2.1 dos parâmetros da função renal de ratos machos e fêmeas nas diferentes idades estudadas. Nos machos a creatinina plasmática foi maior na idade de 9 meses do que aos 2 meses de idade (Idade: $F_{2;39}=3,972$; $p<0,05$). A osmolalidade urinaria foi maior nos ratos de 2 meses do que nos ratos de 18 meses (Idade: $F_{2;41}=3,924$; $p<0,05$). A TFG foi menor nos ratos de 18 meses dos que nos 9 meses (Idade: $F_{2;27}=5,171$; $p<0,05$). O FENa foi maior na idade de 9 meses do que nos 2 meses de idade dos machos ($T_{15,5}=-3,108$; $p<0,01$). Não foram observadas diferenças segundo a idade e o sexo no fluxo urinário e clearance osmolar. No clearance de sódio também não se observaram diferenças segundo a idade.

Tabela 2.1- Parâmetros da função renal de ratos machos de 2, 9 e 18 meses e fêmeas de 18 meses

Parâmetros	Machos			Fêmeas
	2 meses	9 meses	18 meses	18 meses
Plasma _{creatinina} (mg/mL)	0,30 ± 0,02 (n=14)	0,47 ± 0,04 ^a (n=13)	0,45 ± 0,06 (n=15)	0,67 ± 0,09 (n=18)
Fluxo urinário (mL/min)	0,07 ± 0,05 (n=15)	0,03 ± 0,00 (n=14)	0,03 ± 0,00 (n=15)	0,02 ± 0,00 (n=18)
Osmolalidade urinaria (mOsm/kg)	1456 ± 99,86 (n=15)	1191,21±83,92 (n=14)	1092,33±101,18 ^a (n=15)	1210,06±73,22 (n=18)
TFG (mL/min)	0,12 ± 0,01 (n=10)	0,14 ± 0,01 (n=13)	0,09 ± 0,02 ^b (n=7)	0,06 ± 0,02 (n=18)
Clearance osmolar (mL/min)	0,09 ± 0,01 (n=13)	0,10 ± 0,01 (n=14)	0,08 ± 0,01 (n=14)	0,08 ± 0,01 (n=15)
Clearance de Na ⁺ (mL/min)	0,02 ± 0,01 (n=14)	0,03 ± 0,01 (n=14)	0,12 ± 0,09 (n=8)	-
FENa (%)	11,44 ± 2,33 (n=11)	27,17 ± 4,83 ^a (n=12)	-	-

Os dados são apresentados como médias ± E.P.M. ^a são diferentes com os machos de 2 meses $p < 0,05$, ^b são diferentes com os machos de 9 meses $p < 0,05$.

A expressão génica relativa de mRNA de *Slc12a3* no córtex renal não apresentou diferenças significativas entre as fêmeas de 3 e 18 meses, mas nos machos de 18 meses foi observado que a expressão relativa do gene *Slc12a3* foi menor do que os ratos de 3 meses ($T_{11}=2,820$; $p<0,05$; Fig 2B). Por outro lado, nos animais de 3 meses, as fêmeas apresentaram menor expressão génica relativa de *Slc12a3* do que os machos ($T_8=-4,102$; $p<0,01$; Fig 2C). Não se observaram diferenças segundo o sexo nos animais de 18 meses.

Figura 2: Expressão gênica relativa do mRNA de *Slc12a3* no córtex do rim em fêmeas (A) e machos (B) segundo a idade e segundo o sexo na idade de 3 (C) e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.3 Morfologia e função cardiovascular nas diferentes idades

A figura 3 apresentam as pressões sistólica, diastólica e média de ratos fêmeas e machos nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Não se encontraram diferenças segundo a idade na PAS, PAD e PAM das fêmeas (Fig 3A). Por outro lado, os machos na idade de 2 meses apresentaram maior PAS do que quando eles tinham 6, 9 e 12 meses de idade (Idade: $F_{4;35}=5,568$; $p<0,01$). Além disso, nos machos foi observado menor PAM na idade de 12 meses do que na idade de 2 meses (Idade: $F_{4;35}=3,526$; $p<0,05$; Fig 3B).

Figura 3: Pressão arterial dos ratos fêmeas (A) e machos (B) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, ----- $p < 0,05$ na PAS comparando entre as idades indicadas, _____ $p < 0,05$ na PAM comparando entre as idades indicadas. O n para as fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente: 10, 12, 11, 7 e 7, e para os machos foram 9, 15, 8, 5 e 3 respectivamente.

Na figura 4 se apresentam a PAS, PAD e PAM de ratos fêmeas e machos nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os machos na idade de 18 meses apresentaram maior PAS do que quando eles tinham 12 meses de idade (Idade: $F_{4;8}=5,228$; $p<0,05$; Fig 4A). Não se encontraram diferenças segundo o sexo e a idade na PAD e PAM (Fig 4B e C).

Figura 4: Pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) dos ratos fêmeas e machos nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, --- $p < 0,05$ na PAS dos machos comparando entre as idades indicadas. O n para as fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente: 10, 12, 11, 7 e 7, e para os machos foram 9, 15, 8, 5 e 3 respectivamente.

As fêmeas não apresentaram diferenças no número de batimentos cardíacos por minuto segundo a idade (Fig 5A), mas os machos de 18 meses tiveram maior frequência cardíaca do que quando eles tinham 2 meses de idade ($T_{10}=-2,701$; $p<0,05$; Fig 5B). Não se observou diferenças segundo o sexo nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses na frequência cardíaca (Fig 5C).

Figura 5: Frequência cardíaca de ratos fêmeas (**A**) e machos (**B**) nas idades de 2 e 18 meses, e dos ratos fêmeas e machos nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses (**C**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$. O n para as fêmeas nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente: 10, 12, 11, 7 e 7, e para os machos foram 9, 15, 8, 5 e 3 respectivamente.

Segundo como se observa tabela 2.2 da análises ecocardiográfico da morfologia do coração de fêmeas nas diferente idades estudadas, a espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (LVPW;d) foi menor na idade de 6 meses do que na idade de 12 e 18 meses (Idade: $F_{2;28}=4,282$; $p<0,05$), da mesma forma que a parede livre do ventrículo esquerdo em sístole (LVPW;s) (Idade: $F_{2;27}=8,943$; $p<0,01$). O diâmetro da aorta (Ao Sinus) foi maior na idade de 18 meses (Idade: $F_{2;23}=3,438$; $p<0,05$). Nos outros parâmetros morfológicos estudados não se encontraram diferenças segundo a idade.

Tabela 2.2- Análises ecocardiográfico da morfologia do coração de ratos fêmeas de 6, 12 e 18 meses.

Parâmetros morfológicos	Idade (meses)		
	6 (n=11)	12 (n=11)	18 (n=9)
IVS;d (mm)	1,90 ± 0,05	1,99 ± 0,05	1,96 ± 0,04
IVS;s (mm)	2,79 ± 0,09	2,90 ± 0,10	2,73 ± 0,15
LVID;d (mm)	7,35 ± 0,16	7,23 ± 0,15 (n=10)	7,44 ± 0,23
LVID;s (mm)	4,34 ± 0,98	3,91 ± 0,12	4,34 ± 0,27
LVPW;d (mm)	2,21 ± 0,12	2,70 ± 0,15 ^a	2,69 ± 0,14 ^a
LVPW;s (mm)	2,94 ± 0,13	3,55 ± 0,08 ^a (n=10)	3,44 ± 0,10 ^a
LV Vol;d (µL)	286,90 ± 14,76	275,90 ± 13,23 (n=10)	296,4 ± 21,27
LV Vol;s (µL)	82,02 ± 3,38 (n=10)	60,69 ± 3,16 (n=9)	88,77 ± 13,44
Ao Sinus (mm)	3,75 ± 0,15 (n=9)	3,83 ± 0,18 ^b (n=9)	4,30 ± 0,13 ^b (n=8)
LA (mm)	5,42 ± 0,22 (n=9)	5,82 ± 0,31 (n=9)	5,91 ± 0,15 (n=8)
LA/Ao Sinus	1,46 ± 0,08 (n=9)	1,52 ± 0,04 (n=9)	1,38 ± 0,03 (n=8)

Espessura do septo interventricular em diástole (IVS;d) ou em sístole (IVS;s), diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (LVID;d) ou em sístole (LVID;s), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (LVPW;d) ou em sístole (LVPW;s), volume do ventrículo esquerdo em diástole (LV Vol;d) ou em sístole (LV Vol;s), diâmetro da aorta (Ao Sinus), átrio esquerdo (LA), congestão atrial (LA/Ao Sinus). Os dados são apresentados como médias ± E.P.M. ^a são diferentes com as fêmeas de 6 meses $p < 0,05$, ^b são diferentes com as fêmeas de 12 meses $p < 0,05$. O valor n das fêmeas nas diferentes idades dos primeiros parâmetros morfológicos foi colocado abaixo da idade, aqueles parâmetros cujo n foi diferente, o n foi colocado junto com o dado.

Na tabela 2.3 se apresentam as análises ecocardiográficas da função cardíaca de fêmeas de 6, 12 e 18 meses. Nela se observa que a velocidade de enchimento passivo da câmara cardíaca (MV E) foi maior na idade de 6 meses do que na idades de 12 e 18 meses (Idade: $F_{2;28}=4,612$; $p<0,05$). A velocidade de movimentação da válvula interventricular da válvula mitral durante o enchimento passivo (MV IVS E') foi menos negativo na idade de 12 meses do que aos 6 e 18 meses (Idade: $F_{2;26}=22,701$; $p<0,00001$). O índice de disfunção diastólica do Doppler tecidual (MV IVS E'/MV E) foi

mais negativa na idade de 18 meses do que aos 6 e 12 meses de idade (Idade: $F_{2;28}=9,638$; $p<0,001$). A velocidade de movimentação da válvula lateral da válvula mitral durante o enchimento passivo (MV LW E') foi mais negativa na idade de 6 meses do que 12 meses de idade (Idade: $F_{2;28}=4,471$; $p<0,05$). A fração de encurtamento (FS) foi maior aos 12 meses de idade do que aos 6 meses de idade (Idade: $F_{2;27}=3,465$; $p<0,05$). Não se observaram diferenças segundo a idade nos outros parâmetros cardíacos funcionais nas fêmeas.

Tabela 2.3- Análises ecocardiográficas da função cardíaca de ratos fêmeas de 6, 12 e 18 meses.

Parâmetros funcionais	Idade (meses)		
	6 (n=11)	12 (n=11)	18 (n=9)
MV A (mm/s)	277,20 ± 19,06	273,10 ± 16,20 (n=10)	268,9 ± 21,93
MV E (mm/s)	511,10 ± 19,06	439,7 ± 18,48 ^a	412,70 ± 22,65 ^a
MV E/A	1,94 ± 0,18	1,58 ± 0,10	1,61 ± 0,13
MV IVS A' (mm/s)	-27,53 ± 1,68	-25,22 ± 0,86 (n=9)	-26,52 ± 2,24
MV IVS E' (mm/s)	-35,20 ± 1,60	-23,13 ± 0,92 ^{ab} (n=10)	-31,60 ± 1,30 ^b (n=8)
MV IVS E'/A'	1,24 ± 0,09 (n=10)	1,00 ± 0,09	1,34 ± 0,13
MV IVS E'/MV E (%)	-7,00 ± 0,32	- 5,60 ± 0,32 ^a	-8,30 ± 0,65 ^{ab}
MV LW A' (mm/s)	-30,90 ± 2,21 (n=10)	-26,67 ± 1,89	-29,16 ± 2,05
MV LW E' (mm/s)	-41,50 ± 2,92	-30,45 ± 2,67 ^a	-35,33 ± 2,34
MV LW E' /A'	1,25 ± 0,08 (n=9)	1,20 ± 0,12	1,25 ± 0,10
EF (%)	71,72 ± 1,54 (n=10)	76,87 ± 1,38	71,01 ± 2,45
FS (%)	42,43 ± 1,34 (n=10)	47,15 ± 1,36 ^a	42,01 ± 2,03

Velocidade de enchimento ativo (MV A) e passivo E (MV E) durante a diástole ventricular tomado da válvula mitral, taxa da função diastólica (MV E/A), velocidade de movimentação da válvula interventricular da válvula mitral durante o enchimento ativo (MV IVS A') e passivo (MV IVS E'), índice de disfunção diastólica do Doppler tecidual (MV IVS E'/A') e (MV IVS E'/MV E), velocidade de movimentação da válvula lateral da válvula mitral durante o enchimento ativo (MV LW A') e passivo (MV LW E'), índice de disfunção diastólica do Doppler tecidual (MV LW E'/A'), fração de ejeção (EF) e fração de encurtamento (FS). Os dados são apresentados como

médias $\pm$ E.P.M. ^a são diferentes com as fêmeas de 6 meses $p < 0,05$, ^b são diferentes com as fêmeas de 12 meses $p < 0,05$. O valor n das fêmeas nas diferentes idades dos primeiros parâmetros morfológicos foi colocado abaixo da idade, aqueles parâmetros cujo n foi diferente, o n foi colocado junto com o dado.

Na figura 6 se apresenta os resultados da marcação com β -galactosidase das fibras miocárdicas, onde as fêmeas de 18 meses de idade apresentaram maior marcação do que os machos na mesma idade (Sexo: $F_{1,26}=18,662$; $p<0,0001$; Fig 7A).

Figura 6: Porcentagem de núcleos com marcação de β -Galactosidase dos ratos fêmeas e machos nas idades de 3 e 18 meses (**A**). Tecido miocárdico sujeito a marcação β -Galactosidase dos ratos fêmeas (**C**) e machos (**D**) na idade de 3 meses e fêmeas (**D**) e machos (**E**) de 18 meses que foram examinados por microscopia de campo claro. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, ____ $p < 0,05$ comparando entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Na figura 7 se apresenta os resultados da marcação com H2A.X do miocárdio. Não se observaram diferenças segundo o sexo, nem segundo a idade (Fig 8A).

Figura 7: Porcentagem de núcleos com marcação de H2A.X dos ratos fêmeas e machos nas idades de 3 e 18 meses (**A**). Tecido miocárdico sujeito a marcação H2A.X dos ratos fêmeas (**C**) e machos (**D**) na idade de 3 meses e fêmeas (**D**) e machos (**E**) de 18 meses que foram examinados por microscopia de campo claro. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, ____ $p < 0,05$ comparando entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.4 Resumo dos resultados

Tabela 2.4- Resumo dos resultados da ingestão espontânea de água e solução salina isotônica, dos ratos machos nas idades de 2, 9, 12 e 18 meses.

Ingestão espontânea	Idade			
	2 meses	9 meses	12 meses	18 meses
Água	Basal	↓	↓	↓
Salina (0,9%)	Basal	=	=	=

Tabela 2.5- Resumo dos resultados da função renal dos ratos machos (M) nas idades de 2, 9, e 18 meses e nas fêmeas (F) na idade de 18 meses.

Parâmetros	Machos			Sexo
	2 meses	9 meses	18 meses	18 meses
Plasma _{creatinina}	Basal	↑	=	M = F
Fluxo urinário	Basal	=	=	M = F
Osmolalidade urinaria	Basal	=	↓	M = F
TFG	Basal	=	=	M = F
Clearance osmolar	Basal	=	=	M = F
Clearance Na ⁺	Basal	=	=	-
FeNa (%)	Basal	↑	-	-

Tabela 2.6- Resumo dos resultados da expressão gênica relativa do mRNA de Slc12a3 no córtex do rim dos ratos machos (M) e fêmeas (F) na idade de 3 e 18 meses.

Expressão gênica relativa do mRNA de Slc12a3	Sexo	Comparação por idade
	M	3 > 18
	F	3 = 18
	Idade	Comparação por sexo
	3 meses	M > F
	18 meses	M = F

Tabela 2.7- Resumo dos resultados da pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca dos ratos machos (M) e fêmeas (F) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses.

Parâmetro	Sexo	Idade (meses)				
		2	6	9	12	18
PAS	M	Basal	↓	↓	↓	=
	F	Basal	=	=	=	=
	M vs F	M = F	M = F	M = F	M = F	M = F
PAD	M	Basal	=	=	=	=
	F	Basal	=	=	=	=
	M vs F	M = F	M = F	M = F	M = F	M = F
PAM	M	Basal	=	=	↓	=
	F	Basal	=	=	=	=
	M vs F	M = F	M = F	M = F	M = F	M = F
FC	M	Basal	-	-	-	↑
	F	Basal	-	-	-	=
	M vs F	M = F	M = F	M = F	M = F	M = F

Tabela 2.8- Resumo dos resultados ecocardiográficos da morfologia cardíaca de fêmeas nas idades de 2, 6, e 18 meses.

Parâmetros morfológicos	Idade (meses)		
	6	12	18
IVS;d	Basal	=	=
IVS;s	Basal	=	=
LVID;d	Basal	=	=
LVID;s	Basal	=	=
LVPW;d	Basal	↑	↑
LVPW;s	Basal	↑	↑
LV Vol;d	Basal	=	=
LV Vol;s	Basal	=	=
Ao Sinus	Basal	=	=
LA	Basal	=	=
LA/Ao Sinus	Basal	=	=

Espessura do septo interventricular em diástole (IVS;d) ou em sístole (IVS;s), diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (LVID;d) ou em sístole (LVID;s), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (LVPW;d) ou em sístole (LVPW;s), volume do ventrículo esquerdo em diástole (LV Vol;d) ou em sístole (LV Vol;s), diâmetro da aorta (Ao Sinus), átrio esquerdo (LA), congestão atrial (LA/Ao Sinus).

Tabela 2.9- Resumo dos resultados ecocardiográficos da função cardíaca de fêmeas nas idades de 6, 12, e 18 meses.

Parâmetros funcionais	Idade (meses)		
	6	12	18
MV A	Basal	=	=
MV E	Basal	↓	↓
MV E/A	Basal	=	=
MV IVS A'	Basal	=	=
MV IVS E'	Basal	↑	=
MV IVS E'/A'	Basal	=	=
MV IVS E'/MV E	Basal	↑	↓
MV LW A'	Basal	=	=
MV LW E'	Basal	↑	=
MV LW E' /A'	Basal	=	=
EF	Basal	=	=
FS	Basal	↑	=

Velocidade de enchimento ativo (MV A) e passivo E (MV E) durante a diástole ventricular tomado da válvula mitral, taxa da função diastólica (MV E/A), velocidade de movimentação da válvula interventricular da válvula mitral durante o enchimento ativo (MV IVS A') e passivo (MV IVS E'), índice de disfunção diastólica do Doppler tecidual (MV IVS E'/A') e (MV IVS E'/MV E), velocidade de movimentação da válvula lateral da válvula mitral durante o enchimento ativo (MV LW A') e passivo (MV LW E'), índice de disfunção diastólica do Doppler tecidual (MV LW E'/A'), fração de ejeção (EF) e fração de encurtamento (FS).

Tabela 2.10- Resumo dos resultados da marcação imunohistoquímica com β -galactosidase e H2A.X das fibras miocárdicas.

Parâmetro	Sexo	Idade (meses)	
		3	18
β -galactosidase	M	3 = 18	
	F	3 = 18	
	M vs F	M = F	M < F
H2A.X	M	3 = 18	
	F	3 = 18	
	M vs F	M = F	M = F

6. Discussão

A regulação fisiológica garante que o volume plasmático e a osmolalidade sejam mantidos dentro dos limites estabelecidos, liberando os hormônios relacionados com a ingestão e conservação de água e sódio no corpo.²³² As pessoas idosas, da mesma forma que os ratos idosos, apresentam menor consumo de ingestão de água. À medida que as pessoas envelhecem, os mecanismos básicos de feedback que lhes protegem contra a desidratação são enfraquecidos ou ausentes. Assim, foi observado que a reduzida ingestão de água em pessoas idosas estimulada por desidratação foi relacionada com a disfunção das regiões corticais que contribuem ao processo de saciedade, por tanto a sede, nas pessoas idosas, não está associada a elevação da osmolalidade plasmática, como acontece nas pessoas e animais jovens e adultos.^{23,233}

A ingestão voluntária de líquidos é influenciada por fatores como a disponibilidade e a palatabilidade.²³⁴ Assim, pode ser observado que a ingestão de salina isotônica por parte dos ratos, se manteve nas idades estudadas.

O idoso também perde a capacidade de concentrar urina pelo que a osmolalidade urinária diminui, como foi observado nos resultados.²³⁵ A menor osmolalidade urinária dos idosos pode ser explicada por a diminuição de aquaporinas reguladas por AVP presentes na membrana plasmática de túbulo coletor, redução da densidade do transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC2) na membrana plasmática, perda de

canal de sódio e transportadores de ureia (UTA-1 e UTA-1). Todo em conjunto, impede que a medula renal fique concentrada, evitando que gere um gradiente que impulsaria a reabsorção de água desde os túbulos coletores.²³⁵

Como foi observado nos resultados, o aumento da idade dos ratos pode aumentar o FENa, como consequência de uma diminuição de canais e transportadores de sódio na membrana apical das células renais, que são responsáveis da absorção deste íon.²³⁵

A TFG diminuiu nos ratos idosos de forma similar como acontece no ser humano, onde a maioria dos estudos longitudinais indicam que a TGF tem uma perda média de 1 mL/ano.²³⁶ Como foi mencionado anteriormente, a queda na TFG é devida a reduções na taxa de fluxo sanguíneo no capilar glomerular e no coeficiente de ultra filtração.²⁹

Em todos os parâmetros de função renal estudados não foram observadas diferenças segundo o sexo na idade de 18 meses, sugerindo que nessa idade as variações observadas são devidas principalmente ao envelhecimento dos animais.

O controle fino da excreção de sódio é regulado no túbulo contorneado distal por meio do cotransportador de Na^+/Cl^- sensível a tiazida (NCC), que é codificado pelo gene *Slc12a3*.²³⁷ Os hormônios gonadais modulam a expressão de NCC na membrana do túbulo contorneado distal.²³⁸ Assim, o estradiol aumenta e a testosterona diminui a densidade de NCC na membrana plasmática.^{238,239} A diminuição da expressão relativa de mRNA de *SLC12a3* nas fêmeas de 3 meses, poderia sugerir que as fêmeas se encontravam na fase folicular, onde os níveis de estrogênio se encontravam baixos, e por isso a expressão relativa do gene se observou com pouca expressão em relação com os machos.

A PAS e PAM dos machos na idade de 2 meses se observou elevada, mas nas idades de 6, 9 e 12 meses estas pressões diminuíram. A pressão elevada nos machos de 2 meses, pode ser mais uma alteração provocada pelo protocolo da determinação da pressão arterial ao produzir estresse nos animais quando foram colocados no tubo de contenção, junto com a percepção da cauda ser apertada durante o processo da toma de pressão arterial. Como já foi demonstrado que o aumento do estresse estimula a ativação simpática e com ele a pressão arterial.²⁴⁰ Assim, com o tempo os machos se acostumaram o sistema de toma de pressão arterial, e ao diminuir o estresse, nos meses seguidos a pressões diminuíram aos valores em repouso.²⁴¹ No

caso das fêmeas, a pressão arterial avaliada não apresentou alterações como consequência do envelhecimento.

Estudos do efeito da idade sobre a pressão arterial em ratos apresentaram consistentemente que a idade não afetou significativamente a pressão arterial, mas sim a FC.^{241,242} Nos resultados apresentados neste trabalho foi observado que a FC aumentou nos machos de 18 meses, consequência possivelmente da alteração da via eferente reflexa, que se torna quase exclusiva da via simpática ou β -adrenergica.^{243,244}

Por outro lado, a morfologia cardíaca das fêmeas de 18 meses observada na ecocardiografia, aumentou a espessura da parede livre do LV, embora nos idosos o normal é que a massa miocárdica permaneça sem alterações.²⁴⁵ Então, o aumento da espessura da parede livre do LV observado nas fêmeas de 18 meses poderia ser signo de hipertrofia cardíaca, a qual pode se desenvolver por diferentes mecanismos. Um de estes mecanismos, se associa com o aumento da pressão arterial, decorrência da diminuição da complacência dos vasos sanguíneos, que aumenta a pressão de pulso e o volume sistólico.²⁴⁶ Estas alterações aumentam o trabalho realizado pelo coração durante a ejeção na sístole cardíaca, estimulando o remodelamento ventricular.¹¹ No entanto, como foi discutido anteriormente as ratas fêmeas não modificaram a pressão arterial nas idades estudadas, sugerindo que este não é o mecanismo que produziu o aumento da espessura da parede livre do LV. Outro mecanismo que poderia explicar a hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo observada nas ratas de 18 meses é a perda progressiva de miócitos, por morte celular provocada por apoptoses ou necroses. A perda de miócitos no miocárdio é acompanhada com a hipertrofia dos miócitos restantes, o que desenvolvem a espessura da parede do LV.²⁴⁷

Os resultados ecocardiográficos das fêmeas a longo das diferentes idades estudadas revelaram que a função sistólica permaneceu relativamente constante. Estes dados correlacionam com o descrito nas pessoas idosas que preservam a função sistólica, embora ela pode se tornar comprometida durante o exercício.²⁴⁵

Por outro lado, no ecocardiograma observou-se que as ratas idosas apresentaram alterações relacionadas com o enchimento passivo do LV na diástole, que se associa com deficiências no relaxamento do LV, o qual junto com o aumento da espessura da parede livre do LV podem indicar que as ratas idosas apresentavam disfunção diastólica.¹¹ A presença de disfunção diastólica em ratas idosas já foi descrito por Grimes *et al* (2012).²⁴⁸ Além disso, as ratas idosas aparentemente são

mais susceptível de sofrer disfunção diastólica do que os machos, mas as evidências sugerem que a variação sexual observada não depende dos hormônios gonadais.^{11,248}

Por outro lado, embora as fêmeas idosas apresentaram uma disfunção diastólica, elas mantiveram a EF similar que do quando eram mais novas. Clinicamente a esta condição se lhe conhece como insuficiência cardíaca com EF preservada ou insuficiência cardíaca com EF normal (HFpEF).¹¹ O HFpEF é especialmente prevalente em mulheres idosas e é uma causa crescente de admissões hospitalares.^{249,250}

A senescência celular é mediada por inibidores do ciclo celular y caracterizada por a detenção do ciclo celular, aumento da morfologia celular e um aumento da regulação da β -galactosidase associado à senescência (AS), por isso é que o biomarcador mais utilizado para marcar envelhecimento celular é a β -galactosidase-AS.^{251,252} Não obstante, em cardiomiócitos fetal de humanos foi encontrado que a senescência celular não é acompanhada por encurtamento dos telômeros.²⁵³ Além disso, há evidência de que os miofibroblastos do coração sofrem um estado de senescência prematura independentemente da idade.²⁵¹ Assim, a ausência de diferença na marcação com β -galactosidase-AS das células miocárdicas nos animais de 3 e 18 meses, pode ser devido a que as células miocárdica apresentaram senescência prematura, similar aos miofibroblastos cardíacos.

Por outro lado, nos animais de 18 meses foi observado que os machos apresentaram uma menor marcação nuclear com β -galactosidase-AS do que as fêmeas. Esta diferença poder estar associado a diminuição da testosterona que sofrem os machos durante o envelhecimento, já que foi demonstrado que a atividade da β -galactosidase-AS lisosomal das células miocárdicas, diminui na ausência da testosterona, nos animais castrados, e aumenta em fêmeas ovariectomizadas tratadas com testosterona.^{36,254,255}

Nas células eucariotas o DNA é empacotado em nucleossomas, composto de DNA e histonas (H4, H3, H2B e H2A). A família de histonas H2A inclui a H2A1-H2A2, H2AZ e H2AX. A H2AX pode tornar-se fosforilada no resíduo serina 139, quando se produz a ruptura da dupla fita de DNA, que no caso dos mamíferos é uma fosforilação gamma (γ -H2A.X).²⁵⁶ Embora o coração envelhecido apresenta alterações morfológicas e funcionais que poderiam se relacionar com o prejuízo do DNA, a porcentagem de marcação de γ -H2A.X no miócitos cardíacos não foi modificada por a idade nos resultados apresentados. Eleftheriadou *et al* (2017), também não

encontrou diferenças de γ -H2A.X em tecido cardíaco hipertrofiado.²⁵⁷ Assim, sabendo que no envelhecimento há alterações de proteínas que desencadeiam em mudanças morfológicas e funcionais do coração, é possível sugerir que os genes envolvidos neste processo não se encontram associados nas histonas H2AX, mais sabendo que em mamíferos o H2AX representa o 2-25% do complemento de H2A.²⁵⁶

7. Conclusão

Com o envelhecimento a ingestão espontânea de água diminui nos animais, entretanto que o comportamento natriorexigênico se preserva ao longo da vida dos ratos.

Dos parâmetros de função renal, o envelhecimento altera no macho a TFG, a osmolalidade urinária e o FeNa, como consequência, provavelmente, a diminuição da densidade dos transportadores de sódio.

As ratas idosas ao apresentar HFpEF, que é um problema cardíaco associado a mulheres idosas, podem ser utilizadas como modelo para aprofundar o estudo de esta patologia.

A pressão arterial dos ratos Wistar não é alterada pelo envelhecimento, mas a frequência cardíaca se altera com o envelhecimento nos machos.

Os miócitos cardíacos apresentam signos de senescência nos animais adultos e o envelhecimento não altera as histonas da família H2AX.

Apesar de que há muita informação relacionada ao tema do envelhecimento da função renal e do sistema cardiovascular, nossos resultados apresentaram que os ratos Wistar envelhecidos podem ser utilizados como modelo para o estudo das patologias relacionadas com o envelhecimento e a disfunção renal e cardíaca.

CAPÍTULO 3: Resposta hormonal e comportamental dipsogênica e natriorexigênica altera-se em função da idade e do sexo dos ratos

1. Resumo

A manutenção da homeostase do volume e a osmolalidade dos fluidos corporais é importante para a sobrevivência, mas nos idosos o mecanismo de retroalimentação básico que lhes protege da desidratação torna-se deficiente. O objetivo deste trabalho é comparar as alterações hormonais e comportamentais dipsogênicas e natriorexigênicas que decorrem do envelhecimento segundo o sexo, tanto no estado normo- como desidratado. Para isto, um grupo de ratos Wistar machos e fêmeas na idade entre 2 e 18 meses foram submetidos a privação de líquidos por 24 ou 48 horas. Determinamos a ingestão de água e apetite ao sódio, as concentrações plasmáticas de ocitocina (OT), arginina vasopressina (AVP), corticosterona (CORT), peptídeo natriurético atrial (ANP) e angiotensina II (ANGII). Os animais desidratados idosos bebem menos água e salina isotônica, comparados a ratos jovens. As fêmeas desidratadas de 6 meses ingeriram mais salina do que água e aos 18 meses elas beberam mais água do que salina. Os ratos beberam em todas as idades mais água do que salina. Quando se comparou a ingestão total de água nas idades de 2, 9 e 18 meses, os machos desidratados beberam mais água na idade de 2 meses do que as fêmeas, aos 9 e 18 meses ambos sexos beberam menos água do que quando tinham 2 meses. As fêmeas de 2 e 9 meses beberam mais salina do que os machos, ambos sexos na idade de 18 meses beberam menos salina do que quando eram mais novos. Nas idades de 3 e 18 meses, dos animais desidratados por 48 horas, as fêmeas beberam mais água e salina do que os machos. Os animais de 3 meses beberam mais água do que os de 18 meses e as fêmeas de 3 meses beberam mais salina do que as de 18 meses. Durante a desidratação os ratos de 3 meses tiveram aumento na concentração plasmática de AVP, OT, ANGI e CORT, enquanto o ANP diminuiu. Nos machos de 3 meses, quando desidratados o ANP foi maior do que nas fêmeas de 3 meses desidratadas. Os animais de 18 meses desidratados tiveram menor concentração plasmática de ANGI do que os animais de 3 meses. A CORT foi maior nos animais de 18 meses do que nos animais de 3 meses. A concentração plasmática de OT e CORT foi maior nas fêmeas de 18 meses do que nos machos com a mesma idade. O Agtr1a no órgão subfornical (SFO) teve menos expressão relativa nos animais desidratados e mais expressão relativa no núcleo supraóptico (SON) de machos de 18 meses. O OT foi menos expresso relativamente no SON de fêmeas de 18 meses. Em conclusão, a resposta comportamental dipsogênica e neuroendócrina na manutenção da homeostase hidromineral sofre influência do envelhecimento, tendo o sexo um fator preponderante nestas respostas.

Palavras-chave: Desidratação. Sexo. Envelhecimento. Sede e apetite ao sódio. AVP. OT. ANGI. ANP. CORT. Agtr1a. SON. PVN. SFO.

2. Abstract

Maintenance of volume homeostasis and osmolality of body fluids is important for survival, but in the basis feedback mechanism that protects them from dehydration is weak or lost. Our objective of this work is to compare the hormonal and behavioral changes dipsogenic and natriorexigenic that occur from aging and females, both in the normal and dehydrated state. For this, a group of male and female rats between the age of 2 and 18 months were submitted 24 or 48 hours to liquid deprivation. The plasma concentration of oxytocin (OT), arginine vasopressin (AVP), corticosterone (CORT), atrial natriuretic peptide (ANP) and angiotensin II (ANGII) were determined. Animals dehydrated as they age drink less water and isotonic saline. Dehydrated female rats at 6 months ingested more saline than water and at 18 month they drank more water than saline. Male rats drank at all ages more water than saline. When the total water intake at the ages of 2, 9 and 18 months was compared, at the age of 2 months the dehydrated male rats drank more water than the female rats, at 9 and 18 months both sexes

drank less water than when they were 2 months old. Female rats at 2 and 9 months drank more saline than male rats, both sexes at age of 18 months drank less saline than when they were younger. At ages of 3 and 18 months, of the animals dehydrated for 48 hours, the female rats drank more water and saline than male rats. The 3 months-old animals drank more water than 18 months-old animals, and 3 months-old female rats drank more saline than 18 months-old female rats. During dehydration, 3-month-old rats had an increase in the plasma concentration of AVP, OT, ANGII and CORT, although ANP decreased. In dehydrated 3-month-old male rats ANP was higher than in dehydrated 3-month-old female rats. Dehydrated 18-month-old animals had lower plasma concentrations of ANGII than 3-month-old animals. CORT was higher in animals at 18 months than in animals at 3 months. OT and CORT plasma concentration were higher in 18-month-old female rats at than in 18-month-old male rats. Agtr1a in the subfornical organ (SFO) had less relative expression in the dehydrated animal and more relative expression in the 18 months males supraoptic nucleus (SON). OT was less relative expressed in the SON of 18 months females. In conclusion, the dipsogenic and neuroendocrine behavioral response in the maintenance of the hydromineral homeostasis is influenced by aging, with sex being a preponderant factor in these responses.

Keyword: Sex. Aging. Thirst and appetite for sodium. AVP. OT. ANGII. ANP. CORT.

