

INSTITUTO PRESBITERIANO MACKENZIE  
FUNDO MACKENZIE DE PESQUISA - MACKPESQUISA

RELATORIO TÉCNICO CIENTÍFICO

**A ASSOCIAÇÃO DE DOIS FATORES DE RISCO AMBIENTAIS, SAL E DIETA  
HIPERCALÓRICA, NA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR E RENAL DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Proponente: Profa. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah

Equipe de Pesquisa:

Profa. Dra. Patricia Fiorino – CCBS/UPM

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles – CCBS/UPM

Ms. Iara Cristina de Araujo

Centro Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS

2017

## RESUMO

No mundo moderno as mudanças de estilo de vida determinaram um aumento exponencial do consumo de alimentos ricos em gorduras, sal e açúcares acarretando num aumento considerável nos fatores de risco cardiovascular, como a geração de hipertensão e obesidade tornando-as epidemias globais. Vale lembrar que tanto a hipertensão arterial, como a obesidade são doenças multifatoriais tendo em comum várias características e causas. Dentre as possíveis causas desses distúrbios, a hiperatividade simpática, a ação exacerbada do sistema renina-angiotensina e a geração de citocinas pró-inflamatórias podem estar presentes em ambas as patologias. Outro fator importante é o acréscimo de uma sobrecarga salina, agudamente, acrescentando um fator no desenvolvimento dessas patologias. Assim sendo, o principal objetivo desse estudo experimental foi avaliar a função renal e cardiovascular, o controle autonômico cardiovascular e o perfil metabólico em animais espontaneamente hipertensos e obesos submetidos a sobrecarga aguda de sal. Foram utilizados 4 grupos de ratos espontaneamente hipertensos divididos em 4 grupos experimentais: Grupo 1 – Ratos Hipertensos Controle; Grupo 2 – Ratos Hipertensos submetidos à dieta hipercalórica durante 8 semanas a partir do desmame; Grupo 3 – Ratos Hipertensos submetidos à sobrecarga salina nos últimos 10 dias do protocolo e Grupo 4 – Ratos Hipertensos submetidos à dieta hipercalórica durante 8 semanas a partir do desmame e acrescidos de uma sobrecarga salina nos últimos 10 dias do protocolo. Em suma, nossos resultados confirmaram a hipótese de que a ingestão de uma dieta hipercalórica nos animais hipertensos desde o desmame até 11 semanas de vida é capaz de induzir a um quadro clínico semelhante a síndrome metabólica uma vez que foi capaz de ocasionar obesidade associada a intolerância à glicose e a dislipidemia. Em relação a função cardiovascular, a dieta hipercalórica não foi capaz de agravar o quadro de hipertensão arterial dos ratos espontaneamente hipertensos. Entretanto, os animais hipertensos submetidos à sobrecarga salina apresentaram discreto aumento da pressão arterial que foi mais acentuado nos animais que receberam a associação da dieta e sal. Esses dados sugerem que a associação de uma dieta hipercalórica com sobrecarga salina em animais hipertensos potencializa o aumento da pressão arterial. Em relação a função renal, observamos uma significativa redução no ritmo de filtração glomerular induzida pela

dieta que pode estar associada a redução do tufo glomerular observada nas análises morfométricas glomerulares. Assim sendo, nossos resultados mostraram que a associação de dois fatores de risco ambientais, sal e dieta hipercalórica, a partir da infância em ratos predispostos à hipertensão induzem o desenvolvimento de um quadro clínico de síndrome metabólica, com alterações nas funções cardiovascular e renal. Em conclusão, nosso estudo mostra a importância de se evitar o consumo de dietas hipercalóricas e/ou ricas em sal a partir da infância a fim de prevenirmos as morbimortalidades associadas a esses fatores de risco ambientais.

Palavras-chave: Hipertensão, obesidade, dieta hipercalórica, sal, inflamação.

## 1. INTRODUÇÃO

Os casos das doenças cardiovasculares e metabólicas provenientes da má alimentação do mundo moderno aumentam exponencialmente, à medida que o número de fatores de risco dessas também crescem, como sedentarismo, tabagismo, pré-disposição genética e Diabetes Tipo 2 (JOHNSON *et al.*, 2007; POPKIN, 2001).

