

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Nicolly Paz Ferreira Marques

**Diferenças comportamentais de ratos machos espontaneamente hipertensos –
SHR – comparados a normotensos – Wistar Kyoto**

Porto Alegre

2024

Nicolly Paz Ferreira Marques

**Diferenças comportamentais de ratos machos espontaneamente hipertensos –
SHR – comparados a normotensos – Wistar Kyoto**

Trabalho de Conclusão de Curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas do Instituto
de Biociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gome
de Souza.

Coorientadora: Dr^o. Francieli Rohden.

Porto Alegre

2024

Nicolly Paz Ferreira Marques

**Diferenças comportamentais de ratos machos espontaneamente hipertensos –
SHR – comparados a normotensos – Wistar Kyoto**

Trabalho de Conclusão de Curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas do Instituto
de Biociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gome
de Souza.

Coorientadora: Dr^o. Francieli Rohden.

Aprovado em 8 de fevereiro de 2024 pela banca examinadora:

Roberto Farina de Almeida
Prof. na Universidade Federal de Pelotas

Débora Guerini de Souza
Pós-Dr^o. do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS

Diogo Onofre Gomes de Souza
Prof. na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Francieli Rohden
Pós-Dr^o. do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Paz Ferreira Marques, Nicolly
Diferenças comportamentais de ratos machos
espontaneamente hipertensos - SHR - comparados a
normotensos - Wistar Kyoto / Nicolly Paz Ferreira
Marques. -- 2024.
62 f.
Orientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Coorientadora: Francieli Rohden.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Hipertensão. 2. Ratos SHR. 3. Ratos Wistar
Kyoto. 4. Memória. 5. Ansiedade. I. Onofre Gomes de
Souza, Diogo, orient. II. Rohden, Francieli,
coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ciência, caso você não saiba, não é feita por apenas um indivíduo. Sou uma pessoa muito feliz por saber que pude contar com MUITA gente, pessoas que não me deviam absolutamente nada, mas estavam lá para me estender a mão e fazer esse trabalho se tornar possível. Muitas pessoas foram necessárias para tornar esse trabalho real. Eu agradeço ao meu grupo de pesquisa por todo carinho e descontração ao longo dessa cansativa e penosa etapa. Um beijo especial a minha coorientadora Francieli Rohden, por me mostrar a luz no fim do túnel e por muito mais, temos história, ein!? Um crescimento pessoal e profissional com um tempero todo especial seu, obrigada queridona.

Tenho o prazer de dizer que muitas pessoas e atitudes que vi, vivi e aprendi, dentro do ambiente acadêmico, levarei para a vida.

Nossa história começou como colegas de laboratório, e posso dizer, você foi uma peça fundamental nesse trabalho. No momento que mais precisei, você se fez presente, e sempre veio para somar. Obrigada por sua leveza, as bobagens, risadas, lamentos e alegrias... O que tornou tudo muito mais divertido, apesar de tantos, mas tantos problemas. Obrigada, Gustavo Torguato Ribeiro, por tanto! Um amigo que levo comigo, da universidade para a vida...

Outra grande surpresa positiva, minto, MUITO positiva, foi ter um professor tão sentimento e coração como é o professor Diogo Onofre, meu orientador. Um cara incrível, de coração gigantesco, abraçou todas as minhas ideias e me incentivou, desde o início a ir além. Obrigada por fazer o possível e impossível por esse estudo, por mim.

Um agradecimento especial a Fabíola Schons Meyer, a melhor bioterista que o Departamento de Bioquímica poderia ter. Muito obrigada, Fabi, por me socorrer sempre, por todo o final caótico e cansativo, que seria muito pior sem você. Você é demais!!!

Não é fácil entrar em uma universidade pública, não é fácil se manter em uma universidade pública, não é fácil sair de uma universidade pública. Tudo só foi possível porque tenho uma família incrível. Muito obrigada, dinda Na e dinda Pri, por me incentivarem desde pequena os caminhos dos estudos e, conseqüentemente, da faculdade. Obrigada a minha sogra por todos os aprendizados ao longo desses anos.

E um OBRIGADA grande, gigante, para a minha mãe. Minha guerreira, que apesar dos pesares fez e faz de tudo por mim. Eu te amo, mamis. E óbvio a minha vovis, que teve um papel tão grande na minha criação quanto a minha mãe. Amo, vocês!

Obrigadaaaaa, amigaaaaa!!! Por todo o chororo que você precisou aguentar e estava lá, firme e forte me ajudando em tudo. Obrigada, Karen Wendler, minha adevogada.

Dizem que o melhor fica para o final, então... Finalizo agradecendo ao meu companheiro de vida, de jornada, de história, obrigada por segurar as pontas, por acreditar em mim e me incentivar quando tudo parecia dar errado — e juro, pareceu! Sem você nada, absolutamente nada, sairia do papel. Acredito na ideia de que na vida temos pessoas pilares, e você é o meu maior pilar, é a viga mais forte da minha casa, o abraço mais quentinho na noite mais fria, obrigada por ser você, meu pandudinho — kkk —, minha vida! O homem que aprendeu ciência juntinho comigo, sem estar fazendo ciência, haha.

Muito e muito abraços e beijos a todos vocês.

Tenham a certeza de que fizeram diferença na minha vida.

RESUMO

Introdução: A hipertensão arterial sistêmica (HAS) afeta um a cada três adultos no mundo, cuja metade dos indivíduos que a possuem não tem ciência de sua condição. A HAS ocorre quando há um aumento crônico na pressão arterial acometendo um esforço cardiovascular, o que, por sua vez, danifica órgãos alvos: coração, rins, cérebro. E pode causar ataque cardíaco, danos renais entre outros problemas de saúde. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são comumente utilizados na literatura como modelo para HAS, sendo Wistar Kyoto (WKY) seu controle normotenso. Sabemos, através da literatura consolidada, que o grupo SHR é hipertenso, porém as diferenças entre os grupos podem ir além da diferença entre as pressões arteriais, podendo chegar a alterações comportamentais. **Objetivo:** Avaliar, para além da HAS, possíveis diferenças comportamentais entre ratos SHR e WKY. **Métodos:** Utilizamos ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) de 242 a 290 dias, (n=15) e ratos machos normotensos (WKY) de 232 a 319 dias, (n=16). Foi iniciado os experimentos com o Campo aberto (CA), para avaliar a memória de curta duração de habituação ao ambiente. Depois de 90min, as sessões de reconhecimento de objetos (RO), para avaliar a memória de curta e longa duração de reconhecimento de objeto. O Treino possuía dois objetos idênticos (OFA e OFB). Percorridos 90min, inicia a sessão Tarefa, onde foi trocado um objeto familiar (OFB) por um objeto novo (NO). Passadas 24h, inicia a Tarefa 24h, onde houve uma mudança espacial do NO que passa a ser chamado de objeto deslocado (OD). Após duas semanas, inicia a sessão de claro-escuro (CE), que mede a ansiedade. **Resultados:** No CA, o grupo SHR demonstrou ter memória de curta duração de habituação ao ambiente e apresentou comportamento menos ansioso do que o grupo WHY. No RO, os grupos demonstraram não possuírem memória de curta e longa duração de reconhecimento de objeto. No CE, o grupo SHR demonstrou ser menos ansioso do que WHY. **Conclusão:** O grupo WKY possui memória de curta duração de habituação do ambiente. O grupo SHR é menos ansioso. E, possivelmente, o RO não seja o melhor experimento para verificar memória de curta e longa duração para esse modelo experimental. Acreditamos que o presente estudo possa servir de base metodológica e auxiliar a produção de novos estudos sobre a HAS, para uma escolha mais assertiva dos métodos.

Palavras-chave: ratos SHR, hipertensão, memória, ansiedade.

ABSTRACT

Introduction: Systemic arterial hypertension (SAH) affects one in three adults worldwide, with half of the individuals who have it unaware of their condition. SAH occurs when there is a chronic increase in blood pressure affecting cardiovascular effort, which in turn damages target organs: heart, kidneys, brain. It can cause heart attack, kidney damage, among other health problems. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are commonly used in the literature as a model for SAH, with Wistar Kyoto (WKY) being their normotensive control. We know, through consolidated literature, that the SHR group is hypertensive, but the differences between the groups can go beyond the difference between blood pressures, potentially leading to behavioral changes. **Objective:** To evaluate, beyond SAH, possible behavioral differences between SHR and WKY rats. **Methods:** We used male spontaneously hypertensive rats (SHR) aged 242 to 290 days, (n=15) and male normotensive rats (WKY) aged 232 to 319 days, (n=16). The experiments were started with the Open Field (CA), to evaluate short-term memory of habituation to the environment. After 90min, the object recognition (RO) sessions were initiated, to evaluate short and long-term memory of object recognition. The Training had two identical objects (OFA and OFB). After 90min, the Task session started, where a familiar object (OFB) was replaced by a new object (NO). After 24h, the 24h Task started, where there was a spatial change of the NO which became known as the displaced object (OD). After two weeks, the light-dark session (CE) started, which measures anxiety. **Results:** In the CA, the SHR group demonstrated short-term memory of habituation to the environment and exhibited less anxious behavior than the WKY group. In the RO, the groups showed no short and long-term memory of object recognition. In the CE, the SHR group demonstrated being less anxious than WKY. **Conclusion:** The WKY group has short-term memory of habituation to the environment. The SHR group is less anxious. And possibly the RO is not the best experiment to verify short and long-term memory for this experimental model. We believe that the present study can serve as a methodological basis and assist in the production of new studies on SAH, for a more assertive choice of methods.

Keywords: SHR rats, hypertension, memory, anxiety.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Hipertensão Arterial Sistêmica.....	6
1.2. Hipertensão Arterial Sistêmica: seus riscos.....	6
1.3. Hipertensão Arterial Sistêmica: Modelo Animal.....	7
2. OBJETIVO GERAL.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Animais.....	8
3.2. Campo Aberto (CA).....	8
3.3. Reconhecimento de Objetos (RO).....	9
3.4. Claro-escuro (CE).....	10
3.5. Análise estatística.....	11
3.6. Coleta do material biológico.....	11
4. JUSTIFICATIVA METODOLÓGICA.....	12
4.1. Não averiguação da PA.....	12
5. RESULTADOS.....	13
5.1. <i>Campo Aberto</i>	13
5.2. <i>Tempo na zona central e periférica</i>	17
5.3. <i>Distância na zona central e periférica</i>	21
5.4. <i>Reconhecimento de Objetos</i>	29
5.5. <i>Claro-escuro</i>	32
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	37
8. PERSPECTIVAS.....	37
9. REFERÊNCIAS.....	38
10. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão Arterial Sistêmica

A Pressão Arterial Sistêmica (PA) é a força exercida pelo sangue nas artérias, resultando na circulação do sangue por todo o nosso corpo¹. A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), conhecida popularmente por “pressão alta”, é definida como aumento da pressão arterial: pressão sistólica, pressão nos vasos sanguíneos após a contração do coração, maior ou igual a 140mmHg e pressão diastólica, após o relaxamento da musculatura cardíaca, maior ou igual a 90mmHg².

Nos últimos 30 anos, comparativo de 1990 até 2019, houve um aumento de quase duas vezes mais o número de casos, entre pessoas de 30 e 79 anos, com HAS. Esse número deve-se principalmente pelo crescimento e envelhecimento populacional, e maus hábitos de vida³.

A HAS é uma doença grave, atingindo mais de 38 milhões de brasileiros, causando a morte de 400 pessoas por dia. Em 2019, a HAS foi responsável por 110,5 óbitos a cada 100 mil brasileiros^{6 e 7}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2023, publicou um levantamento sobre a hipertensão, dizendo que um a cada três pessoas adultas em todo o mundo possuíam a HAS e metade dos indivíduos não tinham conhecimento sobre sua condição, tão pouco fazem o manejo da doença⁵⁰.

1.2. Hipertensão Arterial Sistêmica: seus riscos

Segundo o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), de 2021⁸, junto com o diabetes, a hipertensão foi considerada o principal fator de risco à saúde do país, e uma das principais causas de morte e doenças em todo o mundo⁹.

Por se tratar de uma doença tácita, quando os sintomas aparecem podem ser causados por um aumento acentuado da pressão ou quando a condição já se encontra em um nível mais avançado¹⁰, podendo ser tarde demais para reverter os danos acarretados pela doença, levando a possíveis danos cognitivos, e até mesmo a morte.

O grande fator de alerta para o cuidado com a hipertensão são as lesões de órgãos alvos. A HAS exige um esforço exacerbado do coração para que o sangue possa ser distribuído corretamente para o corpo, o que aumenta a propensão da

ocorrência de acidente vascular encefálico (AVE), enfarto agudo do miocárdio, aneurisma arterial, insuficiência renal e doenças cardiovasculares (DC)¹¹.

A HAS é responsável por mais de 50% das DCs, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) de 2022¹², e a idade que o paciente se encontra no início da hipertensão se mostrou comumente relevante para o prognóstico de futuras DCs¹³.

Além de ser uma doença silenciosa acaba sobre carregando alguns órgãos como o coração, rins e cérebro, que por sua vez, acarreta doenças derivadas da HAS, como por exemplo o acidente vascular encefálico (AVE), insuficiência cardíaca, danos renais, entre outras condições⁵⁰.

A combinação dos fatores, que afeta a vida humana, define a qualidade de vida dessa pessoa em uma sociedade^{14,15}. Um dos fatores que afetam a qualidade de vida é a saúde física, mental, psicológica e emocional de um indivíduo, sendo assim, a HAS pode alterar diretamente a vida do indivíduo, seja de maneira mais severa ou comedida.

1.3. Hipertensão Arterial Sistêmica: Modelo Animal

Existe um modelo animal específico para essa doença. Os ratos das linhagens espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats* - SHR) são considerados o melhor modelo animal para mimetizar a HAS. Eles são geneticamente desenvolvidos a partir do cruzamento seletivo de ratos normotensos, Wistar Kyoto (WKY), utilizados como controle normal para a PA³⁵.

Esse modelo foi desenvolvido em 1963, no Japão, por Okamoto e seus colegas, através da endogamia seletiva, até alcançar uma uniformidade de animais³⁶, e é abrangentemente utilizado como modelo genético de HAS, que foi criada com a proposta de mimetizar a HAS em humanos, sendo este um modelo animal de fácil disponibilização³⁷.

Para além da HAS, o estudo tem como intenção averiguar outras possíveis diferenças entre o grupo SHR e WKY, para além da PA. Para isso, fizemos os seguintes experimentos: campo aberto, reconhecimento de objetos e claro-escuro.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis diferenças comportamentais entre ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) além da hipertensão arterial sistêmica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para este estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seu controle ratos normotensos (WKY) amplamente utilizados e aceitos na literatura^{42,43,44,45,46,47}. Estando a literatura consolidada sobre os animais SHR serem hipertensos, decidimos permanecer com o estudo, mesmo não tendo sido possível fazer testes para a averiguação da HAS.

Utilizamos ratos machos SHR, com idade entre 232 e 319 dias (n=16), tendo como controle normotenso ratos WKY, com idade entre 242 e 290 dias (n=15), cujo número de aprovação do projeto no comitê de ética é “44046”.

Adquirimos os animais do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde os mantivemos até chegarem na idade desejada. Eles foram separados em grupos de 2 a 3 animais por caixa de policarbonato de 411x 340x 640 mm, e a troca de maravalha foi feita a cada 2 dias. A sala foi mantida com temperatura regulada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo de claro/escuro de 12 horas controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 19h). Os cuidados com animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Bioquímica – UFRGS.

Os animais foram divididos em 2 grupos: SHR e WKY.

3.2. Campo Aberto (CA)

Utilizando as propriedades exploratórias do rato, atividade locomotora e sua capacidade de habituar-se ao novo ambiente, avaliamos a memória de habituação ao ambiente, de curta duração⁵³.

Os animais foram levados para a sala do experimento e, antes de iniciar, ficaram ambientando de 20 a 30 minutos. O aparato consiste em uma caixa preta, contrastando com a cor do animal, de 50cm de comprimento x 50cm de largura x 50cm de altura, onde o roedor foi colocado centralmente e exposto por 10 minutos.

A memória de curta duração foi avaliada considerando a redução, em metros ao longo da sessão, do deslocamento do animal dentro do aparato. E o grau de ansiedade foi avaliado através da relação de distância e tempo na zona central e zona periférica.

Ao final da sessão, a caixa foi devidamente limpa com álcool 70%, para logo após ser posicionado outro animal.