3. Introdução

A manutenção da homeostase do volume e osmolalidade dos fluidos corporais é fundamental para a sobrevivência, sendo o íon sódio o principal determinante da osmolalidade plasmática e do volume do fluido corporal.²⁵⁸ Distúrbios no balanço hidroeletrólítico induzem respostas fisiológicas que evocam diferentes mecanismos endócrinos, cardiovasculares, renais e comportamentais para restabelecer a homeostases hidromineral.^{232,259}

A sede, induzida pela desidratação por exemplo, é o resultado de duas variáveis combinadas: 1) a diminuição do volume plasmático em 8-10 % e 2) o aumento da osmolalidade plasmática de 1 a 2%.^{65,260,261} Assim, a resposta para manutenção da homeostase hidroeletrólítica vai depender do tipo de desidratação que se apresenta no organismo, seja esta intracelular ou extracelular.^{232,259}

Por outro lado, a pressão sanguínea é monitorada por mecanorreceptores sensíveis ao estiramento conhecidos como barorreceptores, os quais são constituídos por terminações livres sensoriais localizados em vasos sanguíneos e o coração.²⁵⁹ Os barorreceptores no arco aórtico e no seio carotídeo enviam sinais, via nervo vago e glossofaríngeo (X e IX par cranial respectivamente) ao núcleo do trato solitário (NTS) no tronco encefálico.^{258,259} Neurônios do NTS apresentam projeções para os neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico (SON) e núcleo paraventricular (PVN), os quais sintetizam AVP, liberado pela neuro-hipófise.²⁵⁸

Os barorreceptores são os que iniciam a resposta mediada pelo tronco encefálico, chamada barorreflexo, na qual eles respondem as mudanças agudas na

pressão arterial, controlando a atividade do sistema nervoso autônomo no coração alterando o débito cardíaco.²⁵⁹

Por outro lado, os barorreceptores e receptores de volume no rim participam estimulando a liberação de renina, que é a chave para a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A angiotensina II (ANGII) estimula a sede, o apetito ao sódio e a liberação de AVP no cérebro e na glândula suprarrenal estimula a liberação de aldosterona, que reduz a perda de sódio na urina e estimula a ingestão de sal.^{232,259,262,263} Por outro lado, o apetite ao sódio induzido por ANGII apresenta uma latência maior do que a ingestão de água.²⁶⁴

Na hipovolemia, o qual se associa com a desidratação extracelular, diminui o número de descargas dos receptores de estiramento cardiopulmonar e arterial o que causa uma série de respostas compensatórias que incluem aumento da ativação simpática, diminuição do tônus vagal, aumento da secreção de renina, aldosterona, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e AVP e o aumento da ingestão de água.^{259,261} Os ajustes pelo reflexo circulatório diante a perda de volume são rápidas, a conservação renal de água e eletrólitos e a substituição da deficiência de água e sódio pela ingestão são respostas mais lentas que dependem de mecanismos tanto neurais como hormonais.²⁶¹

A hipovolemia induz aumento da ANG II circulante, a qual age no cérebro em estruturas dos órgãos circunventriculares (CVOs), da lâmina terminal e áreas límbicas, como a área postrema (AP), o órgão subfornical (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), onde a AP participa na ação pressora e o SFO está envolvido com o comportamento dipsogênico e apetito ao sódio.^{65,261,265} Além disto, outras estruturas que se encontram protegidas pela barreira hematoencefálica exercem, também, ação dipsogênica, como o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) na lamina terminal, o PVN, a área pré-óptica e a substância cinzenta do tronco cerebral, as quais recebem projeções da área pré-óptica.^{65,261}

O hormônio AVP produzido pelos neurônios magnocelulares do SON e PVN é também de extrema importância para a manutenção da homeostase hidroeletrolítica. A AVP é liberada pela neurohipófise em resposta ao estímulo induzido pelo aumento da osmolalidade plasmática e age principalmente no rim estimulando a reabsorção de água e, por tanto, favorecendo a conservação dos fluidos corporais em situações de ausência de ingestão de água.²⁶⁶

A OT, também é um hormônio sintetizado pelos neurônios magnocelulares do

PVN e SON e é liberado pela neurohipófise em resposta aos estímulos osmóticos e mudanças no volume sanguíneo. O OT inibe a ingestão de sódio e estimula a excreção deste íon no rim, por meio da ativação da produção de óxido nítrico (NO) e consequente liberação de cGMP no rim e por estimular a liberação de ANP nos átrios cardíacos.^{267–269}

O ANP que é produzido nos átrios em resposta a distensão auricular, age estimulando a excreção de sódio na urina e inibindo a sede estimulada por desidratação ou por ANGIIa.^{19,260,270–272} Entretanto, o ANP produzido no cérebro, por estimulação alfa adrenérgica, inibe a ingestão de água estimulada pela ANGII.²⁷³ Portanto que a ocitocina (OT) e o peptídeo natriurético atrial (ANP) antagonizam as ações da ANGII sobre a ingestão e excreção de água e sal.²⁷⁰

A corticosterona (CORT) é outro hormônio que participa na regulação do balanço hidromineral, já que durante a desidratação o aumento elevado de AVP estimula a produção de CORT na glândula adrenal, de forma independente do ACTH.^{274,275} Assim, animais em condições de privação hídrica de 48 horas apresentaram nos neurônios parvocelulares do PVN diminuição da expressão do mRNA de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) sendo que o mRNA da AVP nestes mesmos neurônio permaneceu igual, mas a expressão de AVP nos neurônios magnocelulares do PVN e SON foi encontrado elevado junto com a concentração plasmática de AVP.²⁷⁶ No outro experimento nas mesmas condições de estresse hídrico, foi encontrado que o conteúdo de CRH imunoreativo na eminência mediana e a sua liberação foi similar nos machos hidratados e desidratados. Além disso, na pituitária foi observado que o conteúdo de ACTH estava diminuído nos machos na condição de privação hídrica, embora o mRNA da proopiomelanocortina (POMC) fosse similar nos dos grupos de animais, sugerindo que existe uma inibição post-tradução da sínteses e processamento de POMC.²⁷⁷

Por sua vez, o feedback negativo que faz o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) na liberação de AVP pelos neurônios magnocelulares foi revelado num estudo feito em cachorros, onde se determinou o efeito crônico do cortisol, em níveis fisiológicos, na resposta aguda de AVP a uma infusão de salina hipertônica. Os pesquisadores observaram que tanto a liberação de AVP em condição basal como em resposta a infusão de salina foi atenuada pela infusão crônica de cortisol.²⁷⁸ Não obstante, em outro estudo, também realizado em cachorros, foi observado que o aumento agudo da concentração plasmática de cortisol em níveis fisiológico não inibe

a resposta de vasopressina a infusão de salina hipertônica.²⁷⁹ Por tanto, o feedback negativo que faz o cortisol na liberação de AVP só foi observado, quando a concentração plasmática de cortisol se encontra elevado de forma crônica.

Por outro lado, os glicocorticoides têm um efeito antagônico a AVP no rim, já que os glicocorticoides podem diminuir a expressão e função de transportadores de ureia regulados por AVP nos túbulos coletores da medula interna do rim, produzindo uma diminuição na capacidade de concentrar urina associado a um aumento na excreção de ureia. Por tanto, em resposta a privação de fluidos, animais tratados com glicocorticoides apresentam diminuição da expressão dos transportadores de ureia UT-A1, UT-A3 e UT-A3b na medula interna do rim, impedindo a reabsorção de ureia e a concentração de medula interna renal.^{280–282}

Interessantemente, e diferente do que normalmente acontece em indivíduos adultos como descrito anteriormente, os mecanismos básicos em indivíduos idosos, que lhes protegeriam de situações de desidratação estão deficientes. Nesse sentido, a sede induzida pelo aumento na osmolalidade plasmática está reduzida, além disso, a capacidade renal de concentrar urina é limitada ocasionando, em pessoas idosas, maior risco de desidratação sem uma resposta hidroeletrolítica plena.²³

Em um estudo realizado em seres humanos para determinar se as repostas à desidratação estavam alteradas com a idade revelou que, com a privação hídrica por 24 horas, pessoas idosas apresentavam maior osmolalidade e concentração plasmática de sódio e vasopressina, além da deficiência na percepção da sede pois bebiam menor quantidade de água do que as pessoas jovens.²⁸³

A sede hipovolêmica, a qual é um exemplo de desidratação extracelular, e a ingestão de água são reduzidas no envelhecimento possivelmente mediadas por uma redução na sensibilidade dos barorreceptores, já que foi descrito que tanto em seres humanos como em roedores idosos a sensibilidade dos barorreceptores está diminuída.^{242,260,284–286} Por outra parte, o aumento da osmolalidade plasmática, que é um exemplo de desidratação intracelular, está diminuída na pessoa idosa possivelmente pelo aumento da saciedade e pela diminuição da percepção da sede.²⁶⁰

Estudos no homem revelavam que o aumento da idade podia causar uma diminuição na renina circulante paralelo a uma diminuição da concentração plasmática, de aldosterona. Estes achados apresentam-se de forma branda quanto os indivíduos estavam em posição supina e receberam uma quantidade de sódio

normal, enquanto que pessoas em posição ereta e durante a depleção de sódio, a diferença da concentração hormonal por idade foi mais pronunciada.²⁸⁷ Estudos posteriores demonstraram que a diminuição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) ocorre principalmente por uma diminuição na concentração plasmática de renina ativa nas pessoas idosas.²⁸⁸

Em um outro experimento utilizando tomografia de emissão de pósitrons foi determinado o fluxo sanguíneo cerebral regional, em pessoas jovens e idosas após receber uma infusão de salina hipertônica. Assim, foi encontrado que o fluxo sanguíneo de pessoas idosas diminuiu no córtex médio cingulado anterior, região cerebral relacionada com a consciência da sede.²⁸⁹⁻²⁹¹ Estes resultados em conjunto revelam que no ser humano diferentes áreas do cérebro relacionadas com o controle hidromineral são afetadas pela idade.

Em ratos, as pesquisas feitas em relação ao controle hidromineral no idoso têm apresentado diferentes resultados. Ratos Fisher 344 idosos submetidos a privação hídrica de 72 horas não apresentaram alterações na concentração plasmática de AVP ou de renina.³⁰ Embora, sob as mesmas condições experimentais, trabalhos demonstram que tanto a AVP como a OT aumentam, mas a OT nos ratos idosos era maior do que nos ratos jovens.²⁹² Em outro estudo se determinou que sob as mesmas condições, estabelecidas anteriormente a resposta de AVP plasmática ante a privação hídrica foi atenuada em ratos idosos em relação com a resposta observada em ratos jovens.²⁹³ Por outro lado, foi observado que ratos Wistar idosos normoidratados apresentaram maior concentração plasmática de AVP do que os ratos jovens, entretanto a concentração plasmática de OT dos ratos idosos não foi diferente dos ratos jovens mas foi maior dos ratos de 11 meses de idade.²⁹⁴

Fica evidente que o fator idade é relevante na manutenção da homeostase hidromineral principalmente frente aos desafios osmóticos. Além disso, podemos considerar crucial para a homeostase hidromineral as diferenças segundo o sexo. Neste contexto, o hormônio estrógeno produzido em maiores concentrações em fêmeas apresenta-se muito importante. Foi demonstrado que o estrógeno, altera a detecção de sinais pelo sistema nervoso central, e que ao mesmo tempo, age em diferentes vias modulando sistemas de neurotransmissores que participam da resposta específica a alterações osmóticas e de volume.²⁹⁵ Como por exemplo dos efeitos do estrógeno podemos citar: diminuição da ingestão de água e do limiar da concentração plasmática de sódio que estimula a liberação de AVP no plasma e por

tanto aumento na concentração plasmática de AVP, no eixo HHA, diminuição do mRNA de AVP nos neurônios parvocelulares do PVN; na mediação da liberação de AVP na neurohipófise; inibindo a ingestão de líquidos estimulada pela ANGII.²⁹⁵⁻³⁰²

No ser humano foi observado que após a infusão de salina hipertônica, tanto em mulheres na fase folicular quanto em homens, a osmolalidade plasmática foi maior do que em mulheres na fase lútea, que tem mais estrogênio e progesterona. Não foram encontradas diferenças ao longo do período do ciclo menstrual nas mulheres e também não nos homens na concentração plasmática de AVP, mas o limiar da osmolalidade plasmática para a liberação de AVP foi menor nas mulheres na fase lútea do que na fase folicular e que no homem.³⁰³

Ratos também apresentam dimorfismo sexual quanto ao balanço hidromineral. Assim, os machos apresentaram maior limiar para a liberação de AVP do que as fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, quando foram perfundidos com salina hipertônica.³⁰⁴

O comportamento dipsogênico de ratos adultos apresenta diferenças sexuais. Diferentes estímulos osmóticos e volumétricos demonstraram que as fêmeas são dipsogenicamente mais responsivas do que os machos.³⁰⁵ Entretanto, Santollo *et al* (2017), demonstraram que a resposta dipsogênica era diferente quando foi feita a correção pelo peso, sexo e as doses de ANGII. Assim, encontraram que machos ingerem mais água do que fêmeas, mas fêmeas apresentam maior preferência pela salina do que os machos.³⁰⁶

Embora, em diferentes cepas de ratos tem se descrito que as fêmeas não mudam o comportamento dipsogênico e natriorexigênico perante diferentes estímulos ao longo do tempo, as fêmeas apresentam mudanças hormonais.^{307,308} Sendo assim, no período em que as fêmeas entram na estropausa, os níveis plasmáticos de estrogênio diminuem, mas aumentam a concentração plasmática de CORT.¹⁰⁷

Com base no acima exposto o objetivo deste trabalho é comparar as alterações hormonais e comportamentais dipsogênicas e natriorexigênicas que decorrem do envelhecimento, tanto no estado normoidratado quanto durante a privação hídrica. Mais do que isso, buscamos identificar se esses efeitos agem igualmente em machos e fêmeas, e se o fator idade e sexo pode ser relevante na manutenção da homeostase hidroeletrólítica.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período de luz: 06h às 18h), com água e dieta *ad libitum*, até o dia de experimento.

A manipulação dos animais e os procedimentos experimentais foram submetidos à Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicado por US National Institutes of Health (NIH, Publication No. 85-23, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal (protocolo # 014/2014-1).

4.2 Privação hídrica

4.2.1 Avaliação da ingestão de água e apetite ao sódio

Um grupo de machos e fêmeas na idade de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram submetidos a privação de líquidos de 24 horas ou não (grupo controle). Outro grupo de ratos machos e fêmeas com 3 meses (adultos) e 18 meses (idosos) de idade foram mantidos em privação hídrica por 48 horas. Para todos os grupos experimentais, o período de adaptação nas gaiolas metabólicas foi de três dias antes do experimento.

O peso corporal foi determinado antes e depois do experimento, e os procedimentos experimentais seguiram o protocolo realizado por Antunes-Rodrigues *et al* (2005), no qual após do tempo da restrição hídrica, se ofereceu bebedouros graduados contendo água (aos animais controles e com privação hídrica) e se determinou a ingestão hídrica em períodos de 20 minutos durante 60 minutos. Durante esse período, os animais tiveram a oportunidade de saciar a sede. Após o período de reidratação, se ofereceu bebedouro contendo água e salina isotônica. Mediu-se a ingestão dos líquidos cada 20 minutos por uma hora. Os animais ingeriram solução salina como resultado do apetite ao sódio.⁶⁵

4.2.2 Coleta de sangue

O sangue dos machos e as fêmeas com idade de 2, 6, 9, 12 e 18 meses, e

submetidos a privação de líquidos por 24 horas, foi coletado da cauda para determinar o hematócrito, a osmolalidade e o sódio plasmático. Uma semana após a avaliação comportamental da ingestão de água e apetite ao sódio, os animais foram submetidos a restrição de água por 24 horas, sendo decapitados e o sangue do troco coletado.

Um segundo grupo de machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade foram privados de líquidos por 48 horas e eutanasiados por decapitação para a coleta do sangue do tronco.

O sangue utilizado para as dosagens hormonais de AVP, ocitocina (OT), e CORT, foi coletado em tubos com heparina, enquanto para as dosagens de ANGII e ANP foi colocado em tubo contendo um coquetel de inibidores de proteases que se detalham posteriormente no item dosagem plasmática de hormônios.

4.2.2 Coleta de cérebro

O cérebro do grupo de machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade controles e submetidos a desidratação foi coletado e a pituitária posterior foi dissecado *in situ*. A neurohipófise e o cérebro foram armazenados a -70 °C até o dia da extração dos hormônios e realização da dissecação dos núcleos cerebrais respectivamente.

4.3 Dosagens de hormônios

Para as dosagens hormonais de OT, AVP e CORT o sangue foi coletado em tubos de plástico heparinizados (10 µL de heparina por cada mL de sangue), porém, para dosar ANP e ANGII os tubos continham, para 1 cada mL de sangue ácido etilenediaminatetraacético (EDTA, 2 mg/mL), 10 µL de fenilmetilsulfonil fluoreto (1mM), 10 µL de pepstatina A (500 mM), 50 µL de fenantrolina (30 mM) e 10 µL de p-hidroximercuriobenzoato (1mM). O plasma foi obtido logo após a centrifugação por 20 min a 3000 rpm a 4°C e foi armazenado a -20 °C até o dia da extração ou até que o procedimento de radioimunoensaio se iniciasse. AVP e OT foram extraídas a partir de 1 mL de plasma com acetona e éter de petróleo, ANP e ANGII foram extraídos a partir de 1 mL de plasma usando colunas Sep-pak C-18 (Waters Corporation, Milsford, MA; USA) e a CORT foi extraído a partir de 25 µL de plasma com 1 mL de etanol.

Para a extração de AVP e OT da pituitária posterior, a neurohipófise foi colocada junto com 200 µL de ácido acético (0,1 N) e foi homogenizada com um disruptor de células ultrasónico (VirTis). Posteriormente o homogenizado foi centrifugado por 15 min a 10000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi extraído e diluído

1:40000 com o tampão do ensaio de AVP/OT, para dosar os hormônios respectivos. Uma outra diluição 1:5 com água milli-Q foi feita para quantificar as proteínas contidas na neurohipófise pelo método de Bradford.

AVP, OT, ANP, ANGII e CORT foram medidos usando as técnicas de radioimunoensaio descritas na literatura.^{121,269,309–311} A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra-ensaio para os resultados da privação hídrica de 48 horas foram, respectivamente, 0,12 pg/mL e 15,21 % para AVP; 0,12 pg/mL e 6,34 % para OT; 0,75 pg/mL e 4,48 % para ANP; 0,4 pg/mL e 4,34 % para ANG II; 7,8 ug/dL e 4,62 % para CORT. Para os resultados de privação hídrica de 24 horas, o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi, respectivamente, 4,60 e 18,703 % para AVP; 10,02 e 5,72 % para OT; 3,29 e 23,46% para ANP; 9,64 e 1,23 % para ANG II; 3,48 e 9,36 % para CORT. Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata.

A concentração plasmática de PRL foi determinada usando um duplo anticorpo RIA, usando anticorpos fornecidos pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, CA, USA). O laboratório do Dr. Francis produziu o hormônio iodado e o anticorpo secundário. O limite inferior de detecção foi de 0,10 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,5%.

4.4 Avaliação de mRNA por PCR em tempo real em diferentes tecidos

4.4.1 Dissecção

Foram feitas fatias cerebrais cortadas na espessura de 60 µm, utilizando um criostato (Micron HM 500 ON), contendo o PVN, SON e SFO, segundo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson.³¹² Com o auxílio de uma agulha estéril de microdissecção com 1,5 mm de diâmetro interno os núcleos foram dissecados, colocados em tubos estéreis e transferidos a -70°C.

4.4.2 Extração do RNA total

O RNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se o RNeasy Mini kit-Qiagen®, para isto cada amostra foi colocada em tubos estéreis e foram homogeneizados com 1 mL de Qiazol, posteriormente deixou-se repousar por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo de agregar 200 µL de clorofórmio puro amostra foi agitada e posteriormente deixou repousar por 5 min a temperatura ambiente. A mostra foi centrifugada por 15 min a 1200 rcf a 4°C, da fase clara que se formou foi coletado 250 µL e colocado num tubo estéril.

No novo tubo com a mostra foi adicionado 250 µL de etanol 70% e misturado com a amostra e juntos foram colocados na coluna separadora, logo foi centrifugada a coluna por 1 min a 9600 rpm a temperatura ambiente, logo foi adicionado 700 µL de tampão RW1 na coluna e logo de centrifugar foi colocado 500 µL do tampão RPE na coluna, posterior a 5 min de repouso a coluna foi centrifugada novamente. Adicionou-se novamente 500 µL do tampão RPE e se centrifugou, esta vez por 2 min a 9600 rpm a temperatura ambiente, centrifugou-se outra vez por 1 min a 13200 rpm a temperatura ambiente.

Depois, foram colocadas as colunas em tubos estéreis e se deixou evaporar o álcool residual por 5 min, posteriormente foi colocado 25 µL de água RNase free diretamente na coluna e se deixou repousar por 2 min. Finalmente, foram centrifugados colunas e tubos por 1 min a 9600 rpm a temperatura ambiente e os tubos com o RNA foram armazenadas a -70 °C.

4.4.3 Tratamento com DNase e quantificação do RNA

As amostras foram tratadas com DNase utilizando o kit DNA-free™ (ambion® de life technologies) segundo as especificações do fabricante.

A quantificação e a pureza do mRNA foram realizadas no espectrofotômetro (SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader). As relações das absorbâncias de 260/280, 260/230 nm foram utilizadas na determinação da pureza.

4.4.4 Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA), foi feita a partir de 250 ng de RNA, por *kit* comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). A transcrição reversa foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems®) nas seguintes condições: 10 min a 25°C e 120 min a 37°C, posteriormente as amostras foram armazenadas no freezer de -20°C.

4.4.5 PCR em tempo real (QT-PCR)

O QT-PCR foi feito em triplicata, para isto foram utilizados 4 µL de cDNA e 8 µL de uma mistura contendo 6,25 µL de solução Taqman® 2X Master Mix (Applied Biosystems®), 0,65 µL de sonda específica e 1,60 µL de água RNase free. As sondas utilizadas foram: *Agtr1a* (Rn00578456_m1), *Agtr2* (Rn00560677_s1), *Oxt* (Rn00564446_g1) e *Avp* (Rn00566449_m1), as quais foram adquiridas da Applied

Biosystems® e o equipamento utilizado foi 7500 QT-PCR System (Applied Biosystems®). A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no threshold cycle (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$ ou da curva padrão relativa.

4.5 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). A significância estatística da diferença entre as médias dos grupos estudados foi avaliada pelo t-student para grupos independentes, pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido de pós-teste Games-Howell quando as variâncias foram diferentes e Newman-Keuls quando as variâncias foram iguais, com a exceção do conteúdo de AVP na neurohipófise de fêmeas, em que se utilizou o post-hoc de Fisher LSD. Para os experimentos que foram realizados ao longo da vida dos animais e aqueles que foram feitos por um período de tempo, utilizou-se o ANOVA de medidas repetidas seguido de pós-teste Newman-Keuls. Quando os dados não se ajustaram na normalidade, foi usado o teste de Friedman ANOVA e o teste de Mann-Whitney U. Os valores de ANG II plasmáticas nas fêmeas foram transformados em Log. Foi adotado o nível de significância de $p < 0.05$ (bicaudal). O número de animais utilizados é representado por n.

5. Resultados

5.1 Privação hídrica em machos

5.1.1 Respostas comportamentais induzidas pela restrição hídrica (24 e 48 horas)

Observou-se que ratos machos, independentemente da idade, submetidos a restrição hídrica, beberam mais água do que os hidratados durante todo o período de avaliação (interação Tempo x Condição hídrica: 2 meses: $F_{5,160} = 9,744$; $p < 0,0001$; 6 meses: $F_{5,140} = 12,479$; $p < 0,0001$; 9 meses: $F_{5,115} = 21,143$; $p < 0,0001$; 12 meses: $F_{5,85} = 13,655$; $p < 0,0001$; 18 meses: $F_{5,65} = 2,442$; $p < 0,05$; Fig 1A, B, C, D e E). Em relação com a ingestão de salina, os ratos machos submetidos a privação hídrica na idade de 2 meses beberam mais salina do que os ratos normoidratados durante todo o período de avaliação (Interação Tempo x Condição hídrica: 2 meses: $F_{2,64} = 7,925$; $p < 0,001$; Fig 1A). Na idade de 6 meses, os ratos machos que foram submetidos a privação hídrica

beberam mais salina do que os machos hidratados ($F_{1;28} = 10,695$; $p < 0,01$; Fig 1B). Em todas as idades estudadas, os machos na condição de privação hídrica beberam mais água do que solução salina (interação Tempo x Tipo de líquido: 2 meses: $F_{2;128} = 29,260$; $p < 0,0001$; 6 meses: $F_{2;112} = 5,195$; $p < 0,05$; 9 meses: $F_{2;92} = 6,637$; $p < 0,05$; 12 meses: $F_{2;68} = 7,072$; $p < 0,05$; 18 meses: $F_{2;52} = 4,869$; $p < 0,05$).

Figura 1: Ingestão de água e solução salina isotônica dos machos após a privação hídrica de 24h nas idades de 2 meses (A), 6 meses (B), 9 meses (C), 12 meses (D) e 18 meses (E). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, na ingestão de água comparando os machos controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 24h, # $p < 0,05$, na ingestão de salina comparando os machos em privação hídrica, ϕ $p < 0,05$, nos machos que estiveram em privação hídrica comparando ingestão de água e salina, $\downarrow$ indica o momento em que foi apresentada a salina junto com a água. O n para os machos controles nas idades de

2, 6, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente: 19, 19, 14, 8 e 5; e para os submetidos a privação hídrica foram respectivamente os seguintes: 15, 15, 11, 11 e 10.

Na figura 2 se apresenta a ingestão de água e salina dos ratos de 3 meses (adultos) e 18 meses (idosos) de idade, após da privação hídrica por 48 horas. Em todos os períodos avaliados, os ratos desidratados tanto de 3 meses como de 18 meses ingeriram mais água que os controles (Interação Tempo x Idade x Condição hídrica: $F_{5;130} = 5,372$; $p < 0,001$; Fig 2A). Dos ratos machos desidratados os machos de 3 meses beberam mais água do que os machos de 18 meses (Interação Tempo x Idade: $F_{5;130} = 9,498$; $p < 0,00001$; Fig 2A).

Em relação com a ingestão de solução salina nos machos, se observou que somente os ratos de 3 meses submetidos a desidratação apresentaram maior ingestão de sódio do que os ratos de 3 meses hidratados (Interação Tempo x Condição hídrica: $F_{2;48} = 12,480$; $p < 0,0001$; Fig 2B). Ao minuto 120 observou-se que na condição de desidratação de 48 horas, os ratos machos de 3 meses de idade beberam mais salina isotônica do que os ratos de 18 meses (Idade: $F_{1;24} = 4,265$; $p < 0,05$).

Figura 2: Ingestão de água (A) e solução salina isotônica (B) dos machos controles (Ctr) e dos machos submetidos a privação hídrica de 48h (PH) nas idades de 3 meses e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, na ingestão de água ou salina de animais adultos e idosos comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 48h, Ψ $p < 0,05$, na ingestão de água ou salina dos animais adultos comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 48h, # $p < 0,05$, na ingestão de água ou salina dos animais em privação hídrica comparando segundo a idade. O n para os machos nas idades de 3 e 18 meses controles foi de 8 para ambos, e para os submetidos a privação hídrica foram 8 e 7, respectivamente.

5.1.2 Alterações nas concentrações plasmáticas dos hormônios induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

As concentrações plasmáticas de AVP foram maiores nos machos de 3 e 18 meses submetidos a privação hídrica do que os machos hidratados (Condição hídrica: $F_{1;43} = 77,116$; $p < 0,00001$; Fig 3 A). Não se observaram diferença quanto as idades.

Na figura 3B se observa que o nível plasmático de OT dos animais de 3 e 18 meses de idade submetidos a restrição hídrica foi maior do que os animais normoidratados (Condição hídrica: $F_{1;46} = 62,795$; $p < 0,0001$).

A ANGII no plasma dos ratos de 3 meses submetidos a privação hídrica foi maior do que os ratos de 3 meses hidratados (hidratados (Condição hídrica: $F_{1;30} = 16,162$; $p < 0,0001$) e do que os ratos de 18 meses desidratados (Interação: Idade x Condição hídrica: $F_{1;30} = 9,221$; $p < 0,01$; Fig 3C).

O nível plasmático de ANP dos animais de 3 meses e 18 meses de idade submetidos a desidratação foi menor do que os ratos normoidratados (Condição hídrica: $F_{1;32} = 44,922$; $p < 0,00001$; Fig 3D).

Em relação com a CORT, os ratos de 3 meses desidratados tiveram maior nível plasmático do que os ratos hidratados (Condição hídrica: $F_{1;49} = 6,088$; $p < 0,05$). Não se observou diferença na concentração de CORT plasmática segundo o estado de hidratação entre os ratos idosos (Fig 3E).

Figura 3: Concentração plasmática de AVP (A), OT (B), ANGII (C), ANP (D) e CORT (E) em machos controles e submetidos a condição de privação hídrica de 48h, com 3 e 18 meses de idade segundo. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ indica os grupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.1.3 Alterações na expressão gênica de mRNA de Agtr1a do SFO e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Na figura 4 se apresenta a expressão gênica relativa de mRNA do receptor de ANGII (Agtr1a) no SFO dos ratos machos. A condição de desidratação diminui a expressão relativa de mRNA do Agtr1a no SFO dos ratos de 3 meses ($T_7 = 3,409$; $p < 0,05$; Fig 4A) e de 18 meses ($T_{11} = 3,643$; $p < 0,01$; Fig 4B). Não se observaram diferenças na expressão relativa de mRNA do gene segundo a idade dos animais (Fig 4 C e D).

Figura 4: Expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a no SFO de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão relativa do gene Agtr1a no SON de ratos machos não apresentou diferenças nos animais de 3 e 18 meses segundo a condição de hidratação (Fig 5 A e B), mas quando for comparado segundo a idade dos animais, tanto os ratos de 18 meses controles como os submetidos a restrição hídrica tiveram maior expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a do que os ratos de 3 meses de idade ($T_8 = -2,516$; $p < 0,05$ e $T_8 = -3,621$; $p < 0,01$; Fig C e 5D).

Figura 5: Expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a no SON de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.1.4 Alterações no conteúdo de AVP de OT na neurohipófise induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Na figura 6A se observa que o conteúdo de AVP na neurohipófise foi menor nos ratos desidratados de 3 meses de idade do que nos ratos normoidratados (Condição hídrica: $F_{1;31} = 13,197$; $p < 0,001$) e maior nos ratos de 18 meses de idade na condição de privação hídrica do que nos ratos de 3 meses em restrição hídrica (Idade: $F_{1;31} = 14,788$; $p < 0,001$).

Na neurohipófise, o conteúdo de OT foi menor nos ratos de três meses de idade sub a condição de privação hídrica do que nos ratos euidratados (Condição hídrica: $F_{1;27} = 17,442$; $p < 0,0001$). Não se observaram diferenças segundo a idade em nenhuma das condições de hidratação (Fig 6B).

Figura 6: Conteúdo na neurohipófise de AVP (A) e OT (B) em machos controles e submetidos a condição de privação hídrica de 48h, com 3 e 18 meses de idade. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.1.5 Alterações na expressão génica de mRNA de AVP e OT do PVN e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

A expressão genica relativa de mRNA de AVP no PVN não apresentou diferenças segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 7).

Figura 7: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no PVN de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de AVP no SON não apresentou diferenças segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 8).

Figura 8: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no SON de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (**A**), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles de 3 e 18 meses (**C**) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de OT no PVN não apresentou diferenças segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 9).

Figura 9: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no PVN de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de OT no SON não apresentou diferenças segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 7).

Figura 10: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no SON de machos de 3 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidos a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidos a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.2 Privação hídrica em fêmeas

5.2.1 Respostas comportamentais induzidas pela restrição hídrica (24 e 48 horas)

Na figura 11 estão sendo apresentados os dados sobre a ingestão acumulativa de líquidos no tempo do experimento das fêmeas após privação hídrica nas idades de 2 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D) e 18 (E) meses. Em todas as idades avaliadas, as fêmeas na condição de restrição hídrica beberam mais água do que as fêmeas normoidratadas (Condição hídrica: 2 meses: $F_{1;23} = 45,960$; $p < 0,00001$; interação Tempo x Condição hídrica: 6 meses: $F_{5;115} = 8,573$; $p < 0,00001$; 9 meses: $F_{5;115} = 10,722$; $p < 0,00001$; 12 meses: $F_{5;105} = 15,387$; $p < 0,00001$; 18 meses: $F_{5;80} = 11,884$; $p < 0,00001$; Fig 1A, B, C, D e E). A ingestão de solução salina por parte das ratas

desidratadas foi maior do que das ratas normoidratadas (interação Tempo x Condição hídrica: 2 meses: $F_{2;46} = 4,754$; $p < 0,05$; 6 meses: $F_{2;46} = 7,815$; $p < 0,01$; 9 meses: $F_{2;46} = 10,071$; $p < 0,001$; Condição hídrica: 12 meses: $F_{1;21} = 47,192$; $p < 0,00001$; 18 meses: $F_{1;16} = 18,096$; $p < 0,001$; Fig 1A, B, C, D e E).

Foi observado que aos 2, 6 e 9 meses de idade, as fêmeas possuem um perfil de ingestão maior de salina do que de água, sendo significativamente diferente aos seis meses, quando observou-se que as fêmeas submetidas a privação hídrica beberam mais salina do que água (Interação Tempo x Tipo de líquido: $F_{2;92} = 7,360$; $p < 0,01$; Fig 11B), no entanto, este comportamento torna-se igual aos 12 meses e oposto aos 18 meses de idade, em que as fêmeas beberam mais água do que solução salina aos 80 minutos, 100 minutos e 120 minutos (Interação Tempo x Tipo de líquido: $F_{2;32} = 4,365$; $p < 0,05$; Fig 11E).

Figura 11: Ingestão de água e solução salina isotônica das fêmeas após a privação hídrica de 24h nas idades de 2 meses (A), 6 meses (B), 9 meses (C), 12 meses (D) e 18 meses (E). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, na ingestão de água comparando as fêmeas controles com as que estiveram submetidos a desidratação de 24h, # $p < 0,05$, na ingestão de salina comparando as fêmeas em privação hídrica, ϕ $p < 0,05$, nas fêmeas que estiveram em privação hídrica comparando ingestão de água e salina, $\downarrow$ indica o momento em que foi apresentada a salina. O n para as fêmeas controles nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses foram respectivamente os seguintes: 12, 12, 12, 11 e 9; e para as submetidas a privação hídrica foram respectivamente os seguintes: 13, 13, 13, 12, e 9.

Na figura 12 se apresenta a ingestão de água e salina das fêmeas de 3 meses e 18 meses de idade, submetidas a privação hídrica por 48 horas. As fêmeas que foram submetidas a privação hídrica tanto de 3 como de 18 meses beberam mais água do que as fêmeas de 3 e 18 meses controles (Interação Tempo x Condição hídrica: $F_{5;125} = 12,882$; $p < 0,00001$). No final do experimento as fêmeas de 3 meses submetidas a condição de restrição hídrica beberam mais água do que as fêmeas idosas desidratadas (Interação Tempo x Idade: $F_{5;125} = 4,551$; $p < 0,001$; Fig 12A).