As mudanças de estilo de vida do mundo moderno, as inserções da cultura ocidental, principalmente no âmbito dos hábitos alimentares, como os restaurantes de comidas rápidas, aumentam o consumo de alimentos ricos em gorduras, sal e açúcares (JOHNSON *et al.*, 2007), que estão associados com o desenvolvimento da síndrome metabólica, aumento das morbidades por obesidade, doenças cardiovasculares e doenças renais em todo o mundo (ARAUJO *et al.*, 2015; VELÁSQUES-MELÉNDEZ; PIMENTA, 2004). Estudos demonstram que há no Brasil uma progressão no número de indivíduos com doenças ou potenciais doentes relacionados às anormalidades metabólicas (MENDONÇA; DOS ANJOS, 2004).

A obesidade é uma doença crônica definida pelo índice de massa corpórea (IMC) maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, sendo esse um fator de risco para o aumento da pressão arterial sistêmica e consequente desenvolvimento do quadro de hipertensão arterial (HA) (BERRETO-FILHO *et al.*, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou em 2012 que doenças relacionadas ao aumento da pressão arterial são a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2012). A doença renal crônica (DRC) é um exemplo de doença associada ao aumento da pressão arterial. A pressão arterial está intimamente relacionada com a função renal, uma vez que a HA está entre as principais causas de DRC. Os danos renais causados pela elevação da pressão arterial provocam um aumento adicional nesta, que por sua vez provoca maior lesão renal, gerando um círculo vicioso (NKF, 2015). De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, pacientes com doença renal crônica apresentam risco 46% maior de morte por doenças cardiovasculares (SBN, 2011).

Dados da OMS de 2015 indicam que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo estão acima do peso considerado ideal (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>), e dessas, 600 milhões são obesas. O IMC elevado é um fator de risco preponderante para o

desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente infarto agudo do miocárdio e de doenças renais, bem como a DRC (WHO, 2015).

As alterações em parâmetros cardiovasculares foram estudadas em modelos animais e em humanos com obesidade, apresentando uma combinação multifatorial para o desenvolvimento das morbidades ligadas ao sistema circulatório, como a disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA) e da função renal, além de alterações no sistema renina-angiotensina (SRA) e na função endotelial (AGHAMOHAMMADZADEH; HEAGERTY, 2012 WHO, 2015; FIORINO *et al.*, 2016).

O consumo excessivo de sal e dietas ricas em calorias são considerados como fatores de risco cardiovascular. Esses fatores têm em comum o surgimento da resistência a insulina e a ativação de mediadores pró-inflamatórios nos tecidos hepático e adiposo (BARRETO-FILHO *et al.*, 2002; DE LUCA; OLEFSKY, 2006; DE OLIVEIRA, 2011). Além disso, Barreto-filho *et al.* (2002) demonstraram um aumento da atividade do SNS, associado ao aumento da adiposidade corporal. Confirmando esses dados, recentemente nosso grupo mostrou que a obesidade induzida pela administração de dieta rica em gorduras em ratos desde o desmame é acompanhada por alterações cardiovasculares mediadas pelo aumento da atividade simpática. (FIORINO *et al.*, 2016)

De fato, a obesidade é capaz de induzir disfunções cardiovasculares, através da ativação do SNS (DE LUCA; OLEFSKY, 2006; HALL *et al.*, 2015; KOTSIS *et al.*, 2010). Estudos experimentais e clínicos mostraram uma relação direta entre o balanço simpato vago e as disfunções autonômicas (FIORINO *et al.*, 2011; HEAD *et al.*, 2014; LOHMEIER; ILIESCU, 2013; SERAVALLE *et al.*, 2014; VANĚČKOVÁ *et al.*, 2014).

Sabe-se que a deposição de lipídios acontece não apenas em tecido adiposo, mas também em outros tecidos, como nos rins. A deposição lipídica intrarrenal pode estar associada com alterações na expressão das proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBPs) (ABRASS, 2004). Nosso grupo demonstrou, recentemente, em ratos, uma importante associação entre o consumo de dieta hiperlipídica e um aumento das citocinas inflamatórias intrarrenais, demonstrada principalmente pelo aumento da expressão de interleucina-6 (IL-6), que está envolvida na progressão de inúmeras doenças crônicas, como por exemplo, a doença renal (PEREIRA, 2015).