A sessão foi gravada através de uma câmera acoplada acima do aparato, e os parâmetros foram registrados em um programa de gravação de vídeos. Depois, os vídeos foram avaliados utilizando o software ANY-Maze, e os gráficos e análises estatísticas (*unpaired t test* (para grupos paramétricos), *Mann Whitney test* (para grupos não paramétricos) e *2way ANOVA* (para comparação de um grupo inteiro com o outro) utilizando o GraphPad Prism 10.

3.3. Reconhecimento de Objetos (RO)

Transcorridos 90 minutos da sessão do CA, começamos a sessão de Reconhecimento de Objetos (RO). O objetivo era avaliar a capacidade que os animais tinham de discernir um objeto novo (NO) e um objeto deslocado espacialmente (OD) de um objeto familiar (OF), devidamente apresentado ao animal. Através do tempo de exploração concedido a cada objeto, avaliamos a memória de curta e longa duração de reconhecimento de objetos.

Começamos com o Treino, onde os animais foram expostos a dois objetos idênticos que chamamos de Objeto Familiar A (OFA) e Objeto Familiar B (OFB) por 10 minutos, com o objetivo de serem apresentados aos mesmos.

Passados 90 minutos após o final do treino, realizamos a primeira Tarefa, com duração de 10 minutos, onde trocamos o OFB por um Novo Objeto (NO), diferente do objeto apresentado para o roedor. Assim, avaliamos a memória de curta duração de reconhecimento do NO.

Ao final da tarefa, os animais voltaram para suas devidas salas e só retornaram para a sala do experimento no outro dia, passando pela fase de ambientação de 20 a 30 minutos, novamente.

Após a ambientação, iniciamos a Tarefa 24h, com duração de 10 minutos, onde alteramos espacialmente o NO, que passa a ser chamado de Objeto Deslocado (OD), com o objetivo de avaliar a memória de longa duração de reconhecimento do OD.

Consideramos comportamentos exploratórios os atos de cheirar, tocar e olhar o objeto com a cabeça próxima ao mesmo. Consideramos reconhecimento de um objeto quando o comportamento exploratório (tempo) é maior quando comparado à média teórica de 50/100 (50%).

Utiliza-se o mesmo aparato do CA, e, ao final de cada experimento, mantém-se o mesmo padrão de limpeza com a solução de álcool 70%, para logo após ser posicionado outro animal.

As sessões foram gravadas por uma câmera acoplada acima do aparato, e os parâmetros registrados em um programa de gravação de vídeos. Depois, os vídeos foram avaliados utilizando o software ANY-Maze, e os gráficos e análises estatísticas (*One sample t test* com média hipotética de 50) utilizando o GraphPad Prism 10.

3.4. Claro-escuro (CE)

O protocolo Claro-escuro é baseado na razão da exploração dos roedores aos ambientes claro (aversivo) e escuro, permitindo avaliar o comportamento ansioso. Um animal mais ansioso, tende a ficar na caixa escura, e um animal menos ansioso, na caixa clara.

Os animais foram levados para a sala do experimento e, antes de iniciar, ficaram ambientando de 20 a 30 minutos com luminosidade mediana (± 60 lux), única iluminação para o experimento.

O aparato para a sessão consiste em 2 caixas, de cores distintas, conectadas por uma abertura, onde o animal pode transitar. Uma caixa é preta (ambiente normalmente preferido), fechada, não visível, de 36cm de comprimento x 40cm de largura x 20cm de altura. E a outra é clara (aversiva), “aberta”, possui uma tampa translúcida por onde permite a averiguação dos resultados, de 44cm de comprimento x 40cm de largura x 20cm de altura.

O roedor é colocado no centro da caixa clara e deixado para explorar livremente a arena durante 5 minutos, onde foram analisados os seguintes parâmetros: 1) quanto tempo o animal leva para sair pela primeira vez da caixa clara; 2) número de avaliação de risco de entrar na caixa clara (esticando a cabeça na direção do compartimento e ficando no limite entre as duas caixas); 3) número de entradas na caixa clara; 4) número de *rearings* praticadas pelo animal (levantar as patas dianteiras com objetivo de explorar) na caixa clara; 5) tempo que o animal permanece na porção clara do aparato.

Ao final do experimento, a caixa é devidamente limpa com álcool 70%, para logo após ser posicionado outro animal.

A sessão foi gravada por uma câmera acoplada acima do aparato, e os parâmetros registrados em um programa de gravação de vídeos. Depois, os vídeos

foram assistidos pelo pesquisador que cronometrou manualmente e anotou os parâmetros averiguados. Os gráficos e análises estatísticas (*unpaired t test* (para grupos paramétricos) e *Mann Whitney test* (para grupos não paramétricos)) utilizando o GraphPad Prism 10.

3.5. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad prism 10. Para averiguar a normalidade dos grupos foi utilizado o teste *Normality and Lognormality tests*, levando em consideração os resultados do *Shapiro-Wilk test*. Para o CA foram utilizados os testes: *unpaired t test* (para grupos paramétricos), *Mann Whitney test* (para grupos não paramétricos) e *2way ANOVA* (para comparação de um grupo inteiro com o outro). Para o RO foi utilizado o teste *One sample t test* com média hipotética de 50. E para o CE foram utilizados os testes: *unpaired t test* (para grupos paramétricos) e *Mann Whitney test* (para grupos não paramétricos).

Os dados são relatados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ou através do símbolo “ns” ($p > 0,05$). Foram realizados 2 métodos para a identificação dos outliers: 1) através de teste estatístico no GraphPad prism 10 (*Identify outliers* método *ROUT* ($Q=1\%$)) (tt); e 2) quando o ponto era 3 vezes maior ou menor do que a média ($3x$).

3.6. Coleta do material biológico

Após todos os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Colocamos o animal anestesiado no aparelho estereotáxico e, com o auxílio de uma agulha de insulina 50 UI, coletamos líquido diretamente da cisterna magna e colocamos em um Eppendorf, que foi centrifugado a 1000g por 1 min, e o sobrenadante, coletado e congelado. Amostras contaminadas ou hemolisadas foram descartadas.

Depois, com uma seringa de 5ml com uma agulha 25x7 mm, coletamos sangue diretamente do coração do animal. Dividimos metade do material para tubos de sangue com EDTA (anticoagulante), para plasma e, para tubos de sangue com coagulante, para soro. Deixamos descansando por 10 minutos, após, centrifugamos em 1000g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e congelados.

Feitas as 2 coletas iniciais, utilizamos isoflurano 5% para garantir uma anestesia mais profunda, evitando o sofrimento respiratório do animal, pela abertura do tórax,

que acarretou a morte dos animais por hipovolemia. Utilizamos uma bomba de perfusão, 14ml por minuto, conectada ao coração para fazer a troca do sangue residual por uma solução de PBS. Passados 100ml, foram coletados os órgãos: bloco cardiopulmonar aórtico (coração, pulmão, aorta), rins e fígado.

Os animais foram decapitados com uma guilhotina e o cérebro foi coletado. Metade do cérebro foi armazenada no PFA 4% e o restante foi congelado.

Todos os materiais recolhidos foram devidamente armazenados, visando a integridade dos conteúdos biológicos para um posterior estudo.

Apenas o rato em procedimento de anestesia e eutanásia foi levado para dentro da sala. A guilhotina foi limpa entre o uso de animais; as luvas do manipulador foram mantidas limpas; tudo isto para que os animais não tivessem qualquer tipo de estresse ou angústia devido ao odor de sangue.

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas capacitadas e treinadas, para que os animais não tivessem qualquer tipo de sofrimento, mantendo sempre o máximo de respeito e bem-estar.

4. JUSTIFICATIVA METODOLÓGICA

4.1. Não averiguação da PA

Não houve possibilidade de realizar mensurações da hipertensão arterial sistêmica (HAS) dos animais, devido a duas situações: 1) nosso equipamento para estas mensurações ficou completamente danificado, e 2) a única empresa que fabrica este equipamento no Brasil não tinha pronta entrega e a fabricação de um equipamento novo tardaria em muitas semanas o estudo.

Como a literatura atual demonstra que ratos SHR adultos são espontaneamente hipertensos^{42,43,44,45,46,47}, partimos das evidências da literatura para avaliarmos outras possíveis alterações comportamentais, comparando animais normotensos (WKY) e hipertensos SHR).

5. RESULTADOS

5.1. Campo Aberto

5.1. **Figura 1.** *Campo Aberto.* Avaliação da locomoção durante os 10 minutos da sessão. O grupo WKY reduziu sua locomoção ao longo da sessão. O grupo SHR reduziu sua locomoção do 1° ao 5° minuto, mas não manteve a queda até o final da sessão.

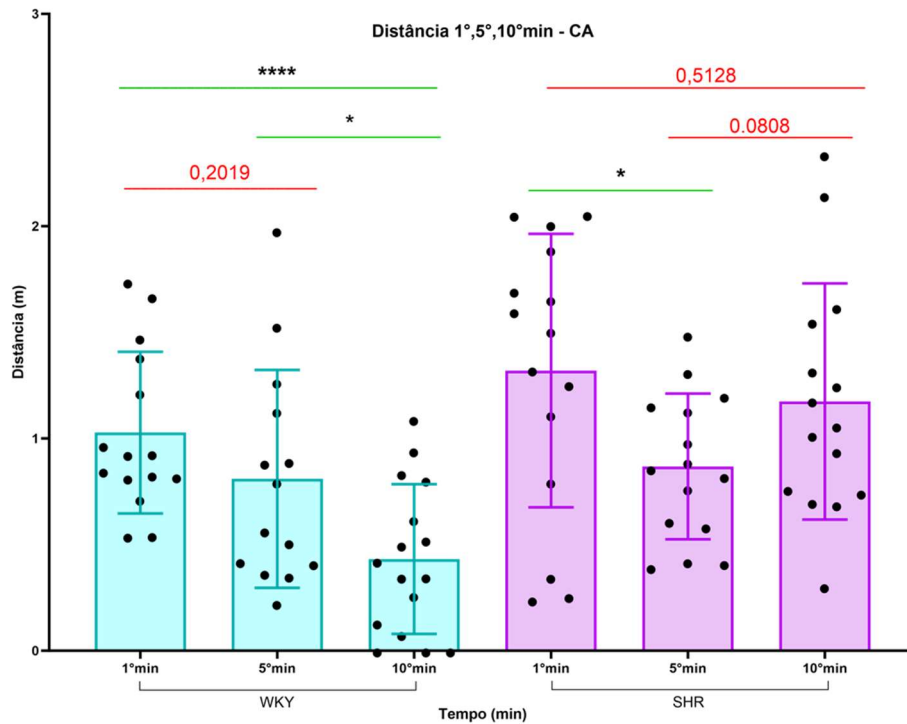


Figura 1. *Campo Aberto.* Distância percorrida no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foram retirados 3 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 1**).

5.1. **Figura 2.** *Campo Aberto.* Avaliação da locomoção durante o 1º minuto da sessão. Os 2 grupos não apresentaram diferença significativa na distância percorrida.

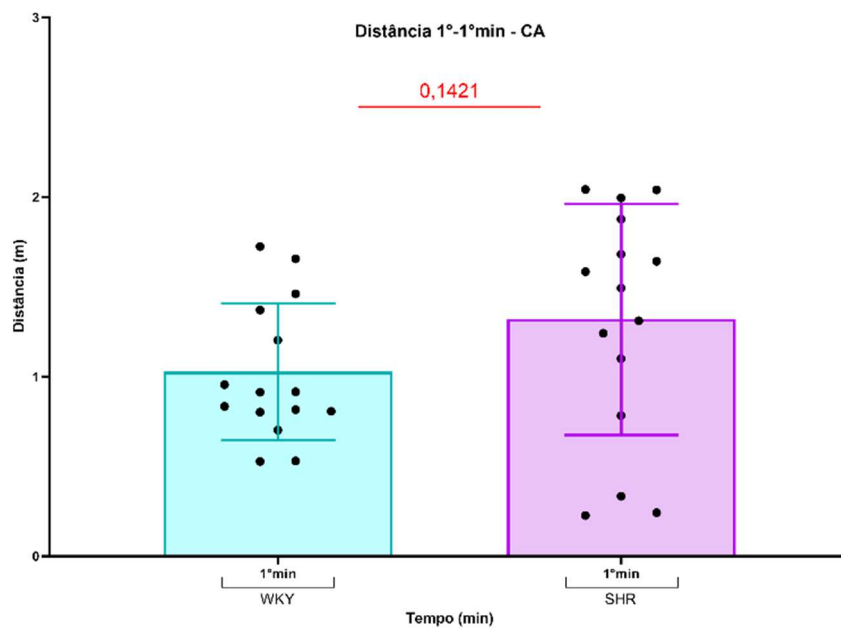


Figura 2. *Campo Aberto.* Comparação da distância percorrida no 1ºminuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. Valor não significativo está em vermelho ($p>0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado um ponto (*Outlier*) do grupo WKY (**Suplementar 2**).

5.1. **Figura 3.** *Campo Aberto.* Avaliação da locomoção total dos animais durante os 10 minutos da sessão. O grupo SHR demonstrou maior locomoção ao longo da sessão, do que o grupo WKY.

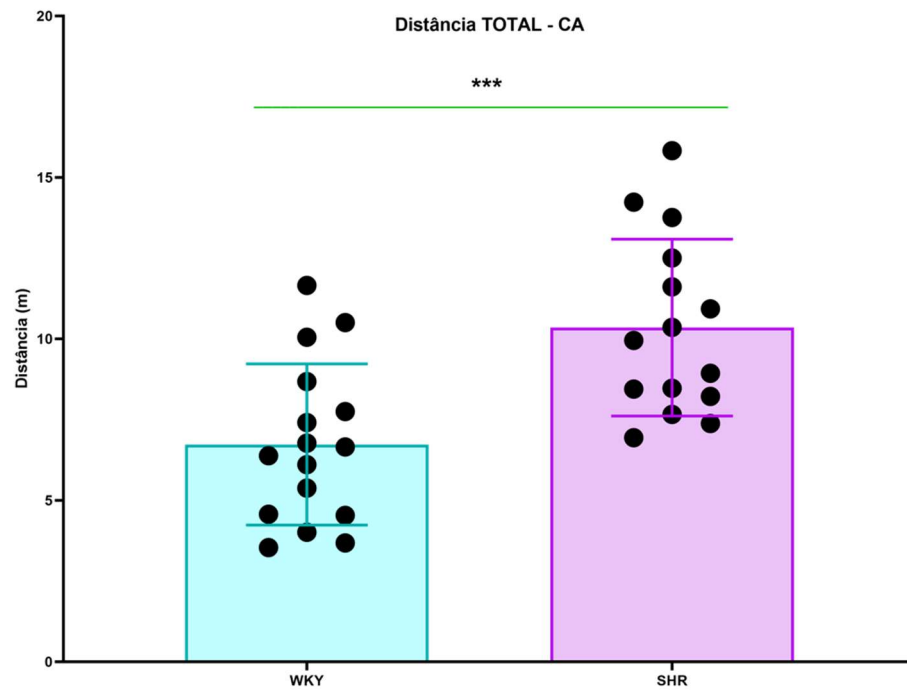


Figura 3. *Campo Aberto.* Distância total percorrida nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. *** $p < 0,001$. Cada ponto (*) representa um animal.

5.1. **Figura 4. Campo Aberto.** Locomoção dos animais, por idade, durante os 10 minutos da sessão. Não houve diferença significativa da distância percorrida e as respectivas idades dos animais nos dois grupos.