A ingestão de salina foi maior nas fêmeas adultas que foram submetidas a restrição hídrica nos tempos 80 minutos, 100 minutos e 120 minutos do que as controles adultas (Interação Tempo x Condição hídrica: $F_{2;50} = 15,328$; $p < 0,00001$). Da mesma maneira, nas fêmeas idosas desidratadas a ingestão de sódio foi maior do que as idosas controles nos minutos 100 e 120 (Interação Tempo x Condição hídrica: $F_{2;50} = 15,328$; $p < 0,00001$). As fêmeas adultas com privação hídrica beberam mais salina do que as idosas na mesma condição hídrica (Interação Tempo x Idade: $F_{2;50} = 4,635$; $p < 0,05$; Fig 12B).

Figura 12: Ingestão de água (A) e solução salina isotônica (B) após a privação hídrica de 48h de fêmeas nas idades de 3 meses e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$, na ingestão de água ou salina de animais adultos e idosos comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 48h, $\Psi p < 0,05$, na ingestão de água ou salina dos animais adultos comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 48h, # $p < 0,05$, na ingestão de água ou salina dos animais em privação hídrica comparando segundo a idade. O n para os machos nas idades de 3 e 18 meses controles foi de 8 e 7 para os submetidos a privação hídrica foram 8 e 6 respectivamente.

5.2.2 Alterações nas concentrações plasmáticas dos hormônios induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Os resultados do valor plasmático de AVP nas fêmeas são apresentados na figura 13A. Podemos observar que as fêmeas em restrição hídrica, tanto de 3 meses como de 18 meses apresentaram maior elevação na concentração plasmática de AVP do que as fêmeas 3 e 18 meses normoidratadas (Condição hídrica: $F_{1;56} = 98,979$; $p < 0,0001$).

Também houve elevação na concentração plasmática de OT nas fêmeas de 3 e 18 meses submetidas a privação hídrica do que nas fêmeas euidratadas (Condição hídrica: $F_{1;49} = 74,994$; $p < 0,00001$; Fig 13B).

As fêmeas de 3 e 18 meses desidratadas apresentaram a concentração plasmática de ANGII maior do que as fêmeas de 3 e 18 meses normoidratadas (Condição hídrica: $F_{1;29} = 38,494$; $p < 0,0001$; Fig 13C). Também, foi observado que a resposta a privação hídrica é menor nas fêmeas de 18 meses do que as de 3 meses de idade (Idade: $F_{1;29} = 7,013$; $p < 0,05$).

Na figura 13D estão apresentadas as concentrações plasmáticas de ANP das fêmeas controles e submetidos a privação hídrica. As fêmeas de 3 e 18 meses de idade submetidos a desidratação apresentaram níveis plasmáticos de ANP menor do que as fêmeas hidratadas (Condição hídrica: $F_{1;32} = 48,506$; $p < 0,0001$).

O nível da CORT plasmática nas fêmeas de 3 meses de idade submetidas a privação hídrica foi maior quando comparado às fêmeas adultas normoidratadas (Condição hídrica: $F_{1;55} = 10,586$; $p < 0,01$). Entretanto as fêmeas idosas hidratadas já apresentaram concentrações plasmáticas de CORT maiores do que os valores observados nas fêmeas adultas normoidratadas (Idade: $F_{1;55} = 24,671$; $p < 0,00001$), não havendo assim diferenças significativas com as fêmeas idosas em restrição hídrica (Fig 13E).

Figura 13: Concentração plasmática de AVP (A), OT (B), ANGII (C), ANP (D) e CORT (E) em fêmeas controles e submetidas a condição de privação hídrica de 48h, com 3 e 18 meses de idade. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.2.3 Alterações na expressão génica de mRNA de Agtr1a do SFO e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

A desidratação produz a diminuição da expressão génica relativa de mRNA de Agtr1a no SFO dos ratos fêmeas de 3 meses ($T_{11} = 2,572$; $p < 0,05$; Fig 14A). Embora não houve uma diferença estatisticamente significativa, tanto as fêmeas desidratadas de 18 meses (Fig 14B), como as fêmeas de 18 meses normoidratadas (Fig 14C) apresentaram uma tendência a diminuição da expressão genica relativa de mRNA de Agtr1a. Não foram observadas diferenças entre nas fêmeas desidratadas segundo a idade (Fig 14D).

Figura 14: Expressão génica relativa de mRNA de Agtr1a no SFO de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Não se observaram diferenças significativas na expressão de mRNA do gene *Agtr1a* no SON das fêmeas segundo a idade e segundo a condição de hidratação dos animais (Fig 15).

Figura 15: Expressão gênica relativa de mRNA de *Agtr1a* no SON de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.2.4 Alterações no conteúdo de AVP de OT na neurohipófise induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

As fêmeas de 3 meses de idade submetidas a restrição hídrica apresentaram uma diminuição do conteúdo de AVP na neurohipófise (Condição hídrica: $F_{1;35} = 4,832$; $p < 0,05$; Fig 16A). No entanto, não se observou mudanças no conteúdo de AVP nas fêmeas de 18 meses de idade. Além disso, o conteúdo de OT na neurohipófise de fêmeas de 3 e 18 meses de idade submetidas ou não a privação hídrica, não mudou de forma significativa nas condições estabelecidas (Fig 16B).

Figura 16: Conteúdo na neurohipófise de AVP (A) e OT (B) em fêmeas controles e submetidos a condição de privação hídrica de 48h, com 3 e 18 meses de idade. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.2.5 Alterações na expressão génica de mRNA de AVP e OT do PVN e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

A expressão genica relativa de mRNA de AVP no PVN não apresentou diferenças segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 17).

Figura 17: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no PVN de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**A**), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles de 3 e 18 meses (**C**) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de AVP no SON não apresentou diferenças significativas segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 18). Embora, as fêmeas de 18 meses submetidas a privação hídrica apresentaram uma tendência a ter menos expressão genica relativa de mRNA AVP no SON do que as normoidratadas (Fig 18B). Também, das fêmeas na condição de desidratação as de 18 meses tiveram uma tendência a diminuir a expressão relativa de mRNA de AVP no SON em relação com a fêmea de 3 meses (Fig 18D).

Figura 18: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no SON de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de OT no PVN não apresentou diferenças significativas segundo a condição de hidratação e a idade (Fig 19).

Figura 19: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no PVN de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (A), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (B), controles de 3 e 18 meses (C) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (D). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

A expressão genica relativa de mRNA de OT no SON não apresentou diferenças significativas segundo a condição de hidratação nas fêmeas de 3 e 18 meses de idade (Fig 20 A e B). Porém, as fêmeas de 18 meses de idade apresentaram menor expressão relativa de mRNA de OT do que as fêmeas de 3 meses de idade, tanto na condição de normoidratação ($T_8=2,496$; $p<0,05$; Fig 20C) como na de desidratação ($T_7=3,078$; $p<0,05$; Fig 20C).

Figura 20: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no SON de fêmeas de 3 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**A**), 18 meses controles e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles de 3 e 18 meses (**C**) e submetidas a desidratação de 48 horas de 3 e 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.3 Privação hídrica 24 horas segundo o sexo

5.3.1 Respostas comportamentais induzidas pela restrição hídrica de 24 horas

Ao comparar os resultados da ingestão total de água e salina segundo o sexo e a idade de 2, 9 e 18 meses de animais submetidos a uma restrição hídrica de 24 horas, não foi observada diferença em relação a ingestão de água segundo o sexo (Fig 21A). Nas idades de 9 e 18 meses tanto machos como fêmeas beberam menos água do que quando eles tinham 2 meses de idade (Idade: $F_{2;62} = 26,182$; $p < 0,00001$).

A ingestão de solução salina isotônica total foi maior nas fêmeas de 9 meses do que nos machos com a mesma idade (Sexo: $F_{1;65} = 7,723$; $p < 0,001$). Na idade de 18 meses as fêmeas beberam menor quantidade de solução salina do que quando

elas tinham 2 e 9 meses de idade (Idade: $F_{2;65} = 7,997$; $p < 0,001$; Fig 21B).

Figura 21: Ingestão total de água (A) e solução salina (B) isotônica das fêmeas e machos após a privação hídrica de 24h nas idades de 2, 9 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.3.2 Alterações nas concentrações plasmáticas dos hormônios induzidas pela restrição hídrica de 24 horas

A figura 22 apresenta os resultados da dosagem hormonal de machos e fêmeas de 18 meses de idade submetidos ou não a privação hídrica de 24 horas. Os animais (tanto machos como fêmeas) na idade de 18 meses, que foram submetidos a desidratação apresentaram maior concentração plasmática de AVP e OT do que os machos e fêmeas hidratadas (Condição hídrica: AVP: $F_{1;28} = 26,979$; $p < 0,0001$ e OT: $F_{2;65} = 7,997$; $p < 0,001$; Fig 22A e B respectivamente). Não se observou diferenças segundo o sexo na concentração plasmática de OT de animais normoidratados e desidratados (Fig 22B).

Não houve diferença entre machos e fêmeas aos 18 meses de idade, tanto nos grupos hidratados como nos grupos submetidos à privação hídrica (Fig 22C). No caso do valor plasmático de ANP as fêmeas hidratadas apresentaram maior nível deste hormônio no plasma do que as fêmeas desidratadas (Condição hídrica: $F_{1;28} = 46,965$; $p < 0,0001$; Fig 22D). Não se observou diferença segundo o sexo na concentração plasmática de ANP dos animais de 18 meses que estiveram submetidos a privação hídrica.

A CORT plasmática foi maior nas fêmeas tanto hidratadas como desidratadas, quando comparada, respectivamente, aos machos controles e na condição de restrição hídrica (Sexo: $F_{1;25} = 26,156$; $p < 0,0001$). Além disso, não se observou diferença na concentração plasmática de CORT na condição de hidratação nenhum

dos dois sexos nos animais de 18 meses (Fig 22E).

Figura 22: Concentração plasmática de AVP (A), OT (B), ANGII (C), ANP (D) e CORT (E) dos machos e fêmeas após a privação hídrica de 24h na idade de 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.4 Privação hídrica 48 horas segundo o sexo

5.4.1 Respostas comportamentais induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

A figura 23 apresenta a ingestão total de água (A) e salina (B) dos machos e fêmeas de 3 e 18 meses de idade, que foram submetidas a restrição hídrica de 48 horas. A ingestão de água foi maior nas fêmeas, tanto naquelas de 3 meses como de 18 meses do que a observada nos machos de 3 e 18 meses de idade (Sexo: $F_{1;25} =$

13,360; $p < 0,01$).

Além disso, os animais de 3 meses, tanto machos como fêmeas, beberam mais água do que os machos e fêmeas de 18 meses (Idade: $F_{1;25} = 59,776$; $p < 0,00001$; Fig 23A). No caso da ingestão de sódio, as fêmeas de 3 meses também beberam mais solução salina do que os machos da mesma idade (Sexo: $F_{1;20} = 20,496$; $p < 0,0001$; Fig 23B). Nesta figura podemos verificar ainda que fêmeas desidratadas de 18 meses de idade tem a tendência de beber menos solução salina isotônica do que as fêmeas desidratadas de 3 meses (Idade: $F_{1;24} = 11,675$; $p < 0,01$; Fig 23B). Além disso, os machos de 18 meses de idade, tenderam a beber menos salina em resposta a restrição hídrica do que as fêmeas de essa idade (Sexo: $F_{1;24} = 26,656$; $p < 0,0001$, Fig 23B)

Figura 23: Ingestão total de água (A) e solução salina isotônica (B), dos machos e fêmeas após a privação hídrica de 48h nas idades de 3 (adultos) e 18 (idosos) meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.4.2 Alterações nas concentrações plasmáticas dos hormônios induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Ao se comparar a concentração plasmática de AVP após a privação hídrica por sexo não se observaram diferenças entre os machos e fêmeas nas idades de 3 e 18 meses (Fig 24A e B), tanto em condições basais como em resposta à privação hídrica.

Por outro lado, nos animais de 3 meses não se observou diferenças na concentração plasmática de OT segundo o sexo (Fig 24C), porém, nas fêmeas de 18 meses de idade, tanto hidratadas como desidratadas, tiveram maior concentração plasmática de OT do que os machos normoidratados e em privação hídrica (Sexo: $F_{1;43} = 18,279$; $p < 0,0001$; Fig 24D).

Não se encontrou diferenças segundo o sexo na concentração plasmática de

ANGII após privação hídrica nos animais de 3 e 18 meses (Fig 24E e F). Nota-se que os valores plasmáticos de ANG II dos animais de 18 meses foram menores do que os observados nos mais jovens (3 meses).

Os machos desidratados de 3 meses apresentaram maior concentração plasmática de ANP do que as fêmeas de 3 meses na mesma condição experimental (Sexo: $F_{1;38} = 7,544$; $p < 0,01$; Fig 24G). Não se observou diferenças do ANP segundo o sexo nos animais de 18 meses (Fig 24H). Verifica-se que a restrição hídrica induz uma redução na concentração plasmática de ANP nos dois grupos experimentais.

A concentração plasmática de CORT nas fêmeas de 3 meses submetidas a privação hídrica foi maior do que nos machos de 3 meses de idade desidratados (Sexo: $F_{1;56} = 18,260$; $p < 0,0001$; Fig 24I). Entretanto, as fêmeas de 18 meses hidratadas e em restrição hídrica apresentaram maiores níveis plasmáticos de CORT do que os machos de 18 meses de idade hidratados e privados de água (Sexo: $F_{1;48} = 68,007$; $p < 0,00001$; Fig 24J). Tanto as fêmeas normoidratadas como aquelas submetidas à privação hídrica apresentam valores elevados na concentração plasmática deste esteroide adrenal.

O nível de PRL no plasma de animais de 3 meses não foi diferente segundo o sexo e o tratamento; entanto que nos animais de 18 meses as fêmeas, tanto hidratadas como desidratadas, apresentaram maior concentração plasmática de PRL do que os machos (Sexo: $F_{1;31} = 42,857$; $p < 0,0001$; Fig 24K e L).

Figura 24: Concentração plasmática de AVP (A e B), OT (C e D), ANGII (E e F), ANP (G e H), CORT (I e J) e PRL (K e L) dos machos e fêmeas de 3 e 18 meses hidratados e submetidos a condição de privação hídrica de 48h. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro ou no topo da coluna.

5.4.3 Alterações na expressão gênica de mRNA de Agtr1a do SFO e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de mRNA de Agtr1a no SFO segundo o sexo nas idades de 3 e 18 meses na condição de euidratação e desidratação (Fig 25).

Figura 25: Expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a no SFO de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Em relação a expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a no SON, não se observaram diferenças significativas segundo o sexo nos animais nas idades de 3 e 18 meses na condição de euidratação e desidratação (Fig 26).

Figura 26: Expressão gênica relativa de mRNA de Agtr1a no SON de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.4.4 Alterações no conteúdo de AVP de OT na neurohipófise induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Na figura 27 se apresenta o conteúdo de AVP e OT na neurohipófise de ratos segundo o sexo na idade de 3 meses e 18 meses quando foram ou não submetidos a privação hídrica.

Na idade de 3 meses os machos desidratados apresentaram um menor conteúdo de AVP na neurohipófise do que os machos normoidratados (Condição hídrica: $F_{1;40} = 16,957$; $p < 0,001$), não se observaram diferenças significativas entre as fêmeas segundo a condição de hidratação, nem segundo o sexo na idade de 3 meses (Fig 27A).

Na figura 27C se observa que o conteúdo de OT na neurohipófise foi menor nos machos de 3 meses submetidos a restrição hídrica do que os ratos normoidratados (Condição hídrica: $F_{1;37} = 20,241$; $p < 0,0001$). Além disso, nos animais de 3 meses na condição de desidratação, as fêmeas apresentaram maior conteúdo de OT na hipófise posterior do que os machos (Sexo: $F_{1;37} = 10,343$; $p < 0,01$).

O conteúdo de OT na hipófise posterior não apresentou mudanças significativas segundo o sexo e o estado de hidratação (Fig 27D).

Figura 27: Conteúdo na neurohipófise de AVP (A e B) e OT (C e D) dos machos e fêmeas de 3 e 18 meses hidratados e submetidos a condição de privação hídrica de 48h. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.4.5 Alterações na expressão gênica de mRNA de AVP e OT do PVN e SON induzidas pela restrição hídrica de 48 horas

Não foram observadas diferenças na expressão genica relativa de mRNA de AVP no PVN segundo o sexo nos animais nas idades de 3 e 18 meses na condição de euidratação e desidratação (Fig 28).

Figura 28: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no PVN de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Na expressão genica relativa de mRNA de AVP no SON não se observaram mudanças significativas segundo o sexo nos animais nas idades de 3 e 18 meses na condição de euidratação e desidratação (Fig 29). Embora, foi observado que as fêmeas de 3 meses de idade desidratadas apresentaram a tendência de ter maior expressão genica relativa de mRNA de AVP no SON do que os machos (Sexo: $t_9 = 2,026$; $p = 0,073$; Fig 29B).

Figura 29: Expressão gênica relativa de mRNA de AVP no SON de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Não foram observadas diferenças na expressão genica relativa de mRNA de OT no PVN segundo o sexo nos animais nas idades de 3 e 18 meses na condição de euidratação e desidratação (Fig 30).

Figura 30: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no PVN de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

Não se apresentaram diferenças na expressão genica relativa de mRNA de OT no SON segundo o sexo nos animais nas idades de 3 e 18 meses na condição de normoidratação e desidratação (Fig 31).

Figura 31: Expressão gênica relativa de mRNA de OT no SON de fêmeas e machos de 3 meses controles (**A**) e submetidas a privação hídrica de 48 horas (**B**), controles 18 meses de idade (**C**) e submetidos a privação hídrica de 48 horas de 18 meses (**D**). Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ em relação ao grupo referência. O n para cada grupo se encontra dentro da coluna.

5.2 Resumo dos resultados

Tabela 3.1- Resumo dos resultados da resposta comportamental dipsogênica e natriorexigênica dos ratos machos (M) e fêmeas (F) nas diferentes idades submetidos a privação hídrica de 24 ou 48 horas.

Sexo	Idade (meses)	Privação hídrica (horas)	Ingestão de água	Ingestão de ss isotônica	Preferência por beber
M	2	24	Basal	Basal	Água
M	6	24	↓	↓	Água
M	9	24	↓	↓	Água
M	12	24	↓	↓	Água
M	18	24	↓	↓	Água
M	3	48	Basal	Basal	Água
M	18	48	↓	↓	Água
F	2	24	Basal	Basal	Salina
F	6	24	↓	=	Salina
F	9	24	↓	↓	Salina e Água
F	12	24	↓	↓	Salina e Água
F	18	24	↓	↓	Água
F	3	48	Basal	Basal	Salina
F	18	48	↓	↓	Água

Tabela 3.2- Resumo dos resultados da resposta comportamental dipsogênica e natriorexigênica comparando segundo o sexo dos ratos nas diferentes idades submetidos a privação hídrica de 24 ou 48 horas.

Idade (meses)	Privação hídrica (horas)	Ingestão de água	Ingestão de ss isotônica
2	24	M = F	M = F
9	24	M = F	M < F
18	24	M = F	M = F
3	48	M < F	M < F
18	48	M < F	M = F

Tabela 3.3- Resumo dos resultados das mudanças no conteúdo dos hormônios na neurohipófise e concentração plasmática de hormônios relacionados com o controle da homeostase hidroeletrolítica segundo o sexo dos ratos machos (M) e fêmeas (F) normohidratados e a idade de 3 e 18 meses.

Hormônio	Idade (meses)		Machos	Fêmeas
	3	18		
AVP _{NH}	M = F	M = F	3 = 18	3 = 18
OT _{NH}	M = F	M = F	3 = 18	3 = 18
AVP	M = F	M = F	3 = 18	3 = 18
OT	M = F	M < F	3 = 18	3 = 18
ANGII	M = F	M = F	3 = 18	3 = 18
ANP	M = F	M = F	3 = 18	3 = 18
CORT	M = F	M < F	3 = 18	3 < 18
PRL	M = F	M < F	-	-

Tabela 3.4- Resumo dos resultados das mudanças do conteúdo de hormônios na neurohipófise (NH) e concentrações plasmáticas de hormônios relacionados com o controle da homeostase hidroeletrolítica dos ratos machos e fêmeas nas diferentes idades submetidos a privação hídrica de 24 ou 48 horas.

Hormônio	Idade (meses)	Privação hídrica (horas)	Machos	Fêmeas	Diferencia segundo o sexo
AVP _{NH}	3	48	↓	=	Não
	18	48	=	=	Não
OT _{NH}	3	48	↓	=	Sim
	18	48	=	=	Não
AVP	18	24	↑	↑	Não
	3	48	↑	↑	Não
	18	48	↑	↑	Não
OT	18	24	↑	↑	Não
	3	48	↑	↑	Não
	18	48	↑	↑↑	Sim
ANGII	18	24	=	=	Não
	3	48	↑	↑	Não
	18	48	=	↑	Não
ANP	18	24	=	↓	Não
	3	48	↓	↓↓	Sim
	18	48	↓	↓	Não
CORT	18	24	=	=	Não
	3	48	↑	↑↑	Sim
	18	48	=	=	Sim
PRL	3	48	=	=	Sim
	18	48	=	=	Sim

Tabela 3.5- Resumo dos resultados das alterações da expressão genica de Agtr1a, AVP e OT no SFO, SON e PVN de ratos machos e fêmeas nas diferentes idades submetidos ou não a privação hídrica de 48 horas.

Tecido	Gene	Sexo	Idade (meses)		Condição hídrica	
			3	18	Controles	Privados
SFO	Agtr1a	M	C > P	C > P	3 = 18	3 = 18
		F	C > P	C = P	3 = 18	3 = 18
SON	Agtr1a	M	C = P	C = P	3 < 18	3 < 18
		F	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
	AVP	M	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
		F	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
	OT	M	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
		F	C = P	C = P	3 > 18	3 > 18
PVN	AVP	M	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
		F	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
	OT	M	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18
		F	C = P	C = P	3 = 18	3 = 18

Tabela 3.6- Resumo dos resultados das alterações da expressão genica de Agtr1a, AVP e OT no SFO, SON e PVN nas diferentes idades, segundo a condição hídrica e o sexo.

Tecido	Gene	Idade	Condição hídrica	Sexo
SFO	Agtr1a	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F
SON	Agtr1a	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F
	AVP	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F
	OT	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F
PVN	AVP	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F
	OT	3	Controles	M = F
			Privados	M = F
		18	Controles	M = F
			Privados	M = F

6. Discussão

Na literatura foi descrito que as pessoas na terceira idade podem apresentar um comprometimento da homeostase hidromineral. Entre as alterações fisiológicas, destaca-se a diminuição na percepção da sede, aumento na secreção basal de AVP, hiper responsividade da secreção de AVP frente a um estímulo osmótico, aumento na secreção basal de ANP e em resposta a um estímulo de infusão salina, diminuição das ações da renina plasmática e da produção de aldosterona.²⁶

Os dados deste trabalho apontam que tanto na privação hídrica de 24 horas, como 48 horas, à medida que os animais envelheciam, estes bebiam menor volume de água e salina isotônica do que quando eles eram mais novos. Além disso, em todas as idades avaliadas os machos tiveram maior preferência por beber água do que

solução salina. Resultados similares já foram reportados por McKinley e colaboradores (2006) na ingestão de água após desidratação de 24 horas e com restrição alimentar e hídrica de 23 horas.^{313–316}

Segundo o descrito na literatura e os nossos resultados, os ratos machos adultos submetidos a desidratação aumentaram a concentração plasmática de AVP, OT, ANGII e CORT, enquanto diminuiu o nível plasmático de ANP.^{270,317–325} Ao comparar as variações hormonais na privação hídrica entre os animais de 3 e 18 meses, somente a ANGII diminuiu frente ao estímulo da desidratação nos animais idosos. Como descrito anteriormente, a diminuição de ANGII em animais idosos pode ser causada por uma diminuição na produção de renina renal, como consequência do envelhecimento renal.^{326,327}

A ANGII regula a sensação de sede e o apetite ao sódio, embora os mecanismos sejam distintos. O SFO tem dois grupos diferentes de neurônios excitatórios com receptor de ANGII tipo 1a-positivo (AT-1a positivo). Os neurônios que se projetam ao órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) controlam a ingestão de água, enquanto os neurônios que se projetam a parte ventral do leito nuclear da estria terminal controlam a ingestão de sal. Os neurônios que controlam a sede são suprimidos sob a condição de depleção de sódio através da ativação de neurônios GABAérgicos mediada pela colecistocinina. Por outro lado, neurônios que controlam o apetite ao sódio são suprimidos na condição de desidratação através da ativação de uma população de neurônios GABAérgicos por intermédio de sinais do canal de sódio Na_x .³²⁸

Contudo, como já foi demonstrado que o cérebro de ratos idosos apresenta diminuição da densidade do receptor AT-1 no PVN e no OVLT, mas não no SFO e SON, como se observaram nossos resultados, onde também não se evidenciou diferenças da expressão de AT-1 segundo o sexo, tanto em ratos adultos como em idosos.^{307,315} Além disso, em nossos resultados foi demonstrado que a expressão do gene *Agtr1a* nos animais submetidos a desidratação foi menor do que os ratos hidratados, contrário ao descrito na literatura, onde se descreve que a restrição hídrica de 48 horas aumenta ou não muda a expressão do AT1 no SFO de ratos machos jovens.^{329,330}

Por outro lado, não se tem evidência de que a reposição de ANGII reverta a menor ingestão em animais idosos, devido, possivelmente a dessensibilização ou perda de função dos receptores de ANGII no SON e SFO ao longo do envelhecimento

ou como encontramos nos nossos ratos a uma diminuição do AT-1 no SFO de animais desidratados.^{30,260,313,331,332} Assim, podemos considerar que a causa da redução do comportamento dipsogênico e natriorexigênico nos animais idosos frente a desidratação foi a diminuição de ANGII plasmática, sem desconsiderar a possível diminuição da sensibilidade ou função dos receptores centrais para este peptídeo (ANGII).

Além da ANGII, o apetite ao sódio também é controlado de forma sinérgica pela aldosterona, a qual age pela via dos neurônios no núcleo do trato solitário (neurônios NTS^{HSD2}), que se projetam para a sub-região ventrolateral do núcleo do leito da estria terminal (vIBNST), e age como o efector da resposta do consumo de sódio induzida pela aldosterona.³³³ Os ratos machos e fêmeas idosos desidratadas apresentaram menor concentração de ANGII plasmática, é de se esperar que a concentração de aldosterona no plasma esteja diminuída. Além disso, evidências mostram que o apetite ao sódio induzido pela aldosterona está diminuído no animal idoso, o que também corrobora com os nossos resultados obtidos mostrando menor ingestão de sódio após privação hídrica em animais idosos de 18 meses.^{260,334,335}

A CORT é outro hormônio que se encontra alterado nos animais de 18 meses. O aumento da concentração plasmática de CORT em animais idosos foi descrito amplamente na literatura, sendo consequência da ausência da retroalimentação negativa exercida pelo eixo HHA, em decorrência da diminuição da expressão de receptores de glicocorticoides no PVN.^{186,336} Assim, os animais idosos normoidratados apresentam elevada concentração plasmática de CORT, pelo que a privação hídrica não promoveu adicional incremento aos níveis plasmáticos de CORT deles.

Em relação aos valores plasmáticos de AVP de animais idosos, não há um consenso definitivo pela comunidade científica, tendo em vista a diversidade dos resultados apresentados. Como exemplo, em condições de normoidratação, ratos idosos apresentam concentrações plasmáticas maiores ou iguais deste peptídeo do que os animais mais jovens, como apresentado nos resultados obtidos no presente trabalho, onde ratos machos de 3 e 18 meses apresentaram concentrações plasmáticas de AVP similares.^{30,337} Por outro lado, valores plasmáticos de AVP na condição de desidratação, foram descritos inalterados em animais idosos, sendo ainda menor a concentração plasmática de AVP dos idosos em comparação aos ratos mais novos.^{30,338} Contudo, nossos dados apontam que animais idosos não perderam a capacidade de responder frente ao estímulo osmótico, aumentando a concentração

plasmática de AVP.

De forma interessante, o aumento de AT-1 no SON de ratos machos de 18 meses, poderia compensar a diminuição de ANGII neles, produzindo que a liberação de AVP pela neurohipófise se mantenha tanto na situação de normoidratação como na condição de desidratação, já que a união da ANGII ao AT-1 no SON estimula a liberação de AVP.³³⁹

Por outro lado, em nossos resultados os ratos idosos tanto machos como fêmeas de 18 meses mantem a expressão relativa de mRNA de AVP no SON e PVN da mesma forma que os animais adultos hidratados e desidratados, neste contexto é possível sugerir que o sistema de expressão do gene de AVP dos neurônios vasopressinérgicos nos núcleos hipotalâmicos se mantém preservado no envelhecimento. Não obstante, Greenwood *et al* (2018), apresentaram que no rato idoso a expressão de mRNA de AVP no SON diminui no animal de 18 meses na condição de desidratação de 72 horas.³⁴⁰

Um estímulo osmótico crônica produz a diminuição da reserva de AVP na neurohipófise pela liberação do hormônio ao corrente sanguínea, o qual agindo no rim favorece a reabsorção de água e possível recuperação da homeostases perda pela desidratação.⁶⁵ Em nossos resultados os machos de 3 meses desidratados apresentaram menor conteúdo de AVP do que os hidratados, como o esperado, e os ratos de 18 meses desidratados apresentaram maior conteúdo de AVP do que os ratos de 3 meses na mesma condição hídrica. Resultados similares foram reportados por Greenwood e colaboradores (2018), com a diferença de que em nossos resultados o conteúdo de AVP foi similar entre os ratos de 18 meses hidratados e desidratados e Greenwood *et al* (2018), reportou que o conteúdo de AVP no animal de 18 meses desidratado por 72 horas foi menor do que o animal hidratado.³⁴⁰ As diferenças encontradas com os nossos resultados podem se dever a diferença de horas nos que os animais foram submetidos a restrição hídrica. Contudo, o fato que os machos de 18 meses de idade desidratados apresentaram maior conteúdo de AVP na neurohipófise do que os machos de 3 meses de idade poderiam se dever a mudanças na maquinaria molecular relacionada com a liberação do hormônio ante o estímulo osmótico. Por outro lado, é importante notar, como já foi mencionado, que a reposta a desidratação dos ratos de 18 meses não está ausente, embora na neurohipófise se mantenha mais conteúdo de AVP nestes animais.

Os resultados apresentados aqui revelaram que a concentração plasmática, o

conteúdo de OT na neurohipófise e a expressão relativa de mRNA de OT no SON e PVN dos nossos ratos machos não variaram segundo a idade tanto na condição de normoidratação, como na induzida pela desidratação. Entretanto, Keck *et al* (2000) demonstraram que ratos idosos apresentavam maior concentração plasmática de OT em condição basal.³³⁶ Silverman e colaboradores (1990) observaram que os ratos Fisher 344 de 25 meses de idade tinham a concentração plasmática de OT maior do que os ratos de 4 meses, após de ter ficado 72 horas em privação hídrica.²⁹² Além disso, Ohno e colaboradores (2018), tem apresentado que a intensidade da fluorescência da proteína vermelha fluorescente 1 associada a oxitocina-monomérica (mRFP1) foi maior na pituitária posterior, o SON e PVN de ratos transgênicos Wistar de 12, 18 e 24 meses de idade do que os ratos de 3 meses de idade. Também, Onho *et al* (2018), encontraram que a mRNA de OT, determinado por meio duma sonda oligodesoxinucleotídica marcada com 35S complementar, no SON e PVN dos ratos transgênicos, foi maior nos animais de 20 meses de idade do que nos de 3 meses de idade.³⁴¹ Estes resultados são diferentes aos obtidos por nosso grupo, no qual a idade não é um fator que muda a concentração plasmática de OT. A diferença dos resultados do presente estudo com a literatura pode ser explicada pela diferença de linhagem de animais e de protocolo de privação hídrica utilizado.

Em relação ao comportamento natriorexigênico nosso trabalho observou que machos na idade de 9 meses apresentaram menor apetite pelo sódio do que as fêmeas, as quais mantiveram a resposta de ingestão de salina perante o estímulo de desidratação de 24 horas. Aos 18 meses, ambos sexos apresentaram diminuído o comportamento natriorexigênico. Resultados similares foram observados na ingestão de salina depois de 48 horas de restrição hídrica, no qual a ingestão foi maior nas fêmeas de 3 meses do que nos machos da mesma idade, mas aos 18 meses de idade a diferença do apetite pela salina segundo o sexo desapareceu. Begg *et al* (2012) já haviam descrito a preferência pela salina das fêmeas adultas tratadas com furosemida, quando foram comparadas com machos, além da perda da preferência por salina e a diferença com o macho quando elas foram idosas.³¹⁵

Além do anterior, foi observado que as fêmeas desidratadas aos 6 meses de vida tiveram maior preferência para beber solução salina do que água, no entanto na idade de 18 meses elas preferiram a água do que salina isotônica. Esta preferência pela solução salina das fêmeas adultas pode ser consequência da interação da participação de várias vias modulando a ingestão de sal, sendo assim, o aumento de

CORT plasmática, o qual é maior nas fêmeas, e aldosterona, como parte da ativação do SRAA pela desidratação, os quais juntos estimulam fortemente a ingestão de salina.³⁴²

Por outro lado, a diminuição da preferência pela salina nas fêmeas de mais idade poderia se correlacionar com a diminuição da concentração plasmática de ANGII observada nos animais idosos, como consequência da diminuição da produção de renina, pelo que embora a CORT estivesse aumentada, ela por se mesma não é capaz de aumentar a ingestão de água e salina.³⁴²

Os nossos resultados apresentam que os machos e fêmeas de 18 meses de idade submetidos a privação hídrica de 24 horas beberam menos quantidade de água do que os animais de 2 meses de idade. Estes dados são similares aos resultados obtidos por Begg e colaboradores (2012) onde não encontraram diferenças segundo o sexo na ingestão de água nos animais jovens.³¹⁵

Por outro lado, na idade de 9 meses machos e fêmeas apresentaram diminuição da ingestão de água quando comparados com a idade de 2 meses e não foram observadas diferenças quando comparados com a idade de 18 meses. Estes dados mostram que mesmo antes dos animais entrarem na velhice, a ingestão de água está diminuída tanto em machos como em fêmeas, indicando a alteração do comportamento dipsogênico na idade adulta dos ratos. Embora não se tenha nada descrito na literatura relacionados com estes resultados, poderia se supor que as mudanças renais morfológicas e funcionais ao longo da vida diminuem a formação e secreção de renina e consequentemente a concentração plasmática de ANGII, afetando a sede como já foi descrito anteriormente.³⁴³

Observamos dimorfismo sexual no comportamento dipsogênico depois da privação hídrica de 48 horas na idade de 3 e 18 meses, onde as fêmeas beberam mais água do que os machos. Resultados similares foram descritos por Kaufman em animais adultos, onde as fêmeas desidratadas por 48 horas beberam $44,3 \pm 7,4$ mL/kg do peso corporal e os machos $22,0 \pm 3,3$ mL/kg do peso corporal.³⁰⁵ Por outro lado, na literatura não se tem descrito trabalhos com privação de líquidos por 48 horas comparando o sexo em ratos de 18 meses, o que se tem é desidratação de 24 horas e os resultados foram similares aos nossos, que não se observou diferença sexual como já se mencionou anteriormente.