A alimentação moderna não é rica apenas em gorduras e açúcares, mas também em cloreto de sódio, o popular sal. A associação da obesidade com o consumo

exacerbado de sal resulta em hiperativação do sistema nervoso simpático (ANDO, 2013). O consumo de sódio diário recomendado pela OMS é de 2000 mg/dia para evitar eventos cardiovasculares danosos, como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio (JTM, 2010). Em países como os EUA, o maior consumo de sal está presente nos alimentos industrializados e restaurantes (USDHHS, 2010), com a média de ingestão diária de 9g/dia de cloreto de sódio, equivalente a 3400 mg/dia de sódio. No Brasil as variações do sal presentes na alimentação chegam até 10g/dia.

Geralmente, variações no consumo de sal da dieta estão associadas com variações correspondentes na pressão arterial como demonstrado tanto em estudos clínicos, como experimentais (CHEN; SANDERS, 1993; CHOBANIAN; HILL, 2000; DENTON *et al.*, 1995; ELLIOT *et al.*, 1996; GALLETI *et al.*, 1997). Por exemplo, em ratos foi verificada uma relação direta entre os níveis pressóricos e a concentração de sódio presente na dieta deles (BALL *et al.*, 2010). Além disso, o aumento dos níveis pressóricos em função do consumo de sal na dieta está relacionado com maior morbimortalidade dos indivíduos, sendo que o risco de eventos cardiovasculares em pacientes sal-sensíveis é cerca de três vezes maior do que nos hipertensos sal-resistentes (MORIMOTO *et al.*, 2006).

Um incremento importante da PA pelo consumo de sal é característico de hipertensão sal-sensível, compondo o grupo dos pacientes que apresentam “hipertensão essencial”, constituindo cerca de 50% dos pacientes hipertensos (RODRIGUES-ITURBE *et al.*, 2007). De fato, vários protocolos têm sido propostos a fim de se definir a sensibilidade ao sal. Por exemplo, Winberg *et al.* (1986) definiram como sensibilidade ao sódio incrementos de 10 mmHg, ou mais, da pressão arterial média após dieta hipersódica, caracterizada como acima de 4-5g de NaCl. Acredita-se que esse aumento da PA está relacionado com o fato de que os rins de alguns indivíduos quando submetidos à dieta rica em sal, não conseguem excretar quantidades adequadas de sal e água a fim de manter o balanço de sódio e água, a não ser à custa de uma pressão elevada (WINBERG *et al.*, 1986; ZHOU *et al.*, 2008). Os determinantes para que uma pessoa desenvolva ou não sensibilidade ao sal ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, sabe-se que o sal desempenha um papel importante na ativação do sistema nervoso simpático, sugerindo que o aumento da pressão arterial possa também estar correlacionado com o aumento da atividade simpática.

Inúmeras evidências indicam a participação da hiperatividade simpática não só na gênese como na manutenção da hipertensão. Esta afirmação desperta a necessidade da utilização de uma ferramenta para estudar com melhor precisão a modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) e da PA no controle cardiovascular em situações fisiológicas ou patológicas. A análise espectral é uma ferramenta que permite estudar a variabilidade da FC (VFC) e da PA (VPA) tanto no domínio do tempo como no domínio da frequência e que já vêm sendo utilizada em estudos experimentais (FARAH *et al.*, 2006; PAGANI *et al.*, 1988).

O estudo da VPA e da VFC no domínio do tempo e da frequência nos permite avaliar a modulação autonômica do sistema cardiovascular. De fato, já está bem estabelecido na literatura que em ratos, o componente oscilatório de baixa frequência para os vasos e coração reflete a modulação simpática enquanto que o componente de alta frequência representa a modulação parassimpática para o coração (FARAH *et al.*, 2004).

Além disso, embora os barorreceptores arteriais sejam capazes de controlar de forma aguda as oscilações da PA, as disfunções crônicas do barorreflexo têm sido documentadas em diversas doenças cardiovasculares (DALL'AGO *et al.*, 1997; HARTHMANN *et al.*, 2007; IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; LA ROVERE *et al.*, 1998; ZANCHETTI; MANCIA, 1991). Dessa maneira, o controle reflexo da circulação controlado pelos barorreceptores é considerado como uma importante ferramenta no manejo do risco após evento cardiovascular (SILVA, 2010).