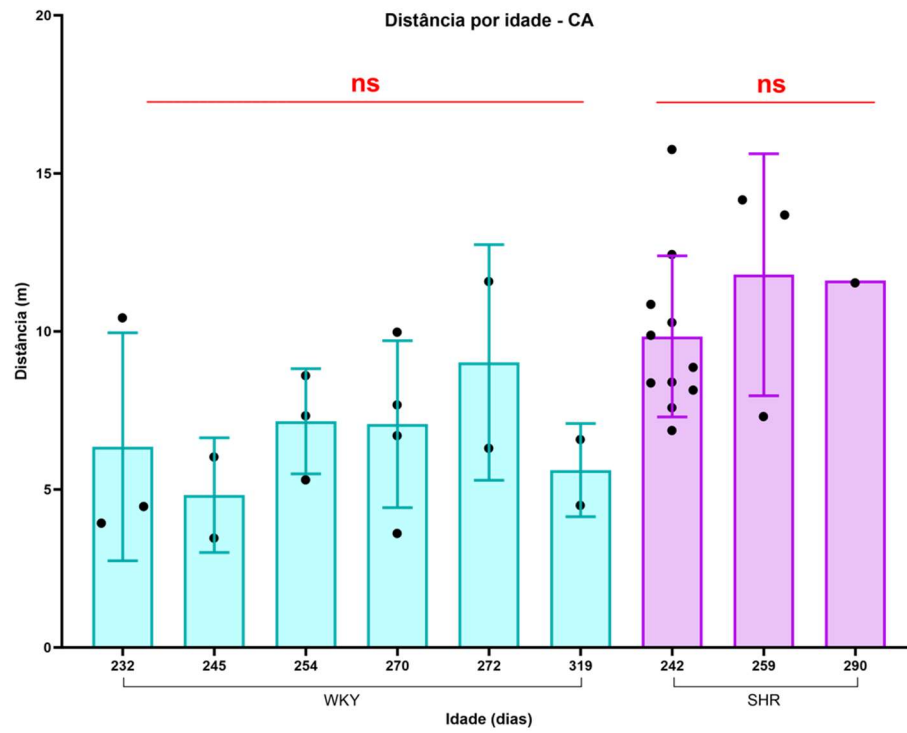


Figura 4. Campo Aberto. Relação entre a idade dos animais e a distância total percorrida pelos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando 2way ANOVA. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ns ($p>0,05$). Cada ponto (•) representa um animal.

5.2. Tempo na zona central e periférica

5.2. **Figura 5. Campo Aberto.** Avaliação do tempo em que os animais permaneceram na zona central no 1°, 5° e 10° minuto da sessão. O grupo WKY, ao decorrer da sessão, reduz o seu tempo de permanência na zona central. O grupo SHR não demonstrou diferença.

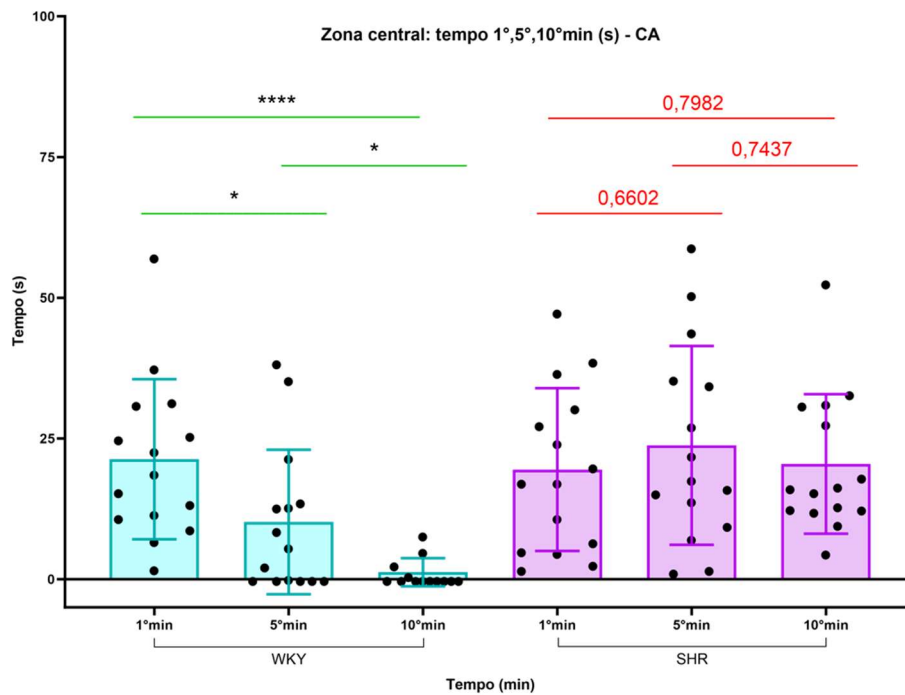


Figura 5. Campo Aberto. Tempo de permanência na zona central no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (*) representa um animal. Foram retirados 5 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 3**).

5.2. **Figura 6.** *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que os animais permaneceram na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto da sessão. O grupo WKY, ao longo da sessão, aumentou seu tempo de permanência na zona periférica. O grupo SHR não demonstrou diferença.

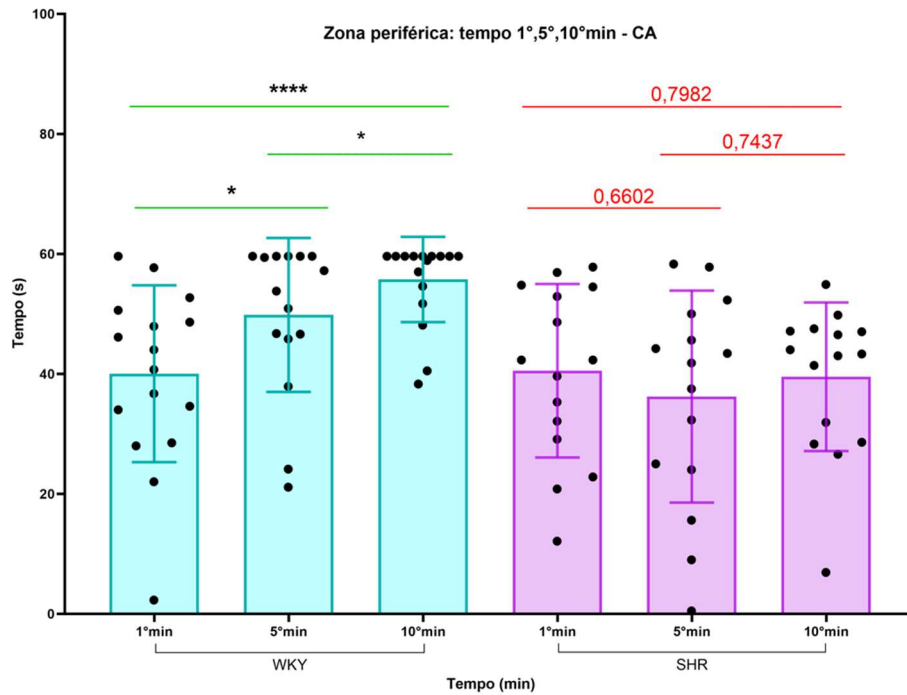


Figura 6. *Campo Aberto*. Tempo de permanência na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (*) representa um animal. Foram retirados 4 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 4**).

5.2. **Figura 7.** *Campo Aberto.* Avaliação do tempo total em que o animal permaneceu na zona central durante os 10 minutos da sessão. O grupo SHR permaneceu mais tempo na zona central, do que o grupo WKY.

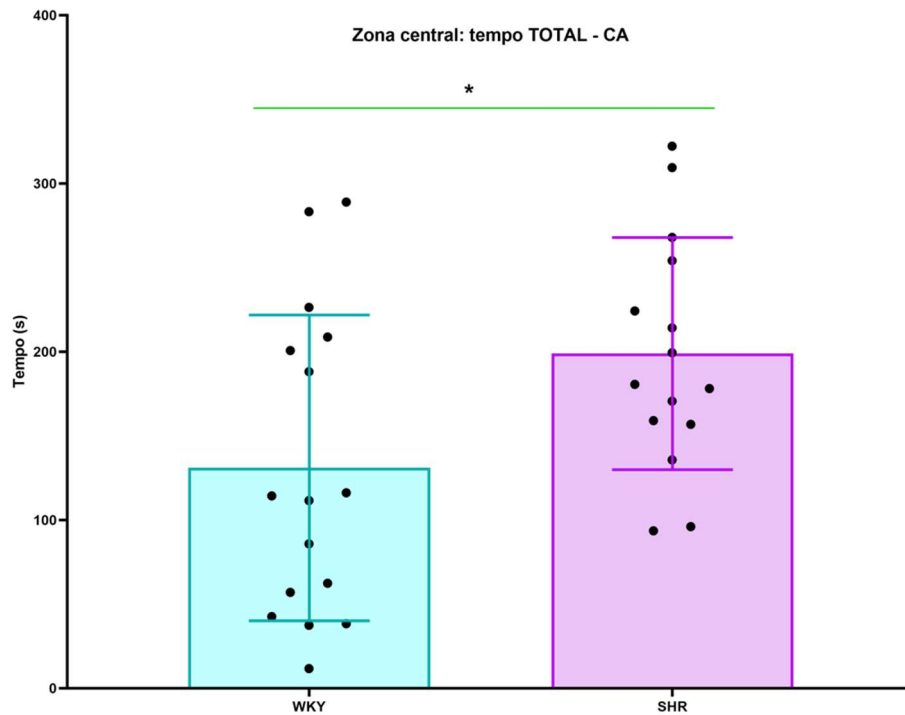


Figura 7. *Campo Aberto.* Tempo total de permanência na zona central nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Cada ponto (•) representa um animal.

5.2. **Figura 8.** *Campo Aberto*. Avaliação do tempo total em que o animal permaneceu na zona periférica durante os 10 minutos da sessão. Os grupos apresentaram o mesmo tempo de permanência na zona periférica.

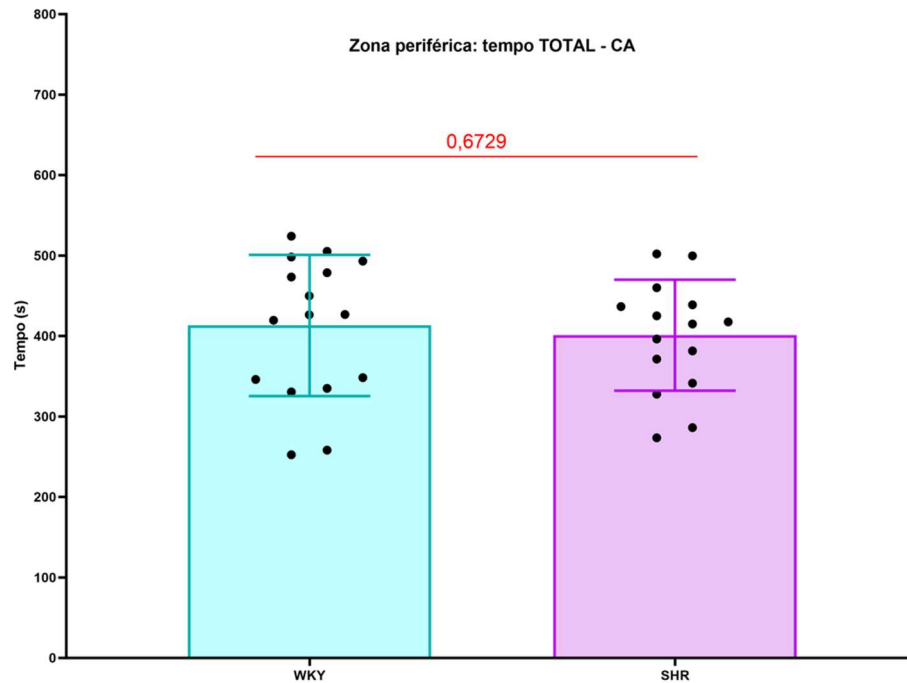


Figura 8. *Campo Aberto*. Tempo total de permanência na zona periférica nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. Valor não significativo está em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal.

5.3. Distância na zona central e periférica

5.3. **Figura 9.** *Campo Aberto.* Avaliação da distância que o animal percorreu na zona central no 1°, 5° e 10° minuto da sessão. O grupo WKY, ao longo da sessão, reduziu sua distância na zona central. O grupo SHR não demonstrou diferença.

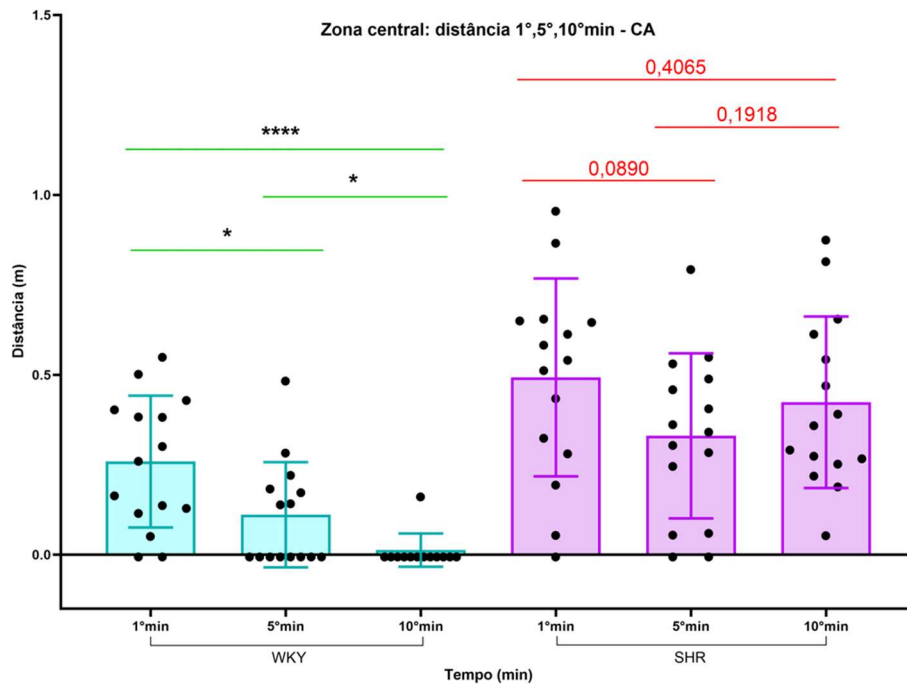


Figura 9. *Campo Aberto.* Distância percorrida na zona central no 1°, 5° e 10° minuto dos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foram retirados 7 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 5**).

5.3. **Figura 10. Campo Aberto.** Avaliação da distância que o animal percorreu na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto da sessão. O grupo WKY, ao longo da sessão, reduziu sua locomoção na zona periferia. O grupo SHR não demonstrou diferença.

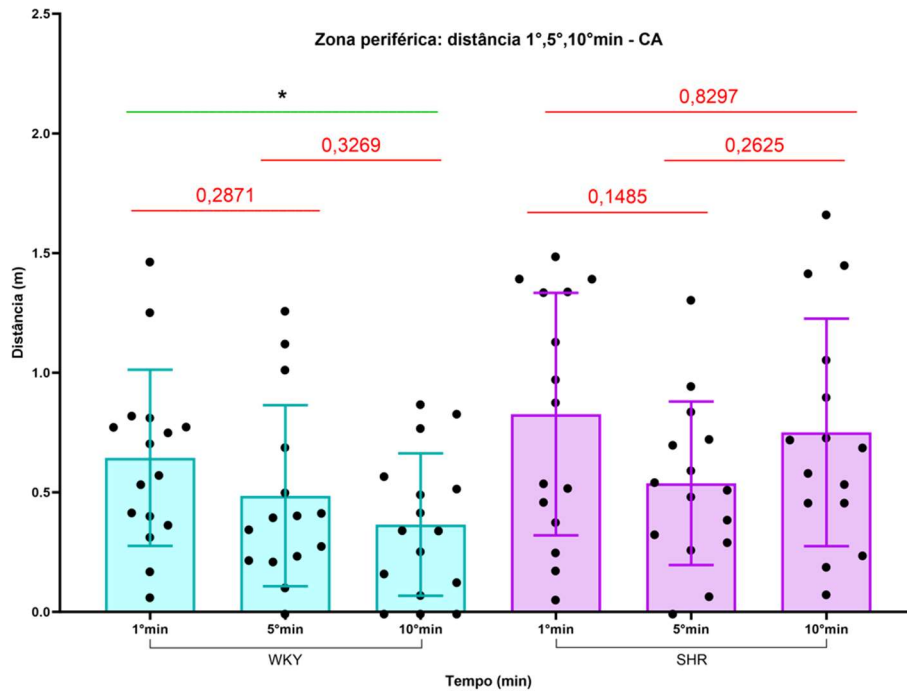


Figura 10. Campo Aberto. Distância percorrida na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto dos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (*) representa um animal. Foi retirado um ponto (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 6**).

5.3. **Figura 11.** *Campo Aberto.* Avaliação da distância total percorrida na zona central durante os 10 minutos do experimento. O grupo SHR apresentou maior locomoção na zona central, do que o grupo WKY.