As fêmeas de 3 meses desidratadas por 48 horas beberam mais água do que os machos com a mesma idade, sendo esse achado associado a maior concentração

plasmática de ANP em machos, comparados às fêmeas. O ANP inibe a ingestão de água, o que poderia contribuir para a menor ingestão de água dos machos do que fêmeas após a desidratação.^{270–272}

Por outro lado, o dimorfismo sexual encontrado no valor plasmático de ANP deve-se possivelmente, a uma diminuição da concentração plasmática de estradiol nas fêmeas, já que estradiol, a progesterona e a testosterona estimulam a expressão de mRNA e conteúdo de ANP no átrio direito de ratos machos e fêmeas.^{37,344–346} O estradiol, mediante o receptor ER α , poderia estar agendo de forma direta na expressão do gene do ANP no coração.^{344,346}

A concentração plasmática de OT das fêmeas de 18 meses hidratadas e desidratadas por 48 horas, foi maior do que os machos. Estes resultados são apresentados pela primeira vez na literatura. Adicionalmente, foi observado que fêmeas idosas tanto hidratadas quanto desidratadas apresentaram níveis plasmáticos de PRL elevados quando comparados aos machos. Neste contexto, é possível sugerir que os níveis elevados de OT nas fêmeas pode ser devido à ação estimuladora da PRL na secreção de OT, uma vez que foi demonstrado que a PRL estimula a liberação de OT.^{347,348}

Por outro lado, o conteúdo de OT na neurohipófise foi similar entre os machos e fêmeas hidratados e desidratados, indicando que possivelmente as fêmeas de 18 meses tem maior formação de OT do que os machos nessa mesma idade e/ou que o processamento na formação do hormônio poderia estar alterado nos machos de 18 meses, já que a expressão relativa de mRNA de OT no SON e PVN não foi diferente nos animais de 18 meses segundo o sexo nem a condição de hidratação.

Em relação com a expressão relativa de mRNA de OT no SON de ratos fêmeas de 18 meses se encontra diminuído quando comparar com as fêmeas de 3 meses, entanto que não foi observado diferenças nas duas idades na expressão relativa de mRNA de OT no PVN, sugerindo que possivelmente os neurônios ocitocinérgicos do SON sofrem inibição da expressão de OT pela CORT, a qual, como já foi descrito, se encontra elevada nas fêmeas de 18 meses e foi mostrado na literatura, que os neurônios do SON apresentam receptores glicocorticoides.^{349–351}

Por último, nossos resultados demonstram que fêmeas adultas submetidas a privação hídrica e as idosas hidratadas e desidratadas apresentam maiores níveis de CORT plasmáticas do que os respectivos machos. Diferentes estudos têm demonstrado que o estrogênio estimula a produção de CORT por meio da estimulação

do PVN que aumenta a expressão do CRH e agindo na glândula adrenal e aumentando a CORT plasmática.^{78,185,187,352} Também, tem se demonstrado que a PRL, o qual está elevado nos animais idosos, estimula o aumento de CORT plasmática.^{187,353} Em contrapartida aos resultados de OT, a qual foi demonstrada ser inibida pela CORT, embora a CORT esteja elevada nos animais idosos, como ela tem diminuído os receptores de glicocorticoides no PVN, o efeito inibitório na expressão relativa de mRNA de OT não são observados.³⁵¹

7. Conclusão

Os ratos submetidos à desidratação (24 e/ou 48 horas), segundo envelheciam bebem menos água e salina isotônica do que quando eles eram mais novos e apresentam maior preferência por beber água que solução salina.

As fêmeas, por sua vez, na vida adulta em resposta a privação hídrica têm preferência pela solução salina isotônica, mas na idade de 12 meses a preferência muda para água, embora com o envelhecimento bebem menos líquidos.

Os animais adultos apresentam diferença sexual no comportamento dipsogênico, o qual não foi observado com a velhice. Por outro lado, o apetite ao sódio, a diminuição da ingestão de sódio acontece primeiro no rato macho durante a vida adulta, e depois nas fêmeas quando são mais velhas.

A diminuição do comportamento dipsogênico e natriorexigênico está possivelmente associada com a diminuição da concentração plasmática de ANGII nos animais idosos.

Ratos idosos, machos e fêmeas, mantém a resposta da AVP, OT e ANP a privação hídrica, mas perdem a capacidade da ANG e CORT responderem a este desafio.

A PRL se encontrou alta nas fêmeas idosas e não se altera em resposta a privação hídrica.

O envelhecimento altera as concentrações plasmáticas de ANGII, OT, ANP e CORT, extinguindo as diferenças sexuais encontradas na idade adulta e gerando novos dimorfismos sexuais na velhice.

A expressão genica relativa de Agtr1a e OT no SFO e SON pode ser alterada pelo envelhecimento, o sexo e a condição hídrica.

Considerando os resultados deste trabalho demonstramos que a resposta comportamental dipsogênica e neuroendócrina na manutenção da homeostase

hidromineral sofre influência do envelhecimento, tendo o sexo um fator preponderante nestas respostas.

Os idosos podem ter alterado os determinantes fisiológicos relacionados com homeostase hidroeletrolítica, muitos trabalhos têm sido publicados em relação a este tema, mas é importante aprofundar e prover mais conhecimento desta matéria para abrir novas vias para o desenvolvimento de melhores opções terapêuticas para os distúrbios do balanço hidroeletrolítico nesta população.

CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou que no envelhecimento o sexo afeta a resposta hormonal relacionada com o controle do metabolismo energético. Embora, a variação observada entre os machos e fêmeas idosas, possivelmente não foi produto dos hormônios gonodais, as diferenças sexuais encontradas nos idosos, podem dever-se a participação mais forte de hormônios conhecidos, que na vida do animal adulto tinham pouca participação ou nenhuma.

Para estudar a disfunção cardíaca e renal no animal envelhecimento no modelo de animal, os ratos Wistar podem ser uma opção, porque eles apresentam alterações similares aos seres humanos.

Este estudo apresentou que o controle neuroendócrino da homeostase hidromineral em condições de privação hídrica é modulado por envelhecimento e o sexo. Além disso, o estímulo de desidratação exibiu que o sexo e a idade são variáveis que agem no comportamento dipsogênico e do apetito ao sódio.

Perspectivas

- Determinar o efeito de ter uma elevada concentração plasmática de CORT a nível sistêmico nas fêmeas em comparação com os machos e nos machos idosos em comparação com os ratos adultos.
- Detalhar pontualmente os mecanismos endócrinos, com ênfases na interação de CORT e PRL, relacionados com o controle do metabolismo energético das fêmeas idosas.
- Determinar o LDLr no fígado e no cérebro e o HMG-COAR no fígado das fêmeas adultas, idosas e idosas com E2 com alimentação *ad libitum*.
- Analisar outros hormônios plasmáticos que podem estar participando na homeostase do metabolismo de lipídeos e colesterol na fêmea de 18 meses com alimentação *ad libitum*.
- Determinar a partir do transcriptoma do núcleo arqueado os mecanismos moleculares alterados nos animais idosos.
- Determinar as mudanças do metabolismo energético frente a um estímulo de estresse osmótico nos machos e fêmeas idosas.
- Comparar o efeito metabólico que tem a PRL elevada entre os machos e fêmeas idosas e com os adultos respectivos.

- Determinar os mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de PRL no animal idoso.
- Determinar quais são os mecanismos pela que o rato na vida adulta tem uma diminuição do comportamento dipsogênico e natriorexigénico de forma similar ao rato idoso.
- Determinar por método do transcriptoma do PVN e SON os mecanismos moleculares que são ativados e inibidos durante a privação hídrica no rato e rata idosa.
- Estudar as mudanças morfológicas e funcionais dos neurônios ocitocinérgicos de ratas idosas.

REFERENCIAS

1. Hale WA, Joubert JD, Kalula S. Aging Populations and Chronic Illness. In: Markle WH, Ficher MA, Smego RA, eds. *Understanding Global Health*. 2nd ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2014.
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs PD. World population prospects: the 2017 revision. *Vol II Demogr profiles*. 2017;2:1-883. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasil. Projeção da população por sexo e idades simples, em 1º de julho - 2010/2060. ftp://ftp.ibge.gov.br/Projecao_da_Populacao/Projecao_da_Populacao_2018/projecoes_2018_populacao_2010_2060.xls. Published 2018. Accessed January 19, 2019.
4. Martin GM. The Biology of Aging: Introduction. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jamenson L, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.
5. Ferrucci L, Studenski S. Clinical Problems of Aging: Introduction. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson L, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.
6. Zamboni M, Zoico E, Scartezzini T, et al. Body composition changes in stable-weight elderly subjects: the effect of sex. *Aging Clin Exp Res*. 2003;15(4):321-327. doi:10.1007%2F03324517
7. JafariNasabian P, Inglis JE, Reilly W, Kelly OJ, Ilich JZ. Aging human body: Changes in bone, muscle and body fat with consequent changes in nutrient intake. *J Endocrinol*. 2017;234(1):R37-R51. doi:10.1530/JOE-16-0603
8. Cowen LE, Hodak SP, Verbalis JG. Age-associated abnormalities of water homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(2):349-370. doi:10.1016/j.ecl.2013.02.005
9. He X, Li Z, Tang X, et al. Age- and sex-related differences in body composition in healthy subjects aged 18 to 82 years. *Med (United States)*. 2018;97(25):12-17. doi:10.1097/MD.00000000000011152
10. Gheller BJF, Riddle ES, Lem MR, Thalacker-Mercer AE. Understanding age-

- related changes in skeletal muscle metabolism: Differences between females and males. *Annu Rev Nutr.* 2016;36(1):129-156. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050901
11. Horn M a. Cardiac physiology of aging: Extracellular considerations. *Compr Physiol.* 2015;5(July):1069-1121. doi:10.1002/cphy.c140063
 12. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. *Circulation.* 2003;107(1):139-146. doi:10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58
 13. Nakou ES, Parthenakis FI, Kallergis EM, Marketou ME, Nakos KS, Vardas PE. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int J Cardiol.* 2016;209:167-175. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.039
 14. Lakatta EG, Gerstenblith G, Angell CS, Shock NW, Weisfeldt ML. Prolonged contraction duration in aged myocardium. *J Clin Invest.* 1975;55(1):61-68. doi:10.1172/JCI107918
 15. Rodeheffer RJ, Gerstenblith G, Becker LC, Fleg JL, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation.* 1984;69(2):203-213. doi:10.1161/01.CIR.69.2.203
 16. Wessells RJ, Bodmer R. Cardiac Aging. *Handb Biol Aging Eighth Ed.* 2007;18(1):111-116. doi:10.1016/B978-0-12-411596-5.00017-4
 17. Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart.* 2016;102(11):825-831. doi:10.1136/heartjnl-2015-308769
 18. Davy KP, Seals DR. Total blood volume in healthy young and older men. *J Appl Physiol.* 1994;76(5):2059-2062. doi:10.1152/jappl.1994.76.5.2059
 19. Schlanger LE. Electrolytes in the aging. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(4):308-319. doi:10.1053/j.ackd.2010.03.008
 20. Fortes MB, Owen JA, Raymond-Barker P, et al. Is this elderly patient dehydrated? Diagnostic accuracy of hydration assessment using physical signs, Urine, and saliva markers. *J Am Med Dir Assoc.* 2015;16(3):221-228. doi:10.1016/j.jamda.2014.09.012
 21. Warren JL, Bacon WE, Haris T, Mcbean AM, Foley DJ, Phillips C. The burden

- and outcomes associated with dehydration among US elderly, 1991. *Am J Public Health*. 1994;84(8):1265-1269. doi:10.2105/AJPH.84.8.1265
22. O'Neill PA, Faragher EB, Davies I, Wears R, Mclean KA, Fairweather DS. Reduced survival with increasing plasma osmolality in elderly continuing-care patients. *Age Ageing*. 1990;19(1):68-71. doi:10.1093/ageing/19.1.68
 23. Hooper L. Why, oh why, are so many older adults not drinking enough fluid? *J Acad Nutr Diet*. 2016;116(5):774-778. doi:10.1016/j.jand.2016.01.006
 24. Luckey AE, Parsa CJ. Fluid and electrolytes in the aged. *Arch Surg*. 2003;138:1055-1060. doi:10.1001/archsurg.138.10.1055
 25. Hawkins RC. Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia. *Clin Chim Acta*. 2003;337:169-172. doi:10.1016/j.cccn.2003.08.001
 26. Miller M. Disorders of fluid balance. In: Halter JB, Ouslander JG, Tinetti ME, Studenski S, High KP, Asthana S, eds. *Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology*. 6th ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2009:1048-1058.
 27. Rodríguez-Puyol D. The aging kidney. *Kidney Int*. 1998;54(6):2247-2265. doi:10.1038/4499994
 28. Gekle M. Kidney and aging — A narrative review. *Exp Gerontol*. 2017;87:153-155. doi:10.1016/j.exger.2016.03.013
 29. Weinstein JR, Anderson S. The aging Kidney-Physiological changes. *Nac Institutes Heal*. 2010;17(4):302-307. doi:10.1053/j.ackd.2010.05.002.
 30. Sladek CD, McNeill TH, Gregg CM, Blair ML, Baggs RB. Vasopressin and renin response to dehydration in aged rats. *Neurobiol Aging*. 1981;2(4):293-302. doi:10.1016/0197-4580(81)90038-5
 31. Ferrucci L, Maggio M, Bandinelli S, et al. Low testosterone levels and the risk of anemia in older men and women. *Arch Intern Med*. 2006;166(13):1380-1388. doi:10.1001/archinte.166.13.1380
 32. Shin YS, You JH, Cha JS, Park JK. The relationship between serum total testosterone and free testosterone levels with serum hemoglobin and hematocrit levels: a study in 1221 men. *Aging Male*. 2016;19(4):209-214. doi:10.1080/13685538.2016.1229764
 33. Roy CN, Snyder PJ, Stephens-Shields AJ, et al. Association of testosterone levels with anemia in older men: A controlled clinical trial. *JAMA Intern Med*.

- 2017;177(4):480-490. doi:10.1001/jamainternmed.2016.9540
34. Price EA. Aging and erythropoiesis: Current state of knowledge. *Blood Cells, Mol Dis*. 2008;41(2):158-165. doi:10.1016/j.bcmd.2008.04.005
 35. Rishpon-Meyerstein N, Kilbridge T, Simone J, Fried W. The effect of testosterone on erythropoietin levels in anemic patients. *Blood*. 1968;31(4):453-460. doi:10.1182/blood-2014-12-567834
 36. Ahern T, Wu FCW. New horizons in testosterone and the ageing male. *Age Ageing*. 2015;44(2):188-195. doi:10.1093/ageing/afv007
 37. Hong M, Yan O, Tao B, et al. Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1992;373(1):213-218. doi:10.1515/bchm3.1992.373.1.213
 38. Nakada D, Oguro H, Levi BP, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature*. 2014;505(7484):555-558. doi:10.1038/nature12932
 39. Lovejoy JC, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis: Etiology and pathophysiology. *Obes Rev*. 2009;10(2):154-167. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00529.x
 40. Ethun K. *Sex and Gender Differences in Body Composition, Lipid Metabolism, and Glucose Regulation*. 1st ed. (Neigh GN, Mitzelfelt MM, eds.). Boston: Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802388-4.00009-4
 41. Link JC, Chen X, Arnold AP, Reue K. Metabolic impact of sex chromosomes. *Adipocyte*. 2013;2(2):74-79. doi:10.4161/adip.23320
 42. Wells JCK. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(3):415-430. doi:10.1016/j.beem.2007.04.007
 43. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*. 1994;74(4):761-811. doi:10.1152/physrev.1994.74.4.761
 44. Bredella MA. Sex differences in body composition. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1043:9-27. doi:10.1007/978-3-319-70178-3_2
 45. White UA, Tchoukalova YD. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):377-392. doi:10.1016/j.bbdis.2013.05.006
 46. Hazzard WR, Applebaum-Bowden D. Why women live longer than men: the biologic mechanism of the sex differential in longevity. *Trans Am Clin Clim*

- Assoc. 1990;101:168-189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2486441>.
47. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: The Framingham study. *Clin Chem*. 2004;50(7):1189-1200. doi:10.1373/clinchem.2004.032763
 48. Soeters MR, Sauerwein HP, Groener JE, et al. Gender-related differences in the metabolic response to fasting. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3646-3652. doi:10.1210/jc.2007-0552
 49. Sadaf Farooqi I, O'Rahilly S. Leptin: A pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):980-984. doi:10.3945/ajcn.2008.26788C
 50. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Jr SC. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron*. 2012;71(1):142-154. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.028.
 51. Ollmann MM, Wilson BD, Yang Y, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* (80-). 1997;278(5335):135-138. doi:10.1126/science.278.5335.135
 52. Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, et al. Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*. 1997;390(6658):349. doi:10.1038/37016
 53. Havel PJ, Kasim-Karakas, Sidika, Dubuc GR, Mueller W, Phinney S. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med*. 1996;2(9):949-950. doi:10.1038/nm0996-949b
 54. Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, et al. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3243-3246. doi:10.1210/jc.83.9.3243
 55. Lin K-C, Sagawa N, Yura S, Itoh H, Fujii S. Simultaneous increases of leptin and gonadotropin-releasing hormone following exogenous estrogen administration in women with normally menstrual cycle. *Endocr J*. 2005;52(4):449-454. doi:10.1507/endocrj.52.449
 56. Rocha M, Bing C, Williams G, Puerta M. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem*. 2004;15(6):328-334. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.01.003
 57. Vallejo G, Dieguez C, Casanueva FF. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro:

- dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):2149-2155.
doi:10.1210/jcem.83.6.4849
58. Sirbu A, Buburuzan L, Kevirkian S, et al. Adiponectin expression in visceral adiposity is an important determinant of insulin resistance in morbid obesity. *Endokrynol Pol*. 2018;69(3):252-258. doi:10.5603/EP.a2018.0026
 59. Lee B, Shao J. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(2):149-156. doi:10.1007/s11154-013-9283-3
 60. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005;6(1):13-21.
doi:10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x
 61. Christen T, Trompet S, Noordam R, et al. Sex differences in body fat distribution are related to sex differences in serum leptin and adiponectin. *Peptides*. 2018;107:25-31. doi:10.1016/j.peptides.2018.07.008
 62. Nishizawa H, Shimomura L, Kishida K, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002;51(September):2734-2741. doi:10.2337/diabetes.51.9.2734
 63. Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol*. 2006;190(85):425-432.
doi:10.1677/joe.1.06596
 64. Blaak E. Sex differences in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(1363-1950 (Print)):500-504.
 65. Antunes-Rodrigues J, Moreira A, Elias LLK, de Castro M. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. 1st ed. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN S.A; 2005.
 66. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011;60(11):1500-1510.
doi:10.1016/j.metabol.2011.06.012
 67. Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 1998;47(1):3-6. doi:10.1016/S0026-0495(98)90184-6
 68. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol*

- Metab.* 1982;54(1):131-138. doi:10.1210/jcem-54-1-131
69. Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia*. 2005;48(10):2119-2130. doi:10.1007/s00125-005-1886-0
 70. Fichna M, Fichna P. Glucocorticoids and beta-cell function. *Endokrynol Pol.* 2017;68(5):568-573. doi:10.5603/EP.2017.0060
 71. Billaudel B, Mathias PCF, Sutter BCJ, Malaisse WJ. Inhibition by corticosterone of calcium inflow and insulin release in rat pancreatic islets. *J Endocrinol.* 1984;100(2):227-233. doi:10.1677/joe.0.1000227
 72. Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S. Glucocorticoid increases glucose cycling and inhibits insulin release in pancreatic islets of ob/ob mice. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 1):E663-E666. doi:10.1152/ajpendo.1992.263.4.E663
 73. Gremlich S, Roduit RL, Thorens B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic cells. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3216-3222. doi:10.1016/j.metabol.2005.06.023
 74. Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology.* 1992;131(3):1261-1269. doi:10.1210/endo.131.3.1324155
 75. Isgor C, Cecchi M, Kabbaj M, Akil H. Estrogen receptor B in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience.* 2003;121(4):837-845. doi:10.1016/S0306-4522(03)00561-X
 76. Lunga P, Herbert J. 17 β -Oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(9):776-785. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01234.x
 77. Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(3):272-278. doi:10.1111/j.0953-8194.2004.01167.x
 78. Bohler HCL, Thomas Zoeller R, King JC, Rubin BS, Weber R, Merriam GR. Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of

- proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Mol Brain Res.* 1990;8(3):259-262. doi:10.1016/0169-328X(90)90025-9
79. Freeman ME, Kanyicska L, Lerant A, et al. Prolactin: structure , function , and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1523-1631. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1523
 80. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(3):110-116. doi:10.1016/j.tem.2006.02.005
 81. Sauve D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res.* 2000;868(2):306-314. doi:10.1016/S0006-8993(00)02344-1
 82. Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull.* 1986;17(4):563-569. doi:10.1016/0361-9230(86)90226-1
 83. Fleenor D, Arumugam R, Freemark M, Arumugam F/, Freemark /. Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of Insulin-Like Growth Factor I. *Horm Res.* 2006;66:101-110. doi:10.1159/000093667
 84. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(4):1120-1126. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.026
 85. Nilsson LA, Roepstorff C, Kiens B, Ling C. Prolactin suppresses Malonyl-CoA concentration in human adipose tissue. *Horm Metab Res.* 2009;41(10):747-751. doi:10.1055/s-0029-1224181
 86. Gualillo O, Lago F, García M, et al. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* 1999;140:5149-5153. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.023
 87. Brandebourg TD, Bown JL, Ben-Jonathan N. Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(2):408-413. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.168
 88. Ruiz-Herrera X, De Los Ríos EA, Díaz JM, et al. Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males. *Endocrinology.*

- 2017;158(1):56-68. doi:10.1210/en.2016-1444
89. White UA, Coulter AA, Miles TK, Stephens JM. The STAT5A-mediated induction of pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression by prolactin or growth hormone in adipocytes. *Diabetes*. 2007;56(June):1623-1629. doi:10.2337/db06-1286.AOX
 90. Viengchareun S, Bouzinba-Segard H, Laigneau JP, et al. Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2004;33(3):679-691. doi:10.1677/jme.1.01563
 91. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: The roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol*. 2000;164(3):277-286. doi:10.1677/joe.0.1640277
 92. Arumugam R, Horowitz E, Noland RC, Lu D, Fleenor D, Freemark M. Regulation of islet B-Cell pyruvate metabolism: interactions of prolactin, glucose, and dexamethasone. *Endocrinology*. 2010;151(7):3074-3083. doi:10.1210/en.2010-0049
 93. Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13337-13345. <http://www.jbc.org/content/269/18/13337.full.pdf>. Accessed April 19, 2018.
 94. Yasui T, Murakami T, Maeda T, Oka T. Involvement of gonadal steroid hormone disturbance in altered prolactin receptor gene expression in the liver of diabetic mice. *J Endocrinol*. 1999;161(1):33-40. <http://www.endocrinology.org>. Accessed February 1, 2019.
 95. Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H. Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. *J Endocrinol*. 1994;143(2):383-392. doi:10.1677/joe.0.1430383
 96. Lyons DJ, Broberger C. TIDAL WAVES: Network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(4):420-438. doi:10.1016/j.yfrne.2014.02.001
 97. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Compr Physiol*. 2016;6(3):1387-1428. doi:10.1002/cphy.c150027
 98. Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism.

- Physiol Rev.* 2014;94(2):355-382. doi:10.1152/physrev.00030.2013
99. Zamboni, M, Zoico E, Scartezzini T, Mazzali G, Tosoni P, Zivelonghi A. Body composition changes in stable-weight elderly subjects: the effect of sex. *Aging Clin Exp Res.* 2003;15(4):321-327.
 100. Wolden-Hanson T. Changes in body composition in response to challenges during aging in rats. *Interdiscip Top Gerontol.* 2010;37:64-83. doi:10.1159/000319995
 101. Kirchengast S. Gender differences in body composition from childhood to old age: An evolutionary point of view. *J Life Sci.* 2010;2(1):1-10. doi:10.1080/09751270.2010.11885146
 102. Morita Y, Iwamoto I, Mizuma N, et al. Precedence of the shift of body-fat distribution over the change in body composition after menopause. *J Obstet Gynaecol Res.* 2006;32(5):513-516. doi:10.1111/j.1447-0756.2006.00437.x
 103. Douchi T, Kosha S, Uto H, et al. Precedence of bone loss over changes in body composition and body fat distribution within a few years after menopause. *Maturitas.* 2003;46(2):133-138. doi:10.1016/S0378-5122(03)00162-2
 104. Wu CH, Yao WJ, Lu FH, Yang YC, Wu JS, Chang CJ. Sex differences of body fat distribution and cardiovascular dysmetabolic factors in old age. *Age Ageing.* 2001;30(4):331-336. doi:10.1093/ageing/30.4.331
 105. Basu R, Man CD, Campioni M, et al. Effects of age and sex on postprandial glucose metabolism differences in glucose turnover, insulin secretion, insulin action, and hepatic insulin extraction. *Diabetes.* 2006;55(7):2001-2014. doi:10.2337/db05-1692
 106. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed Res Int.* 2014;2014(757461). doi:10.1155/2014/757461
 107. Bowman RE, Maclusky NJ, Diaz SE, Zrull MC, Luine VN. Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. *Brain Res.* 2006;1126(1):156-166. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.047
 108. Deuschle M, Gotthard U, Schweiger U, et al. With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sci.* 1997;61(22):2239-2246.
 109. Born J, Ditschuneit I, Schreiber M, Dodt C, Fehm HL. Effects of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *Eur J Endocrinol.* 1995;132(6):705-711. doi:10.1530/EJE.0.1320705

110. Roelfsema F, Pijl H, Keenan DM, Veldhuis JD. Prolactin secretion in healthy adults is determined by gender, age and body mass index. *PLoS One*. 2012;7(2):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0031305
111. Wang T, Lu J, Xu YU, et al. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation. A population-based study. *Diabetes Care*. 2013;36(7):1974-1980. doi:10.2337/dc12-1893
112. Keenan DM, Roelfsema F, Carroll BJ, Iranmanesh A, Veldhuis JD. Sex defines the age dependence of endogenous ACTH-cortisol dose responsiveness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:515-523. doi:10.1152/ajpregu.00200.2009.
113. Schianca GPC, Castello L, Rapetti R, Limoncini A, Bartoli E. Insulin sensitivity: Gender-related differences in subjects with normal glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(5):339-344. doi:10.1016/j.numecd.2005.05.004
114. Balaskó M, Soós S, Székely M, Pétervári E. Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance. *J Chem Neuroanat*. 2014;61:248-255. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.08.006
115. Schautz B, Later W, Heller M, Peters A, Müller MJ, Bosy-Westphal A. Impact of age on leptin and adiponectin independent of adiposity. *Br J Nutr*. 2012;108(2):363-370. doi:10.1017/S0007114511005605
116. Roszkowska-Gancarz M, Jonas M, Owczarz M, et al. Age-related changes of leptin and leptin receptor variants in healthy elderly and long-lived adults. *Geriatr Gerontol Int*. 2015;15(3):365-371. doi:10.1111/ggi.12267
117. Matsuda M, Mori T, Sassa S, Sakamoto S, Park MK, Kawashima S. Chronic effect of hyperprolactinemia on blood glucose and lipid level in mice. *Life Sci*. 1996;58(14):1171-1177. doi:10.1016/0024-3205(96)00075-6
118. Esquifino AI, Cano P, Jimenez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. Changes of prolactin regulatory mechanisms in aging: 24-h rhythms of serum prolactin and median eminence and adenohipophysial concentration of dopamine, serotonin, (γ -aminobutyric acid, taurine and somatostatin in young and aged rats. *Exp Gerontol*. 2004;39(1):45-52. doi:10.1016/j.exger.2003.08.004
119. Rossmanith WG, Szilagyi A, Scherbaum WA. Episodic thyrotropin (TSH) and prolactin (PRL) secretion during aging in postmenopausal women. *Horm Metab Res*. 1992;24(4):185-190. doi:10.1055/s-2007-1003290

120. Gietka-Czernel M. The thyroid gland in postmenopausal women: physiology and diseases. *Menopause Rev.* 2017;16(2):33-37. doi:10.5114/pm.2017.68588
121. Vecsei P. Glucocorticoids: Cortisol, Cortisone, Corticosterone, Compounds, and their Metabolites. In: Jaffe BM, Behrman HR, eds. *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. 2d ed. Academic Press; 1978:767-796. doi:10.1016/B978-0-12-379260-0.50046-7
122. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Tadeu Hochmuller Fogaça R, de Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutr Hosp.* 2013;28(6):2151-2156. doi:10.3305/nh.2013.28.6.6659
123. Nistiar F, Racz O, Lukacinova A, et al. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J Environ Sci Heal Part A.* 2012;47(9):1224-1233. doi:10.1080/10934529.2012.672071
124. Wiesner B, Sheard N. The duration of life in an albino rat population. *R Soc Edinburgh.* 1934;55(November 6):1-22. doi:https://doi.org/10.1017/S0370164600014310
125. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-119. doi:10.1258/002367707779399518
126. Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. *Experientia.* 1970;26(7):789-790. doi:10.1007/BF02232553
127. Salvestrini V, Sell C, Lorenzini A. Obesity may accelerate the aging process. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019. doi:10.3389/fendo.2019.00266
128. Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav.* 2007;92(5):911-923. doi:10.1016/j.physbeh.2007.06.017
129. Enesco M, Leblond CP. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morph.* 1962;10(4):530-562. <http://dev.biologists.org/content/develop/10/4/530.full.pdf>. Accessed April 30, 2019.
130. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2

- pluripotent cells through an androgen receptor-,mediated pathway.
Endocrinology. 2003;144(11):5081-5088. doi:10.1210/en.2003-0741
131. Bhasin S, Taylor WE, Singh R, et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: Mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol Med Sci*. 2003;58A(12):1103-1110.
<https://academic.oup.com/biomedgerontology/article-abstract/58/12/M1103/591636>. Accessed May 2, 2019.
 132. Somogyi V, Peto K, Deak A, Tanczos B, Nemeth N. Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (CrI:WI) rats. *Biorheology*. 2018;54(5-6):127-140. doi:10.3233/BIR-17148
 133. Passadore MD, Griggio MA, Luz J. Effects of aging on the energy balance of food-restricted rats. *Acta Physiol Scand*. 2004;181(2):193-198.
doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01281.x
 134. Thomas MA, Rice HB, Weinstock D, Corwin RL. Effects of aging on food intake and body composition in rats. *Physiol Behav*. 2002;76(4-5):487-500.
doi:10.1016/S0031-9384(02)00800-4
 135. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, Rostom de Mello MA. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):16. doi:10.1186/1758-5996-4-16
 136. Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav*. 1976;17(2):201-208. doi:10.1016/0031-9384(76)90064-0
 137. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(June):1251-1263.
doi:10.1098/rstb.2006.1860
 138. Asarian L, Geary N. Sex differences in the physiology of eating. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(11):R1215-R1267.
doi:10.1152/ajpregu.00446.2012
 139. Roy EJ, Wade GN. Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm Behav*. 1977;8(3):265-274. doi:10.1016/0018-506X(77)90001-0
 140. Chai J, Blaha V, Meguid MM, et al. Use of orchietomy and testosterone replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am J Physiol*. 1999;276(45):R1366-R1373. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.5.R1366

141. Grygorieva N, Povoroznyuk V, Gopkalova I, Orlyk T. Age and sex features of bone mineral density in rats. *Fiziol Zh.* 2017;63(1):26-32.
doi:10.15407/fz63.01.026
142. Karahan S, Kincaid SA, Lauten SD, Wright JC. In vivo whole body and appendicular bone mineral density in rats: a dual energy X-ray absorptiometry study. *Comp Med.* 2002;52(2):143-151.
143. Zhang XZ, Kalu DN, Erbas B, Hopper JL, Seeman E. The effects of gonadectomy on bone size, mass, and volumetric density in growing rats are gender-, site-, and growth hormone-specific. *J Bone Miner Res.* 1999;14(5):802-809. doi:10.1359/jbmr.1999.14.5.802
144. Govindarajan P, Schlewitz G, Schlieffe N, et al. Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variation in bone parameters and bone loss at Multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res.* 2013;19:76-86. doi:10.12659/MSMBR.883815
145. Gu Z, Du Y, Liu Y, et al. Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. *Age (Omaha).* 2012;34(6):1393-1403.
doi:10.1007/s11357-011-9312-7
146. Bonzón-Kulichenko E, Moltó E, Pintado C, et al. Changes in visceral adipose tissue plasma membrane lipid composition in old rats are associated with adipocyte hypertrophy with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73(9):1139-1146. doi:10.1093/gerona/gly081
147. Antonio Laurato Sertié R, de Oliveira Caminhotto R, Andreotti S, et al. Metabolic adaptations in the adipose tissue that underlie the body fat mass gain in middle-aged rats. *Age (Omaha).* 2015;37(5):87. doi:10.1007/s11357-015-9826-5
148. Sicree RA, Zimmet PZ, Dunstan DW, Cameron AJ, Welborn TA, Shaw JE. Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test - The AusDiab study. *Diabet Med.* 2008;25(3):296-302.
doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02362.x
149. van den Top M, Zhao FY, Viriyapong R, et al. The impact of ageing, fasting and high-fat diet on central and peripheral glucose tolerance and glucose-sensing neural networks in the arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2017;29(10):1-23. doi:10.1111/jne.12528
150. Yoshino G, Kazumi T, Kobayashi N, Terashi K, Morita S, Baba S. Insulin and

- glucagon relationships during aging in rats. *Endocrinol Jpn.* 1979;26(3):325-329. doi:10.1507/endocrj1954.26.325
151. Muñoz V, Gaspar R, Kuga G, et al. The effects of aging on rho kinase and insulin signalling in skeletal muscle and white adipose tissue of rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018. doi:10.1093/gerona/gly293
 152. Kleber Costa Teixeira R, Haber Feijó D, Lopes Valente A, et al. Influence of oophorectomy on glycemia and lipidogram. *Acta Cir Bras.* 2018;33(5):415-419. doi:10.1590/s0102-865020180050000003
 153. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism.* 2009;58(1):38-47. doi:10.1016/j.metabol.2008.08.004
 154. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. The diversity of sex steroid action: Regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol.* 2012;212(1):3-12. doi:10.1530/JOE-11-0044
 155. Barros RPA, Ke Gustafsson J-A°. Estrogen receptors and the metabolic Network. *Cell Metab.* 2011;14(3):289-299. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.005
 156. Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;122(1-3):74-81. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.06.012
 157. Reis F, Reis A, Coimbra C. Effects of hyperprolactinaemia on glucose tolerance and insulin release in male and female rats. *J Endocrinol.* 1997;153(3):423-428. doi:10.1677/joe.0.1530423
 158. Fleenor DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: Roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology.* 2001;142(7):2805-2810. doi:10.1210/endo.142.7.8267
 159. Rafacho A, Abrantes JLF, Ribeiro DL, et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. *Horm Metab Res.* 2011;43(4):275-281. doi:10.1055/s-0030-1269896
 160. Altura B, Lum G, Turlapaty P, Altura BT. Sequential changes in serum glucose, triglycerides and cholesterol in aging of normal and alloxan-diabetic rats. *Experientia.* 1981;37(3):224-226. doi:10.1007/BF01991622
 161. Sharma G, Prossnitz ER. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic B-cells.