Outro fator importante na gênese e desenvolvimento da hipertensão arterial é o clássico sistema renina angiotensina, um sistema endócrino complexo de peptídios e enzimas, responsável principalmente na regulação da PA. Embora a angiotensina II seja o peptídeo com a função biológica mais expressiva, sabe-se atualmente que há outras angiotensinas que com participação de funções biológicas importantes, em sítios de produção e ação específicos, como Angiotensina III, IV e Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (VARAGIC *et al.*, 2008). Estudos recentes demonstraram que a hiperinsulinemia ativa o SRA por aumentar a expressão do angiotensinogênio, da Ang II e do receptor AT1, agindo para aumento da hipertensão em indivíduos com resistência à insulina, comum em indivíduos obesos (SOFFER, 1981). Portanto, o SRA é uma peça-chave nos estudos dos mecanismos de aumentos pressóricos em estudos de obesidade e sobrecarga salina,

pois espera-se que uma dieta hipercalórica, ou seja, de indução de obesidade animal, aumente a expressão dos principais peptídeos da cascata, porém há também a administração de sobrecarga de sal, o que também causa alterações no balanço da cascata do SRA.

Cientistas desenvolveram, ao longo do tempo, vários modelos animais para o estudo da hipertensão arterial, entre eles, os ratos espontaneamente hipertensivos (do inglês Spontaneously Hypertensive Rats, SHR), desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963). Esse modelo experimental é atualmente o mais utilizado para estudar a hipertensão, pois mimetiza a hipertensão essencial do homem. Nesse modelo SHR ocorre o aumento gradual da PA determinando um quadro de hipertensão, com o desenvolvimento da doença a partir da 7ª semana de vida até a 16ª semana, quando é atingido o platô, caracterizando a hipertensão sustentada (BELL *et al.*, 2004). Também foi descrito nesse modelo o desenvolvimento de hipertrofia no ventrículo esquerdo e disfunção diastólica, assim como observado hipertensão arterial primária em humanos, caracterizando o dano cardíaco (BELL *et al.*, 2004; DE ANGELIS *et al.*, 2004; DE ANGELIS *et al.*, 2004; MOSTARDA *et al.*, 2011; RUILOPE; SCHMIEDER, 2008; ZAMO *et al.*, 2010;). Além disso, nosso grupo observou que o modelo SHR apresenta aumento da variabilidade da PA e redução da sensibilidade barorreflexa, que leva à disfunção autonômica a causar lesão em órgão-alvo (IRIGOYEN *et al.*, 2005), e também foi demonstrado neste modelo que ocorre a redução do fluxo sanguíneo em tecidos renais, musculares e pulmonares e prejuízo na liberação de óxido nítrico (SOARES, 2004).

A associação entre hipertensão arterial e obesidade em animais SHR tem sido estudada em diferentes contextos e com resultados contraditórios. Animais SHR recém desmamados quando submetidos à dieta hiperlipídica não são capazes de desenvolver hipertensão arterial (WEXLER, 1981). Em um outro estudo a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e hipercalórica em animais SHR adultos foi acompanhada de hiperinsulinemia, taquicardia e paradoxalmente com redução da pressão arterial (CONTRERAS; WILLIAMS, 1989). Entretanto, animais SHR adultos submetidos à dieta hiperlipídica durante 12 semanas apresentaram obesidade, intolerância à glicose e aumento significativo da pressão arterial sistólica quando comparados com os animais SHR alimentados com dieta padrão (SHIN *et al.* 2009), assim como animais SHR jovens alimentados com ração hiperlipídica e hipercalórica durante 8 semanas também



apresentaram aumento da pressão arterial quando comparados com animais SHR alimentados com ração padrão (SANTOS *et al.*, 2007). Além disso, a administração da dieta hiperlipídica em animais SHR também foi capaz de ativar o sistema renina angiotensina intra-renal (Chung *et al.* 2009).

Visando abranger tanto a perspectiva da hipertensão essencial, quanto os desafios impostos pelo estilo alimentar da nossa sociedade moderna, este projeto propõe estudar os efeitos da associação de dois fatores de risco ambientais, sal e dieta hipercalórica na função cardiovascular e renal, de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

## **2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

O alto índice de mortalidade cardiovascular associado com a incidência de quadros clínicos de hipertensão, bem como o aumento da prevalência de obesidade e doença renal no mundo industrializado, inclusive no Brasil representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e a morbimortalidade associada a essas patologias.

Assim sendo, é grande o impacto econômico que ocorre nos serviços de saúde devido aos custos para o tratamento da doença e/ou das suas complicações. A perda de produtividade no trabalho, a aposentadoria precoce e a mortalidade prematura também são fatores prejudiciais à saúde pública com graves repercussões sociais.