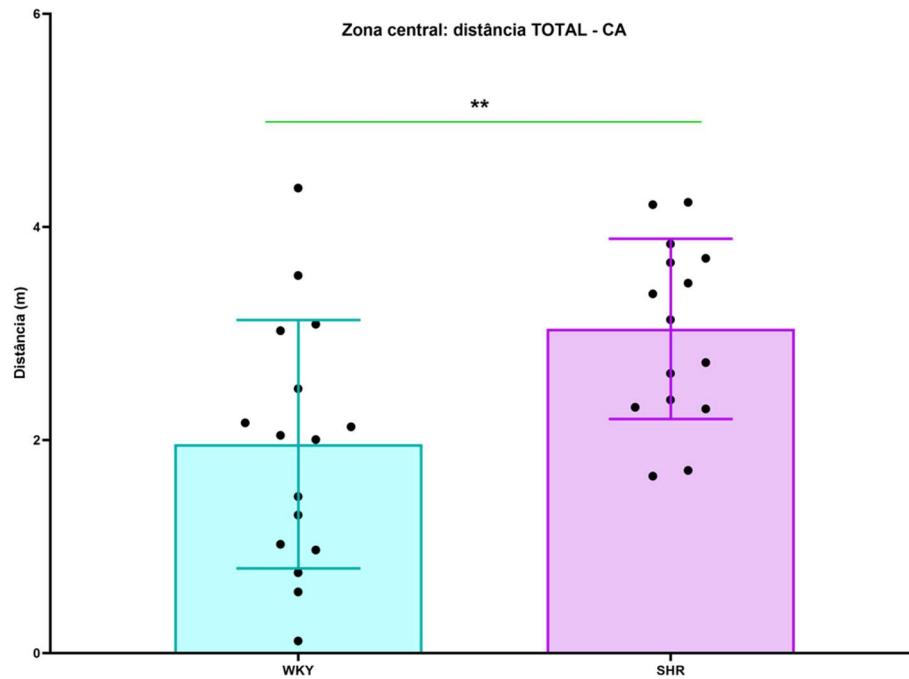


Figura 11. *Campo Aberto.* Distância total percorrida na zona central pelos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$. Cada ponto (•) representa um animal.

5.3. **Figura 12.** *Campo Aberto.* Avaliação da distância total percorrida na zona periférica durante os 10 minutos da sessão. O grupo SHR apresentou maior locomoção na zona periférica, do que o grupo WKY.

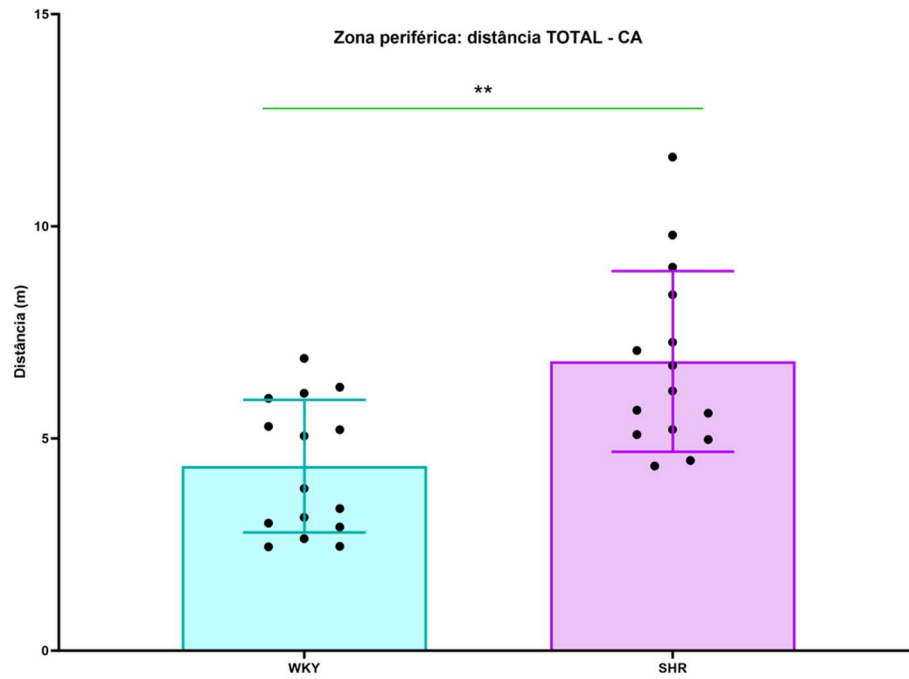


Figura12. *Campo Aberto.* Distância total percorrida na zona periférica pelos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$. Cada ponto (•) representa um animal.

5.3. **Figura 13.** *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que o animal permaneceu na zona central durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos. Os grupos não mostraram diferença no tempo no 1° minuto na zona central. No 5° e 10° minuto, o grupo WKY reduziu o seu tempo de permanência na zona central, o grupo SHR, não.

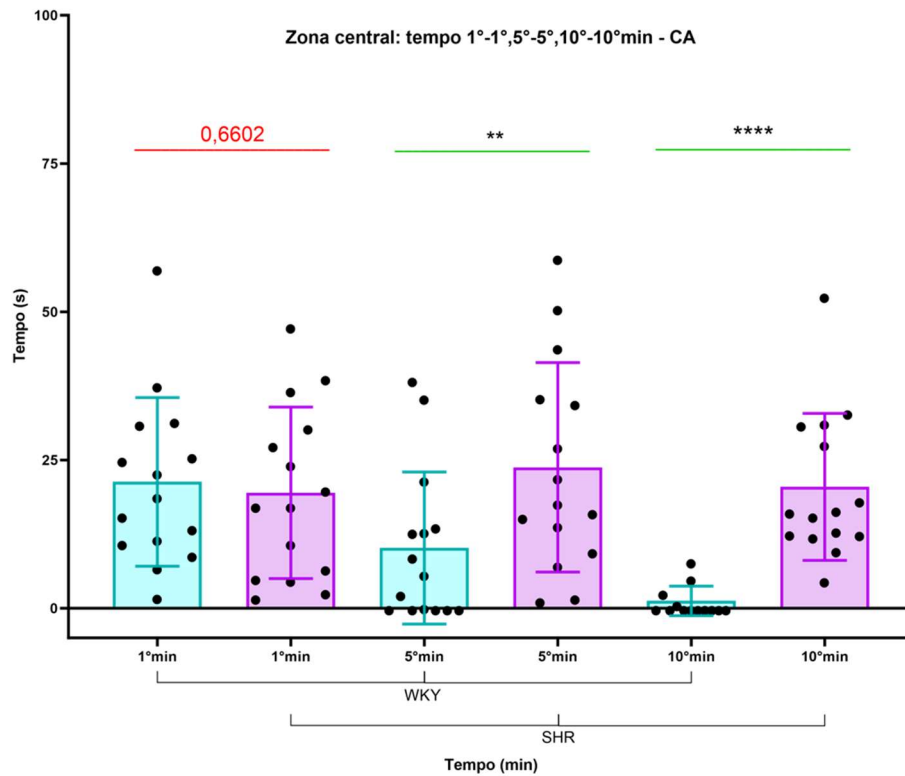


Figura 13. *Campo Aberto*. Comparação do tempo de permanência na zona central no 1°, 5° e 10° minuto pelos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foram retirados 5 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 7**).

5.3. **Figura 14. Campo Aberto.** Avaliação do tempo em que o animal permaneceu na zona periférica durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos. Os grupos não mostraram diferença no tempo no 1° minuto na zona periférica. No 5° e 10° minuto, o grupo WKY aumentou o seu tempo de permanência na zona periférica, o grupo SHR, não.

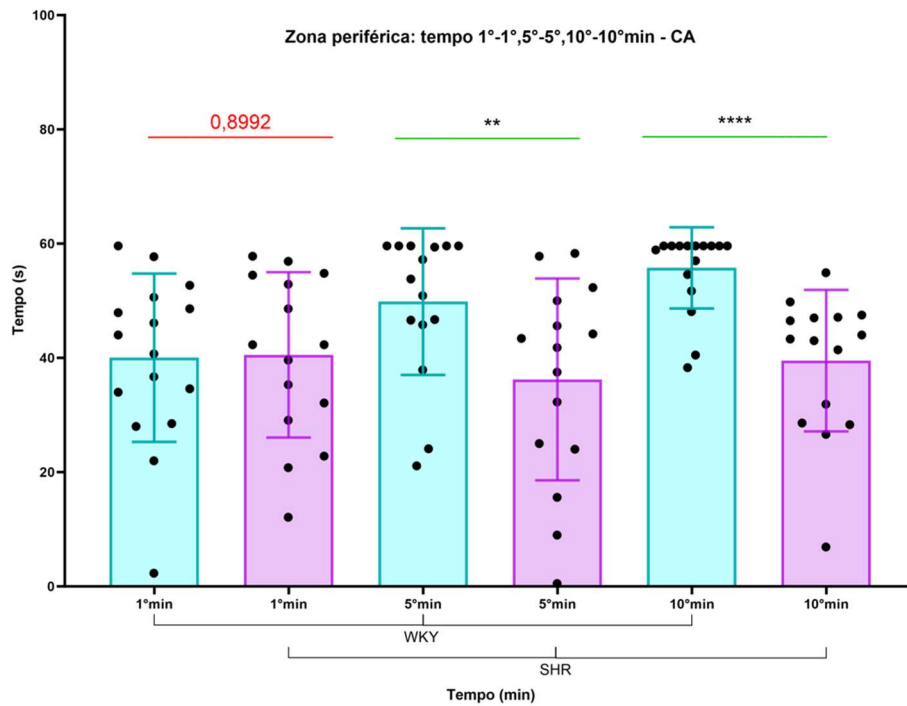


Figura 14. Campo Aberto. Comparação do tempo de permanência na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foram retirados 4 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 8**).

5.3. **Figura 15.** *Campo Aberto*. Avaliação da distância percorrida na zona central durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos. O grupo WKY, ao longo da sessão, reduziu a distância na zona central. O grupo SHR, não.

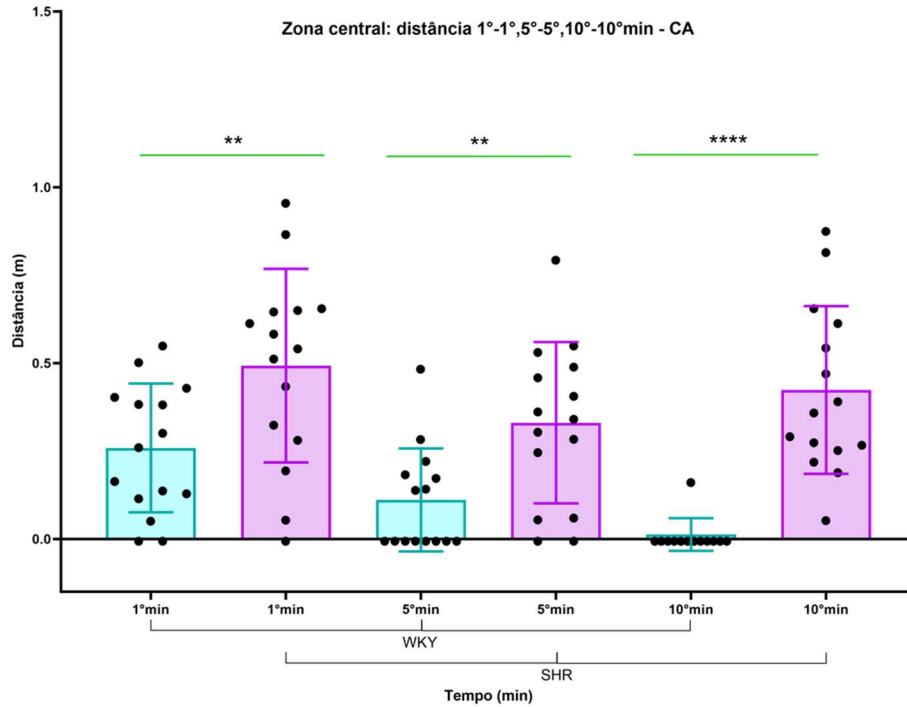


Figura 15. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida na zona central no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** p<0,01, **** p<0,0001. Cada ponto (•) representa um animal. Foram retirados 6 pontos (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 9**).

5.3. **Figura 16.** *Campo Aberto*. Avaliação da distância percorrida na zona periférica durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos. O grupo WKY apresentou uma menor distância percorrida no 10° minuto do que o grupo SHR.

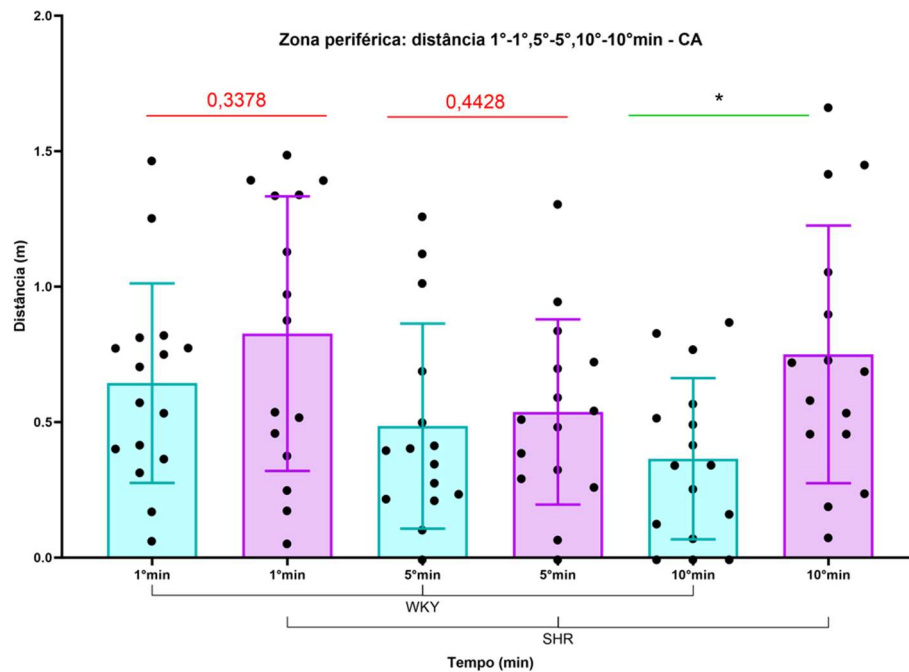


Figura 16. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado 1 ponto (*Outliers*) do grupo WKY (**Suplementar 10**).

5.4. Reconhecimento de Objetos

5.4. **Figura 17.** Reconhecimento de Objetos. Avaliação do tempo explorado em cada objeto idêntico (Objeto Familiar A e B). O grupo WKY mostrou preferência pelo Objeto Familiar A. O grupo SHR mostrou preferência pelo Objeto Familiar B.

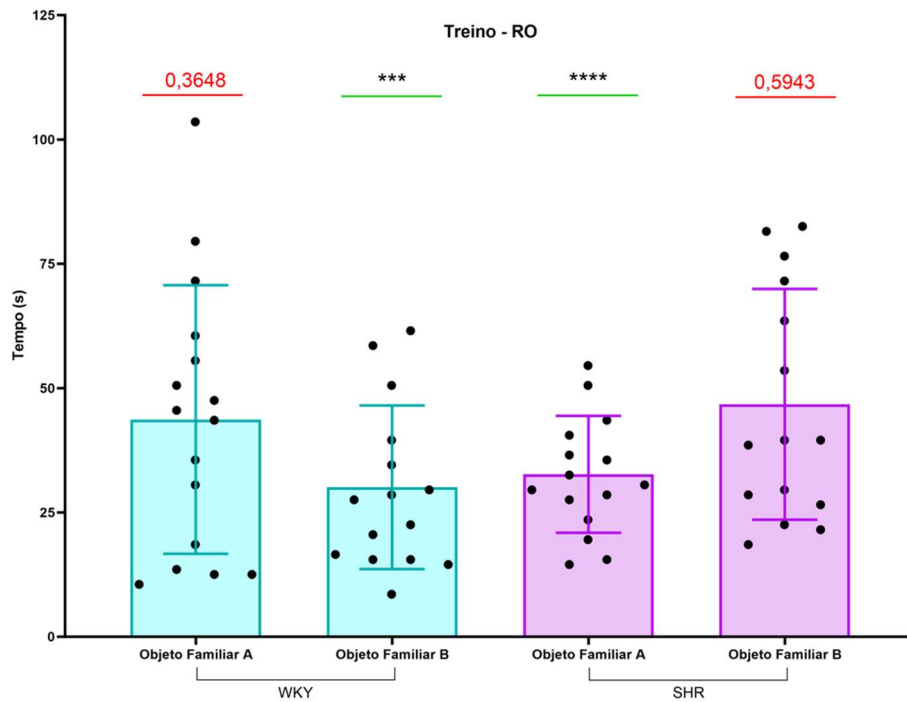


Figura 17. Reconhecimento de Objetos. Treino: tempo de exploração dedicado em cada objeto idêntico (Objeto Familiar) nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Valores não significativos estão em vermelho (p > 0,05). Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado 1 ponto (*Outlier*) do grupo WKY (Suplementar 11).