- Endocrinology*. 2011;152(8):3030-3039. doi:10.1210/en.2011-0091
162. Ropero AB, Pang Y, Alonso-Magdalena P, Thomas P, Nadal Á. Role of ER β and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose. *Steroids*. 2012;77(10):951-958. doi:10.1016/j.steroids.2012.01.015
 163. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: It's not just about sex hormones sex differences in lipid metabolism and lipoprotein kinetics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):885-893. doi:10.1210/jc.2010-2061
 164. Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab*. 2018;15:45-55. doi:10.1016/j.molmet.2018.05.008
 165. Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Effect of sex and obesity on basal VLDL-triacylglycerol kinetics. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(3):573-582. doi:10.1093/ajcn/77.3.573
 166. Boudet J, Rouillet JB, Lacour B. Influence of Fast, Body Weight and Diet on Serum Cholesterol, Triglycerides, and Phospholipids Concentrations in the Aging Rat. 1988;20:734-737.
 167. Uchida K, Nomura Y, Kadowaki M, Takase H, Takano K, Takeuchi N. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res*. 1978;19(5):544-552. <http://www.jlr.org/content/19/5/544.full.pdf>. Accessed December 21, 2018.
 168. Murawski U, Kriesten K, Egge H. Age-related changes of lipid fractions and total fatty acids in the serum of female and male rats aged from 37 to 1200 days. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*. 1989;94(3):525-536. doi:10.1016/0305-0491(89)90192-2
 169. Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, Mc Auley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res Rev*. 2016;27:108-124. doi:10.1016/j.arr.2016.03.008
 170. Bose C, Bhuvaneswaran C, Udupa KB. Age-related alteration in hepatic acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase and its relation to LDL receptor and MAPK. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(6-7):740-751. doi:10.1016/j.mad.2005.02.003
 171. Pallottini V, Martini C, Cavallini G, et al. Modified HMG-CoA reductase and LDLr regulation is deeply involved in age-related hypercholesterolemia. *J Cell*

- Biochem.* 2006;98(5):1044-1053. doi:10.1002/jcb.20951
172. Nanjee MN, Miller NE. Sex difference in the saturable binding of low-density lipoprotein by liver membranes in ageing rats. *Biochim Biophys Acta.* 1988;959(3):378-385. doi:10.1016/0005-2760(88)90212-3
 173. Carrascosa JM, Ros M, Andrés A, Fernández-Agulló T, Arribas C. Changes in the neuroendocrine control of energy homeostasis by adiposity signals during aging. *Exp Gerontol.* 2009;44(1-2):20-25. doi:10.1016/j.exger.2008.05.005
 174. Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259:624-630. doi:10.1006/bbrc.1999.0842
 175. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes.* 1997;46(12):2035-2039. doi:10.2337/diab.46.12.2035
 176. Scarpace PJ, Tümer N. Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity. *Physiol Behav.* 2001;74(4-5):721-727. doi:10.1016/S0031-9384(01)00616-3
 177. Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Campoy F, et al. Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats. *J Endocrinol.* 2001;171(1):23-32. <http://www.endocrinology.org>. Accessed December 28, 2018.
 178. Xu A, Chan KW, Hoo RLC, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18073-18080. doi:10.1074/jbc.M414231200
 179. Isobe T, Saitoh S, Takagi S, et al. Influence of gender, age and renal function on plasma adiponectin level: The Tanno and Sobetsu study. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(1):91-98. doi:10.1530/eje.1.01930
 180. Adamczak M, Rzepka E, Chudek J, Więcek A. Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;62(1):114-118. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02182.x
 181. Song HJ, Oh S, Quan S, et al. Gender differences in adiponectin levels and body composition in older adults: Hallym aging study. *BMC Geriatr.* 2014;14(1):8. doi:10.1186/1471-2318-14-8
 182. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.*

- 2007;13(3):332-339. doi:10.1038/nm1557
183. Engin A. *Adiponectin-Resistance in Obesity*. Vol 960. (Engin AB, Engin A, eds.). Cham: Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-48382-5_5
 184. Lo MJ, Kau MM, Wang PS. Effect of aging on corticosterone secretion in diestrous rats. *J Cell Biochem*. 2006;97(2):351-358. doi:10.1002/jcb.20576
 185. Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OFX. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J*. 1995;9(5):419-423. doi:10.1096/fasebj.9.5.7896013
 186. Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience*. 2009;159(1):259-270. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.12.020
 187. Lo MJ, Wang PS. Relative and combined effects of estradiol and prolactin on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *Chin J Physiol*. 2003;46(3):103-109.
 188. Lo MJ, Kau MM, Chen JJ, et al. Age-related differences in corticosterone secretion in female rats. *Metabolism*. 1999;48(4):535-541. doi:10.1016/S0026-0495(99)90117-8
 189. De Guia RM, Rose AJ, Herzig S. Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;19(2):117-128. doi:10.1515/hmbci-2014-0021
 190. Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol*. 2014;223(3):R49-R62. doi:10.1530/JOE-14-0373
 191. Mueller KM, Hartmann K, Kaltenecker D, et al. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency attenuates aging-and HFD-induced obesity and impairs the feeding-fasting transition. *Diabetes*. 2017;66(2):272-286. doi:10.2337/db16-0381
 192. Putten L, van Zwieten M, Mattheij J, van Kemenade J. Studies on prolactin-secreting cells in aging rats of different strains. I. Alterations in pituitary histology and serum prolactin levels as related to aging. *Mech Ageing Dev*. 1988;42(1):75-90. doi:10.1016/0047-6374(88)90064-4
 193. Reymond MJ. Age-related loss of the responsiveness of the tuberoinfundibular

- dopaminergic neurons to prolactin in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1990;52(5):490-496. doi:10.1159/000125633
194. ThyagaRajan S, MohanKumar PS, Quadri SK. Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging. *Brain Res*. 1995;689(1):122-128. doi:10.1016/0006-8993(95)00551-Z
 195. Demarest KT, Moore KE, Riegler GD. Dopaminergic neuronal function, anterior pituitary dopamine content, and serum concentrations of prolactin, luteinizing hormone and progesterone in the aged female rat. *Brain Res*. 1982;247(2):347-354. doi:10.1016/0006-8993(82)91260-4
 196. Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: Weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48(5):547-553. doi:10.1046/j.1365-2265.1998.00403.x
 197. Heshmati HM, Turpin G, Gennes JL De. Chronic hyperprolactinemia and plasma lipids in women. *Klin Wochenschr*. 1987;65(11):516-519. doi:10.1007/BF01721038
 198. Atmaca A, Bilgici B, Ecemis GC, Tuncel OK. Evaluation of body weight, insulin resistance, leptin and adiponectin levels in premenopausal women with hyperprolactinemia. *Endocrine*. 2012;44(3):756-761. doi:10.1007/s12020-013-9931-0
 199. Luque GM, Lopez-Vicchi F, Ornstein AM, et al. Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine D2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):974-988. doi:10.1152/ajpendo.00200.2016.-We
 200. Lisbôa PC, Curty FH, Moreira RM, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Horm Metab Res*. 2001;33(9):532-535. doi:10.1055/s-2001-17211
 201. Donda A, Reymond F, Rey F, Lemarchand-Béraud T. Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. *Acta Endocrinol*. 1990;122(5):577-584. doi:10.1530/acta.0.1220577
 202. Greeley G, Lipton M, Kizer J. Serum thyroxine, triiodothyronine, and TSH levels and TSH release after TRH in aging male and female rats. *Endocr Res Commun*. 1982;9(3-4):169-177. doi:10.3109/07435808209045762
 203. Donda A, Reymond MJ, Ziirich MG, Lemarchand-bqaud T. Influence of sex and

- age on T3 receptors and T3 concentration in the pituitary gland of the rat : consequences on TSH secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 1987;54(1):29-34. doi:10.1016/0303-7207(87)90136-5
204. Schmitt R, Melk A. Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney Int*. 2017;92(3):569-579. doi:10.1016/j.kint.2017.02.036
 205. Marín J, Rodríguez-Marines MA. Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol*. 1999;34(4):503-512. doi:10.1016/S0531-5565(99)00029-7
 206. Waller BF. The old-age heart: Normal aging changes which can produce or mimic cardiac disease. *Clin Cardiol*. 1988;11(8):513-517. doi:10.1002/clc.4960110802
 207. Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ, Harvey W. Right ventricular function in cardiovascular disease, Part I. Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation*. 2008;117(11):1436-1448. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653576
 208. Freeman R V, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-3326. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738
 209. Movahed M-R, Saito Y, Ahmadi-Kashani M, Ebrahimi R. Mitral annulus calcification is associated with valvular and cardiac structural abnormalities. *Cardiovasc Ultrasound*. 2007;5:14. doi:10.1186/1476-7120-5-14
 210. Fulkerson PK, Beaver BM, Auseon JC, Graber HL. Calcification of the mitral annulus. Etiology, clinical associations, complications and therapy. *Am J Med*. 1979;66(6):967-977. doi:10.1016/0002-9343(79)90452-2
 211. Jones SA, Boyett MR, Lancaster MK. Declining into failure. The age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node. *Circulation*. 2007;115(10):1183-1190. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.663070
 212. Dun W, Boyden PA. Aged atria: electrical remodeling conducive to atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol*. 2009;25(1):9-18. doi:10.1007/s10840-008-9358-3
 213. Aires M de M. *Fisiologia*. 3rd ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A; 2013.
 214. Nikitin NP, A Witte KK, R Thackray SD, Goodge LJ, Clark AL, F Cleland JG. Effect of age and sex on left atrial morphology and function. *Eur J Echocardiogr*. 2003;4(1):36-42. doi:10.1053/euje.2002.0611

215. Boyd AC, Hons B, Schiller NB, Leung D, Ross DL, Thomas L. Atrial dilation and altered function are mediated by age and diastolic function but not before the eighth decade. *JAAC:Cardiovascular Imaging*. 2011;4(3):234-242. doi:10.1016/j.jcmg.2010.11.018
216. Chiao YA, Rabinovitch PS. The aging heart. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(9):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a025148
217. Ouzounian M, Lee DS, Liu PP. Diastolic heart failure: Mechanisms and controversies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(7):375-386. doi:10.1038/ncpcardio1245
218. Fares E, Howlett SE. Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(1):1-7. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05276.x
219. Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Reseach*. 2004;94(12):1533-1542. doi:10.1161/01.RES.0000129254.25507.d6
220. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II. Causal mechanism and treatment. *Circ (Circulation)*. 2002;105(12):1387-1393. doi:10.1161/hc1202.105290
221. Brunk UT, Jones CB, Sohal RS. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat Res DNAAging*. 1992;275(3-6):395-403. doi:10.1016/0921-8734(92)90042-N
222. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*. 2004;263(1-2):55-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524167>.
223. Kennedy BK, Steffen KK, Kaeberlein M. Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(11):1323-1328. doi:10.1007/s00018-007-6470-y
224. Ren J, Brown-Borg HM. Impaired cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from Ames dwarf mice with IGF-I deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2002;12(2):99-105. doi:10.1054/ghir.2002.0267
225. Reed AL, Tanaka A, Sorescu D, et al. Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2011;301(3):824-831. doi:10.1152/ajpheart.00407.2010.-Diastolic
226. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial

- infarction and cardiac remodeling. *Cardiovas Res*. 2007;74(2):184-195.
doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.002
227. Ferrara N, Komici K, Corbi G, et al. B-adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front Physiol*. 2014;4(396):1-10.
doi:10.3389/fphys.2013.00396
 228. Scarpace PJ, Shu Y, Tumer N. Influence of exercise training on myocardial beta-adrenergic signal transduction: differential regulation with age. *J Appl Physiol*. 1994;77(2):737-741. doi:10.1152/jappl.1994.77.2.737
 229. Rengo G, Lymperopoulos A, Zincarelli C, et al. Blockade of β -adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal α 2-adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure. *Br J Pharmacol*. 2012;166(8):2430-2440.
doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01972.x
 230. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016;37(42):3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
 231. Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill GJ, Barreto SM. Cardiovascular health in Brazil trends and perspectives global burden of cardiovascular disease. *Circulation*. 2016;133(4):422-433.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008727
 232. Thornton SN. Thirst and hydration: Physiology and consequences of dysfunction. *Physiol Behav*. 2010;100(1):15-21.
doi:10.1016/j.physbeh.2010.02.026
 233. Saker P, Farrell MJ, Adib FRM, Egan GF, McKinley MJ, Denton DA. Regional brain responses associated with drinking water during thirst and after its satiation. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(14). doi:10.1073/pnas.1403382111
 234. Kenney WL, Chiu P. Influence of age on thirst and fluid intake. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(9):1524-1532. doi:10.1097/00005768-200109000-00016
 235. Tamma G, Goswami N, Reichmuth J, De Santo NG, Valenti G. Aquaporins, Vasopressin, and Aging: Current Perspectives. *Endocrinology*. 2015;156(3):777-788. doi:10.1210/en.2014-1812
 236. Bitzer M, Wiggins J. Aging biology in the kidney. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016;23(1):12-18. doi:10.1053/j.ackd.2015.11.005
 237. Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(5):655-659.

doi:10.1097/00041552-200109000-00017

238. Chen Z, Vaughn DA, Fanestil DD, Vaughn Fanestil DD. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5(4):149. <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/5/4/1112.full.pdf>. Accessed May 13, 2019.
239. Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR, Hebert SC. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1661-1669. doi:10.1172/JCI601
240. Ziegler MG, Milic M. Sympathetic nerves and hypertension in stress, sleep apnea, and caregiving. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(1):26-30. doi:10.1097/MNH.0000000000000288
241. Buñag RD, Teravainen T-L. Tail-cuff detection of systolic hypertension in different strains of ageing rats. *Mech Ageing Dev*. 1991;59(1-2):197-213. doi:10.1016/0047-6374(91)90085-E
242. Barringer DL, Buñag RD. Autonomic regulation of reflex bradycardia in rats declines with age. *Exp Gerontol*. 1991;26(1):65-75. doi:10.1016/0531-5565(91)90063-R
243. Rothbaum DA, Shaw DJ, Angell CS, Shock NW. Age differences in the baroreceptor response of rats. *Journals Gerontol*. 1974;29(5):488-492. doi:10.1093/geronj/29.5.488
244. Buñag RD, Teräväinen TL, Eriksson L. Enhanced sympathetic mediation of chronotropic baroreflexes in old Sprague-Dawley rats. *Mech Ageing Dev*. 1990;53(2):195-208. doi:10.1016/0047-6374(90)90070-V
245. Dannenberg AL, Levy D, Garrison RJ. Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham study). *Am J Cardiol*. 1989;64(16):1066-1068. doi:10.1016/0002-9149(89)90816-3
246. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure-A review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(4):975-984. doi:10.1016/S0735-1097(01)01108-1
247. Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8(6):1441-1448. doi:10.1016/S0735-1097(86)80321-7
248. Grimes KM, Lindsey ML, Gelfond JA, Buffenstein R. Getting to the heart of the

- matter: age-related changes in diastolic heart function in the longest-lived rodent, the naked mole rat. *J Gerontol Biol Sci.* 2012;67A(4):384-394. doi:10.1093/gerona/glr222
249. Brouwers FP, Hillege HL, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ. Comparing new onset heart failure with reduced ejection fraction and new onset heart failure with preserved ejection fraction: An epidemiologic perspective. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9(4):363-368. doi:10.1007/s11897-012-0115-7
 250. Oktay AA, Rich JD, Shah SJ. The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Hear Fail Rep.* 2013;10(4):401-410. doi:10.1007/s11897-013-0155-7
 251. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A. Essential role for premature senescence of myofibroblasts in myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(17):2018-2028. doi:10.1016/j.jacc.2016.02.047
 252. Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell.* 2006;5(2):187-195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
 253. Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes. *Aging Cell.* 2005;4(1):21-30. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00137.x
 254. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal Effects of Aging on Serum Total and Free Testosterone Levels in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):724-731.
 255. Koenig H, Goldstone A, Lu CY. Testosterone-mediated sexual dimorphism of the rodent heart ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens. *Circ Res.* 1982;50(6):782-787. doi:10.1161/01.RES.50.6.782
 256. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858
 257. Eleftheriadou O, Boguslavskyi A, Longman MR, et al. Expression and regulation of type 2A protein phosphatases and alpha4 signalling in cardiac health and hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(4):37. doi:10.1007/s00395-017-0625-2
 258. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM.

- Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004;84(1):169-208. doi:10.1152/physrev.00017.2003
259. Leib DE, Zimmerman CA, Knight ZA. Thirst. *Curr Biol.* 2016;26(24):R1260-R1265. doi:10.1016/j.cub.2016.11.019
 260. Begg DP. Disturbances of thirst and fluid balance associated with aging. *Physiol Behav.* 2017;178:28-34. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.003
 261. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998;78(3):583-686. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.583
 262. Zhang D ming, Epstein AN, Schulkin J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Res.* 1993;600(1):20-26. doi:10.1016/0006-8993(93)90396-5
 263. Franci CR, Kozlowski GP, McCann SM. Water intake in rats subjected to hypothalamic immuno-neutralization of angiotensin II, atrial natriuretic peptide, vasopressin, or oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(8):2952-2956. doi:10.1073/pnas.86.8.2952
 264. de Arruda Camargo LA, Saad WA, de Luca LA, Renzi A, Silveira JN, Menani J. Synergist interaction between angiotensin II and DOCA on sodium and water balance in rats. *Physiol Behav.* 1994;55(3):423-427. doi:10.1016/0031-9384(94)90095-7
 265. Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1980;239(8):R382-R389. doi:10.1152/ajpregu.1980.239.5.R382
 266. Roy C, Barth T, Jard S. Vasopressin-sensitive kidney adenylate Cyclase. *J Biol Chem.* 1975;250(8):3149-3156.
 267. Blackburn RE, Demko AD, Hoffman GE, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1992;263(6 Pt 2):R1347-R1353. doi:10.1016/0195-6663(92)90037-7
 268. Soares TJ, Coimbra TM, Martins a R, et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(January):278-283. doi:10.1073/pnas.96.1.278
 269. Haanwinckel M a, Elias LK, Favaretto a L, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(August):7902-7906. doi:10.1073/pnas.92.17.7902

270. Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration-and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat (thirst/cardiac peptides). *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82(24):8720-8723. doi:10.1073/pnas.82.24.8720
271. Ehrlich KJ, Fitts DA. Atrial natriuretic peptide in the subfornical organ reduces drinking induced by angiotensin or in response to water deprivation. *Behav Neurosci.* 1990;104(2):365-372. doi:10.1037/0735-7044.104.2.365
272. Itoh H, Nakao K, Yamada T, et al. Antidipsogenic action of a novel peptide, "brain natriuretic peptide", in rats. *Eur J Pharmacol.* 1988;150(1-2):193-196. doi:10.1016/0014-2999(88)90769-8
273. Bastos R, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Brain Res.* 2001;895(1-2):80-88. doi:10.1016/S0006-8993(01)02033-9
274. Wotus C, Osborn JW, Nieto PA, Engeland WC. Regulation of corticosterone production by vasopressin during water restriction and after drinking in rats. *Neuroendocrinology.* 2003;78(6):301-311. doi:10.1159/000074883
275. Chatelain D, Montel V, Dickes-Coopman A, Chatelain A, Deloof S. Trophic and steroidogenic effects of water deprivation on the adrenal gland of the adult female rat. *Regul Pept.* 2003;110(3):249-255. doi:10.1016/S0167-0115(02)00217-3
276. Grinevich V, Ma XM, Verbalis J, Aguilera G. Hypothalamic pituitary adrenal axis and hypothalamic-neurohypophyseal responsiveness in water-deprived rats. *Exp Neurol.* 2001;171(2):329-341. doi:10.1006/exnr.2001.7784
277. Aguilera G, Lightman SL, Kiss A. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal during water deprivation. *Endocrinology.* 1993;132(1):241-248. doi:10.1210/endo.132.1.8380375
278. Papanek PE, Raff H. Chronic physiological increases in cortisol inhibit the vasopressin response to hypertonicity in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1994;267(5 Pt 2):R1342-9. doi:10.1109/JRPROC.1931.222258
279. Raff H, Skelton MM, Cowley AW. Feedback control of vasopressin and corticotrophin secretion in conscious dogs: Effect of hypertonic saline. *J Endocrinol.* 1989;122(1):41-48. doi:10.1677/joe.0.1220041
280. Li C, Wang W, Summer SN, Falk S, Schrier RW. Downregulation of UT-A1/UT-

- A3 is associated with urinary concentrating defect in glucocorticoid-excess state. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(10):1975-1981.
doi:10.1681/ASN.2008010051
281. Naruse M, Klein JD, Ashkar ZM, Jacobs JD, Sands JM. Glucocorticoids downregulate the vasopressin regulated urea transporter in rat terminal inner medullary collecting ducts. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:517-523.
 282. Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. Glucocorticoids inhibit transcription and expression of the UT-A urea transporter gene. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2002;282:F853-F858. doi:10.1152/ajprenal.00262.2001
 283. Phillips PA, Rolls BJ, Ledingham JG, et al. Reduced thirst after water deprivation in healthy elderly men. *N Engl J Med*. 1984;311(12):753-759.
doi:10.1056/NEJM199401273300403
 284. Tanabe S, Buñag RD. Age-related central and baroreceptor impairment in female Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*. 1989;256(5 Pt 2):H1399-406.
doi:10.1152/ajpheart.1989.256.5.H1399
 285. Gribbin B, Pickering TG, Sleight P, Peto R. Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. *Circ Res*. 1971;29(4):424-431.
<http://ahajournals.org>. Accessed November 16, 2018.
 286. Shimada K, Kitazumi T, Sadakane N, Ogura H, Ozawa T. Age-related changes of baroreflex function, plasma norepinephrine, and blood pressure. *Hypertension*. 1985;7(1):113-117. doi:10.1161/01.HYP.7.1.113
 287. Weidmann P, De Myttenaere-Bursztein S, Maxwell MH, et al. Effect on aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney Int*. 1975;8(5):325-333. doi:10.1038/ki.1975.120
 288. Tsunoda K, Abe K, Goto T, et al. Effect of age on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in normal subjects: simultaneous measurement of active and inactive renin, renin substrate, and aldosterone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;62(2):384-389.
 289. Farrell MJ, Zamarripa F, Shade R, et al. Effect of aging on regional cerebral blood flow responses associated with osmotic thirst and its satiation by water drinking: a PET study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(1):382-387.
doi:10.1073/pnas.0710572105
 290. Denton D, Shade R, Zamarripa F, et al. Neuroimaging of genesis and satiation of thirst and an interoceptor-driven theory of origins of primary consciousness.

- Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(9):5304-5309. www.pnas.org. Accessed January 24, 2019.
291. Egan G, Silk T, Zamarripa F, et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(25):15241-15246. doi:10.1073/pnas.2136650100
 292. Silverman WiF, Aravich PA, Sladek JR, Sladek CD. Physiological and biochemical indices of neurohypophyseal function in the aging Fischer rat. *Neuroendocrinology.* 1990;52(2):181-190. doi:10.1159/000125571
 293. Swenson KL, Sands JM, Jacobs JD, et al. Effect of aging on vasopressin and aquaporin responses to dehydration in Fischer 344 , Brown- Norway FI rats. *Am J Physiol.* 1997;273(42):R35-R40. doi:10.1152/ajpregu.1997.273.1.R35
 294. Fliers E, Swaab DF. Activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons during aging in the Wistar rat. *Peptides.* 1983;4(2):165-170. doi:10.1016/0196-9781(83)90108-0
 295. Curtis KS. Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiol Behav.* 2009;97(2):180-192. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.027
 296. Flack JD. The actions of ethinyloestradiol on the pituitary-adrenal system of the rat. *Br J Pharmacol.* 1970;38(2):321-331. doi:10.1111/j.1476-5381.1970.tb08520.x
 297. Barron WM, Schreiber J, Lindheimer MD. Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol.* 1986;250(4 Pt 1):E352-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3963178>.
 298. Santollo J. Sex differences in angiotensin II-stimulated fluid intake. *Exp Physiol.* 2017;102(11):1380-1384. doi:10.1113/EP086518
 299. Ferrini MG, Grillo CA, Piroli G, De Kloet ER, De Nicola AF. Sex difference in glucocorticoid regulation of vasopressin mRNA in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Cell Mol Neurobiol.* 1997;17(6):671-686. doi:10.1023/A:1022538120627
 300. Tarttelin MF, Gorski RA. Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. *Physiol Behav.* 1971;7(6):847-852. doi:10.1016/0031-9384(71)90050-3
 301. Forsling ML, Peysner K. Pituitary and plasma vasopressin concentrations and fluid balance throughout the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol.* 1988;117(3):397-402. doi:10.1677/joe.0.1170397

302. Ota M, Crofton JT, Liu H, Festavan G, Share L. Increased plasma osmolality stimulates peripheral and central vasopressin release in male and female rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1994;267(4 Pt 2):R923-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943433>.
303. Stachenfeld NS, Splenser AE, Calzone WL, Taylor MP, Keefe DL. Selected contribution: Sex differences in osmotic regulation of AVP and renal sodium handling. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1893-1901.
doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1893
304. Crofton JT, Share L. Osmotic control of vasopressin in male and female rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1989;257(4 Pt 2):R738-43.
doi:10.1152/ajpregu.1989.257.4.R738
305. Kaufman S. A comparison of the dipsogenic responses of male and female rats to a variety of stimuli. *Can J Physiol Pharmacol*. 1980;58(10):1180-1183.
306. Santollo J, Torregrossa A-M, Daniels D, Author HB. Sex differences in the drinking response to angiotensin II (AngII): effect of body weight. *Horm Behav*. 2017;93:128-136. doi:10.1016/j.yhbeh.2017.05.013
307. Rowland NE, Morien A, Garcea M, Fregly MJ. Aging and fluid homeostasis in rats. *Regul Integr Comp Physiol*. 1997;273(42):R1441-R1450.
doi:10.1152/ajpregu.1997.273.4.R1441
308. LeFevre J, McClintock K. Reproductive senescence in female rats: A longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38(4): 780-789. doi:10.1095/biolreprod38.4.780
309. Elias P, Elias L, Moreira A. Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico de Diabetes insípido com dosagem de vasopressina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1998;42(3):198-204.
310. Gutkowska J, Hork K, Thibault G, Januszewicz P, Cantin M, Genest J. Atrial Natriuretic Factor is a circulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;125(1):315-323.
311. Botelho L, Block C, Khosla M, Santos R. Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*. 1994;15(4):723-729.
312. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 1997.
313. McKinley MJ, Denton D a, Thomas CJ, Woods RL, Mathai ML. Differential

- effects of aging on fluid intake in response to hypovolemia, hypertonicity, and hormonal stimuli in Munich Wistar rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3450-3455. doi:10.1073/pnas.0511099103
314. Thunhorst RL, Johnson AK. Thirst and salt appetite responses in young and old Brown Norway rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R317-R327. doi:10.1152/ajpregu.00368.2002
 315. Begg DP, Sinclair AJ, Weisinger RS. Reductions in water and sodium intake by aged male and female rats. *Nutr Res*. 2012;32(11):865-872. doi:10.1016/j.nutres.2012.09.014
 316. Thunhorst RL, Beltz T, Johnson AK. Age-related declines in thirst and salt appetite responses in male Fischer 344 x Brown Norway rats. *Physiol Behav*. 2014;135:180-188. doi:10.1016/j.physbeh.2014.06.010.
 317. Edwards BR, LaRoche Jr. FT. Antidiuretic effect of endogenous oxytocin in dehydrated Brattleboro homozygous rats. *Am J Physiol*. 1984;247(16):F453-F465. doi:10.1152/ajprenal.1984.247.3.F453
 318. Barney C, Threatch RM, Fregly J. Water deprivation-induced drinking in rats : role of angiotensin II. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1983;244(13):1-5. doi:10.1152/ajpregu.1983.244.2.R244
 319. Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Fazâa S. Effets métaboliques et endocriniens de la privation hydrique et/ ou alimentaire chez le rat. *Comptes Rendus - Biol*. 2005;328(5):463-470. doi:10.1016/j.crv.2005.02.003
 320. Makino Y, Minamino N, Kakishita E, Kangawa K, Matsuo H. Natriuretic peptides in water-deprived and in salt-loaded rats. *Peptides*. 1996;17(6):1031-1039. doi:10.1016/0196-9781(96)00148-9
 321. Hohenegger M, Laminger U, Om P. Metabolic effects of water deprivation. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986;24(5):277-282.
 322. Shin S-J, Wen J-D, Chen ; I-Hsuan, et al. Increased renal ANP synthesis, but decreased or unchanged cardiac ANP synthesis in water-deprived and salt-restricted rats. *Kidney Int*. 1998;54(5):1617-1625. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00163.x
 323. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50:198-207. doi:10.1590/S0004-27302006000200006

324. Pawez J, Thibault G, Gutkowska J, et al. Atrial natriuretic factor and vasopressin during dehydration and rehydration in rats. *AJP Endocrinol Metab.* 1986;251(4Pt1):E497-E501. doi:10.1152/ajpendo.1986.251.4.E497
325. Bahner U, Lenkei Z, Palkovits M, Heidland A, Geiger H, Luft FC. Central atrial natriuretic peptide in dehydration. *Idégygy Sz.* 2007;60(3-4):130-135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451053>.
326. Noth RH, Lassman MN, Tan SY, Fernandez-Cruz A, Patrick J, Mulrow J. Age and the Renin-Aldosterone System. *Arch Intern Med.* 1977;137(1414-1417):28-31. doi:10.1001/archinte.1977.03630220056014
327. Jung FF, Kennefick TM, Ingelfinger JR, et al. Down-regulation of the intra renal renin-angiotensin system in the aging rat. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5(8):1573-1580. <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/5/8/1573.full.pdf>. Accessed November 13, 2018.
328. Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, et al. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci.* 2017;20(2). doi:10.1038/nn.4463
329. Barth SW, Gerstberger R. Differential regulation of angiotensinogen and AT(1A) receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. *Mol Brain Res.* 1999;64(2):151-164. doi:10.1016/S0169-328X(98)00308-8
330. Sanvitto GL, Jöhren O, Hauser W, Saavedra JM. Water deprivation upregulates ANG II AT1 binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *Am J Physiol Metab.* 1997;273(36):E156-E163. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.e156
331. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Drinking and arterial blood pressure responses to ANG II in young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:1135-1141. doi:10.1152/ajpregu.00360.2010.
332. Silver AJ, Morley JE, Ishimaru-Tseng TV, Morley PMK. Angiotensin II and fluid ingestion in old rats. *Neurobiol Aging.* 1993;14(6):519-522. doi:10.1016/0197-4580(93)90033-8
333. Resch JM, Fenselau H, Madara JC, et al. Aldosterone-sensing neurons in the NTS exhibit state-dependent pacemaker activity and drive sodium appetite via synergy with angiotensin II signaling. *Neuron.* 2017;96(1):190-206.e7. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.014
334. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Effects of aging on mineralocorticoid-

- induced salt appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(12):R1498-505. doi:10.1152/ajpregu.00349.2013
335. Thunhorst RL, Xue B, Beltz TG, Johnson AK. Age-related changes in thirst, salt appetite, and arterial blood pressure in response to aldosterone-dexamethasone combination in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308(10):R807-R815. doi:10.1152/ajpregu.00490.2014
 336. Keck ME, Hatzinger M, Wotjak CT, Landgraf R, Holsboer F, Neumann ID. Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats. *Eur J Neurosci*. 2000;12(4):1487-1494. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00030.x
 337. Terwel D, Markerink M, Jolles J. Age-related changes in concentrations of vasopressin in the central nervous system and plasma of the male wistar rat. *Mech Ageing Dev*. 1992;65(2-3):127-136. doi:10.1016/0047-6374(92)90029-D
 338. Sladek CD, Olschowka JA. Dehydration induces Fos, but not increased vasopressin in the supraoptic nucleus of aged rats. *Brain Res*. 1994;652:207-215. <https://eurekamag.com/pdf.php?pdf=008425731>. Accessed January 30, 2017.
 339. Sandgren JA, Linggongoro DW, Zhang SY, et al. Angiotensin AT 1A receptors expressed in vasopressin-producing cells of the supraoptic nucleus contribute to osmotic control of vasopressin. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2018;314(6):R770-R780. doi:10.1152/ajpregu.00435.2017
 340. Greenwood MP, Greenwood M, Romanova E V., et al. The effects of aging on biosynthetic processes in the rat hypothalamic osmoregulatory neuroendocrine system. *Neurobiol Aging*. 2018;65:178-191. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.008
 341. Ohno S, Hashimoto H, Fujihara H, et al. Increased oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fluorescent intensity with urocortin-like immunoreactivity in the hypothalamo-neurohypophysial system of aged transgenic rats. *Neurosci Res*. 2018;128:40-49. doi:10.1016/j.neures.2017.08.001
 342. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp*. 2007;293(3):R1444-R1451. doi:10.1152/ajpregu
 343. Bolignano D, Mattace-Raso F, Sijbrands EJG, Zoccali C. The aging kidney revisited: A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2014;14(1):65-80.

doi:10.1016/j.arr.2014.02.003

344. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, Mccann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11765-11770. doi:10.1073/pnas.201394198
345. Xu X, Xiao JC, Luo LF, et al. Effects of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol*. 2008;130(2):196-204.
doi:10.1016/j.ijcard.2007.08.041
346. Belo NO, Silva-Barra J, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, Gutkowska J, Dos Reis AM. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept*. 2004;117(1):53-60. doi:10.1016/j.regpep.2003.10.007
347. Parker SL, Armstrong WE, Sladek CD, Grosvenor CE, Crowley WR. Prolactin stimulates the release of oxytocin in lactating rats: for a physiological role via an action at the neural lobe. *Neuroendocrinology*. 1991;53(5):503-510.
doi:10.1159/000125764
348. Laczi F, Szasz A, Vecsernyes M, Julesz J. Neurohypophysial hormone secretion in hyperprolactinaemic women. *Neuropeptides*. 1998;32(5):435-437.
doi:10.1016/S0143-4179(98)90068-3
349. Kiss JZ, Van Eekelen JAM, Reul JMHM, Westphal HM, De Kloet ER. Glucocorticoid receptor in magnocellular neurosecretory cells. *Endocrinology*. 1988;122(2):444-449. doi:10.1210/endo-122-2-444
350. Nahar J, Rainville JR, Dohanich GP, Tasker JG, Tasker J. Further evidence for a membrane receptor that binds glucocorticoids in the rodent hypothalamus. *Steroids*. 2016;114:33-40. doi:10.1016/j.steroids.2016.05.013
351. Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HLP, et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*. 2007;147(1):247-257. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.021
352. Ni X, Nicholson RC. Steroid hormone mediated regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression. *Front Biosci*. 2006;11:2909-2917.
353. Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N. Age-related changes in growth hormone and prolactin messenger RNA levels in the rat. *Endocrinol Jpn*. 1990;37(6):827-840.