As altas taxas de prevalência da hipertensão arterial verificadas globalmente, associadas com fatores de risco cardiovascular presentes nas sociedades desenvolvidas, como ingestão de dietas hipercalóricas, bem como o consumo excessivo de cloreto de sódio, justificam as mais diferentes abordagens de investigação visando não só melhorar o manejo da doença bem como estabelecer estratégias de prevenção da mesma em todo o mundo.

Neste contexto, este projeto se propõe a estudar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), ou seja, animais que nascem com predisposição genética para HA, similar ao observado em pacientes com hipertensão essencial, os efeitos do consumo de uma dieta hipercalórica, iniciada logo após o desmame, simulando o que acontece na população, uma vez que se observa nas sociedades modernas o consumo de uma

dieta hipercalórica desde o início do desenvolvimento das crianças, e de sal (1%), na função cardiovascular e renal.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Estudar os efeitos da associação de dois fatores de risco ambientais, sal e dieta hipercalórica na função cardiovascular e renal, de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**3.1.1 Avaliar os efeitos da dieta hipercalórica e do sal na função cardiovascular através do estudo do(a):**

- a) Pressão arterial e frequência cardíaca;
- b) Controle autonômico cardiovascular, com a ferramenta de análise espectral;
- c) Sensibilidade do barorreflexo.

**3.1.2 Avaliar os efeitos da dieta e sal na função renal, através do estudo do(a):**

- a) Função renal in vivo;
- b) Análise das citocinas inflamatórias;
- c) Análise da morfometria, da deposição lipídica e da deposição de colágeno;
- d) Expressão proteica das proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBP1 e SREBP2).

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos métodos descritos a seguir foram aprovados pelos comitês de ética da Universidade Federal de São Paulo (CEUA nº 8070180417) e da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Processo CEUA/UPM Nº 131/10/2015).

Para realização dos experimentos, foram utilizados ratos SHR machos recém-desmamados (21-28 dias de idade), durante 8 semanas (56 dias) e pesando inicialmente entre 40 – 50 gramas. Os animais foram mantidos agrupados no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em ambiente com temperatura (22° C – 25° C), e ciclo claro-escuro (12/12 horas) controlado, com livre acesso à água e ração comum (ração industrial para ratos e camundongos, NUVILAB CR-1, PR) ou ração hipercalórica, preparada manualmente no laboratório. Semanalmente, o peso corporal será avaliado utilizando balança semi-analítica comercial para pequenos animais.

O comprimento nasoanal foi obtido com uso de fita métrica, com o animal anestesiado, momentos antes do início da eutanásia. O índice de Lee foi obtido a partir da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal  $[3\sqrt{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}]$  (BERNARDIS, 1970). O resultado foi multiplicado por 100.

A dieta comum foi uma ração padrão industrializada (ração industrial para ratos e camundongos, NUVILAB CR-1, PR, Brasil).

A dieta hipercalórica foi preparada em laboratório, sendo que a receita foi adaptada da dieta palatável hiperlipídica previamente descrita e utilizada por Estadella et al., (2004). A dieta é normoprotéica e consiste em uma mistura hipercalórica contendo ração comercial, amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maisena na proporção 5:2:2:1, conforme descrito abaixo:

- 50% de ração padrão NUVILAB CR-1 em pó
- 20% de amendoim Yoki® torrado
- 20% de chocolate granulado Visconti®
- 10% de bolacha maizena Marilan®

Os ingredientes foram triturados e misturados até a obtenção de um pó homogêneo. À essa mistura foi adicionada água destilada suficiente para se obter uma massa consistente e homogênea, a mistura foi, então, modelada em pequenos cilindros com cerca de 2 cm de diâmetro e 4-6 cm de comprimento. A secagem foi feita em estufa ventilada, a 60°C, por 24 horas, para obtenção da consistência desejada, semelhante à ração padrão.

Foram realizadas análises bromatológicas de ambas as rações para se obter as informações nutricionais características de cada ração.