5.4. **Figura 18. Reconhecimento de Objetos.** Avaliação do tempo explorado no objeto conhecido (Objeto Familiar A) e no Novo Objeto. Os grupos não apresentaram preferência por nenhum objeto.

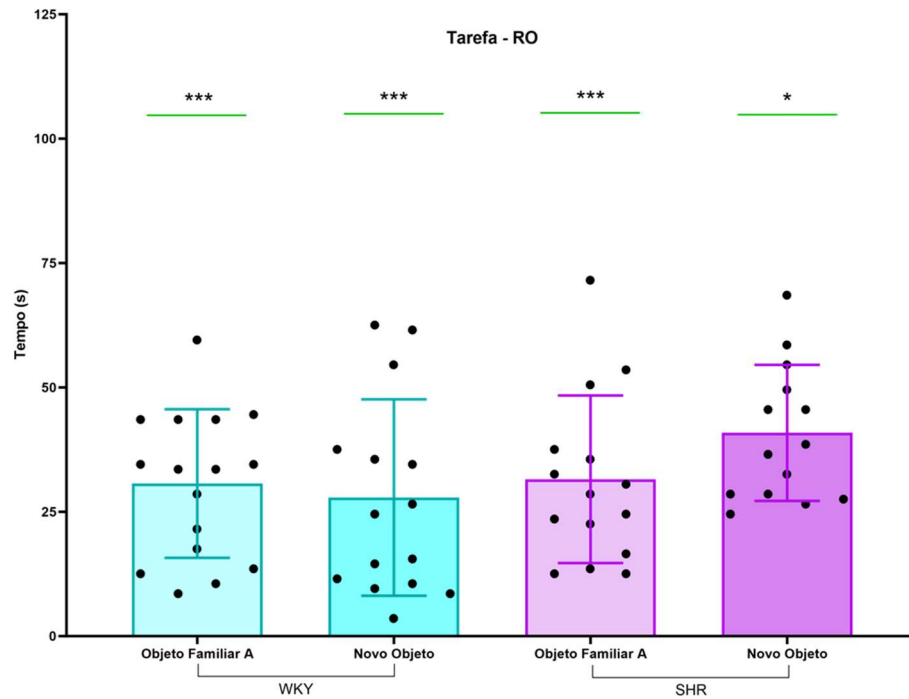


Figura 18. Reconhecimento de Objetos. Tarefa: tempo de exploração dedicado ao Objeto Familiar e ao Novo Objeto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado 1 ponto (*Outlier*) de cada grupo (**Suplementar 12**).

5.4. **Figura 19. Reconhecimento de Objetos.** Avaliação do tempo explorado no objeto conhecido (Objeto Familiar A) e no objeto novo que foi deslocado espacialmente (Objeto Deslocado). Os grupos não apresentaram preferência por nenhum dos objetos.

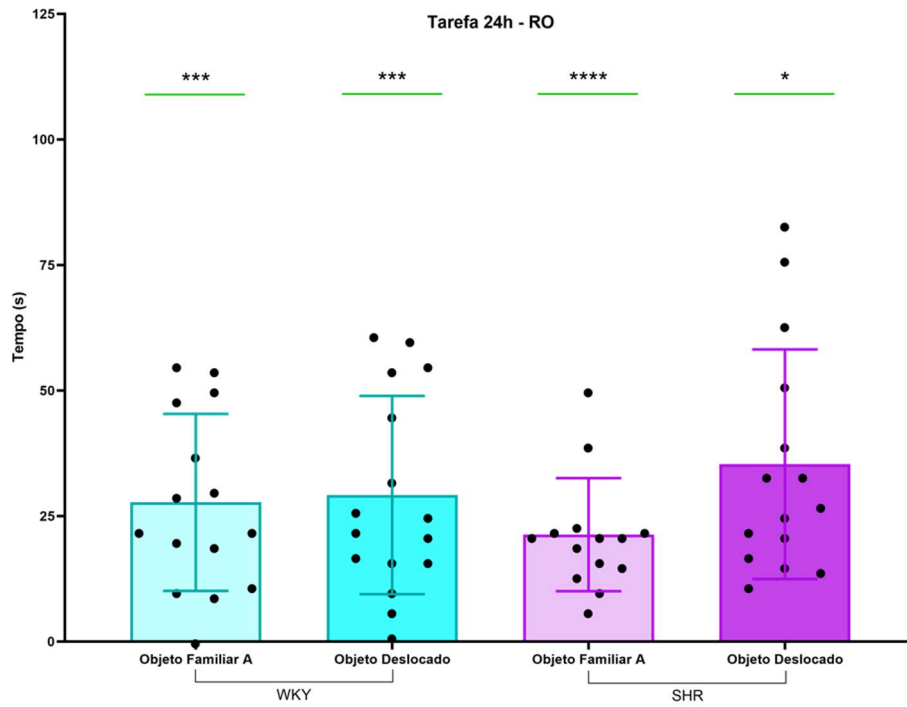


Figura 19. Reconhecimento de Objetos. Tarefa 24h: tempo de exploração dedicado ao Objeto Familiar e ao Objeto Deslocado nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado 1 ponto (*Outlier*) de cada grupo (**Suplementar 13**).

5.5. Claro-escuro

5.5. **Figura 20.** *Claro-escuro.* Avaliação do tempo levado para os animais saírem a primeira vez da região clara indo para a região escura. Os grupos não demonstraram diferença no tempo.

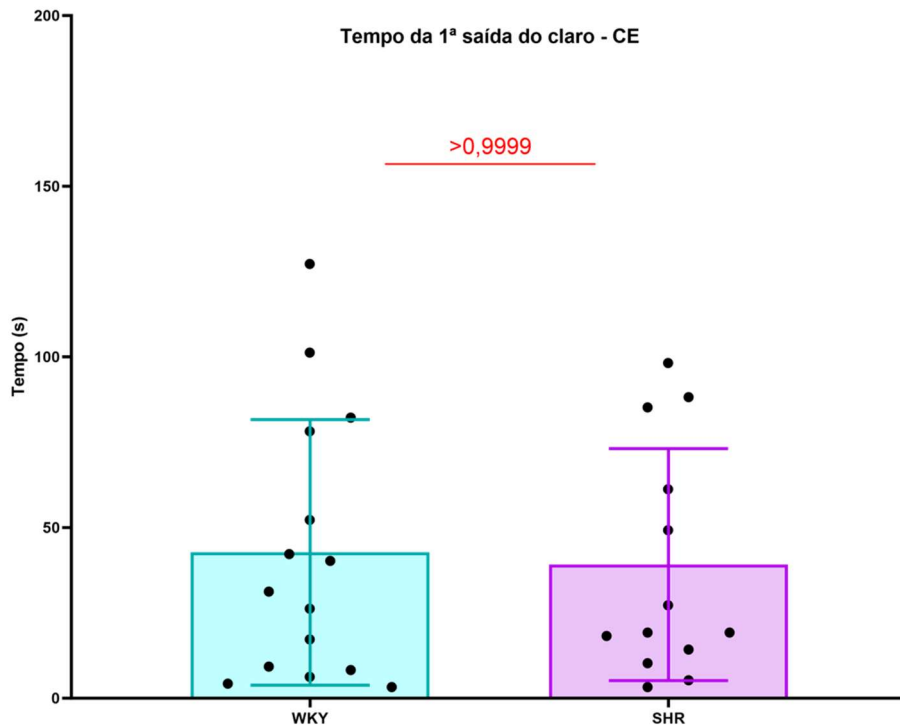


Figura 20. *Claro-escuro.* Tempo levado para o animal sair da região clara nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (*) representa um animal.

5.5. **Figura 21.** *Claro-escuro.* Número de vezes que o animal arriscou ir da região escura para a região clara. Os grupos não demonstraram diferença comportamental na quantidade de arriscadas.

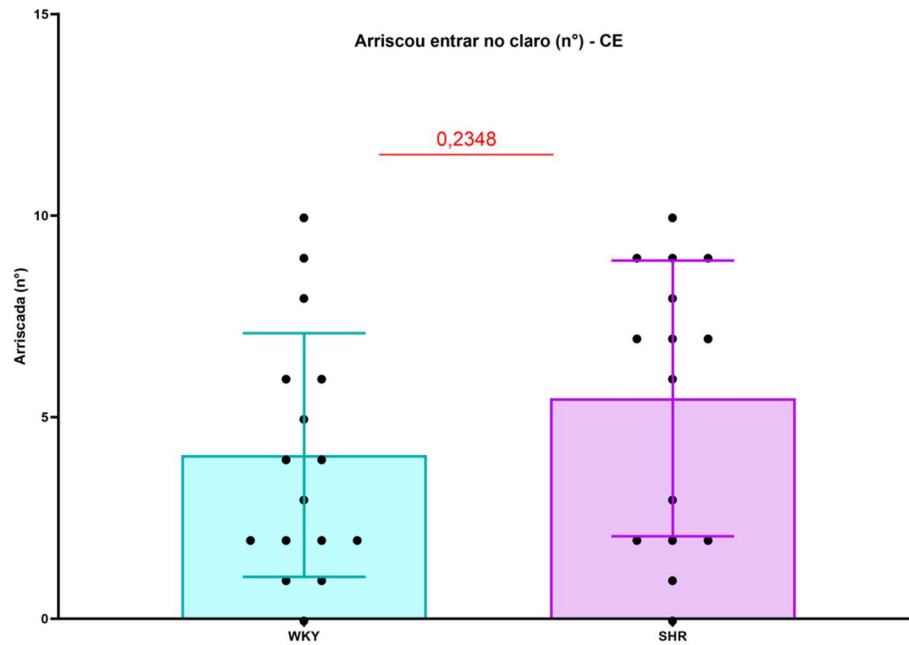


Figura 21. *Claro-escuro.* Número de vezes que o animal arriscou ir para a região clara nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal.

5.5. **Figura 22.** *Claro-escuro.* Número de vezes que o animal entrou na região clara. O grupo SHR entrou mais vezes na região clara, do que o grupo WKY.

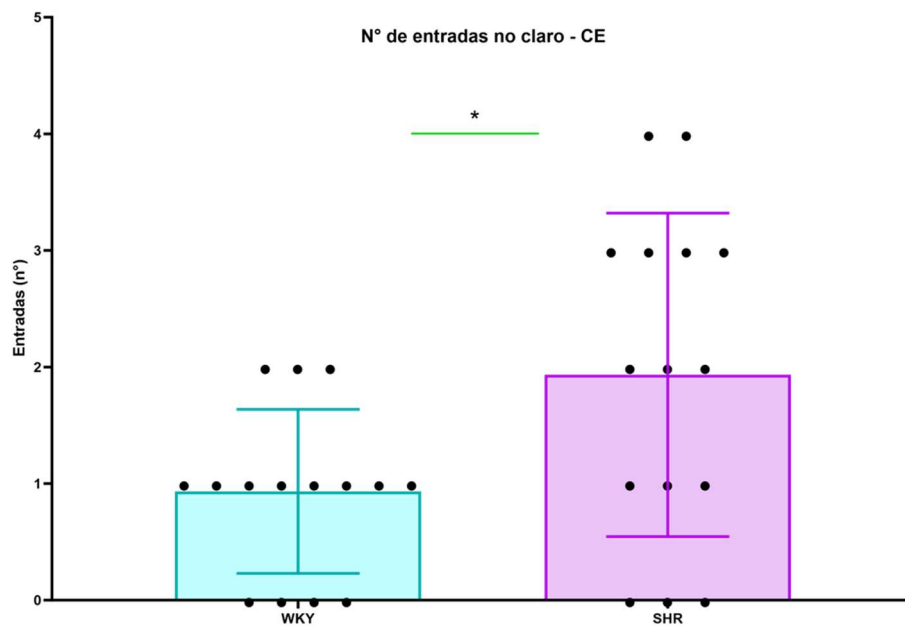


Figura 22. *Claro-escuro.* Número de vezes que os grupos WKY e SHR entraram na região clara. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado 1 ponto (*Outlier*) do grupo WKY (**Suplementar 14**).

5.5. **Figura 23.** *Claro-escuro.* Número de vezes que os animais praticaram *rearing* dentro da região clara. O grupo SHR apresenta mais números de *rearings*, do que o grupo WKY.

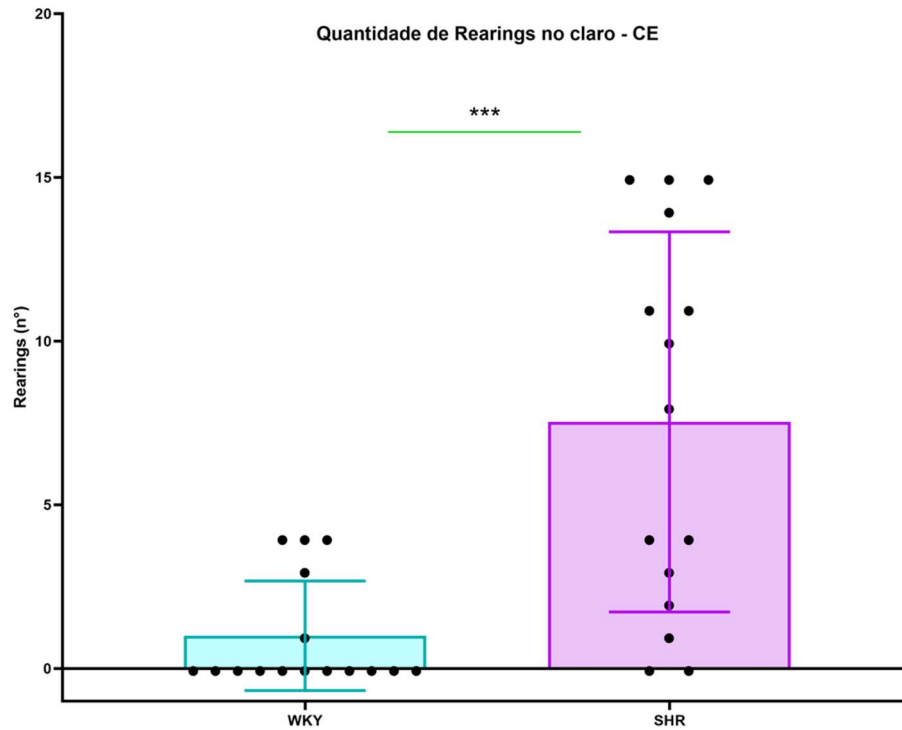


Figura 23. *Claro-escuro.* Quantidade de vezes que o animal praticou *rearings* nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. *** $p < 0,001$. Cada ponto (•) representa um animal. Os 4 pontos superiores no grupo WKY são Outliers (3x), porém optamos por mantê-los; o nível de significância não foi alterado.

5.5. **Figura 24.** *Claro-escuro.* Tempo total que os animais ficaram na região clara. O grupo SHR ficou mais tempo na região clara, do que o grupo WKY.

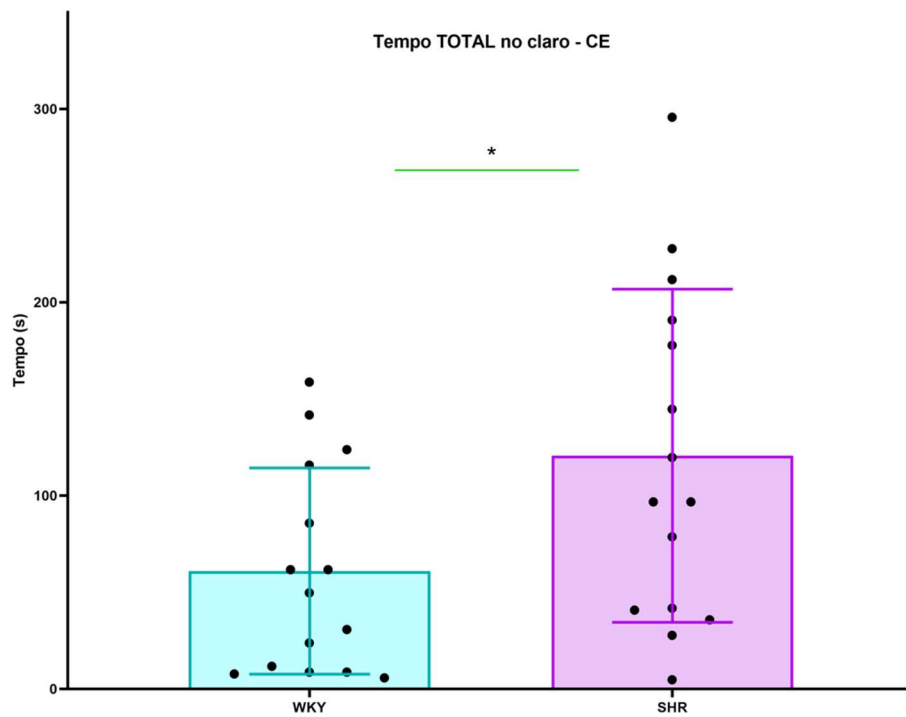


Figura 24. *Claro-escuro.* Tempo total na região clara dos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Cada ponto (•) representa um animal. Foi retirado um ponto (*Outlier*) do grupo WKY (**Suplementar 15**).