354. Vilhena-Franco T, Mecawi AS, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *J Endocrinol.* 2016;231(2):167-180. doi:10.1530/joe-16-0311
355. Flynn FW, Schulkint JAY, Havens M. Sex differences in salt preference and taste reactivity in rats. *Brain Res Bull.* 1993;32(8):91-95. doi:10.1016/0361-9230(93)90061-F
356. Curtis KS, Contreras RJ. Sex differences in electrophysiological and behavioral responses to NaCl taste. *Behav Neurosci.* 2006;120(4):917-924. doi:10.1037/0735-7044.120.4.917
357. Santollo J, Daniels D. Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. *Front Syst Neurosci.* 2015;9(March):1-11. doi:10.3389/fnsys.2015.00025
358. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(6):687-698. doi:10.1111/j.1472-8206.2010.00854.x
359. Pendergrass KD, Pirro NT, M.Westwood B, Ferrario C, Brosnihan KB, M.Chappell MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2008;295(1):H10-H20. doi:10.1152/ajpheart.01277.2007
360. Quiñones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JPH, Pfaff DW. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology.* 1997;65(1):9-17. doi:10.1159/000127160
361. Ebner NC, Lin T, Muradoglu M, et al. Associations between oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, plasma oxytocin, and attachment across adulthood. *Int J Psychophysiol.* 2019;136(2017):22-32. doi:10.1016/j.ijpsycho.2018.01.008

ANEXOS

ANEXO A- Sexual differences and aging in the drinking behavior and hormone release induced by water deprivation

Quirós Cognuck S, Reis WL, Silva MS, Almeida-Pereira G, de Barba LK, Zorro SV, Mecawi AS, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J

Abstract

Maintenance of volume and osmolality of body fluid are important and adaptive responses to protect from dehydration are crucial for survival. The objective of this work is to compare the hormonal and behavioral dipsogenic and natriorexigenic changes that occur in aging and to compare the male and female responses upon water deprivation challenge. For this purpose, a group of male and female Wistar rats with 3 and 18 months were submitted to water deprivation (WD) for 48 hours. Plasma concentration of oxytocin (OT), arginine vasopressin (AVP), corticosterone (CORT), atrial natriuretic peptide (ANP) and angiotensin II (ANGII), and water and sodium (0.15M NaCl) intake were determined. In response to WD, the old male and female rats drink less water and saline, have a lower ANGII plasma concentration and lost the CORT response, when compared to normohydrated rats. Relative expression of AT1 mRNA decreased in the subfornical organ (SFO) of adult and old male rats and adult female rats. Sexual differences were found in response to WD, where adult and old female rats showed higher water and saline intake than the respective males. Also, adult male rats showed higher plasma ANP and lower CORT concentration than adult females. Moreover, plasma OT and CORT levels of old female rats were higher than those in the old male rats in both WD and normohydration conditions. In conclusion, the drinking behavior and neuroendocrine response in the maintenance of the hydromineral homeostasis are influenced by aging, with sex being a preponderant factor in these responses.

Keyword: Thirst. Sodium Appetite. Neurohypophyseal hormones. Renin-Angiotensin System. Atrial Natriuretic Peptide.

Introduction

The physiological mechanisms that protect from dehydration are deficient in elderly. Hyperosmotic and hypovolemic thirst are reduced in aging, possibly due to decreased thirst perception, reduced baroreceptor sensitivity and increased satiety.^{242,260,284–286} In addition, renal capacity to concentrate urine is reduced, increasing the risk of dehydration in the elderly.²³

Studies in humans have shown that aging may cause a decrease in the activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS).^{287, 288}

Elderly subjects also show higher plasma osmolality, sodium, arginine vasopressin (AVP) levels, and reduced perception of thirst and water intake than younger people after 24h water deprivation (WD).²⁸³ However, old rats show different results. Old male Fisher 344 and Wistar Han rats and submitted to 72h WD did not show changes in plasma concentration of AVP or renin.^{30,340} Although, under the same

experimental conditions, other studies demonstrated that AVP and oxytocin (OT) levels were increased in old rats compared to young rats.^{292,293} On the other hand, it was observed that normohydrated old Wistar rats presented higher plasma concentration of AVP than the young rats, however the OT plasma concentration of old rats was not different from the young rats.²⁹⁴ It is evident that the age factor induces to a different set point in the regulation of hydromineral homeostasis, compared to adult population, mainly during osmotic challenges.

In addition to age, differences according to sex appear to affect hydromineral homeostasis. In this context, fluctuations in gonadal hormones, especially estrogens, changes hydromineral homeostasis at different stages of reproductive life, including reproductive senescence.²⁶¹ In this way, estradiol alters signals detection into the central nervous system, and at the same time, acts modulating several neurotransmitter systems that participate in the specific response to osmotic and volume changes.²⁹⁵ In response to WD it was shown that oestradiol acts mainly on the vasopressinergic system, increasing its neuronal activity and AVP secretion.³⁵⁴

In response to different osmotic and volume stimuli dipsogenic behavior is more evident in adult female than males rats.³⁰⁵ However, Santollo *et al*, demonstrated opposite gender differences, in which adult males ingest more water than females, but females have a higher preference for saline than males.³⁰⁶

Due to discrepancies in responses and absence of a single assessment experimental protocol to collect data from adult and elderly, female and male animals, the objective of this study was to compare the dipsogenic and natriorexigenic behavior and hormonal changes in young and aged rats.

Material and methods

Animals

Male and female Wistar rats obtained from the animal facility located at the Campus-USP of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. Rats were subjected to experiments with 3 and 18 months old. They were maintained under controlled temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and exposed to a 12/12 hours light-dark cycle (light period: 06 hours to 18 hours) and tap water and standard pelleted food *ad libitum* (QuimtiaNuvilab®). All experimental procedures were performed in the morning between 08:00 and 11:00 hours. This study was conducted according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH; Publication No. 85-23, revised 1996),

and the experimental protocols were approved by the Ethical Committee for Animal User of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocol # 014/2014-1).

Assessment of water intake and sodium appetite

One set of male and female rats with age of 3 (adults) and 18 months (old) were kept, or not, under WD for 48 hours with free food access. Animals were habituated for three days before the experiment.

Body weight was determined before and after experimental period, and the experimental procedures followed the protocol performed by Antunes-Rodrigues *et al*, 2005, in which, after the time of the WD, volumetric burettes with water were offered to evaluate the dipsogenic responses every 20 minutes for 60 minutes. After the rehydration period, another volumetric burette with isotonic saline (0.15M NaCl) was offered. Fluid intake was measured every 20 minutes for one hour.⁶⁵

Blood and brain collection

A second group of male and female rats of 3 and 18 months old were submitted, or not, to WD for 48 hours (with access of food) and the trunk blood and brain were collected. Blood was collected from trunk in chilled tubes containing heparin (10 µL/mL of blood) to measure plasma AVP, OT, and CORT, whereas to measure plasma ANGII and ANP the blood was placed in a chilled tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (2 mg/mL) and proteolytic enzyme inhibitors (10 µL of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µL of 500 mM pepstatin A and 20 µL of p-hydroxymercuribenzoate per mL of blood). Plasma was obtained after centrifugation for 20 min at 3000 rpm at 4°C and stored at -20 until specific extraction and immunoassay procedures.

Brains were removed *situ* and stored at -70°C until the day of the dissection of the subfornical organ.

Hormonal extractions and immunoassays

AVP and OT were extracted from 1 mL of plasma with acetone and petroleum ether, while CORT was extracted from 25 µL of plasma with 1 mL ethanol, and ANP and ANG II were extracted from 1 mL of plasma using Sep-Pak C-18 cartridges (Waters Corporation, Milford, MA, USA). All hormone measurements were performed

using specific radioimmunoassay techniques described in the literature.^{121,269,309–311} All measurements were performed in duplicate in the same assay. The sensitivity of the assay and the coefficient of variation intra-assay were respectively: 0.1 pg/mL and 15.2 % for AVP; 0.1 pg/mL and 6.3 % for OT; 0.8 pg/mL and 4.5 % for ANP; 0.4 pg/mL and 4.3 % for ANG II; 7.8 ug/dL and 4.6 % for CORT.

Microdissection, RNA isolation and semi-quantitative real-time PCR

Coronal sections containing the SFO with a 60 µm thickness were obtained in a cryostat (Micron HM 500 ON), according to the coordinates of the Paxinos and Watson atlas.³¹² With the aid of a sterile microdissection needle with 1.5 mm internal diameter, the SFO was punched and placed in sterile tubes and stored at -70°C.

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit-Qiagen®, according to manufacturer protocol and treated with DNase using the DNA-free TM kit (ambion® from life technologies). Quantitation and purity of the mRNA were verified in the spectrophotometer (SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader). Absorbance ratios of 260/280, 260/230 nm were used in determining the purity.

The complementary DNA synthesis (cDNA) was made from 250 ng of RNA by commercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems®). Reverse transcription was performed in a thermocycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) under the following conditions: 10 min at 25°C and 120 min at 37°C, then the samples were stored at -20°C.

The QT-PCR was run in triplicate, using Taqman®, assays (Applied Biosystems®): *Agtr1a* (Rn00578456_m1) and *Rat ACTB* (actin, beta; Rn00667869_m1) as endogenous control gene, in the 7500 QT-PCR System (Applied Biosystems®). The relative expression of the target gene was calculated based on the threshold cycle (Ct). The results were analyzed according to the $\Delta\Delta C_t$ method.

Statistical analysis

Results are presented as the means $\pm$ standard error (SEM). Data were analyzed using Statistica (StatSoft, USA) and SPSS Statist (IBM, USA) software. Drinking responses were analyzed by repeated measures ANOVA and two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test when variances were equal and Games-Howell when variances were different. Body weight and plasma concentration hormones were analyzed by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test

when variances were equal and Games-Howell when variances were different. Plasma ANGII values were transformed to Log. For analysis of the mRNA relative expression Student's unpaired t-test was performed. The significance level was set at $p < 0.05$ (two-tailed). The number of animals used is represented by "n". The normohydrated rats will be call control (Ctrl).

Results

Behavioral responses induced by 48 hours of WD

Table 1 shows the body weight of the animals according to sex, age and hydration condition. There were no differences in body weight according to sex, age and hydration condition interaction, neither by sex and age, sex and hydration condition, and age hydration condition interactions.

Table 1: Body weight of normohydrated and WD of 3- and 18-months male and female rats. N is showed in the last column.

Sex	Age (months)	Condition	Body Weight (g)	N
Male	3	Normohydrated	680.50 $\pm$ 27.52	8
		WD	651.50 $\pm$ 22.10	8
	18	Normohydrated	820.71 $\pm$ 41.13	7
		WD	815.86 $\pm$ 40.92	7
Female	3	Normohydrated	333.00 $\pm$ 6.00	8
		WD	325.62 $\pm$ 10.59	8
	18	Normohydrated	506.57 $\pm$ 30.24	7
		WD	482.00 $\pm$ 22.92	7

Values are expressed as means $\pm$ SEM.

Figure 1 shows water and saline intake of rats aged 3 months (adults) and 18 months (old), after 48 h WD. In all the evaluated times, the dehydrated rats, both the 3 and 18-month male rats drank more water than the respective controls (WD: $F_{1,26} = 261.20$, $p < 0.05$), and 18-month dehydrated males drank less water than dehydrated 3-month males (Age x WD interaction: $F_{1,26} = 14.18$, $p < 0.05$, Fig 1A). Regarding saline intake in males (Fig. 1B), 3-month rats submitted to dehydration showed higher sodium intake than 3-month hydrated rats at 80 min ($Z = -2.30$, $p < 0.05$); 100 min ($Z = -2.69$, $p < 0.05$) and 120 min ($Z = -3.45$, $p < 0.05$). Also, 3-month-old rats submitted to

WD drank more sodium than dehydrated 18-month rats at 120 minutes ($Z = 2.43$, $p < 0.05$).

Figure 1: Water (A) and isotonic saline solution (B) intake of control males (Ctrl) and males submitted to WD of 48h (WD) at ages of 3 and 18 months. Data are presented as means $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ vs respective normohydrated aged rats, Ψ $p < 0.05$ vs normohydrated adult rats, # $p < 0.05$ vs WD old rats. N indicates the number of animals.

Figure 2 shows the intake of water and saline of 3- and 18-months old females, submitted to WD. Females that submitted to WD at both 3 and 18 months drank more water than controls at 3 and 18 months (WD: $F_{1,25} = 591.76$, $p < 0.05$). At the end of the experiment females of 3 months under WD condition drank more water than dehydrated old females (Age x WD interaction: $F_{1,25} = 27.33$, $p < 0.05$, Fig 2A). Saline intake was higher in adult females submitted to WD than the adult controls (Time x WD interaction: $F_{2,50} = 15.33$, $p < 0.05$). Similarly, in dehydrated old females, sodium intake was higher than the respective controls at 100 and 120 minutes (Time x WD interaction: $F_{2,50} = 2.90$, $p < 0.05$). Water deprived adult females drank more saline than old females in the same water condition (Time x Age interaction: $F_{2,50} = 4.12$, $p < 0.05$, Fig 2B).

Figure 2: Water (A) and isotonic saline solution (B) intake after water deprivation of 48 h of females at ages of 3 and 18 months. Data are presented as means $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ vs respective normohydrated aged rats, Ψ $p < 0.05$ vs normohydrated adult rats, # $p < 0.05$ vs WD old rats. N indicates the number of animals.

Figure 3 shows the cumulative intake of water (A) and saline (B) of males and females of 3 and 18 months old, submitted to WD for 48 hours. Water intake was higher in females, both at 3 months and 18 months than in males at 3 and 18 months of age (Sex: $F_{1,25} = 13.36$, $p < 0.05$, Fig 3A). In addition, 3-month-old male and female animals drank more water than respective 18 months old counterpart (Age: $F_{1,25} = 59.78$, $p < 0.05$, Fig 3A).

Relative to sodium intake, females at 3 months old also drank more saline than males of the same age (Sex: $F_{1,24} = 26.66$, $p < 0.05$, Fig 3B). In this figure, we can also verify that dehydrated 18-month-old females drink less saline solution than 3-month-old females (Age: $F_{1,24} = 11.68$, $p < 0.05$, Fig 3B). In addition, 18 months old males drink less saline in response to water restriction than females of that age (Sex: $F_{1,24} = 26.66$, $p < 0.05$, Fig. 3B).

Figure 3: Water (A) and isotonic saline solution (B) ingestion after WD of 48 hours of 3 (adults) and 18 (elderly) months old males and female rats. Data are reported as means $\pm$ S.E.M., _____ $p < 0.05$ among the indicated groups. The n of the sample is indicated inside or above the column.

Hormones concentrations after 48h WD

Plasma AVP concentrations were higher in 3- and 18-months old males subjected to WD than in respective hydrated males (WD: $F_{1,43} = 77.08$, $p < 0.05$, Fig 4A). No difference in AVP levels by age was observed. In figure 4B can be seen that the plasma OT level of 3- and 18-months old animals submitted to WD was higher than the respective normohydrated animals (WD: $F_{1,46} = 62.80$, $p < 0.05$). No difference in OT levels by age was observed. Plasma ANGII concentration in 3-month old male rats submitted to WD was higher than the hydrated 3-month old male rats (WD: $F_{130} = 16.16$, $p < 0.05$) and the dehydrated 18-month old male rats (Age: $F_{1,30} = 6.47$, $p < 0.05$, Fig 4C). In contrast to 3 months old male rats, no difference in ANGII levels by WD condition was observed in old rats, compared to hydrated old group. Plasma ANP level of the 3- and 18-month-old animals submitted to WD was lower than normohydrated male rats at the same ages (WD: $F_{1,32} = 44.92$, $p < 0.05$, Fig 4D). Plasma CORT in dehydrated 3-month old male rats had a higher plasma level than the respective hydrated male rats (WD: $F_{1,49} = 6.09$, $p < 0.05$). No difference was observed in plasma CORT concentration according to the state of hydration among the old male rats (Fig 4E).

Figure 4: AVP (A), OT (B), ANGII (C), ANP (D) and CORT (E) plasma concentration in control and submitted to a 48 h WD condition at 3- and 18-months old males. Data are reported as means $\pm$ S.E.M., _____ $p < 0.05$ among the indicated groups. The “n” of the sample is indicated inside the column.

Plasma AVP concentration in adult females are shown in Figure 5A. It can be observed that WD females, both 3- and 18-months old showed an increase in the plasma AVP concentration compared with 3 and 18 months normohydrated females, respectively (WD: $F_{1,55} = 91.02$, $p < 0.05$). No difference in AVP levels by age was observed. Also, OT plasma concentration was higher in 3- and 18-month old females subjected to WD than euhydrated female rats at same age (WD: $F_{1,49} = 74.99$, $p < 0.05$ Fig 5B), without differences in OT levels by age.

Dehydrated 3- and 18-months old female rats showed higher ANGII plasma concentration than normohydrated 3- and 18-months old female rats (WD: $F_{1,29} = 38.49$, $p < 0.05$). Also, ANGII response to WD was lower in 18-months old female than 3-months old female (Age: $F_{1,29} = 7.01$, $p < 0.05$, Fig 5C). Figure 5D shows plasma ANP concentration of control and WD female. 3- and 18-month-old females submitted to dehydration showed lower ANP levels than the respective hydrated females (WD: $F_{1,32} = 48.51$, $p < 0.05$).

Plasma CORT level in 3-months-old females submitted to WD was higher than normohydrated 3-months-old females (WD: $F_{1,55} = 10.59$, $p < 0.05$). However, hydrated 18-month-old females showed higher plasma CORT concentrations than

normohydrated 3-months-old females (Age: $F_{1.55} = 24.67$, $p < 0.05$). However, in old females, there was no significant difference between hydrated and WD group (Fig 5E).

Figure 5: AVP (A), OT (B), ANGII (C), ANP (D) and CORT (E) plasma concentrations in hydrated and submitted 48 h to WD condition at 3- and 18-month-old female. Data are reported as means $\pm$ S.E.M., _____ $p < 0.05$ between indicated groups. The “n” of the sample is indicated inside the column.

Comparing of AVP concentration by sex, no differences were observed between males and females at ages of 3 and 18 months (Fig. 6A and B), both at hydrated and dehydrated conditions. Regarding OT levels, in 3-month-old animals, there was no differences between male and female groups (Fig. 6C), however, in 18-month-old, both hydrated and dehydrated females, had higher OT plasma concentration than respective male groups (Sex: $F_{1.43} = 18.28$, $p < 0.05$, Fig 6D).

No differences were found by sex in the plasma ANGII concentration after WD in 3- and 18-month-old animals (Fig 6E and F). On the other hand, 3-months-old

dehydrated males showed higher ANP plasma concentration than females with the same age and experimental condition (Sex: $F_{1.38} = 7.54$, $p < 0.05$, Fig 6G). No differences according to sex in plasma ANP concentration were observed in the 18-month-old animals (Fig 6H).

CORT concentration in 3-months-old females subjected to WD was higher than in 3-month-old dehydrated males (Sex: $F_{1.56} = 18.26$, $p < 0.05$, Fig 6I). However, hydrated and dehydrated 18-month-old females showed higher CORT plasma levels than hydrated and dehydrated 18-month-old males respectively (Sex: $F_{1.48} = 68.01$, $p < 0.05$, Fig 6J).

Figure 6: AVP (A and B), OT (C and D), ANGII (E and F), ANP (G and H), CORT (I and J) plasma concentration of hydrated and submitted 48h to WD 3- and 18-month-old males and females. Data are showed as means $\pm$ S.E.M., _____ $p < 0.05$ among the indicated groups. The “n” of the sample is indicated inside or above the column.

***Agtr1a* mRNA expression in the SFO induced by WD of 48-hours**

Figure 7 shows the ANGII receptor (*Agtr1a*) mRNA expression in the SFO of male rats. Dehydration condition decreased *Agtr1a* mRNA expression in the SFO of 3-months-old rats (WD: $t_7 = 3.41$, $p < 0.05$, Fig 7A) and 18-month-old rats (WD: $t_{11} = 3.64$, $p < 0.05$, Fig 7B). No differences were observed in the relative expression of the gene according to the age of the animals (Fig 7C and D).

Figure 7: Relative *Agtr1a* mRNA expression in the SFO of control and submitted 48 hours to WD 3-months-old (A) and 18-month-old males (B). 3- and 18-month-old control (C) and submitted to dehydration for 48 hours males (D). Data are presented as means $\pm$ S.E.M, * $p < 0.05$ relative to the reference group. The “n” of the sample is indicated inside the column.

Dehydration induced a decrease in the relative expression of *Agtr1a* mRNA in the SFO of 3-months-old female rats (WD: $t_{11} = 2.57$, $p < 0.05$, Fig. 8A), but no differences in the relative expression of *Agtr1a* mRNA was observed between normohydrated and dehydrated 18-month-old females (Fig. 8B). No differences were observed between hydrated and dehydrated females according to age (Fig 8 C and D).

Figure 8: Relative Agtr1a mRNA expression in the SFO of control and submitted 48 hours to WD 3-months-old (A) and 18-month-old females (B). 3- and 18-month-old control (C) and submitted to dehydration for 48 hours females (D). Data are presented as means $\pm$ S.E.M, * $p < 0.05$ relative to the reference group. The “n” of the sample is indicated inside the column.

Discussion

It has been well described in the literature that elderly people show an imbalance in the hydromineral homeostasis. The data of this work indicates that in response to WD for 48 hours, as the animals getting older, they drink less water and isotonic saline than when they were younger. This is in accordance with previous reports, showing the response of decreased fluid intake after dehydration to aging.^{313–}

316

ANGII regulates thirst and appetite for sodium by different neuronal pathways. SFO has two different groups of excitatory neurons expressing after type 1 (AT1) ANGII receptor, neurons projecting to the organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) control water intake, whereas neurons that project to the ventral part of the bed of the terminal stria control the salt intake. Thirst control neurons are suppressed under the condition of sodium depletion through the activation of GABAergic neurons mediated by cholecystinin. On the other hand, neurons that control sodium appetite are suppressed in the dehydration condition by activating a population of GABAergic neurons via signals from the Nax sodium channel.³²⁸

However, as it has been shown that the brain of elderly rats shows a decrease in AT-1 receptor density in PVN and in OVLT, but not in SFO and SON, as observed in our results.^{307,315} In addition, our results were demonstrated that the expression of the Agtr1a gene in animals undergoing dehydration was lower than the hydrated rats.

Contrary, it was described that the 48-hour water restriction increases or does not change AT1 expression in the SFO of young male rats.^{329,330}

When comparing the hormonal variations after WD, plasma ANGII concentrations were markedly in the old animals, compared with 3 months old rats, both in male and female groups. This reduction could be caused by a decrease in renal renin production as a consequence of renal aging.^{326,327} On the other hand, there is no evidence that ANGII replacement reverses the lower intake in elderly animals, possibly due to the desensitization or loss of function of ANGII receptors in the SON and SFO along the aging or as we found in our rats, by a decrease of the AT-1 receptors in the SFO of dehydrated animals.^{30,260,313,331,332} Thus, we can consider that the reduction of the dipsogenic and natriorexigenic behavior in the elderly animals in response to dehydration may be ascribed to the decrease of plasma ANGII and decrease of AT-1 receptors in the SFO.

In addition to ANGII action, sodium appetite is also synergistically controlled by aldosterone, which acts via neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS^{HSD2} neurons), which protrude into the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis (vBNST), and acts as the effector of aldosterone-induced sodium consumption response.³³³ Because dehydrated old female and male rats had lower ANGII plasma concentrations, the aldosterone plasma concentration is expected to be decreased. In addition, evidence shows that the aldosterone-induced sodium appetite is decreased in the old animal, which also corroborates our results, showing lower sodium intake after water deprivation in 18-month old animals.^{260,334,335}

We observed sexual differences in the ingestion behavior in response to WD for 48 hours, where 3 and 18-month-old female rats drank more fluids than male rats in similar age. Similar results were described by Kaufman only in adult animals, where dehydrated females drank more water than males.³⁰⁵ Regarding adult males, it was observed, in response to dehydration, higher ANP plasma levels than in females. Thus, it may contribute to lower fluid intake of these animals, since inhibitory role of ANP on water and sodium intake has been reported.^{270–272}

The higher saline intake observed in adult females in relation to adult males may be due to different mechanism involved in the modulation of salt intake. In this sense, CORT plasma increase, which is higher in females, and aldosterone, as part of the activation of RAAS by dehydration, which together strongly stimulate saline intake.³⁴² In the other hand, differences in taste sensitivity between males and females

may be contributing to the differential salt intake, in which concentrations of estrogens decrease gustatory sensitivity by sodium.^{355–357}

In the case of older animals, greater fluid intake in females in response to water restriction may be related to the permanent reduction of gonadal hormones, favoring the activation of RAAS and AT-1 receptors.³⁵⁸ In addition, dehydrated elderly males could have decreased RAAS by decreasing testosterone, which increases plasma renin levels and ACE activity.³⁵⁹

CORT was found to be elevated in 18-month-old animals. The increase in the plasma concentration of CORT in elderly animals has been widely described in the literature and is a consequence of a decrease of negative feedback exerted by the glucocorticoid, due to the decrease in the expression of glucocorticoid receptors in the PVN.^{186,336} Thus, our results confirm that normohydrated old animals showed slightly higher CORT plasma concentration, compared with younger counterpart. On the other hand, water deprivation did not promote an additional increase in the CORT plasma levels.

Regarding plasma AVP values in old animals, the reports in the literature are not concordant. As an example, under normohydration conditions, elderly rats were shown to have higher or similar plasma AVP concentrations compared with younger animals.^{30,337} Here we show that 18-month-old male rats presented similar plasma concentrations of AVP compared with 3-month-old rats. On the other hand, plasma AVP levels in the dehydration condition was described to be unchanged in old animals or lower, compared with the younger rats.^{30,338} However, our data indicate that older animals maintain the ability to respond to osmotic stimulation, increasing plasma concentration of AVP after WD.

Results shown here revealed that the plasma OT concentration did not vary according to age in rats either in normohydration or dehydration condition. Keck *et al.*, demonstrated that basal secretion of OT from neurohypophysis was increased in old male Wistar rats.³³⁶ However, Silverman *et al.*, observed that 25-month-old male 344 Fisher rats showed a higher OT plasma concentration than 4-month-old rats, after 72 hours of WD.²⁹² These results are different from those obtained by our group, in which age is not a factor that changes the plasma OT concentration.

Plasma OT concentration of hydrated and dehydrated 18-month-old females was higher than respective males. These results are presented for the first time in the literature. So, it is possible to suggest that elevated OT plasma levels in females may

be due to the stimulatory action of prolactin on OT secretion, since it has been shown that prolactin stimulates the release of OT.^{347,348} It is important to highlight that although the OT plasma concentration was higher in old female rats than in old male rats, old female rats tended to drink more saline than male rats. It suggests that old female rats may present fewer OT receptors in the areas related to the control of sodium appetite, since it has been shown that estrogen increases the expression of OT receptor mRNA in some areas of the hypothalamic limbic system and that in aging the OT receptor gene has epigenetic changes.^{360,361}

Our results demonstrate that dehydrated adult female and dehydrated and hydrated old females show higher levels of plasma CORT than their respective males. Different studies have shown that estrogen stimulates the production of CORT through the stimulation of PVN that increases the expression of CRH/ACTH that acting on the adrenal gland increases plasma CORT.^{78,185,187,352} Also, prolactin, which is elevated in elderly animals, has been shown to stimulate CORT secretion.^{187,353} In contrast to OT, which has been shown to be inhibited by CORT, although CORT is elevated in elderly animals, as it has decreased the receptors in PVN, so the inhibitory effect in OT is not observed.³⁵¹

Finally, as it was described in the literature and in our results, adult animals submitted to dehydration increased AVP, OT, ANGII and CORT plasma concentration, while decreasing ANP plasma level.^{270,317–325}

In summary, age rats submitted to 48-hour dehydration, drink less water and isotonic saline than younger counterpart. This change in dipsogenic and natriorexigenic behavior is associated with a decrease in the plasma concentration of ANGII in older animals. On the other hand, adult and old animals showed gender difference on fluid intake, possibly by changes in ANGII, OT, ANP and CORT plasma concentrations, extinguishing the sexual differences found in adulthood and generating new hydromineral homeostasis in aging. This study contributes for the further understanding of sex-specificity and the effect of aging on the adaptative response to dehydration.

Acknowledgments

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

Brazil (FAPESP # 2013/09799-1). We thank Maria Valci dos Santos and Milene Mantovani for their excellent technical assistance.

References

1. Hale WA, Joubert JD, Kalula S. Aging Populations and Chronic Illness. In: Markle WH, Ficher MA, Smego RA, eds. *Understanding Global Health*. 2nd ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2014.
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs PD. World population prospects: the 2017 revision. *Vol II Demogr profiles*. 2017;2:1-883. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasil. Projeção da população por sexo e idades simples, em 1º de julho - 2010/2060. ftp://ftp.ibge.gov.br/Projecao_da_Populacao/Projecao_da_Populacao_2018/projecoes_2018_populacao_2010_2060.xls. Published 2018. Accessed January 19, 2019.
4. Martin GM. The Biology of Aging: Introduction. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jamenson L, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.
5. Ferrucci L, Studenski S. Clinical Problems of Aging: Introduction. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson L, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.
6. Zamboni M, Zoico E, Scartezzini T, et al. Body composition changes in stable-weight elderly subjects: the effect of sex. *Aging Clin Exp Res*. 2003;15(4):321-327. doi:10.1007%2FBF03324517
7. JafariNasabian P, Inglis JE, Reilly W, Kelly OJ, Ilich JZ. Aging human body: Changes in bone, muscle and body fat with consequent changes in nutrient intake. *J Endocrinol*. 2017;234(1):R37-R51. doi:10.1530/JOE-16-0603
8. Cowen LE, Hodak SP, Verbalis JG. Age-associated abnormalities of water homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(2):349-370. doi:10.1016/j.ecl.2013.02.005
9. He X, Li Z, Tang X, et al. Age- and sex-related differences in body composition in healthy subjects aged 18 to 82 years. *Med (United States)*. 2018;97(25):12-

17. doi:10.1097/MD.00000000000011152
10. Gheller BJF, Riddle ES, Lem MR, Thalacker-Mercer AE. Understanding age-related changes in skeletal muscle metabolism: Differences between females and males. *Annu Rev Nutr.* 2016;36(1):129-156. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050901
11. Horn M a. Cardiac physiology of aging: Extracellular considerations. *Compr Physiol.* 2015;5(July):1069-1121. doi:10.1002/cphy.c140063
12. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. *Circulation.* 2003;107(1):139-146. doi:10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58
13. Nakou ES, Parthenakis FI, Kallergis EM, Marketou ME, Nakos KS, Vardas PE. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int J Cardiol.* 2016;209:167-175. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.039
14. Lakatta EG, Gerstenblith G, Angell CS, Shock NW, Weisfeldt ML. Prolonged contraction duration in aged myocardium. *J Clin Invest.* 1975;55(1):61-68. doi:10.1172/JCI107918
15. Rodeheffer RJ, Gerstenblith G, Becker LC, Fleg JL, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation.* 1984;69(2):203-213. doi:10.1161/01.CIR.69.2.203
16. Wessells RJ, Bodmer R. Cardiac Aging. *Handb Biol Aging Eighth Ed.* 2007;18(1):111-116. doi:10.1016/B978-0-12-411596-5.00017-4
17. Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart.* 2016;102(11):825-831. doi:10.1136/heartjnl-2015-308769
18. Davy KP, Seals DR. Total blood volume in healthy young and older men. *J Appl Physiol.* 1994;76(5):2059-2062. doi:10.1152/jappl.1994.76.5.2059
19. Schlanger LE. Electrolytes in the aging. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(4):308-319. doi:10.1053/j.ackd.2010.03.008
20. Fortes MB, Owen JA, Raymond-Barker P, et al. Is this elderly patient dehydrated? Diagnostic accuracy of hydration assessment using physical signs, Urine, and saliva markers. *J Am Med Dir Assoc.* 2015;16(3):221-228.