**Tabela 1.** Resultados das análises bromatológicas realizadas nas duas rações administradas nos protocolos animais. Ração comercial: ração industrial para ratos e camundongos comercial (NUVILAB CR-1, PR); Ração Hipercalórica: ração manipulada contendo ração comercial, amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maizena na proporção 5:2:2:1. \*p < 0,05 vs Ração comercial

	<b>Ração Comercial</b>	<b>Ração Hipercalórica</b>
<b>Cinzas (%)</b>	7.18±0.04	3.84±0.03*
<b>Proteínas (%)</b>	23.40±0.44	17.28±0.08*
<b>Lipídios (%)</b>	6.79±0.09	19.50±0.12*
<b>Fibras (%)</b>	6.05±0.13	3.03±0.18*
<b>Umidade (%)</b>	11.27	7.70
<b>Carboidratos (%)</b>	45.31±0.45	48.65±0.29*
<b>Calorias (kcal/g)</b>	4.45±0.01	5.14±0.01*

O conteúdo energético da dieta hipercalórica, determinado por cálculo da soma do valor calórico de proteínas, lipídeos e carboidratos dos ingredientes da receita é 5,14 kcal/g, o que perfaz 0,69 kcal/g a mais do que a dieta padrão.

A sobrecarga salina foi administrada ao fim do tratamento, nos últimos 10 dias (a partir do 47º dia após o desmame) do tratamento de 8 semanas. Foi uma mistura de água potável acrescida de 1% de NaCl (Cloreto de sódio, Synth). A solução salina foi dada aos animais *ad libitum*.

Os animais SHR foram divididos de forma randomizada em 4 grupos com n=6-12/grupo:

- Grupo Hipertenso Controle (HC) – serão tratados com água de beber e ração industrial durante 8 semanas.
- Grupo Hipertenso Dieta (HD) – serão tratados com água de beber e ração hipercalórica durante 8 semanas.
- Grupo Hipertenso Sal (HS) – serão tratados com dieta padrão e sobrecarga salina na água de beber (1%) nos últimos 10 dias de tratamento.
- Grupo Hipertenso Dieta e sal (HDS) – serão tratados com ração hipercalórica durante 8 semanas e sobrecarga salina na água de beber (NaCl, 1%) nos últimos 10 dias de tratamento.

Os animais que passaram pelos procedimentos de avaliações cardiovasculares não tiveram coletados tecidos. Tais medidas foram tomadas devido ao nível de estresse pós-cirúrgico e utilização de fármacos, que poderiam alterar parâmetros fisiológicos e patológicos, como a massa de tecido adiposo e o perfil lipídico.

Ao final do protocolo, a determinação da glicemia foi realizada com os animais em jejum de 8 horas, onde se retirou uma gota de sangue da cauda que foi introduzida em glicosímetro comercial (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).

Em seguida, foi realizado o teste de tolerância a glicose (TTG) onde, após a obtenção da glicemia basal, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de solução de glicose 50% e a glicemia foi analisada, pelo mesmo método de glicosímetro nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos, após a administração de glicose (TAI, 1994)

Os valores de glicemia de cada tempo foram tabulados em gráfico e calculadas as áreas sob a curva (AUC) da resposta glicêmica, no software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., Califórnia, USA) e dividido por minuto de experimento, dando a resposta final de área sob a curva por minuto (AUC/min).

O registro direto da pressão arterial foi realizado através da cateterização da artéria e veia femorais (FARAH et al., 2001). O procedimento cirúrgico realizou-se com os ratos anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (70 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) via intraperitoneal. Os cateteres consistiram de uma parte mais fina (Micro-Renathane® Implantation Tubing, Braintree Scientific, Inc.), introduzida pela femoral acessando a aorta ou veia cava inferior, e uma parte mais grossa (Tygon Catheter Tubing, Braintree Scientific, Inc.) passada subcutaneamente até o dorso do animal, entre as escápulas, e então fixada através de pontos cirúrgicos na pele. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e drogas pós-cirúrgicas foram administradas: meloxicam (2 mg/kg), enrofloxacino (10 mg/kg) e cloridrato de tramadol (4 mg/kg).

Os registros de PA e FC foram realizados com os ratos acordados e em livre movimentação, no qual após a estabilização de atividade exploratória do animal (15-20 minutos), foram registrados 30 minutos dos sinais de PA e FC.

A medida direta da PA foi obtida através do cateter da artéria femoral conectado a um transdutor de pressão (Hewlett-Packard 1280, EUA) acoplado a um amplificador

(AECAD-02PD, Projetos AVS, Brasil). O sinal amplificado foi digitalizado através de uma placa de conversão analógico-digital (modelo DI-158, Dataq Instruments, USA), com frequência de amostragem de 2000 Hz, instalada em um computador (modelo T23, IBM Thinkpad, Inc). Os dados digitalizados foram processados através do programa WinDag (DataQ Instruments, Inc.; USA) e posteriormente analisados (Excel, Microsoft Co., USA).