6. DISCUSSÃO

O grupo WKY, na avaliação da locomoção durante os 10 minutos da sessão do CA (**Figura 1**), demonstrou possuir memória de curta duração de habituação ao ambiente, pois ao longo da sessão reduziu a distância percorrida, corroborando com o achado de Yen⁴⁸. Já o grupo SHR reduziu a distância do 1° para o 5° minuto, porém essa redução não se estende até o final na sessão. Inferimos então, que o grupo SHR possui memória de habituação, mas não de curta duração por habituação ao ambiente.

A locomoção total do grupo SHR, percorrida no CA (**Figura 3**), é maior do que a distância do grupo WKY, podendo sugerir que o grupo SHR não possui memória de curta duração por habituação ao ambiente, por esse motivo acaba se deslocando mais. Porém, também pode sugerir a presença de um déficit de atenção e hiperatividade.

Outra possibilidade para esses dois resultados (**Figura 1 e 3**) é que o grupo SHR tenha desenvolvido um déficit de atenção ou hiperatividade, o que justificaria o aumento ou a não redução da distância percorrida pelo grupo, já que esse modelo animal também é utilizado para essa finalidade em outros estudos^{51,52}.

Com o objetivo de verificar se os grupos possuíam diferenças no deslocamento, foi feito o comparativo do 1° minuto entre os grupos (**Figura 2**). Eles não apresentaram diferença significativa na distância percorrida no 1° minuto, indicando semelhante atividade locomotora. Com isso, possivelmente, descartamos a possibilidade das diferenças no deslocamento serem por um padrão basal de deslocamento maior ou menor em determinado grupo.

Como os animais possuíam diferentes idades, decidimos fazer a comparação das idades com as respectivas distâncias totais dos indivíduos (**Figura 4**). Segundo nossos dados estatísticos não há diferença significativa entre as idades e as distâncias que os roedores percorreram, ou seja, a idade do animal não foi um fator relevante para a diferença dos resultados.

A avaliação do tempo em que os animais permaneceram na zona central e periférica no 1°, 5° e 10° minuto das sessões do CA (**Figura 5 e 6**), demonstrou que à medida que transcorreu a sessão, o grupo WKY passa a frequentar mais a zona periférica do que a central. Quando comparado os respectivos minutos entre os grupos (**Figura 13 e 14**) fica clara a diferença a partir do 5° minuto; o grupo WKY reduz seu tempo na zona central, enquanto o

SHR se mantém, já na zona periférica ocorre o contrário, o grupo WKY aumenta o seu tempo, tornando estatisticamente diferente os tempos entre os grupos. Isso pode demonstrar um aumento de ansiedade no grupo WKY ao longo da sessão, ou, também pode ser um comportamento natural do roedor, visando sua sobrevivência, por exemplo, a um ambiente desconhecido, como também poder ser inferido o fato de que ao se habituar ao ambiente o animal se estabelece em um determinado local (*home base*) e, ao acaso, se estabeleceu na zona periférica. Já para o grupo SHR, quando olhamos também o tempo total na zona central (**Figura 7**), podemos inferir que o grupo é menos ansioso, o que corrobora com os achados do CE.

A avaliação da distância percorrida na zona central e periférica no 1°, 5° e 10° minuto das sessões do CA (**Figura 9 e 10**), demonstrou que à medida que transcorreu a sessão, o grupo WKY reduz seu deslocamento, até mesmo no 10° minuto na zona periférica, onde foi demonstrado que o animal se encontra (**Figura 5 e 6**). Quando comparado os respectivos minutos entre os grupos (**Figura 15 e 16**) fica clara a diferença no 1°, 5° e 10° minuto na zona central entre eles, já na zona periférica a diferença se manifesta apenas no 10° minuto. Isso pode demonstrar que o grupo WKY possui memória de curta duração, pois reduz a distância ao longo da sessão, o que não ocorre com o grupo SHR. Há também a possibilidade do grupo SHR ser mais hiperativo ou ter a presença do déficit de atenção, o que também justificaria a não redução da distância total nas duas zonas (**Figura 11 e 12**). Outra possibilidade seria um possível dano cognitivo do grupo SHR, acometendo um possível padrão de autopreservação natural esperado para os roedores.

Os resultados do RO foram, no mínimo, diferentes do esperado, a começar com o fato dos animais mostrarem preferência por determinado objeto, sendo eles idênticos (**Figura 17**). E no momento que trocamos para um objeto diferente (**Figura 18**) não houve diferença alguma, assim como quando foi alterado espacialmente (**Figura 19**), ou seja, eles trataram como se os objetos fossem a mesma coisa, e estivessem no mesmo lugar. Tendo resultados tão controversos, acreditamos que o experimento para averiguar memória de curta e longa duração por reconhecimento de objetos, não seja o mais indicado, e até mesmo adequado, para averiguar esses parâmetros utilizando esses modelos animais. Contradizendo com nossos achados o trabalho do Yen demonstrou que o grupo SHR possuiu memória através do RO⁴⁸.

Nos primeiros dois parâmetros utilizados para averiguar a ansiedade dos animais, não obtivemos diferenças significativas (**Figura 20 e 21**). A partir desses, o grupo SHR mostrou ser menos ansioso do que o grupo WKY (**Figura 22, 23 e 24**). Outra possibilidade para esses dados seria uma possível perda cognitiva, que poderia levar o animal a uma dificuldade de reconhecimento de situações que necessitariam de cautela, levando a um possível perigo, ou seja, o animal pode vir a ter uma perda de autopreservação. O pesquisador Ramos demonstrou que o grupo SHR é mais ansioso, divergindo dos nossos resultados⁴⁹.

Todos os resultados podem ser diferentes, caso venham a ser replicados com roedores mais novos, levando em consideração o tempo em que a doença atuou nos animais dessa pesquisa, poderíamos verificar padrões diferentes em outras idades.

7. CONCLUSÃO

O grupo WKY, segundo nossos estudos, mostrou ter memória de curta duração de habituação ao ambiente, e o grupo SHR demonstrou possuir habituação ao ambiente e ser menos ansioso.

Contudo, nossos achados também podem estar relacionados com uma possível hiperatividade, déficit de atenção e uma redução do padrão de autopreservação no grupo SHR, por danos cognitivos.

Levantamos, também, a hipótese do experimento para averiguação da memória de curta e longa duração através de reconhecimento de objetos, não ser o mais adequado para os modelos animais (SHR e WKY).

Com isso, demonstramos preliminarmente diferenças comportamentais na existência da memória de habituação ao ambiente somente de WKY e menor comportamento ansioso no SHR, nos nossos modelos experimentais e para os testes comportamentais utilizados.

8. PERSPECTIVAS

Avaliação de parâmetros cerebrais, cardiovasculares, pulmonares, hepáticas e renais, possivelmente distintos entre WKY e SHR.

Relevância:

1. Essas diferenças possam ser úteis para manejo da hipertensão arterial sistêmica;
2. Descoberta de possíveis marcadores de sangue e licor para a HAS e outras doenças cardiovasculares.

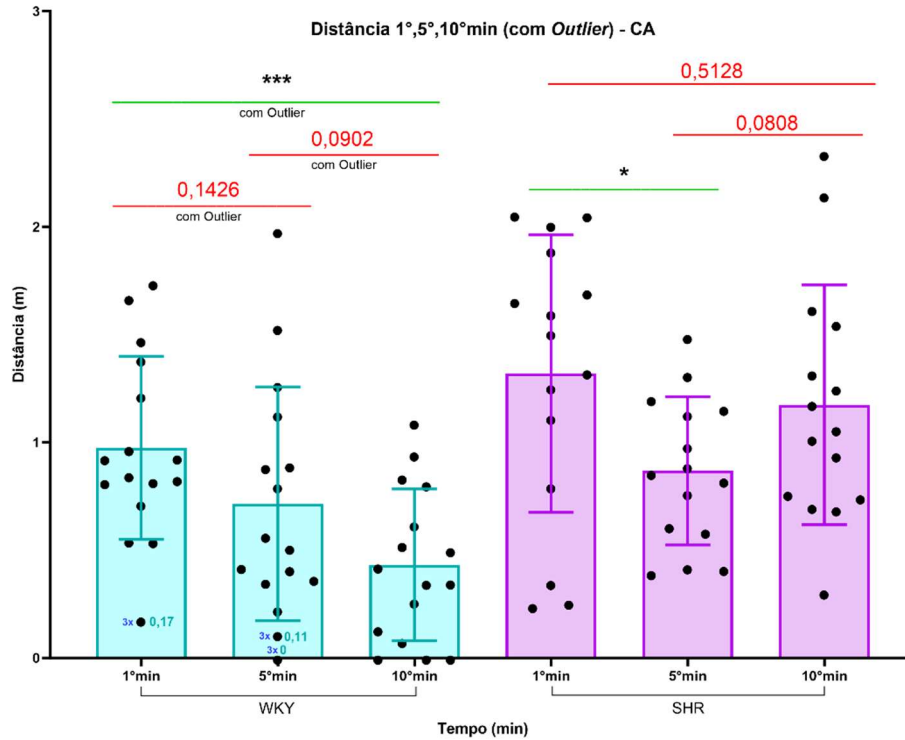
9. REFERÊNCIAS

- ¹ UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Ciência para todos: entendendo a pressão arterial. **Ciência para todos**, Belo Horizonte, v. 7, p. 14-14, 2 out. 2022. Disponível em: <https://www.ufmg.br/cienciaparatodos/wp-content/uploads/2013/12/pag14-Ciencia.pdf>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ² MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão (pressão alta)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hipertensao-pressao-alta-1>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ³ SAÚDE, Ministério da; **Cadernos de Atenção Básica: Hipertensão Arterial Sistêmica**. 1. ed. Brasília-DF, 2006. P. 1-53.
- ⁶ CNN BRASIL. **Hipertensão arterial: conheça os riscos e saiba como prevenir a doença silenciosa**. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/hipertensao-arterial-conheca-os-riscos-e-saiba-como-prevenir-a-doenca-silenciosa/#:~:text=A%20press%C3%A3o%20alta%20%C3%A9%20o,perif%C3%A9rica%20e%20doen%C3%A7a%20renal%20cr%C3%B4nica..> Acesso em: 29 set. 2022.
- ⁷ **Como reduzir a pressão sanguínea em sete passos**. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/como-reduzir-a-pressao-sanguinea-em-sete-passos/>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ⁸ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico: Percentual de adultos (>18 anos) com excesso de peso (IMC >25 kg/m²). In: **Plataforma integrada de vigilância em saúde**. [S. l.], 2 out. 2022. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/vigitel/>. Acesso em: 1 out. 2022.
- ⁹ ORGANIZAÇÃO Pan-Americana de Saúde: Mundo tem mais de 700 milhões de pessoas com hipertensão não tratada. [S. l.], 25 ago. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/25-8-2021-mundo-tem-mais-700-milhoes-pessoas-com-hipertensao-nao-tratada>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ¹⁰ UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Ciência para todos: entendendo a pressão arterial. **Ciência para todos**, Belo Horizonte, v. 7, p. 14-14, 2 out. 2022. Disponível em: <https://www.ufmg.br/cienciaparatodos/wp-content/uploads/2013/12/pag14-Ciencia.pdf>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ¹¹ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão (pressão alta)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hipertensao-pressao-alta-1>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ¹² ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Dia Mundial da Hipertensão 2022. In: **Dia Mundial da Hipertensão 2022**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/campanhas/dia-mundial-da-hipertensao-2022>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ¹³ GHORANI, Hussam, et al, 2021. DOI: [10.1016/j.numecd.2021.09.007](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.09.007)
- ¹⁴ MINAYO, M. C. D. S; HARTZ, Z. M. D. A; BUSS, Paulo Marchiori. **Qualidade de vida e saúde: um debate necessário**. Debate: Ciência e Saúde Coletiva, Brasil-RJ, p. 1-12, dez./2005. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2000.v5n1/7-18/pt>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ¹⁵ LANDEIRO, G. M. B. et al. **Revisão sistemática dos estudos sobre qualidade de vida indexados na base de dados Scielo**. TEMAS LIVRES: Ciência e Saúde Coletiva, São Luís-MA, p. 1-10, dez./2005. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2011.v16n10/4257-4266/pt> Acesso em: 29 set. 2022.
- ³⁵ MOREIRA, J. V. M., et al, 2022. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/248590/001148430.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Efeitos de Isquemia Cerebral Focal Permanente em Ratos Hipertensos
- ³⁶ TRIPPODO, NICK C., et al, 1981. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/epdf/10.1161/01.RES.48.3.309>
Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension: Man and Rat.

- ³⁷ ERGUL, Adviyee, et al, 2016. DOI: :10.1007/s12975-016-0464-8.
- ⁴² AM Lehnen, et al, 2011. DOI: [10.1055/s-0031-1271747](https://doi.org/10.1055/s-0031-1271747)
- ⁴³ HALMENSCHLAGER, Luiza, et al, 2017. DOI: [10.3390/nu9080826](https://doi.org/10.3390/nu9080826)
- ⁴⁴ MARSCHNER, Rafael, et al, 2019. doi: [10.1371/journal.pone.0222334](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222334)
- ⁴⁵ LEGUÍSAMO, Natalia M., et al, 2012. DOI: [10.1186/1475-2840-11-100](https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-100)
- ⁴⁶ GOMES, Luis Henrique, et al, 2019. DOI: 10.5935/abc.20190050. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/HBL8GX8n6CxPwmhHkRDcDTv/?lang=pt&format=pdf>
- ⁴⁷ REZENDE, Mateus. 2020. COMPARAÇÕES DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA FIOLOGIA CARDIOVASCULAR E TERMORREGULATÓRIA EM RATOS WISTAR, WISTAR KYOTO E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS DURANTE O REPOUSO E O EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.xhtml?popup=true&id_trabalho=10363521
- ⁴⁸ YEN, Patrick, et al, 2022. DOI: [10.1007/s10571-021-01094-3](https://doi.org/10.1007/s10571-021-01094-3)
- ⁴⁹ RAMOS, Andre, et al, 2008. DOI: [10.1016/j.bbr.2008.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.007)
- ⁵⁰ ORGANIZAÇÃO Mundial da Saúde: Relatório lançado pela OMS detalha o impacto devastador da hipertensão e as formas de combatê-la. 19 set. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/19-9-2023-relatorio-lancado-pela-oms-detalha-impacto-devastador-da-hipertensao-e-formas#:~:text=Segundo%20o%20relat%C3%B3rio%2C%20aproximadamente%20quatro,adultos%20em%20todo%20o%20mundo>. Acesso em: 19 fev. 2024.
- ⁵¹ SOUZA, Rafaela Venturi de, et al, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199233/Rafaela%20Venturi.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ⁵² CALZAVARA, Mariana Bendlin, et al, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/23893>
- ⁵³ TYPLT, Marei, et al, 2013. DOI: [10.3389/fnint.2013.00079](https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00079)

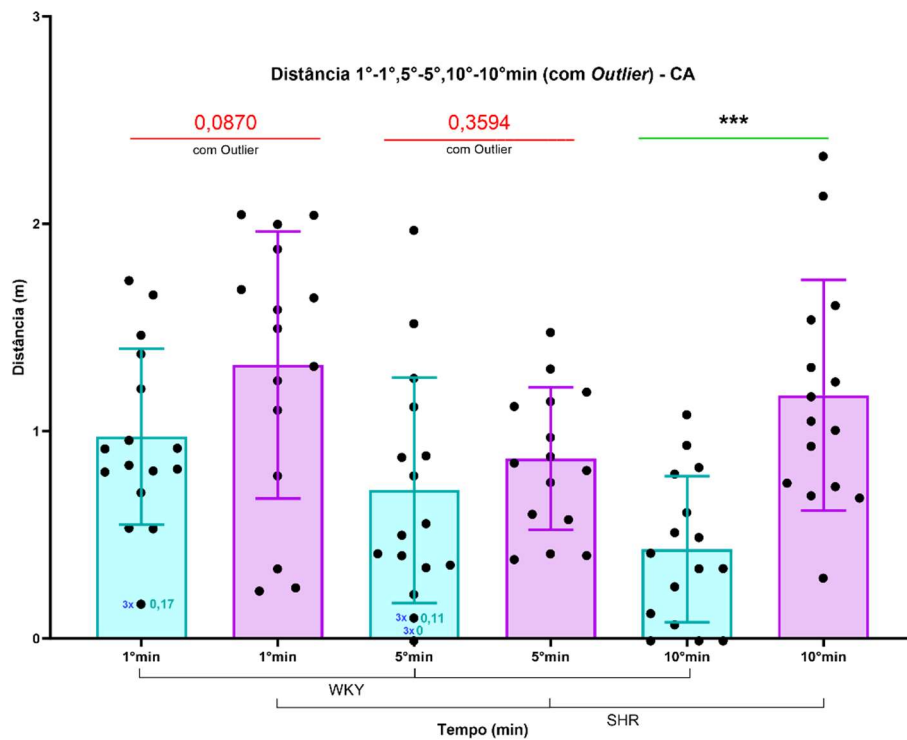
10. FIGURAS SUPLEMENTARES

10.1. (Suplementar 1). *Campo Aberto*. Avaliação da locomoção durante os 10 minutos da sessão com os pontos *outliers*; referente à **Figura 1**.