- doi:10.1016/j.jamda.2014.09.012
21. Warren JL, Bacon WE, Haris T, Mcbean AM, Foley DJ, Phillips C. The burden and outcomes associated with dehydration among US elderly, 1991. *Am J Public Health*. 1994;84(8):1265-1269. doi:10.2105/AJPH.84.8.1265
 22. O'Neill PA, Faragher EB, Davies I, Wears R, Mclean KA, Fairweather DS. Reduced survival with increasing plasma osmolality in elderly continuing-care patients. *Age Ageing*. 1990;19(1):68-71. doi:10.1093/ageing/19.1.68
 23. Hooper L. Why, oh why, are so many older adults not drinking enough fluid? *J Acad Nutr Diet*. 2016;116(5):774-778. doi:10.1016/j.jand.2016.01.006
 24. Luckey AE, Parsa CJ. Fluid and electrolytes in the aged. *Arch Surg*. 2003;138:1055-1060. doi:10.1001/archsurg.138.10.1055
 25. Hawkins RC. Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia. *Clin Chim Acta*. 2003;337:169-172. doi:10.1016/j.cccn.2003.08.001
 26. Miller M. Disorders of fluid balance. In: Halter JB, Ouslander JG, Tinetti ME, Studenski S, High KP, Asthana S, eds. *Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology*. 6th ed. The United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2009:1048-1058.
 27. Rodríguez-Puyol D. The aging kidney. *Kidney Int*. 1998;54(6):2247-2265. doi:10.1038/4499994
 28. Gekle M. Kidney and aging — A narrative review. *Exp Gerontol*. 2017;87:153-155. doi:10.1016/j.exger.2016.03.013
 29. Weinstein JR, Anderson S. The aging Kidney-Physiological changes. *Nac Institutes Heal*. 2010;17(4):302-307. doi:10.1053/j.ackd.2010.05.002.
 30. Sladek CD, McNeill TH, Gregg CM, Blair ML, Baggs RB. Vasopressin and renin response to dehydration in aged rats. *Neurobiol Aging*. 1981;2(4):293-302. doi:10.1016/0197-4580(81)90038-5
 31. Ferrucci L, Maggio M, Bandinelli S, et al. Low testosterone levels and the risk of anemia in older men and women. *Arch Intern Med*. 2006;166(13):1380-1388. doi:10.1001/archinte.166.13.1380
 32. Shin YS, You JH, Cha JS, Park JK. The relationship between serum total testosterone and free testosterone levels with serum hemoglobin and hematocrit levels: a study in 1221 men. *Aging Male*. 2016;19(4):209-214. doi:10.1080/13685538.2016.1229764

33. Roy CN, Snyder PJ, Stephens-Shields AJ, et al. Association of testosterone levels with anemia in older men: A controlled clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2017;177(4):480-490. doi:10.1001/jamainternmed.2016.9540
34. Price EA. Aging and erythropoiesis: Current state of knowledge. *Blood Cells, Mol Dis.* 2008;41(2):158-165. doi:10.1016/j.bcmed.2008.04.005
35. Rishpon-Meyerstein N, Kilbridge T, Simone J, Fried W. The effect of testosterone on erythropoietin levels in anemic patients. *Blood.* 1968;31(4):453-460. doi:10.1182/blood-2014-12-567834
36. Ahern T, Wu FCW. New horizons in testosterone and the ageing male. *Age Ageing.* 2015;44(2):188-195. doi:10.1093/ageing/afv007
37. Hong M, Yan O, Tao B, et al. Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1992;373(1):213-218. doi:10.1515/bchm3.1992.373.1.213
38. Nakada D, Oguro H, Levi BP, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature.* 2014;505(7484):555-558. doi:10.1038/nature12932
39. Lovejoy JC, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis: Etiology and pathophysiology. *Obes Rev.* 2009;10(2):154-167. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00529.x
40. Ethun K. *Sex and Gender Differences in Body Composition, Lipid Metabolism, and Glucose Regulation.* 1st ed. (Neigh GN, Mitzelfelt MM, eds.). Boston: Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802388-4.00009-4
41. Link JC, Chen X, Arnold AP, Reue K. Metabolic impact of sex chromosomes. *Adipocyte.* 2013;2(2):74-79. doi:10.4161/adip.23320
42. Wells JCK. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(3):415-430. doi:10.1016/j.beem.2007.04.007
43. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev.* 1994;74(4):761-811. doi:10.1152/physrev.1994.74.4.761
44. Bredella MA. Sex differences in body composition. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1043:9-27. doi:10.1007/978-3-319-70178-3_2
45. White UA, Tchoukalova YD. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):377-392. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.006

46. Hazzard WR, Applebaum-Bowden D. Why women live longer than men: the biologic mechanism of the sex differential in longevity. *Trans Am Clin Clim Assoc.* 1990;101:168-189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2486441>.
47. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: The Framingham study. *Clin Chem.* 2004;50(7):1189-1200. doi:10.1373/clinchem.2004.032763
48. Soeters MR, Sauerwein HP, Groener JE, et al. Gender-related differences in the metabolic response to fasting. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3646-3652. doi:10.1210/jc.2007-0552
49. Sadaf Farooqi I, O'Rahilly S. Leptin: A pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):980-984. doi:10.3945/ajcn.2008.26788C
50. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Jr SC. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron.* 2012;71(1):142-154. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.028.Leptin
51. Ollmann MM, Wilson BD, Yang Y, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science (80-).* 1997;278(5335):135-138. doi:10.1126/science.278.5335.135
52. Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, et al. Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature.* 1997;390(6658):349. doi:10.1038/37016
53. Havel PJ, Kasim-Karakas, Sidika, Dubuc GR, Mueller W, Phinney S. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med.* 1996;2(9):949-950. doi:10.1038/nm0996-949b
54. Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, et al. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3243-3246. doi:10.1210/jc.83.9.3243
55. Lin K-C, Sagawa N, Yura S, Itoh H, Fujii S. Simultaneous increases of leptin and gonadotropin-releasing hormone following exogenous estrogen administration in women with normally menstrual cycle. *Endocr J.* 2005;52(4):449-454. doi:10.1507/endocrj.52.449
56. Rocha M, Bing C, Williams G, Puerta M. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem.* 2004;15(6):328-334. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.01.003

57. Vallejo G, Dieguez C, Casanueva FF. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):2149-2155.
doi:10.1210/jcem.83.6.4849
58. Sirbu A, Buburuzan L, Kevirkian S, et al. Adiponectin expression in visceral adiposity is an important determinant of insulin resistance in morbid obesity. *Endokrynol Pol*. 2018;69(3):252-258. doi:10.5603/EP.a2018.0026
59. Lee B, Shao J. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(2):149-156. doi:10.1007/s11154-013-9283-3
60. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005;6(1):13-21.
doi:10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x
61. Christen T, Trompet S, Noordam R, et al. Sex differences in body fat distribution are related to sex differences in serum leptin and adiponectin. *Peptides*. 2018;107:25-31. doi:10.1016/j.peptides.2018.07.008
62. Nishizawa H, Shimomura L, Kishida K, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002;51(September):2734-2741. doi:10.2337/diabetes.51.9.2734
63. Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol*. 2006;190(85):425-432.
doi:10.1677/joe.1.06596
64. Blaak E. Sex differences in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(1363-1950 (Print)):500-504.
65. Antunes-Rodrigues J, Moreira A, Elias LLK, de Castro M. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. 1st ed. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN S.A; 2005.
66. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011;60(11):1500-1510.
doi:10.1016/j.metabol.2011.06.012
67. Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 1998;47(1):3-6. doi:10.1016/S0026-0495(98)90184-6
68. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Cortisol-induced insulin resistance in man:

- impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54(1):131-138. doi:10.1210/jcem-54-1-131
69. Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia.* 2005;48(10):2119-2130. doi:10.1007/s00125-005-1886-0
 70. Fichna M, Fichna P. Glucocorticoids and beta-cell function. *Endokrynol Pol.* 2017;68(5):568-573. doi:10.5603/EP.2017.0060
 71. Billaudel B, Mathias PCF, Sutter BCJ, Malaisse WJ. Inhibition by corticosterone of calcium inflow and insulin release in rat pancreatic islets. *J Endocrinol.* 1984;100(2):227-233. doi:10.1677/joe.0.1000227
 72. Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S. Glucocorticoid increases glucose cycling and inhibits insulin release in pancreatic islets of ob/ob mice. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 1):E663-E666. doi:10.1152/ajpendo.1992.263.4.E663
 73. Gremlich S, Roduit RL, Thorens B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic cells. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3216-3222. doi:10.1016/j.metabol.2005.06.023
 74. Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology.* 1992;131(3):1261-1269. doi:10.1210/endo.131.3.1324155
 75. Isgor C, Cecchi M, Kabbaj M, Akil H. Estrogen receptor B in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience.* 2003;121(4):837-845. doi:10.1016/S0306-4522(03)00561-X
 76. Lunga P, Herbert J. 17 β -Oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(9):776-785. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01234.x
 77. Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(3):272-278. doi:10.1111/j.0953-8194.2004.01167.x

78. Bohler HCL, Thomas Zoeller R, King JC, Rubin BS, Weber R, Merriam GR. Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Mol Brain Res*. 1990;8(3):259-262. doi:10.1016/0169-328X(90)90025-9
79. Freeman ME, Kanyicska L, Lerant A, et al. Prolactin: structure , function , and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1523-1631. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1523
80. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(3):110-116. doi:10.1016/j.tem.2006.02.005
81. Sauve D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res*. 2000;868(2):306-314. doi:10.1016/S0006-8993(00)02344-1
82. Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull*. 1986;17(4):563-569. doi:10.1016/0361-9230(86)90226-1
83. Fleenor D, Arumugam R, Freemark M, Arumugam F/, Freemark /. Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of Insulin-Like Growth Factor I. *Horm Res*. 2006;66:101-110. doi:10.1159/000093667
84. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1120-1126. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.026
85. Nilsson LA, Roepstorff C, Kiens B, Ling C. Prolactin suppresses Malonyl-CoA concentration in human adipose tissue. *Horm Metab Res*. 2009;41(10):747-751. doi:10.1055/s-0029-1224181
86. Gualillo O, Lago F, García M, et al. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1999;140:5149-5153. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.023
87. Brandebourg TD, Bown JL, Ben-Jonathan N. Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(2):408-413. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.168

88. Ruiz-Herrera X, De Los Ríos EA, Díaz JM, et al. Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males. *Endocrinology*. 2017;158(1):56-68. doi:10.1210/en.2016-1444
89. White UA, Coulter AA, Miles TK, Stephens JM. The STAT5A-mediated induction of pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression by prolactin or growth hormone in adipocytes. *Diabetes*. 2007;56(June):1623-1629. doi:10.2337/db06-1286.AOX
90. Viengchareun S, Bouzinba-Segard H, Laigneau JP, et al. Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2004;33(3):679-691. doi:10.1677/jme.1.01563
91. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: The roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol*. 2000;164(3):277-286. doi:10.1677/joe.0.1640277
92. Arumugam R, Horowitz E, Noland RC, Lu D, Fleenor D, Freemark M. Regulation of islet B-Cell pyruvate metabolism: interactions of prolactin, glucose, and dexamethasone. *Endocrinology*. 2010;151(7):3074-3083. doi:10.1210/en.2010-0049
93. Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13337-13345. <http://www.jbc.org/content/269/18/13337.full.pdf>. Accessed April 19, 2018.
94. Yasui T, Murakami T, Maeda T, Oka T. Involvement of gonadal steroid hormone disturbance in altered prolactin receptor gene expression in the liver of diabetic mice. *J Endocrinol*. 1999;161(1):33-40. <http://www.endocrinology.org>. Accessed February 1, 2019.
95. Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H. Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. *J Endocrinol*. 1994;143(2):383-392. doi:10.1677/joe.0.1430383
96. Lyons DJ, Broberger C. TIDAL WAVES: Network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(4):420-438. doi:10.1016/j.yfrne.2014.02.001
97. Ortega-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Compr Physiol*. 2016;6(3):1387-1428.

- doi:10.1002/cphy.c150027
98. Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev.* 2014;94(2):355-382. doi:10.1152/physrev.00030.2013
 99. Zamboni M, Zoico E, Scartezzini T, Mazzali G, Tosoni P, Zivelonghi A. Body composition changes in stable-weight elderly subjects: the effect of sex. *Aging Clin Exp Res.* 2003;15(4):321-327.
 100. Wolden-Hanson T. Changes in body composition in response to challenges during aging in rats. *Interdiscip Top Gerontol.* 2010;37:64-83. doi:10.1159/000319995
 101. Kirchengast S. Gender differences in body composition from childhood to old age: An evolutionary point of view. *J Life Sci.* 2010;2(1):1-10. doi:10.1080/09751270.2010.11885146
 102. Morita Y, Iwamoto I, Mizuma N, et al. Precedence of the shift of body-fat distribution over the change in body composition after menopause. *J Obstet Gynaecol Res.* 2006;32(5):513-516. doi:10.1111/j.1447-0756.2006.00437.x
 103. Douchi T, Kosha S, Uto H, et al. Precedence of bone loss over changes in body composition and body fat distribution within a few years after menopause. *Maturitas.* 2003;46(2):133-138. doi:10.1016/S0378-5122(03)00162-2
 104. Wu CH, Yao WJ, Lu FH, Yang YC, Wu JS, Chang CJ. Sex differences of body fat distribution and cardiovascular dysmetabolic factors in old age. *Age Ageing.* 2001;30(4):331-336. doi:10.1093/ageing/30.4.331
 105. Basu R, Man CD, Campioni M, et al. Effects of age and sex on postprandial glucose metabolism differences in glucose turnover, insulin secretion, insulin action, and hepatic insulin extraction. *Diabetes.* 2006;55(7):2001-2014. doi:10.2337/db05-1692
 106. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed Res Int.* 2014;2014(757461). doi:10.1155/2014/757461
 107. Bowman RE, Maclusky NJ, Diaz SE, Zrull MC, Luine VN. Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. *Brain Res.* 2006;1126(1):156-166. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.047
 108. Deuschle M, Gotthard U, Schweiger U, et al. With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sci.* 1997;61(22):2239-2246.
 109. Born J, Ditschuneit I, Schreiber M, Dodt C, Fehm HL. Effects of age and

- gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *Eur J Endocrinol*. 1995;132(6):705-711. doi:10.1530/EJE.0.1320705
110. Roelfsema F, Pijl H, Keenan DM, Veldhuis JD. Prolactin secretion in healthy adults is determined by gender, age and body mass index. *PLoS One*. 2012;7(2):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0031305
 111. Wang T, Lu J, Xu YU, et al. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation. A population-based study. *Diabetes Care*. 2013;36(7):1974-1980. doi:10.2337/dc12-1893
 112. Keenan DM, Roelfsema F, Carroll BJ, Iranmanesh A, Veldhuis JD. Sex defines the age dependence of endogenous ACTH-cortisol dose responsiveness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:515-523. doi:10.1152/ajpregu.00200.2009.
 113. Schianca GPC, Castello L, Rapetti R, Limoncini A, Bartoli E. Insulin sensitivity: Gender-related differences in subjects with normal glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(5):339-344. doi:10.1016/j.numecd.2005.05.004
 114. Balaskó M, Soós S, Székely M, Pétervári E. Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance. *J Chem Neuroanat*. 2014;61:248-255. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.08.006
 115. Schautz B, Later W, Heller M, Peters A, Müller MJ, Bosy-Westphal A. Impact of age on leptin and adiponectin independent of adiposity. *Br J Nutr*. 2012;108(2):363-370. doi:10.1017/S0007114511005605
 116. Roszkowska-Gancarz M, Jonas M, Owczarz M, et al. Age-related changes of leptin and leptin receptor variants in healthy elderly and long-lived adults. *Geriatr Gerontol Int*. 2015;15(3):365-371. doi:10.1111/ggi.12267
 117. Matsuda M, Mori T, Sassa S, Sakamoto S, Park MK, Kawashima S. Chronic effect of hyperprolactinemia on blood glucose and lipid level in mice. *Life Sci*. 1996;58(14):1171-1177. doi:10.1016/0024-3205(96)00075-6
 118. Esquifino AI, Cano P, Jimenez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. Changes of prolactin regulatory mechanisms in aging: 24-h rhythms of serum prolactin and median eminence and adenohipophysial concentration of dopamine, serotonin, (γ -aminobutyric acid, taurine and somatostatin in young and aged rats. *Exp Gerontol*. 2004;39(1):45-52. doi:10.1016/j.exger.2003.08.004
 119. Rossmanith WG, Szilagyi A, Scherbaum WA. Episodic thyrotropin (TSH) and

- prolactin (PRL) secretion during aging in postmenopausal women. *Horm Metab Res.* 1992;24(4):185-190. doi:10.1055/s-2007-1003290
120. Gietka-Czernel M. The thyroid gland in postmenopausal women: physiology and diseases. *Menopause Rev.* 2017;16(2):33-37. doi:10.5114/pm.2017.68588
 121. Vecsei P. Glucocorticoids: Cortisol, Cortisone, Corticosterone, Compounds, and their Metabolites. In: Jaffe BM, Behrman HR, eds. *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. 2d ed. Academic Press; 1978:767-796. doi:10.1016/B978-0-12-379260-0.50046-7
 122. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Tadeu Hochmuller Fogaça R, de Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutr Hosp.* 2013;28(6):2151-2156. doi:10.3305/nh.2013.28.6.6659
 123. Nistiar F, Racz O, Lukacinova A, et al. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J Environ Sci Heal Part A.* 2012;47(9):1224-1233. doi:10.1080/10934529.2012.672071
 124. Wiesner B, Sheard N. The duration of life in an albino rat population. *R Soc Edinburgh.* 1934;55(November 6):1-22. doi:https://doi.org/10.1017/S0370164600014310
 125. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-119. doi:10.1258/002367707779399518
 126. Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. *Experientia.* 1970;26(7):789-790. doi:10.1007/BF02232553
 127. Salvestrini V, Sell C, Lorenzini A. Obesity may accelerate the aging process. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019. doi:10.3389/fendo.2019.00266
 128. Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav.* 2007;92(5):911-923. doi:10.1016/j.physbeh.2007.06.017
 129. Enesco M, Leblond CP. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morph.* 1962;10(4):530-562. <http://dev.biologists.org/content/develop/10/4/530.full.pdf>. Accessed April 30, 2019.

130. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-,mediated pathway. *Endocrinology*. 2003;144(11):5081-5088. doi:10.1210/en.2003-0741
131. Bhasin S, Taylor WE, Singh R, et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: Mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol Med Sci*. 2003;58A(12):1103-1110. <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article-abstract/58/12/M1103/591636>. Accessed May 2, 2019.
132. Somogyi V, Peto K, Deak A, Tanczos B, Nemeth N. Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (Crl:WI) rats. *Biorheology*. 2018;54(5-6):127-140. doi:10.3233/BIR-17148
133. Passadore MD, Griggio MA, Luz J. Effects of aging on the energy balance of food-restricted rats. *Acta Physiol Scand*. 2004;181(2):193-198. doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01281.x
134. Thomas MA, Rice HB, Weinstock D, Corwin RL. Effects of aging on food intake and body composition in rats. *Physiol Behav*. 2002;76(4-5):487-500. doi:10.1016/S0031-9384(02)00800-4
135. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, Rostom de Mello MA. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):16. doi:10.1186/1758-5996-4-16
136. Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav*. 1976;17(2):201-208. doi:10.1016/0031-9384(76)90064-0
137. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(June):1251-1263. doi:10.1098/rstb.2006.1860
138. Asarian L, Geary N. Sex differences in the physiology of eating. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(11):R1215-R1267. doi:10.1152/ajpregu.00446.2012
139. Roy EJ, Wade GN. Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm Behav*. 1977;8(3):265-274. doi:10.1016/0018-506X(77)90001-0
140. Chai J, Blaha V, Meguid MM, et al. Use of orchietomy and testosterone

- replacement to explore meal number-to-meal size relationship in male rats. *Am J Physiol*. 1999;276(45):R1366-R1373. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.5.R1366
141. Grygorieva N, Povoroznyuk V, Gopkalova I, Orlyk T. Age and sex features of bone mineral density in rats. *Fiziol Zh*. 2017;63(1):26-32. doi:10.15407/fz63.01.026
 142. Karahan S, Kincaid SA, Lauten SD, Wright JC. In vivo whole body and appendicular bone mineral density in rats: a dual energy X-ray absorptiometry study. *Comp Med*. 2002;52(2):143-151.
 143. Zhang XZ, Kalu DN, Erbas B, Hopper JL, Seeman E. The effects of gonadectomy on bone size, mass, and volumetric density in growing rats are gender-, site-, and growth hormone-specific. *J Bone Miner Res*. 1999;14(5):802-809. doi:10.1359/jbmr.1999.14.5.802
 144. Govindarajan P, Schlewitz G, Schlieke N, et al. Implications of combined ovariectomy/multi-deficiency diet on rat bone with age-related variation in bone parameters and bone loss at Multiple skeletal sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013;19:76-86. doi:10.12659/MSMBR.883815
 145. Gu Z, Du Y, Liu Y, et al. Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. *Age (Omaha)*. 2012;34(6):1393-1403. doi:10.1007/s11357-011-9312-7
 146. Bonzón-Kulichenko E, Moltó E, Pintado C, et al. Changes in visceral adipose tissue plasma membrane lipid composition in old rats are associated with adipocyte hypertrophy with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(9):1139-1146. doi:10.1093/gerona/gly081
 147. Antonio Laurato Sertié R, de Oliveira Caminhotto R, Andreotti S, et al. Metabolic adaptations in the adipose tissue that underlie the body fat mass gain in middle-aged rats. *Age (Omaha)*. 2015;37(5):87. doi:10.1007/s11357-015-9826-5
 148. Sicree RA, Zimmet PZ, Dunstan DW, Cameron AJ, Welborn TA, Shaw JE. Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test - The AusDiab study. *Diabet Med*. 2008;25(3):296-302. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02362.x
 149. van den Top M, Zhao FY, Viriyapong R, et al. The impact of ageing, fasting and high-fat diet on central and peripheral glucose tolerance and glucose-sensing neural networks in the arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol*.

- 2017;29(10):1-23. doi:10.1111/jne.12528
150. Yoshino G, Kazumi T, Kobayashi N, Terashi K, Morita S, Baba S. Insulin and glucagon relationships during aging in rats. *Endocrinol Jpn.* 1979;26(3):325-329. doi:10.1507/endocrj1954.26.325
 151. Muñoz V, Gaspar R, Kuga G, et al. The effects of aging on rho kinase and insulin signalling in skeletal muscle and white adipose tissue of rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018. doi:10.1093/gerona/gly293
 152. Kleber Costa Teixeira R, Haber Feijó D, Lopes Valente A, et al. Influence of oophorectomy on glycemia and lipidogram. *Acta Cir Bras.* 2018;33(5):415-419. doi:10.1590/s0102-865020180050000003
 153. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism.* 2009;58(1):38-47. doi:10.1016/j.metabol.2008.08.004
 154. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. The diversity of sex steroid action: Regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol.* 2012;212(1):3-12. doi:10.1530/JOE-11-0044
 155. Barros RPA, Ke Gustafsson J-A°. Estrogen receptors and the metabolic Network. *Cell Metab.* 2011;14(3):289-299. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.005
 156. Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;122(1-3):74-81. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.06.012
 157. Reis F, Reis A, Coimbra C. Effects of hyperprolactinaemia on glucose tolerance and insulin release in male and female rats. *J Endocrinol.* 1997;153(3):423-428. doi:10.1677/joe.0.1530423
 158. Fleenor DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: Roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology.* 2001;142(7):2805-2810. doi:10.1210/endo.142.7.8267
 159. Rafacho A, Abrantes JLF, Ribeiro DL, et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. *Horm Metab Res.* 2011;43(4):275-281. doi:10.1055/s-0030-1269896
 160. Altura B, Lum G, Turlapaty P, Altura BT. Sequential changes in serum glucose, triglycerides and cholesterol in aging of normal and alloxan-diabetic rats. *Experientia.* 1981;37(3):224-226. doi:10.1007/BF01991622

161. Sharma G, Prossnitz ER. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic B-cells. *Endocrinology*. 2011;152(8):3030-3039. doi:10.1210/en.2011-0091
162. Ropero AB, Pang Y, Alonso-Magdalena P, Thomas P, Nadal Á. Role of ER β and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose. *Steroids*. 2012;77(10):951-958. doi:10.1016/j.steroids.2012.01.015
163. Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: It's not just about sex hormones sex differences in lipid metabolism and lipoprotein kinetics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):885-893. doi:10.1210/jc.2010-2061
164. Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab*. 2018;15:45-55. doi:10.1016/j.molmet.2018.05.008
165. Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Effect of sex and obesity on basal VLDL-triacylglycerol kinetics. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(3):573-582. doi:10.1093/ajcn/77.3.573
166. Boudet J, Rouillet JB, Lacour B. Influence of Fast, Body Weight and Diet on Serum Cholesterol, Triglycerides, and Phospholipids Concentrations in the Aging Rat. 1988;20:734-737.
167. Uchida K, Nomura Y, Kadowaki M, Takase H, Takano K, Takeuchi N. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res*. 1978;19(5):544-552. <http://www.jlr.org/content/19/5/544.full.pdf>. Accessed December 21, 2018.
168. Murawski U, Kriesten K, Egge H. Age-related changes of lipid fractions and total fatty acids in the serum of female and male rats aged from 37 to 1200 days. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*. 1989;94(3):525-536. doi:10.1016/0305-0491(89)90192-2
169. Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, Mc Auley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res Rev*. 2016;27:108-124. doi:10.1016/j.arr.2016.03.008
170. Bose C, Bhuvaneswaran C, Udupa KB. Age-related alteration in hepatic acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase and its relation to LDL receptor and MAPK. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(6-7):740-751. doi:10.1016/j.mad.2005.02.003

171. Pallottini V, Martini C, Cavallini G, et al. Modified HMG-CoA reductase and LDLr regulation is deeply involved in age-related hypercholesterolemia. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1044-1053. doi:10.1002/jcb.20951
172. Nanjee MN, Miller NE. Sex difference in the saturable binding of low-density lipoprotein by liver membranes in ageing rats. *Biochim Biophys Acta*. 1988;959(3):378-385. doi:10.1016/0005-2760(88)90212-3
173. Carrascosa JM, Ros M, Andrés A, Fernández-Agulló T, Arribas C. Changes in the neuroendocrine control of energy homeostasis by adiposity signals during aging. *Exp Gerontol*. 2009;44(1-2):20-25. doi:10.1016/j.exger.2008.05.005
174. Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:624-630. doi:10.1006/bbrc.1999.0842
175. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes*. 1997;46(12):2035-2039. doi:10.2337/diab.46.12.2035
176. Scarpace PJ, Tümer N. Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity. *Physiol Behav*. 2001;74(4-5):721-727. doi:10.1016/S0031-9384(01)00616-3
177. Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Campoy F, et al. Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats. *J Endocrinol*. 2001;171(1):23-32. <http://www.endocrinology.org>. Accessed December 28, 2018.
178. Xu A, Chan KW, Hoo RLC, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(18):18073-18080. doi:10.1074/jbc.M414231200
179. Isobe T, Saitoh S, Takagi S, et al. Influence of gender, age and renal function on plasma adiponectin level: The Tanno and Sobetsu study. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(1):91-98. doi:10.1530/eje.1.01930
180. Adamczak M, Rzepka E, Chudek J, Więcek A. Ageing and plasma adiponectin concentration in apparently healthy males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(1):114-118. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02182.x
181. Song HJ, Oh S, Quan S, et al. Gender differences in adiponectin levels and body composition in older adults: Hallym aging study. *BMC Geriatr*. 2014;14(1):8. doi:10.1186/1471-2318-14-8

182. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007;13(3):332-339. doi:10.1038/nm1557
183. Engin A. *Adiponectin-Resistance in Obesity*. Vol 960. (Engin AB, Engin A, eds.). Cham: Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-48382-5_5
184. Lo MJ, Kau MM, Wang PS. Effect of aging on corticosterone secretion in diestrous rats. *J Cell Biochem*. 2006;97(2):351-358. doi:10.1002/jcb.20576
185. Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OFX. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J*. 1995;9(5):419-423. doi:10.1096/fasebj.9.5.7896013
186. Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience*. 2009;159(1):259-270. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.12.020
187. Lo MJ, Wang PS. Relative and combined effects of estradiol and prolactin on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *Chin J Physiol*. 2003;46(3):103-109.
188. Lo MJ, Kau MM, Chen JJ, et al. Age-related differences in corticosterone secretion in female rats. *Metabolism*. 1999;48(4):535-541. doi:10.1016/S0026-0495(99)90117-8
189. De Guia RM, Rose AJ, Herzig S. Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;19(2):117-128. doi:10.1515/hmbci-2014-0021
190. Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol*. 2014;223(3):R49-R62. doi:10.1530/JOE-14-0373
191. Mueller KM, Hartmann K, Kaltenecker D, et al. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency attenuates aging-and HFD-induced obesity and impairs the feeding-fasting transition. *Diabetes*. 2017;66(2):272-286. doi:10.2337/db16-0381
192. Putten L, van Zwieten M, Mattheij J, van Kemenade J. Studies on prolactin-secreting cells in aging rats of different strains. I. Alterations in pituitary histology and serum prolactin levels as related to aging. *Mech Ageing Dev*.

- 1988;42(1):75-90. doi:10.1016/0047-6374(88)90064-4
193. Reymond MJ. Age-related loss of the responsiveness of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1990;52(5):490-496. doi:10.1159/000125633
 194. ThyagaRajan S, MohanKumar PS, Quadri SK. Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging. *Brain Res*. 1995;689(1):122-128. doi:10.1016/0006-8993(95)00551-Z
 195. Demarest KT, Moore KE, Riegler GD. Dopaminergic neuronal function, anterior pituitary dopamine content, and serum concentrations of prolactin, luteinizing hormone and progesterone in the aged female rat. *Brain Res*. 1982;247(2):347-354. doi:10.1016/0006-8993(82)91260-4
 196. Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: Weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48(5):547-553. doi:10.1046/j.1365-2265.1998.00403.x
 197. Heshmati HM, Turpin G, Gennes JL De. Chronic hyperprolactinemia and plasma lipids in women. *Klin Wochenschr*. 1987;65(11):516-519. doi:10.1007/BF01721038
 198. Atmaca A, Bilgici B, Ecemis GC, Tuncel OK. Evaluation of body weight, insulin resistance, leptin and adiponectin levels in premenopausal women with hyperprolactinemia. *Endocrine*. 2012;44(3):756-761. doi:10.1007/s12020-013-9931-0
 199. Luque GM, Lopez-Vicchi F, Ornstein AM, et al. Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine D2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):974-988. doi:10.1152/ajpendo.00200.2016.-We
 200. Lisbôa PC, Curty FH, Moreira RM, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Horm Metab Res*. 2001;33(9):532-535. doi:10.1055/s-2001-17211
 201. Donda A, Reymond F, Rey F, Lemarchand-Béraud T. Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. *Acta Endocrinol*. 1990;122(5):577-584. doi:10.1530/acta.0.1220577
 202. Greeley G, Lipton M, Kizer J. Serum thyroxine, triiodothyronine, and TSH levels and TSH release after TRH in aging male and female rats. *Endocr Res*

- Commun.* 1982;9(3-4):169-177. doi:10.3109/07435808209045762
203. Donda A, Reymond MJ, Ziirich MG, Lemarchand-bqaud T. Influence of sex and age on T3 receptors and T3 concentration in the pituitary gland of the rat : consequences on TSH secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 1987;54(1):29-34. doi:10.1016/0303-7207(87)90136-5
 204. Schmitt R, Melk A. Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney Int.* 2017;92(3):569-579. doi:10.1016/j.kint.2017.02.036
 205. Marín J, Rodríguez-Marines MA. Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol.* 1999;34(4):503-512. doi:10.1016/S0531-5565(99)00029-7
 206. Waller BF. The old-age heart: Normal aging changes which can produce or mimic cardiac disease. *Clin Cardiol.* 1988;11(8):513-517. doi:10.1002/clc.4960110802
 207. Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ, Harvey W. Right ventricular function in cardiovascular disease, Part I. Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation.* 2008;117(11):1436-1448. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653576
 208. Freeman R V, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation.* 2005;111(24):3316-3326. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738
 209. Movahed M-R, Saito Y, Ahmadi-Kashani M, Ebrahimi R. Mitral annulus calcification is associated with valvular and cardiac structural abnormalities. *Cardiovasc Ultrasound.* 2007;5:14. doi:10.1186/1476-7120-5-14
 210. Fulkerson PK, Beaver BM, Auseon JC, Graber HL. Calcification of the mitral annulus. Etiology, clinical associations, complications and therapy. *Am J Med.* 1979;66(6):967-977. doi:10.1016/0002-9343(79)90452-2
 211. Jones SA, Boyett MR, Lancaster MK. Declining into failure. The age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node. *Circulation.* 2007;115(10):1183-1190. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.663070
 212. Dun W, Boyden PA. Aged atria: electrical remodeling conducive to atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2009;25(1):9-18. doi:10.1007/s10840-008-9358-3
 213. Aires M de M. *Fisiologia*. 3rd ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A; 2013.
 214. Nikitin NP, A Witte KK, R Thackray SD, Goodge LJ, Clark AL, F Cleland JG.