Os ciclos cardíacos obtidos pelo programa WinDag, aliado à análise pelo programa Excel, forneceram os dados em forma de texto das medidas de pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e intervalo de pulso (IP).

As análises de variabilidade da PA e IP nos domínios do tempo e da frequência foram analisadas pelo programa pelo programa Cardioseries 2.4 (DIAS, 2010). A variabilidade de IP no domínio do tempo foi quantificada pela variância total (VARIP) e pela raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos R-R (RMSSD). Já a variabilidade da PS no domínio do tempo foi representada pela variância (VARPA). Já para análise da variabilidade de IP e da PS no domínio da frequência, as séries temporais utilizaram-se da transformada rápida de Fourier (FFT) para decomposição dos sinais da onda em espectros de potência. Houve interpolação dos sinais de 10 Hz e os espectros foram gerados a partir de trechos de 512 pontos cada, com sobreposição de 50%. (SANTOS, 2015).

As potências foram definidas como:

- Bandas de muito baixa frequência (VLF) - inferiores a 0.20Hz;
- Bandas de baixa frequência (LF), representando a modulação simpática - entre 0.20-0.75Hz
- Bandas de alta frequência (HF), correspondente com modulação vagal, - entre 0.75-4,0 Hz.

Cada uma foi calculada pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para normalização, as potências das bandas de LF e HF foram subtraídas da potência na banda VLF e sua soma foi considerada a totalidade. Este estudo não abordou as faixas de muito baixa frequência por não estarem muito bem definidas pela literatura.

Após o registro da PA basal, foi realizada a administração de drogas vasoativas através do cateter da veia femoral, em concentrações seriada e sequencias (0,1 mL) de Cloridrato de fenilefrina (Fe, Sigma Aldrich) e Niprussiato de sódio (Np, Sigma

Aldrich) para avaliação da sensibilidade pressorreceptora. As doses administradas foram, seriadamente: Cloridrato de fenilefrina – 0,5, 1, 2 e 4 ug/mL; nitroprussiato de sódio – 2, 5, 5, 10 e 20 ug/mL, sendo considerada variações de até 30 mmHg. O índice da sensibilidade do reflexo pressorreceptor foi calculado pela razão entre as respostas de FC em função das variações de PA ( $\Delta FC/\Delta PA$ ), obtendo os índices de bradicardia e taquicardia (FARAH et al., 2001).

Os animais permaneceram em gaiolas metabólicas (marca Instrulab) durante os dois últimos dias de protocolo experimental, para coleta de urina e avaliação do volume urinário de 24 horas. O consumo individual de água e ração também foi quantificado, através do cálculo da diferença de peso de ração e volume de água, antes e após o período de 24 horas. As primeiras 24 horas de permanência na gaiola metabólica foram destinadas para habituação do animal à mesma. Depois, mais 24 horas de permanência para coleta oficial de urina e avaliações metabólicas de consumo. A urina foi coletada, centrifugada a 5000rpm, 4°C por 10 minutos (centrífuga modelo HARRIER 18/80) e armazenada a -20°C para posteriores análises bioquímicas.

Ao final da 8 semana de tratamento, os animais em jejum de 8 horas, foram eutanasiados por meio de sobrecarga anestésica, com cetamina (210 mg/kg) associada à xilazina (36 mg/kg). Amostras de sangue serão coletadas para avaliações bioquímicas e moleculares através de um sistema de coleta de sangue à vácuo com canhão e agulha específicos (BD Vacutainer®, Inglaterra) e tubo de coleta a vácuo com acelerador de coagulação (Guangzhou Improve Medical Inst. Co.) diretamente da bifurcação entre a veia mesentérica e veia esplênica. O coração foi retirado e pesado, em seguida o ventrículo esquerdo foi isolado (retirando-se os átrios e ventrículo direito) e pesado. A gordura retroperitoneal e epididimal foram também retiradas e pesadas.

Os tubos coletados foram armazenados em recipiente com gelo para repouso e coagulação correta. Após 30 minutos da coleta do sangue total, os tubos foram centrifugados a 4°C, 4000 rpm por 10 minutos, e armazenados em tubos em freezer a -20°C.

Para o perfil metabólico, foram dosados em soro: colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de alta densidade (HDL). As análises foram realizadas por métodos

colorimétricos enzimáticos comerciais (Labtest, BR) em espectrofotômetro Humanlyzer 3000 (Human GMBH, Alemanha).