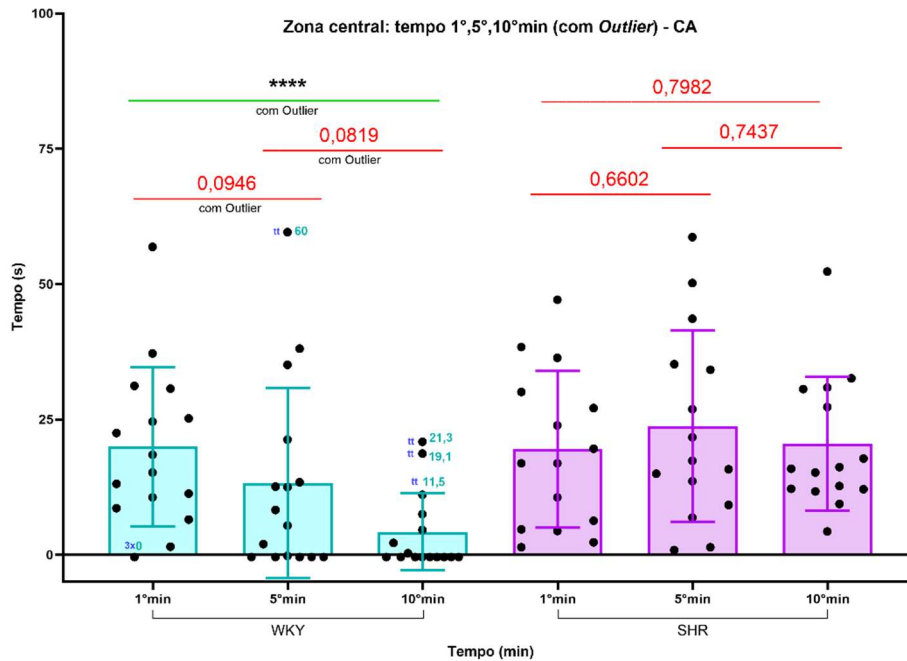
Suplementar 1. *Campo Aberto*. Distância percorrida no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados como média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 3 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x).

10.2. (Suplementar 2). *Campo Aberto*. Avaliação da locomoção durante o 1º minuto da sessão com os pontos *outliers*; referente à **Figura 2**.



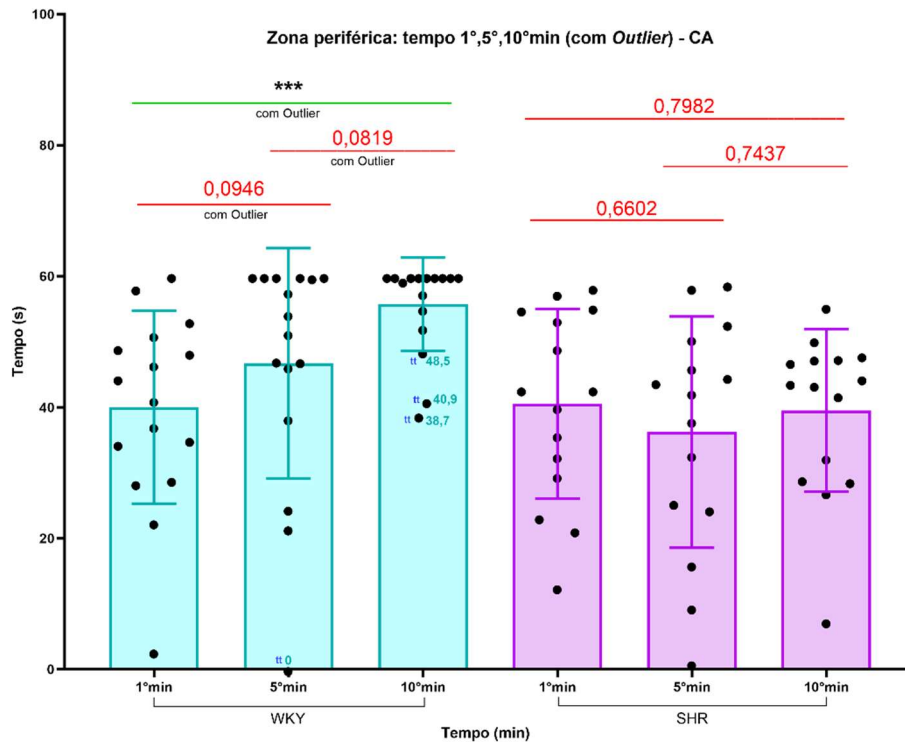
Suplementar 2. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida no 1º, 5º e 10º minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *unpaired t test*. Os dados são mostrados como média e desvio padrão. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 3 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x).

10.3. (Suplementar 3). *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que os animais permaneceram na zona central no 1°, 5° e 10° minuto da sessão com os pontos *outliers*; referente à **Figura 5**.



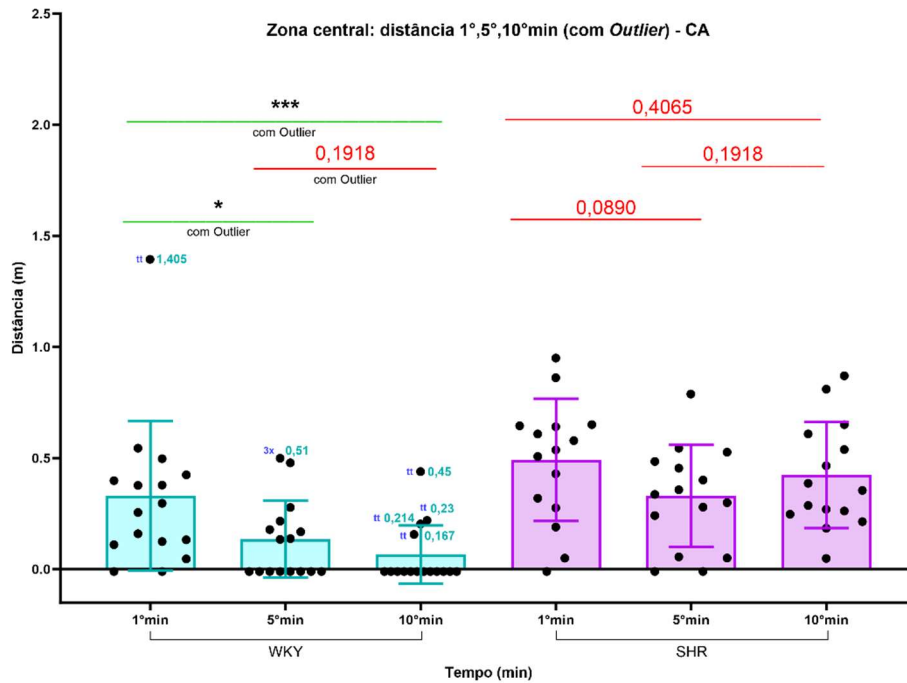
Suplementar 3. *Campo Aberto*. Tempo de permanência na zona central no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 5 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x). *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.4. (Suplementar 4). *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que os animais permaneceram na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto da sessão com os pontos *outliers*; referente à **Figura 6**.



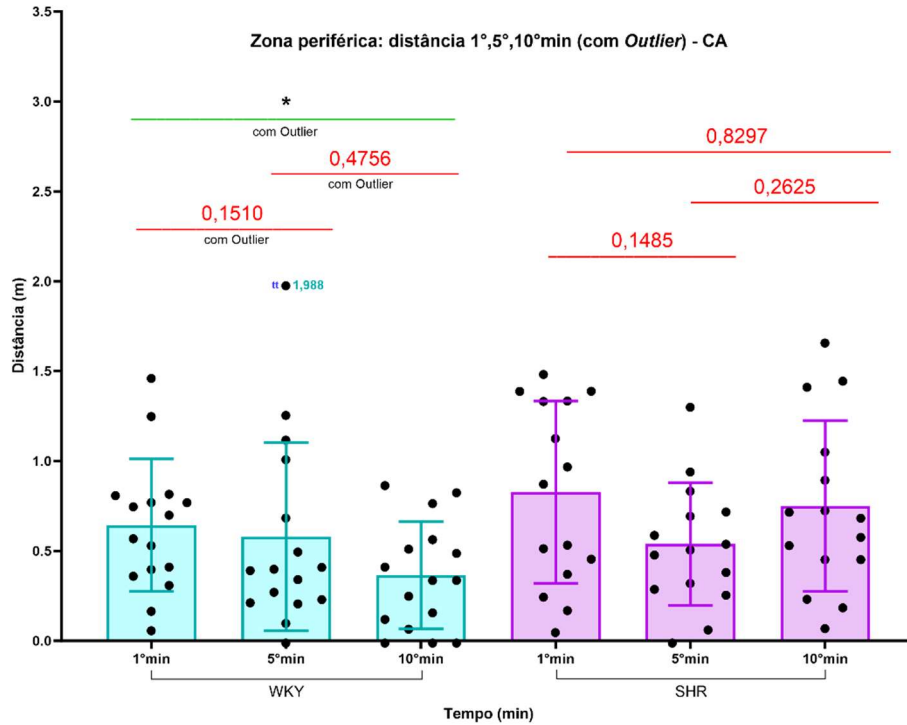
Suplementar 4. *Campo Aberto*. Tempo de permanência na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 4 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.5. (Suplementar 5). *Campo Aberto*. Avaliação da distância que o animal percorreu na zona central no 1°, 5° e 10° minuto da sessão com os pontos *outliers*; referente à **Figura 9**.



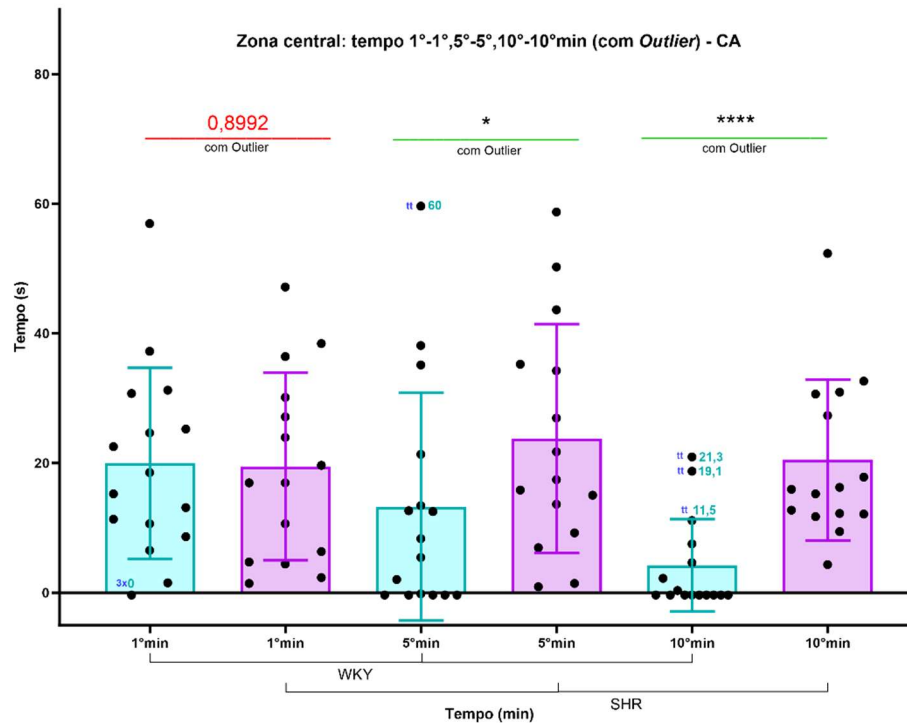
Suplementar 5. *Campo Aberto*. Distância percorrida na zona central no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 7 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x). *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.6. (Suplementar 6). *Campo Aberto*. Avaliação da distância que o animal percorreu na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto da sessão com o ponto *outlier*; referente à **Figura 10**.



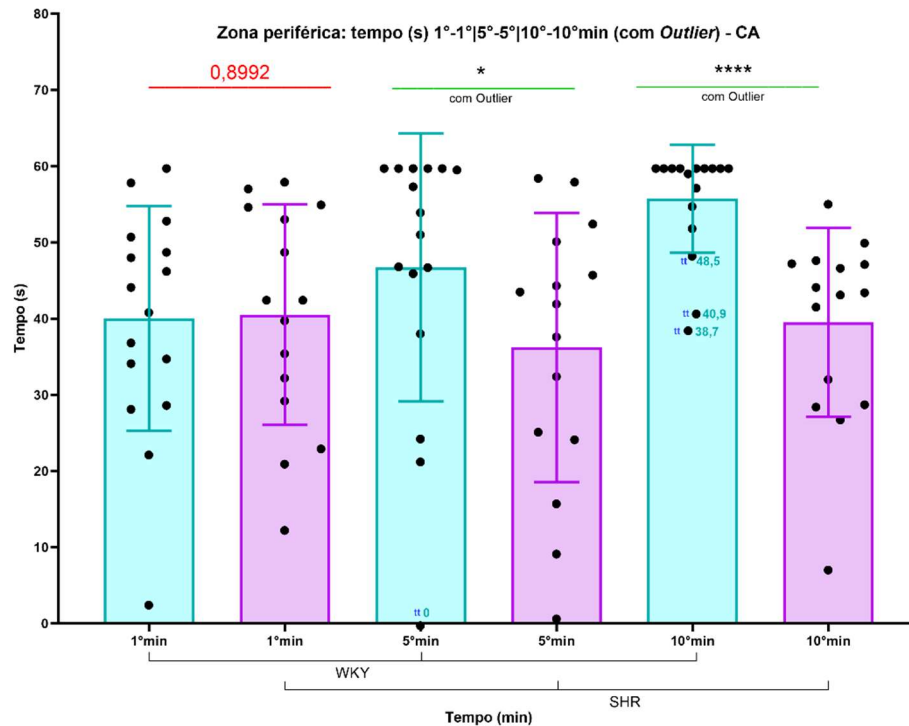
Suplementar 6. *Campo Aberto*. Distância percorrida na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 1 ponto (*Outlier*) excluído do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.7. (Suplementar 7). *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que o animal permaneceu na zona central durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos com os pontos *outliers*; referente à **Figura 13**.



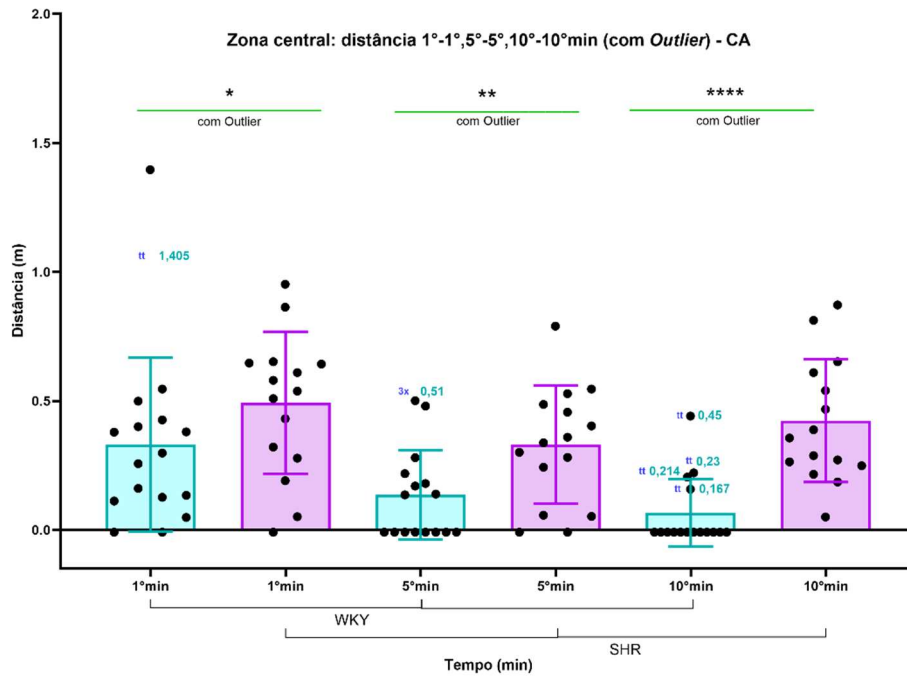
Suplementar 7. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida na zona central no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 5 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x). *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.8. (Suplementar 8). *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que o animal permaneceu na zona periférica durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos com os pontos *outliers*; referente à **Figura 14**.