- Effect of age and sex on left atrial morphology and function. *Eur J Echocardiogr.* 2003;4(1):36-42. doi:10.1053/euje.2002.0611
215. Boyd AC, Hons B, Schiller NB, Leung D, Ross DL, Thomas L. Atrial dilation and altered function are mediated by age and diastolic function but not before the eighth decade. *JAAC:Cardiovascular Imaging.* 2011;4(3):234-242. doi:10.1016/j.jcmg.2010.11.018
 216. Chiao YA, Rabinovitch PS. The aging heart. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(9):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a025148
 217. Ouzounian M, Lee DS, Liu PP. Diastolic heart failure: Mechanisms and controversies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(7):375-386. doi:10.1038/ncpcardio1245
 218. Fares E, Howlett SE. Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(1):1-7. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05276.x
 219. Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Reseach.* 2004;94(12):1533-1542. doi:10.1161/01.RES.0000129254.25507.d6
 220. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II. Causal mechanism and treatment. *Circ (Circulation).* 2002;105(12):1387-1393. doi:10.1161/hc1202.105290
 221. Brunk UT, Jones CB, Sohal RS. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat Res DNAging.* 1992;275(3-6):395-403. doi:10.1016/0921-8734(92)90042-N
 222. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem.* 2004;263(1-2):55-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524167>.
 223. Kennedy BK, Steffen KK, Kaeberlein M. Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(11):1323-1328. doi:10.1007/s00018-007-6470-y
 224. Ren J, Brown-Borg HM. Impaired cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from Ames dwarf mice with IGF-I deficiency. *Growth Horm IGF Res.* 2002;12(2):99-105. doi:10.1054/ghir.2002.0267
 225. Reed AL, Tanaka A, Sorescu D, et al. Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. *Am J Physiol Hear Circ*

- Physiol.* 2011;301(3):824-831. doi:10.1152/ajpheart.00407.2010.-Diastolic
226. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovas Res.* 2007;74(2):184-195. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.002
 227. Ferrara N, Komici K, Corbi G, et al. B-adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front Physiol.* 2014;4(396):1-10. doi:10.3389/fphys.2013.00396
 228. Scarpace PJ, Shu Y, Tumer N. Influence of exercise training on myocardial beta-adrenergic signal transduction: differential regulation with age. *J Appl Physiol.* 1994;77(2):737-741. doi:10.1152/jappl.1994.77.2.737
 229. Rengo G, Lymperopoulos A, Zincarelli C, et al. Blockade of β -adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal α 2-adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure. *Br J Pharmacol.* 2012;166(8):2430-2440. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01972.x
 230. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 2016;37(42):3232-3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334
 231. Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill GJ, Barreto SM. Cardiovascular health in Brazil trends and perspectives global burden of cardiovascular disease. *Circulation.* 2016;133(4):422-433. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008727
 232. Thornton SN. Thirst and hydration: Physiology and consequences of dysfunction. *Physiol Behav.* 2010;100(1):15-21. doi:10.1016/j.physbeh.2010.02.026
 233. Saker P, Farrell MJ, Adib FRM, Egan GF, McKinley MJ, Denton DA. Regional brain responses associated with drinking water during thirst and after its satiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(14). doi:10.1073/pnas.1403382111
 234. Kenney WL, Chiu P. Influence of age on thirst and fluid intake. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(9):1524-1532. doi:10.1097/00005768-200109000-00016
 235. Tamma G, Goswami N, Reichmuth J, De Santo NG, Valenti G. Aquaporins, Vasopressin, and Aging: Current Perspectives. *Endocrinology.* 2015;156(3):777-788. doi:10.1210/en.2014-1812
 236. Bitzer M, Wiggins J. Aging biology in the kidney. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016;23(1):12-18. doi:10.1053/j.ackd.2015.11.005

237. Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(5):655-659. doi:10.1097/00041552-200109000-00017
238. Chen Z, Vaughn DA, Fanestil DD, Vaughn Fanestil DD. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5(4):149. <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/5/4/1112.full.pdf>. Accessed May 13, 2019.
239. Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR, Hebert SC. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1661-1669. doi:10.1172/JCI601
240. Ziegler MG, Milic M. Sympathetic nerves and hypertension in stress, sleep apnea, and caregiving. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(1):26-30. doi:10.1097/MNH.0000000000000288
241. Buñag RD, Teravainen T-L. Tail-cuff detection of systolic hypertension in different strains of ageing rats. *Mech Ageing Dev*. 1991;59(1-2):197-213. doi:10.1016/0047-6374(91)90085-E
242. Barringer DL, Buñag RD. Autonomic regulation of reflex bradycardia in rats declines with age. *Exp Gerontol*. 1991;26(1):65-75. doi:10.1016/0531-5565(91)90063-R
243. Rothbaum DA, Shaw DJ, Angell CS, Shock NW. Age differences in the baroreceptor response of rats. *Journals Gerontol*. 1974;29(5):488-492. doi:10.1093/geronj/29.5.488
244. Buñag RD, Teräväinen TL, Eriksson L. Enhanced sympathetic mediation of chronotropic baroreflexes in old Sprague-Dawley rats. *Mech Ageing Dev*. 1990;53(2):195-208. doi:10.1016/0047-6374(90)90070-V
245. Dannenberg AL, Levy D, Garrison RJ. Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham study). *Am J Cardiol*. 1989;64(16):1066-1068. doi:10.1016/0002-9149(89)90816-3
246. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure-A review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(4):975-984. doi:10.1016/S0735-1097(01)01108-1
247. Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8(6):1441-

1448. doi:10.1016/S0735-1097(86)80321-7
248. Grimes KM, Lindsey ML, Gelfond JA, Buffenstein R. Getting to the heart of the matter: age-related changes in diastolic heart function in the longest-lived rodent, the naked mole rat. *J Gerontol Biol Sci.* 2012;67A(4):384-394. doi:10.1093/gerona/glr222
 249. Brouwers FP, Hillege HL, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ. Comparing new onset heart failure with reduced ejection fraction and new onset heart failure with preserved ejection fraction: An epidemiologic perspective. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9(4):363-368. doi:10.1007/s11897-012-0115-7
 250. Oktay AA, Rich JD, Shah SJ. The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Hear Fail Rep.* 2013;10(4):401-410. doi:10.1007/s11897-013-0155-7
 251. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A. Essential role for premature senescence of myofibroblasts in myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(17):2018-2028. doi:10.1016/j.jacc.2016.02.047
 252. Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell.* 2006;5(2):187-195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
 253. Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes. *Aging Cell.* 2005;4(1):21-30. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00137.x
 254. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal Effects of Aging on Serum Total and Free Testosterone Levels in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):724-731.
 255. Koenig H, Goldstone A, Lu CY. Testosterone-mediated sexual dimorphism of the rodent heart ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens. *Circ Res.* 1982;50(6):782-787. doi:10.1161/01.RES.50.6.782
 256. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858
 257. Eleftheriadou O, Boguslavskiy A, Longman MR, et al. Expression and regulation of type 2A protein phosphatases and α 4 signalling in cardiac health and hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(4):37.

doi:10.1007/s00395-017-0625-2

258. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004;84(1):169-208. doi:10.1152/physrev.00017.2003
259. Leib DE, Zimmerman CA, Knight ZA. Thirst. *Curr Biol.* 2016;26(24):R1260-R1265. doi:10.1016/j.cub.2016.11.019
260. Begg DP. Disturbances of thirst and fluid balance associated with aging. *Physiol Behav.* 2017;178:28-34. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.003
261. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998;78(3):583-686. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.583
262. Zhang D ming, Epstein AN, Schulkin J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Res.* 1993;600(1):20-26. doi:10.1016/0006-8993(93)90396-5
263. Franci CR, Kozlowski GP, McCann SM. Water intake in rats subjected to hypothalamic immuno-neutralization of angiotensin II, atrial natriuretic peptide, vasopressin, or oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(8):2952-2956. doi:10.1073/pnas.86.8.2952
264. de Arruda Camargo LA, Saad WA, de Luca LA, Renzi A, Silveira JN, Menani J. Synergist interaction between angiotensin II and DOCA on sodium and water balance in rats. *Physiol Behav.* 1994;55(3):423-427. doi:10.1016/0031-9384(94)90095-7
265. Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1980;239(8):R382-R389. doi:10.1152/ajpregu.1980.239.5.R382
266. Roy C, Barth T, Jard S. Vasopressin-sensitive kidney adenylate Cyclase. *J Biol Chem.* 1975;250(8):3149-3156.
267. Blackburn RE, Demko AD, Hoffman GE, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1992;263(6 Pt 2):R1347-R1353. doi:10.1016/0195-6663(92)90037-7
268. Soares TJ, Coimbra TM, Martins a R, et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(January):278-283. doi:10.1073/pnas.96.1.278
269. Haanwinckel M a, Elias LK, Favaretto a L, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and

- natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(August):7902-7906. doi:10.1073/pnas.92.17.7902
270. Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration-and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat (thirst/cardiac peptides). *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82(24):8720-8723. doi:10.1073/pnas.82.24.8720
 271. Ehrlich KJ, Fitts DA. Atrial natriuretic peptide in the subfornical organ reduces drinking induced by angiotensin or in response to water deprivation. *Behav Neurosci*. 1990;104(2):365-372. doi:10.1037/0735-7044.104.2.365
 272. Itoh H, Nakao K, Yamada T, et al. Antidipsogenic action of a novel peptide, "brain natriuretic peptide", in rats. *Eur J Pharmacol*. 1988;150(1-2):193-196. doi:10.1016/0014-2999(88)90769-8
 273. Bastos R, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Brain Res*. 2001;895(1-2):80-88. doi:10.1016/S0006-8993(01)02033-9
 274. Wotus C, Osborn JW, Nieto PA, Engeland WC. Regulation of corticosterone production by vasopressin during water restriction and after drinking in rats. *Neuroendocrinology*. 2003;78(6):301-311. doi:10.1159/000074883
 275. Chatelain D, Montel V, Dickes-Coopman A, Chatelain A, Deloof S. Trophic and steroidogenic effects of water deprivation on the adrenal gland of the adult female rat. *Regul Pept*. 2003;110(3):249-255. doi:10.1016/S0167-0115(02)00217-3
 276. Grinevich V, Ma XM, Verbalis J, Aguilera G. Hypothalamic pituitary adrenal axis and hypothalamic-neurohypophyseal responsiveness in water-deprived rats. *Exp Neurol*. 2001;171(2):329-341. doi:10.1006/exnr.2001.7784
 277. Aguilera G, Lightman SL, Kiss A. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal during water deprivation. *Endocrinology*. 1993;132(1):241-248. doi:10.1210/endo.132.1.8380375
 278. Papanek PE, Raff H. Chronic physiological increases in cortisol inhibit the vasopressin response to hypertonicity in conscious dogs. *Am J Physiol*. 1994;267(5 Pt 2):R1342-9. doi:10.1109/JRPROC.1931.222258
 279. Raff H, Skelton MM, Cowley AW. Feedback control of vasopressin and corticotrophin secretion in conscious dogs: Effect of hypertonic saline. *J*

- Endocrinol.* 1989;122(1):41-48. doi:10.1677/joe.0.1220041
280. Li C, Wang W, Summer SN, Falk S, Schrier RW. Downregulation of UT-A1/UT-A3 is associated with urinary concentrating defect in glucocorticoid-excess state. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(10):1975-1981. doi:10.1681/ASN.2008010051
 281. Naruse M, Klein JD, Ashkar ZM, Jacobs JD, Sands JM. Glucocorticoids downregulate the vasopressin regulated urea transporter in rat terminal inner medullary collecting ducts. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:517-523.
 282. Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. Glucocorticoids inhibit transcription and expression of the UT-A urea transporter gene. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2002;282:F853-F858. doi:10.1152/ajprenal.00262.2001
 283. Phillips PA, Rolls BJ, Ledingham JG, et al. Reduced thirst after water deprivation in healthy elderly men. *N Engl J Med.* 1984;311(12):753-759. doi:10.1056/NEJM199401273300403
 284. Tanabe S, Buñag RD. Age-related central and baroreceptor impairment in female Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol.* 1989;256(5 Pt 2):H1399-406. doi:10.1152/ajpheart.1989.256.5.H1399
 285. Gribbin B, Pickering TG, Sleight P, Peto R. Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. *Circ Res.* 1971;29(4):424-431. <http://ahajournals.org>. Accessed November 16, 2018.
 286. Shimada K, Kitazumi T, Sadakane N, Ogura H, Ozawa T. Age-related changes of baroreflex function, plasma norepinephrine, and blood pressure. *Hypertension.* 1985;7(1):113-117. doi:10.1161/01.HYP.7.1.113
 287. Weidmann P, De Myttenaere-Bursztejn S, Maxwell MH, et al. Effect on aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney Int.* 1975;8(5):325-333. doi:10.1038/ki.1975.120
 288. Tsunoda K, Abe K, Goto T, et al. Effect of age on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in normal subjects: simultaneous measurement of active and inactive renin, renin substrate, and aldosterone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62(2):384-389.
 289. Farrell MJ, Zamarripa F, Shade R, et al. Effect of aging on regional cerebral blood flow responses associated with osmotic thirst and its satiation by water drinking: a PET study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(1):382-387. doi:10.1073/pnas.0710572105

290. Denton D, Shade R, Zamarippa F, et al. Neuroimaging of genesis and satiation of thirst and an interoceptor-driven theory of origins of primary consciousness. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(9):5304-5309. www.pnas.org. Accessed January 24, 2019.
291. Egan G, Silk T, Zamarippa F, et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(25):15241-15246. doi:10.1073/pnas.2136650100
292. Silverman WiF, Aravich PA, Sladek JR, Sladek CD. Physiological and biochemical indices of neurohypophyseal function in the aging Fischer rat. *Neuroendocrinology*. 1990;52(2):181-190. doi:10.1159/000125571
293. Swenson KL, Sands JM, Jacobs JD, et al. Effect of aging on vasopressin and aquaporin responses to dehydration in Fischer 344 , Brown- Norway FI rats. *Am J Physiol*. 1997;273(42):R35-R40. doi:10.1152/ajpregu.1997.273.1.R35
294. Fliers E, Swaab DF. Activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons during aging in the Wistar rat. *Peptides*. 1983;4(2):165-170. doi:10.1016/0196-9781(83)90108-0
295. Curtis KS. Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiol Behav*. 2009;97(2):180-192. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.027
296. Flack JD. The actions of ethinyloestradiol on the pituitary-adrenal system of the rat. *Br J Pharmacol*. 1970;38(2):321-331. doi:10.1111/j.1476-5381.1970.tb08520.x
297. Barron WM, Schreiber J, Lindheimer MD. Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol*. 1986;250(4 Pt 1):E352-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3963178>.
298. Santollo J. Sex differences in angiotensin II-stimulated fluid intake. *Exp Physiol*. 2017;102(11):1380-1384. doi:10.1113/EP086518
299. Ferrini MG, Grillo CA, Piroli G, De Kloet ER, De Nicola AF. Sex difference in glucocorticoid regulation of vasopressin mRNA in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Cell Mol Neurobiol*. 1997;17(6):671-686. doi:10.1023/A:1022538120627
300. Tarttelin MF, Gorski RA. Variations in food and water intake in the normal and acyclic female rat. *Physiol Behav*. 1971;7(6):847-852. doi:10.1016/0031-9384(71)90050-3
301. Forsling ML, Peysner K. Pituitary and plasma vasopressin concentrations and

- fluid balance throughout the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol*. 1988;117(3):397-402. doi:10.1677/joe.0.1170397
302. Ota M, Crofton JT, Liu H, Festavan G, Share L. Increased plasma osmolality stimulates peripheral and central vasopressin release in male and female rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1994;267(4 Pt 2):R923-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943433>.
 303. Stachenfeld NS, Splenser AE, Calzone WL, Taylor MP, Keefe DL. Selected contribution: Sex differences in osmotic regulation of AVP and renal sodium handling. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1893-1901. doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1893
 304. Crofton JT, Share L. Osmotic control of vasopressin in male and female rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1989;257(4 Pt 2):R738-43. doi:10.1152/ajpregu.1989.257.4.R738
 305. Kaufman S. A comparison of the dipsogenic responses of male and female rats to a variety of stimuli. *Can J Physiol Pharmacol*. 1980;58(10):1180-1183.
 306. Santollo J, Torregrossa A-M, Daniels D, Author HB. Sex differences in the drinking response to angiotensin II (AngII): effect of body weight. *Horm Behav*. 2017;93:128-136. doi:10.1016/j.yhbeh.2017.05.013
 307. Rowland NE, Morien A, Garcea M, Fregly MJ. Aging and fluid homeostasis in rats. *Regul Integr Comp Physiol*. 1997;273(42):R1441-R1450. doi:10.1152/ajpregu.1997.273.4.R1441
 308. LeFevre J, McClintock K. Reproductive senescence in female rats: A longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38(4): 780-789. doi:10.1095/biolreprod38.4.780
 309. Elias P, Elias L, Moreira A. Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico de Diabetes insípido com dosagem de vasopressina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1998;42(3):198-204.
 310. Gutkowska J, Hork K, Thibault G, Januszewicz P, Cantin M, Genest J. Atrial Natriuretic Factor is a circulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;125(1):315-323.
 311. Botelho L, Block C, Khosla M, Santos R. Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*. 1994;15(4):723-729.
 312. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. San

- Diego: Academic Press; 1997.
313. McKinley MJ, Denton D a, Thomas CJ, Woods RL, Mathai ML. Differential effects of aging on fluid intake in response to hypovolemia, hypertonicity, and hormonal stimuli in Munich Wistar rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3450-3455. doi:10.1073/pnas.0511099103
 314. Thunhorst RL, Johnson AK. Thirst and salt appetite responses in young and old Brown Norway rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R317-R327. doi:10.1152/ajpregu.00368.2002
 315. Begg DP, Sinclair AJ, Weisinger RS. Reductions in water and sodium intake by aged male and female rats. *Nutr Res*. 2012;32(11):865-872. doi:10.1016/j.nutres.2012.09.014
 316. Thunhorst RL, Beltz T, Johnson AK. Age-related declines in thirst and salt appetite responses in male Fischer 344 x Brown Norway rats. *Physiol Behav*. 2014;135:180-188. doi:10.1016/j.physbeh.2014.06.010.
 317. Edwards BR, LaRochelle Jr. FT. Antidiuretic effect of endogenous oxytocin in dehydrated Brattleboro homozygous rats. *Am J Physiol*. 1984;247(16):F453-F465. doi:10.1152/ajprenal.1984.247.3.F453
 318. Barney C, Threatte RM, Fregly J. Water deprivation-induced drinking in rats : role of angiotensin II. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 1983;244(13):1-5. doi:10.1152/ajpregu.1983.244.2.R244
 319. Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Fazâa S. Effets métaboliques et endocriniens de la privation hydrique et/ ou alimentaire chez le rat. *Comptes Rendus - Biol*. 2005;328(5):463-470. doi:10.1016/j.crv.2005.02.003
 320. Makino Y, Minamino N, Kakishita E, Kangawa K, Matsuo H. Natriuretic peptides in water-deprived and in salt-loaded rats. *Peptides*. 1996;17(6):1031-1039. doi:10.1016/0196-9781(96)00148-9
 321. Hohenegger M, Laming U, Om P. Metabolic effects of water deprivation. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986;24(5):277-282.
 322. Shin S-J, Wen J-D, Chen ; I-Hsuan, et al. Increased renal ANP synthesis, but decreased or unchanged cardiac ANP synthesis in water-deprived and salt-restricted rats. *Kidney Int*. 1998;54(5):1617-1625. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00163.x
 323. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras*

- Endocrinol Metabol.* 2006;50:198-207. doi:10.1590/S0004-27302006000200006
324. Pawez J, Thibault G, Gutkowska J, et al. Atrial natriuretic factor and vasopressin during dehydration and rehydration in rats. *AJP Endocrinol Metab.* 1986;251(4Pt1):E497-E501. doi:10.1152/ajpendo.1986.251.4.E497
 325. Bahner U, Lenkei Z, Palkovits M, Heidland A, Geiger H, Luft FC. Central atrial natriuretic peptide in dehydration. *Ideggyogy Sz.* 2007;60(3-4):130-135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451053>.
 326. Noth RH, Lassman MN, Tan SY, Fernandez-Cruz A, Patrick J, Mulrow J. Age and the Renin-Aldosterone System. *Arch Intern Med.* 1977;137(1414-1417):28-31. doi:10.1001/archinte.1977.03630220056014
 327. Jung FF, Kennefick TM, Ingelfinger JR, et al. Down-regulation of the intra renal renin-angiotensin system in the aging rat. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5(8):1573-1580. <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/5/8/1573.full.pdf>. Accessed November 13, 2018.
 328. Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, et al. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci.* 2017;20(2). doi:10.1038/hn.4463
 329. Barth SW, Gerstberger R. Differential regulation of angiotensinogen and AT(1A) receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. *Mol Brain Res.* 1999;64(2):151-164. doi:10.1016/S0169-328X(98)00308-8
 330. Sanvitto GL, Johren O, Hauser W, Saavedra JM. Water deprivation upregulates ANG II AT1 binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *Am J Physiol Metab.* 1997;273(36):E156-E163. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.1.e156
 331. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Drinking and arterial blood pressure responses to ANG II in young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:1135-1141. doi:10.1152/ajpregu.00360.2010.
 332. Silver AJ, Morley JE, Ishimaru-Tseng TV, Morley PMK. Angiotensin II and fluid ingestion in old rats. *Neurobiol Aging.* 1993;14(6):519-522. doi:10.1016/0197-4580(93)90033-8
 333. Resch JM, Fenselau H, Madara JC, et al. Aldosterone-sensing neurons in the NTS exhibit state-dependent pacemaker activity and drive sodium appetite via synergy with angiotensin II signaling. *Neuron.* 2017;96(1):190-206.e7.

doi:10.1016/j.neuron.2017.09.014

334. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Effects of aging on mineralocorticoid-induced salt appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(12):R1498-505. doi:10.1152/ajpregu.00349.2013
335. Thunhorst RL, Xue B, Beltz TG, Johnson AK. Age-related changes in thirst, salt appetite, and arterial blood pressure in response to aldosterone-dexamethasone combination in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308(10):R807-R815. doi:10.1152/ajpregu.00490.2014
336. Keck ME, Hatzinger M, Wotjak CT, Landgraf R, Holsboer F, Neumann ID. Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats. *Eur J Neurosci*. 2000;12(4):1487-1494. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00030.x
337. Terwel D, Markerink M, Jolles J. Age-related changes in concentrations of vasopressin in the central nervous system and plasma of the male wistar rat. *Mech Ageing Dev*. 1992;65(2-3):127-136. doi:10.1016/0047-6374(92)90029-D
338. Sladek CD, Olschowka JA. Dehydration induces Fos, but not increased vasopressin in the supraoptic nucleus of aged rats. *Brain Res*. 1994;652:207-215. <https://eurekamag.com/pdf.php?pdf=008425731>. Accessed January 30, 2017.
339. Sandgren JA, Linggongoro DW, Zhang SY, et al. Angiotensin AT 1A receptors expressed in vasopressin-producing cells of the supraoptic nucleus contribute to osmotic control of vasopressin. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2018;314(6):R770-R780. doi:10.1152/ajpregu.00435.2017
340. Greenwood MP, Greenwood M, Romanova E V., et al. The effects of aging on biosynthetic processes in the rat hypothalamic osmoregulatory neuroendocrine system. *Neurobiol Aging*. 2018;65:178-191. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.008
341. Ohno S, Hashimoto H, Fujihara H, et al. Increased oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fluorescent intensity with urocortin-like immunoreactivity in the hypothalamo-neurohypophyseal system of aged transgenic rats. *Neurosci Res*. 2018;128:40-49. doi:10.1016/j.neures.2017.08.001
342. Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp*. 2007;293(3):R1444-R1451. doi:10.1152/ajpregu

343. Bolignano D, Mattace-Raso F, Sijbrands EJG, Zoccali C. The aging kidney revisited: A systematic review. *Ageing Res Rev.* 2014;14(1):65-80.
doi:10.1016/j.arr.2014.02.003
344. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, Mccann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11765-11770. doi:10.1073/pnas.201394198
345. Xu X, Xiao JC, Luo LF, et al. Effects of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *Int J Cardiol.* 2008;130(2):196-204.
doi:10.1016/j.ijcard.2007.08.041
346. Belo NO, Silva-Barra J, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, Gutkowska J, Dos Reis AM. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept.* 2004;117(1):53-60. doi:10.1016/j.regpep.2003.10.007
347. Parker SL, Armstrong WE, Sladek CD, Grosvenor CE, Crowley WR. Prolactin stimulates the release of oxytocin in lactating rats: for a physiological role via an action at the neural lobe. *Neuroendocrinology.* 1991;53(5):503-510.
doi:10.1159/000125764
348. Laczi F, Szasz A, Vecsernyes M, Julesz J. Neurohypophysial hormone secretion in hyperprolactinaemic women. *Neuropeptides.* 1998;32(5):435-437.
doi:10.1016/S0143-4179(98)90068-3
349. Kiss JZ, Van Eekelen JAM, Reul JM, Westphal HM, De Kloet ER. Glucocorticoid receptor in magnocellular neurosecretory cells. *Endocrinology.* 1988;122(2):444-449. doi:10.1210/endo-122-2-444
350. Nahar J, Rainville JR, Dohanich GP, Tasker JG, Tasker J. Further evidence for a membrane receptor that binds glucocorticoids in the rodent hypothalamus. *Steroids.* 2016;114:33-40. doi:10.1016/j.steroids.2016.05.013
351. Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HLP, et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience.* 2007;147(1):247-257. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.021
352. Ni X, Nicholson RC. Steroid hormone mediated regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression. *Front Biosci.* 2006;11:2909-2917.
353. Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N. Age-related changes in growth

- hormone and prolactin messenger RNA levels in the rat. *Endocrinol Jpn.* 1990;37(6):827-840.
354. Vilhena-Franco T, Mecawi AS, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *J Endocrinol.* 2016;231(2):167-180. doi:10.1530/joe-16-0311
 355. Flynn FW, Schulkint JAY, Havens M. Sex differences in salt preference and taste reactivity in rats. *Brain Res Bull.* 1993;32(8):91-95. doi:10.1016/0361-9230(93)90061-F
 356. Curtis KS, Contreras RJ. Sex differences in electrophysiological and behavioral responses to NaCl taste. *Behav Neurosci.* 2006;120(4):917-924. doi:10.1037/0735-7044.120.4.917
 357. Santollo J, Daniels D. Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. *Front Syst Neurosci.* 2015;9(March):1-11. doi:10.3389/fnsys.2015.00025
 358. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(6):687-698. doi:10.1111/j.1472-8206.2010.00854.x
 359. Pendergrass KD, Pirro NT, M.Westwood B, Ferrario C, Brosnihan KB, M.Chappell MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2008;295(1):H10-H20. doi:10.1152/ajpheart.01277.2007
 360. Quiñones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Adan RA, Burbach JPH, Pfaff DW. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology.* 1997;65(1):9-17. doi:10.1159/000127160
 361. Ebner NC, Lin T, Muradoglu M, et al. Associations between oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, plasma oxytocin, and attachment across adulthood. *Int J Psychophysiol.* 2019;136(2017):22-32. doi:10.1016/j.ijpsycho.2018.01.008

APÊNDICES

APENDICE A- Hematócrito, osmolalidade e sódio plasmático em fêmeas e ratos adultos e idosos normoidratados e desidratados

Materiais e métodos

Para aferição do hematócrito, o sangue foi coletado em capilares de vidro heparinizados com uma das extremidades obstruídas, as quais posteriormente foram centrifugados durante cinco minutos a 1000 rpm. A leitura foi realizada utilizando uma escala de micro-hematócrito para determinação do mesmo e os valores obtidos foram expressos em porcentagem (%) de glóbulos vermelhos.

Para a determinação da osmolalidade plasmática utilizou-se o método de redução do ponto de congelação da água através de um osmômetro (Advanced Instruments Inc. ®, modelo 3250), no qual foram utilizados 250 µL da amostra.

A concentração de sódio no plasma foi determinada com ajuda de um analisador de eletrólitos (9180 Analisador de Eletrólitos, Roche), para isto foi utilizado 90 microlitros da mostra.

Resultados

Ratos submetidos a privação hídrica de 24 horas

Os animais desidratados apresentaram uma tendência de ter maiores porcentagens de hematócrito (Fig 1). Na idade de 18 meses as fêmeas hidratadas apresentaram a menor porcentagem de hematócrito ($43,62 \pm 2,56\%$) comparado as idades de 2 meses ($48,00 \pm 4,94\%$; $p < 0,05$) e 12 meses ($47,89 \pm 2,57\%$; $p < 0,05$). Além, só aos 18 meses as fêmeas submetidas a condição de privação hídrica apresentaram maior porcentagem de hematócrito ($46,33 \pm 2,60\%$) do que as controles ($43,62 \pm 2,56\%$; $p < 0,05$; Fig 1 A).

Ademais, os machos privados têm o hematócrito menor na idade de 18 meses ($49,75 \pm 4,37\%$) do que a idade de 2 ($56,36 \pm 4,40\%$; $p < 0,05$) e 9 meses ($55,45 \pm 4,01\%$; $p < 0,05$; Fig 1D), mas os controles não apresentarão mudanças no hematócrito segundo a idade. Não foram observadas diferenças no hematócrito entre os ratos machos em comparação as fêmeas nas diferentes condições de hidratação (Fig 1 C e D).

Figura 1: Hematócrito das fêmeas (A), machos (B), animais controles (C) e animais que foram submetidos a privação hídrica (D) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 24 horas, _____ $p < 0,05$ entre as idades indicadas para fêmeas controles, -.-.-.- $p < 0,05$ entre as idades indicadas para machos privados. O n segundo a ordem cronológica de idade para as fêmeas controles e submetidas a privação hídrica foi respectivamente: 12, 12, 12, 10, 8 e 13, 13, 11, 8, 9; para os machos controles e privados foi: 19, 15, 13, 8, 5 e 14, 11, 11, 11, 8.

As fêmeas controles normoidratadas de 9 meses de idade apresentaram o menor valor de osmolalidade plasmática ($294,5 \pm 6,02$ mOsm/KgH₂O) do que as outras idades estudadas (2 meses: $305,78 \pm 3,23$; 6 meses: $300,8 \pm 3,33$; 12 meses: $300,86 \pm 4,67$ e 18 meses: $305,14 \pm 2,97$ Osm/kgH₂O; $p < 0,05$; Fig 2 A). Também, na idade de 9 meses se observou que as fêmeas submetidas a privação hídrica apresentaram maior osmolalidade plasmática ($309,85 \pm 7,70$ mOsm/KgH₂O) do que as fêmeas hidratadas nessa mesma idade ($294,5 \pm 6,02$ mOsm/KgH₂O; $p < 0,05$).

Por outro lado, a osmolalidade plasmática dos machos normoidratados foi menor na idade de 2 meses ($297 \pm 7,43$ mOsm/kgH₂O) do que as idades de 6, 9 12 e 18 meses ($306 \pm 1,21$; $301,42 \pm 4,12$; $302,75 \pm 7,11$ e $306,8 \pm 7,19$ mOsm/KgH₂O respectivamente; $p < 0,05$; Fig 2 B e C). Além disso, na idade de 2 meses os ratos submetidos a privação hídrica apresentaram maior osmolalidade plasmática ($310,47 \pm 6,60$ mOsm/kgH₂O) do que os ratos hidratados ($297 \pm 7,43$ mOsm/kgH₂O).

Quando foi feita a avaliação comparativa entre machos e fêmeas, Fig 2 C, encontrou-se que na idade de 2 meses as fêmeas hidratadas apresentam maior osmolalidade (305,78 $\pm$ 3,23 mOsm/KgH₂O) do que os machos na mesma condição hídrica (297 $\pm$ 7,43 mOsm/kgH₂O; $p < 0,05$), mas na idade de 6 e 9 meses foram os ratos machos que tiveram a maior osmolalidade plasmática (306 $\pm$ 1,21 e 301,42 $\pm$ 4,12 mOsm/kgH₂O respectivamente) do que as fêmeas nas mesmas idades respectivamente (300,8 $\pm$ 3,33 e 294,5 $\pm$ 6,02 mOsm/KgH₂O; $p < 0,05$). Não se observaram diferenças segundo o sexo nas diferentes idades nos animais submetidos a desidratação (Fig 2D).

Figura 2: Osmolalidade plasmática das fêmeas (A), machos (B), animais controles (C) e animais que foram submetidos a privação hídrica (D) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 24 horas, _____ $p < 0,05$ entre as idades indicadas para fêmeas controles, $p < 0,05$ entre as idades indicadas para fêmeas privadas, _._._. $p < 0,05$ entre as idades indicadas para machos controles. O n segundo a ordem cronológica de idade para as fêmeas controles e submetidas a privação hídrica foi respectivamente: 12, 12, 12, 10, 8 e 13, 13, 13, 12, 8; para os machos controles e privados foi: 19, 18, 14, 8, 5 e 19, 12, 11, 11, 9.

Na idade de 6 meses tanto as fêmeas normoidratadas como as que se encontravam em restrição hídrica apresentaram a menor concentração de sódio plasmático (124,17 $\pm$ 12,97 e 133,38 $\pm$ 10,44 mEq/L respectivamente; $p < 0,05$; Fig 3 A

e D). Não foi observada diferenças entre as condições de hidratação em ambos sexos, nem diferença segundo o sexo nos controles (Fig 3 A, B e C). No grupo dos privados, só aos seis meses o valor plasmático de sódio foi menor nas fêmeas do que os machos (138,63 $\pm$ 9,09 mEq/L; $p < 0,05$; Fig 3 D).

Figura 3: Sódio plasmático das fêmeas (A), machos (B), animais controles (C) e animais que foram submetidos a privação hídrica (D) nas idades de 2, 6, 9, 12 e 18 meses. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$, comparando os animais controles com os que estiveram submetidos a desidratação de 24 horas, _____ $p < 0,05$ entre as idades indicadas para fêmeas controles, $p < 0,05$ entre as idades indicadas para fêmeas privadas. O n segundo a ordem cronológica de idade para as fêmeas controles e submetidas a privação hídrica foi respectivamente: 9, 12, 12, 11, 8 e 11, 13, 13, 12, 9; para os machos controles e privados foi: 16, 18, 14, 8, 5 e 10, 11, 11, 11, 10.

Ratos submetidos a privação hídrica de 48 horas

A porcentagem de hematócrito nos ratos com 3 meses submetidos a privação hídrica (54,00 $\pm$ 1,77%) foi maior do que os ratos adultos hidratados (47,80 $\pm$ 2,14%; $p < 0,05$) e dos machos idosos desidratados (48,58 $\pm$ 5,12%; $p < 0,05$; Fig 4A). Por outro lado, as fêmeas adultas (51,00 $\pm$ 2,25%) com restrição hídrica tiveram a porcentagem de hematócrito maior do que as fêmeas adultas hidratadas (45,92 $\pm$ 1,38 %; $p < 0,05$; Fig 4B).

Ambos, ratos adultos hidratados (47,80 $\pm$ 2,14%) e desidratados (54,00 $\pm$

1,77%) apresentaram maior porcentagem de hematócrito do que as fêmeas adultas normoidratadas ($45,92 \pm 1,38\%$) e na condição de restrição hídrica ($51,00 \pm 2,25\%$; Fig 4C). Nos animais idosos, não foi observado diferenças nem por sexo nem por estado de hidratação na porcentagem de hematócrito (Fig 4D).

Figura 4: Hematócrito de machos (A) e fêmeas (B) controles e na condição de privação hídrica, com 3 meses (C) e 18 meses de idade (D) segundo o sexo e a condição de hidratação. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para os machos e fêmeas de 3 e 18 meses controles foram respectivamente os seguintes: 15, 15, 12 e 10; e para os submetidos a privação hídrica foram respectivamente os seguintes: 12, 15, 12 e 10.

Na figura 5 se observa que todos animais, exceto os machos de 18 meses, que foram submetidos a privação hídrica apresentaram a osmolalidade plasmática maior do que os animais hidratados. Porém, as fêmeas de 3 meses ($310,40 \pm 4,00$ mOsm/KgH₂O) com restrição hídrica tiveram maior osmolalidade plasmática do que as fêmeas desidratadas de 18 meses ($303,18 \pm 1,94$ mOsm/KgH₂O; $p < 0,05$; Fig 5 B).

Além disso, se observou que ratos de 3 meses normoidratados ($300,67 \pm 2,50$ mOsm/KgH₂O) tinham a osmolalidade plasmática maior do que as fêmeas de 3 meses hidratadas ($298,5 \pm 2,79$ mOsm/KgH₂O; $p < 0,05$), e os machos de 18 meses desidratados ($307,75 \pm 4,69$ mOsm/KgH₂O) apresentaram a osmolalidade plasmática maior do que as fêmeas de 18 meses submetidas a restrição hídrica ($303,18 \pm 1,94$

mOsm/KgH₂O; $p < 0,05$; Fig 5 C e D).

Figura 5: Osmolalidade plasmática de machos (A) e fêmeas (B) controles e na condição de privação hídrica, com 3 meses (C) e 18 meses de idade (D) segundo o sexo e a condição de hidratação. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para os machos e fêmeas de 3 e 18 meses controles foram respectivamente os seguintes: 15, 14, 12 e 12; e para os submetidos a privação hídrica foram respectivamente os seguintes: 12, 10, 12 e 11.

Segundo se apresenta na figura 6 os animais submetidos a restrição hídrica apresentaram maior concentração plasmática de sódio do que os animais hidratados. Além disso, se encontrou que tanto os machos ($140,50 \pm 1,17$ mEq/L) como as fêmeas de 18 meses ($139,69 \pm 1,55$ mEq/L) normoidratadas tinham o sódio plasmático maior do que os machos ($139,06 \pm 1,39$ mEq/L; $p < 0,05$) e fêmeas ($138,12 \pm 1,63$ mEq/L; $p < 0,05$) hidratadas de 3 meses. As fêmeas de 3 meses submetidas a privação hídrica ($147,60 \pm 2,03$ mEq/L) apresentaram maior concentração plasmática de sódio do que as fêmeas de 18 meses na condição de privação hídrica ($145,46 \pm 1,56$ mEq/L; $p < 0,05$; Fig 6 A e B).

Também foi observado que fêmeas adultas desidratadas ($147,60 \pm 2,03$ mEq/L) apresentaram maior concentração de sódio plasmático do que os machos adultos desidratados ($146,33 \pm 1,59$ mEq/L; $p < 0,05$; Fig 6 C).

Figura 6: Sódio plasmático de machos (A) e fêmeas (B) controles e na condição de privação hídrica, com 3 meses (C) e 18 meses (D) segundo o sexo e a condição de hidratação. Os dados são apresentados como médias $\pm$ E.P.M, _____ $p < 0,05$ entre os grupos indicados. O n para os machos e fêmeas de 3 e 18 meses controles foram respectivamente os seguintes: 16, 16, 12 e 13; e para os submetidos a privação hídrica foram respectivamente os seguintes: 15, 15, 12 e 13.