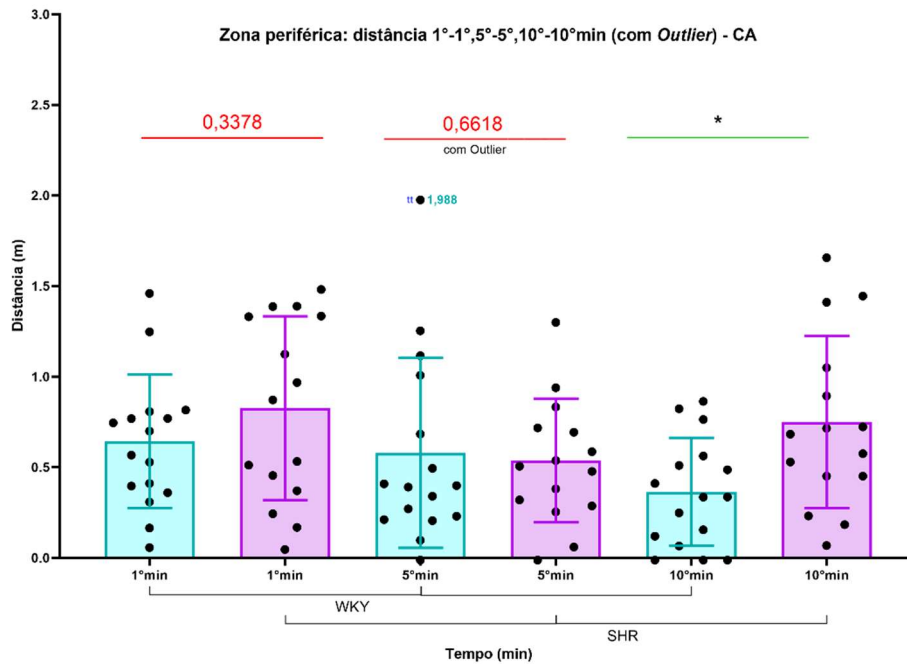
Suplementar 8. *Campo Aberto*. Comparação do tempo de permanência na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 4 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.9. (Suplementar 9). *Campo Aberto*. Avaliação do tempo em que o animal permaneceu na zona periférica durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos com os pontos *outliers*; referente à **Figura 15**.



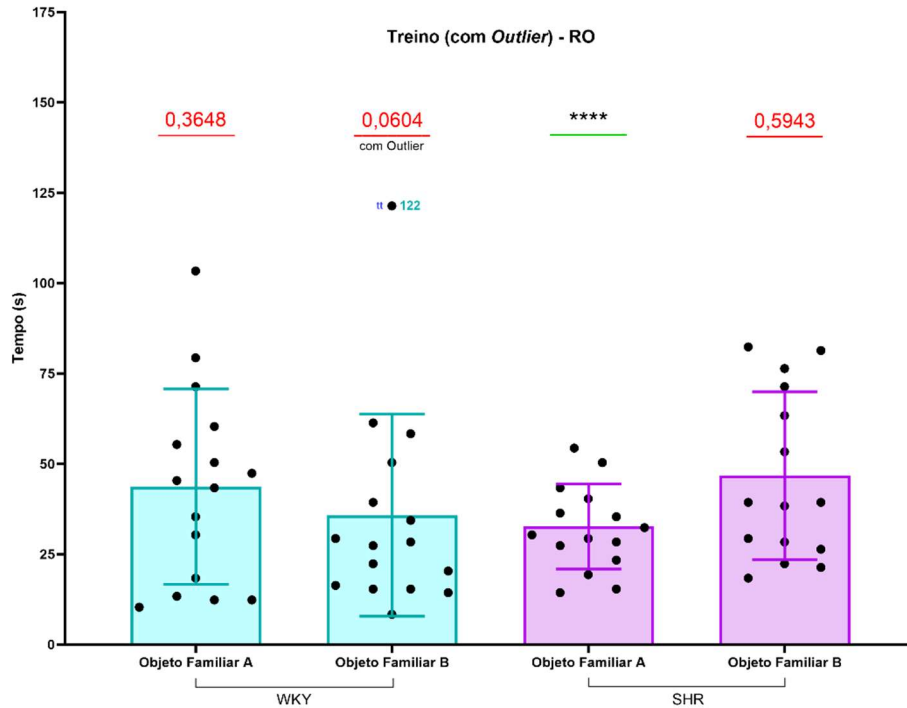
Suplementar 9. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida na zona central no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Cada ponto (*) representa um animal. O grupo WKY possui 6 pontos (*Outliers*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x). *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.10. (Suplementar 10). *Campo Aberto*. *Campo Aberto*. Avaliação da distância percorrida na zona periférica durante o 1°, 5° e 10° minuto da sessão entre os grupos com o ponto *outlier*; referente à **Figura 16**.



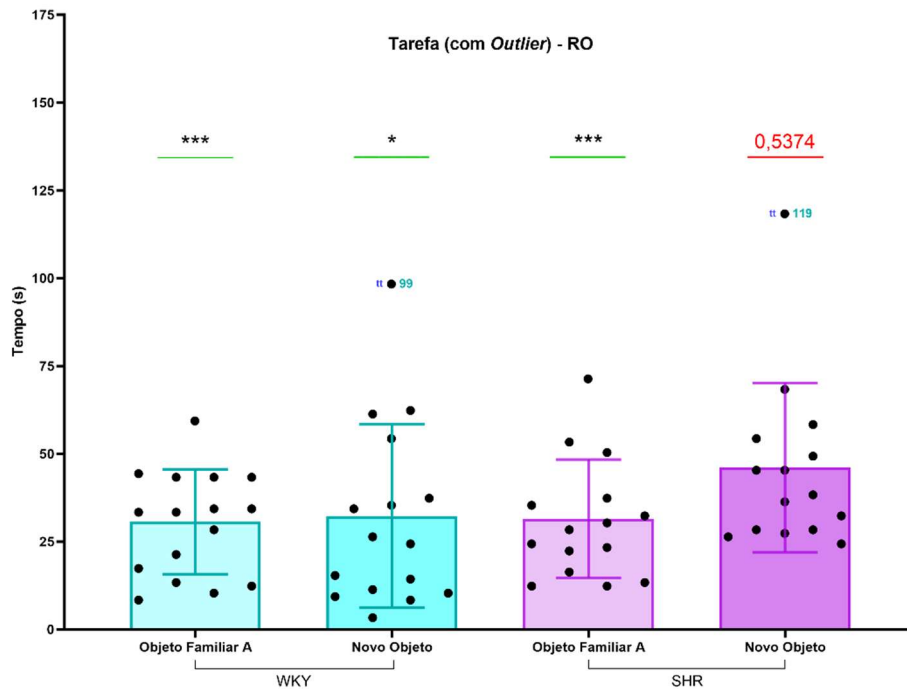
Suplementar 10. *Campo Aberto*. Comparação da distância percorrida na zona periférica no 1°, 5° e 10° minuto entre os grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 1 ponto (*Outlier*) excluído do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.11. (Suplementar 11). *Reconhecimento de Objetos*. Avaliação do tempo explorado em cada objeto idêntico (Objeto Familiar A e B) com o ponto *outlier*; referente à **Figura 17**.



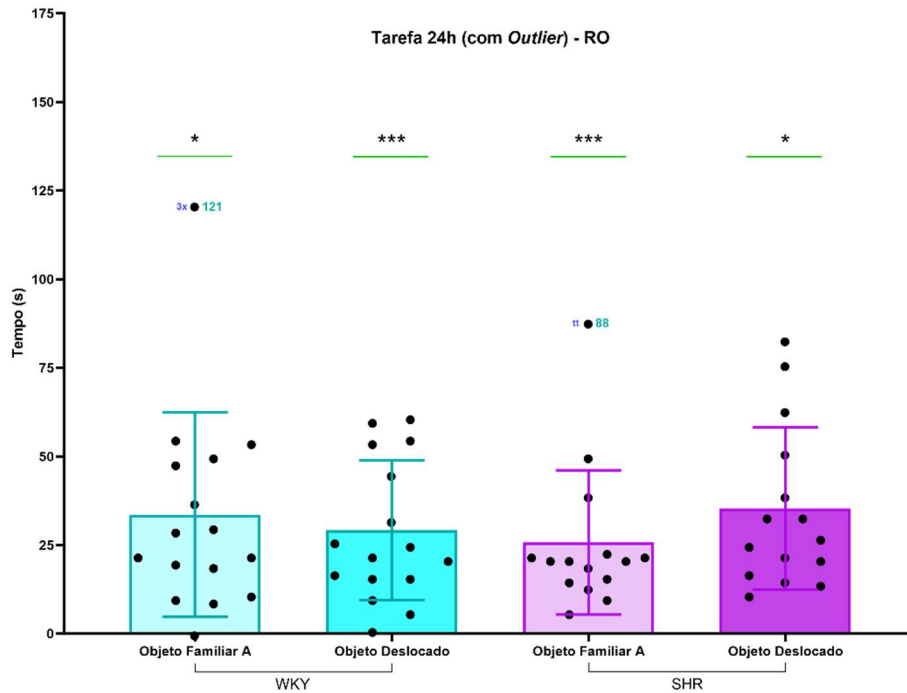
Suplementar 11. *Reconhecimento de Objetos*. Treino: tempo de exploração dedicado em cada objeto idêntico (Objeto Familiar) nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Valores não significativos estão em vermelho ($p > 0,05$). Cada ponto (*) representa um animal. O grupo WKY possui 1 ponto (*Outlier*) excluído do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.12. (Suplementar 12). *Reconhecimento de Objetos*. Avaliação do tempo explorado no objeto conhecido (Objeto Familiar A) e no Novo Objeto com os pontos *outliers*; referente à **Figura 18**.



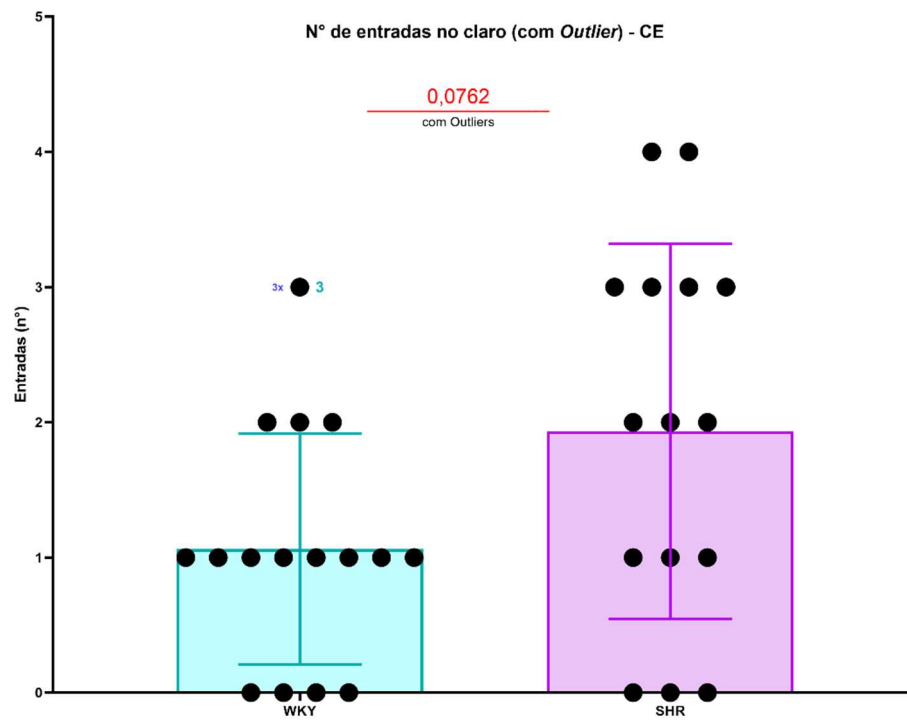
Suplementar 12. *Reconhecimento de Objetos*. Tarefa: tempo de exploração dedicado ao Objeto Familiar e ao Novo Objeto nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Cada ponto (•) representa um animal. Os grupos possuem 1 ponto (*Outlier*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.13. (Suplementar 13). *Reconhecimento de Objetos*. Avaliação do tempo explorado no objeto conhecido (Objeto Familiar A) e no objeto novo que foi deslocado espacialmente (Objeto Deslocado) com os pontos *outliers*; referente à Figura 19.



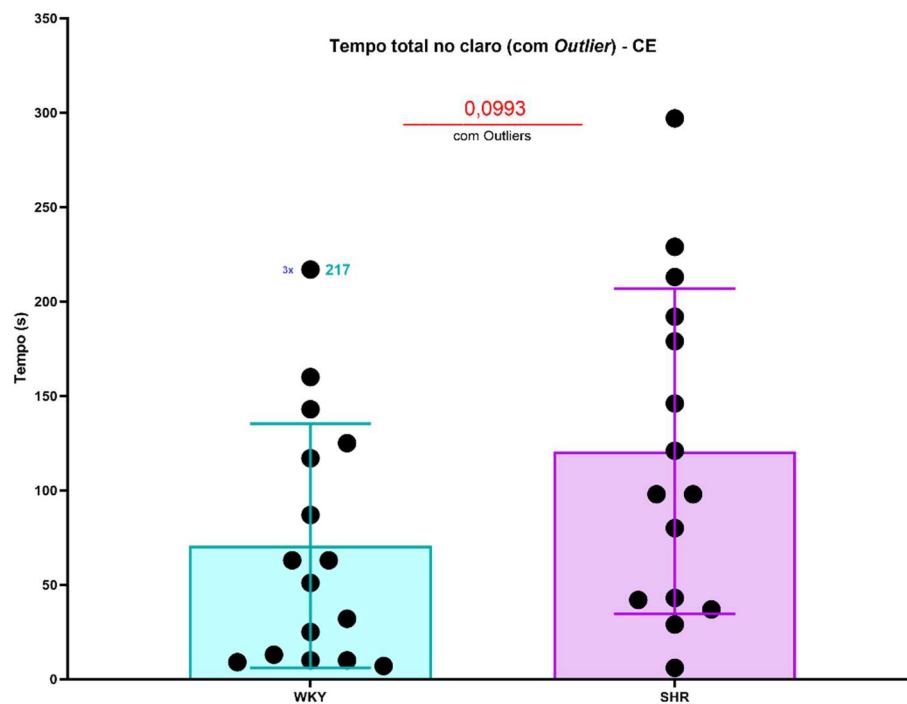
Suplementar 13. *Reconhecimento de Objetos*. Tarefa 24h: tempo de exploração dedicado ao Objeto Familiar e ao Objeto Deslocado nos respectivos grupos: WKY e SHR. Análise estatística utilizando *One sample t test* com média hipotética de 50. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Cada ponto (•) representa um animal. Os grupos possuem 1 ponto (*Outlier*) excluídos do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x). *Outlier* detectado através do teste *Identify Outliers* (tt).

10.14. (Suplementar 14). *Claro-escuro*. Número de vezes que o animal entrou na região clara com o ponto *outlier*; referente à Figura 22.



Suplementar 14. *Claro-escuro*. Número de vezes que os grupos WKY e SHR entraram na região clara. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 1 ponto (*Outlier*) excluído do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x).

10.15. (Suplementar 15). *Claro-escuro*. Número de vezes que o animal entrou na região clara com o ponto *outlier*, referente à Figura 24.



Suplementar 15. *Claro-escuro*. Tempo total na região clara dos grupos WKY e SHR. Análise estatística utilizando *Mann Whitney test*. Os dados são mostrados com média e desvio padrão. * $p < 0,05$. Cada ponto (•) representa um animal. O grupo WKY possui 1 ponto (*Outlier*) excluído do trabalho principal. *Outlier* maior ou menor que 3 vezes a média (3x).