A avaliação da função renal *in vivo* foi realizada através da determinação da taxa de filtração glomerular (TFG). A determinação da TFG é baseada na depuração de substâncias endógenas, como a da creatinina, que requer análises sérica e urinária. A estimativa da TFG (mL/min) foi obtida através do seguinte cálculo:

$TFG = (DOUcr \times FU) / DOPcr$ , onde:

DOUcr = Densidade ótica de creatinina na urina (mg/dL)

DOPcr = Densidade ótica da creatinina no sangue (mg/dL)

FU = Fluxo urinário (mL/min)

Após a eutanásia, o rim esquerdo foi seccionado em seu plano longitudinal, de modo a obter duas partes semelhantes. Uma das partes foi conservada em formaldeído 4% tamponado durante 24 horas e, posteriormente mantido em álcool 70% para a fixação do tecido. Em seguida, os tecidos foram processados (desidratação, diafanização e parafinização) e incluídos em Paraplast (Sigma). Os cortes foram realizados com uso de micrótomo (marca LUPETEC, modelo MRP-09), em 5 µm de espessura e corados com Picrosirius.

A análise dos parâmetros morfológicos foi realizada por meio de microscopia óptica com o auxílio do programa Image Pro-Plus 4.1. Foram fotografados 20 glomérulos por animal, no aumento de 400X (sistema de aquisição de imagem Leica DFC310 FX) para avaliação do diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular e área da cápsula de Bowman. A área do espaço de Bowman foi obtida através da subtração da área da cápsula menos a área do tufo glomerular.

As lâminas coradas pelo Picrosirius também foram utilizadas para avaliação da deposição de fibras colágenas no tecido renal dos animais. Foram avaliadas 15 fotos por lâmina, no aumento de 200X (sistema de aquisição de imagem Leica DFC310 FX). O programa Image Pro-Plus 4.1, foi utilizado para obtenção da porcentagem de colágeno por área de tecido analisada.

A coloração para avaliação da deposição lipídica renal foi realizada no laboratório de Histologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH-Usp) em colaboração com a profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista.



A outra parte do rim esquerdo seccionado foi aderida a um pedaço de papel cartão com o auxílio de resina (Tissue Tek Sakura) congelada inicialmente em nitrogênio líquido e, em seguida, mantida em freezer sob temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . O tecido foi cortado em criostato (MICROM – HM505E), com espessura de  $8\ \mu\text{m}$ . Em seguida foi feita fixação em formaldeído 4% e realizada a coloração com Oil Red O, contra-corada com Hematoxilina, para verificar a deposição de gotículas de gordura nos glomérulos e nos túbulos. Foram avaliadas 15 fotos por lâmina, no aumento de 200X (sistema de aquisição de imagem Leica DFC310 FX). Utilizando o programa Image Pro-Plus 4.1, foi possível obter a porcentagem de lipídios por área de tecido analisada.

Amostras de rim esquerdo incluídas em Paraplast foram cortadas em  $4\ \mu\text{m}$  de espessura, com uso de micrótomo (marca LUPETEC, modelo MRP-09). Após desparafinização e hidratação dos cortes (bateria de xilol e álcool etílico seguida de água), foi realizada a recuperação antigênica dos tecidos com tampão citrato 100x concentrado (pH 6,0) a  $98^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi aplicado bloqueador de peroxidase (marca Spring) de modo a cobrir todo o tecido na lâmina. Para o bloqueio de proteína, foi utilizada albumina de soro bovino (marca Sigma), por 10 minutos. Em seguida foi realizada incubação por 1 hora nos anticorpos primários anti-fibronectina e anti-colágeno IV (ABCAM) na diluição de 1:200 cada. O sistema de detecção utilizado foi o N-Histofine® Simple Stain MAX PO (Nichirei) durante 30 minutos, seguido do substrato-cromógeno DAB (marca Spring) por 5 minutos. Para melhor visualização das estruturas, os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina.

Foram avaliadas 15 fotos por lâmina, no aumento de 200X (sistema de aquisição de imagem Leica DFC310 FX). Utilizando o programa Image Pro-Plus 4.1, foi possível obter a porcentagem de marcação por área de tecido analisada.

A quantificação proteica no tecido renal e a dosagem de citocinas inflamatórias no tecido renal foram realizadas no laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), com a colaboração da profa. Dra. Kátia De Angelis.

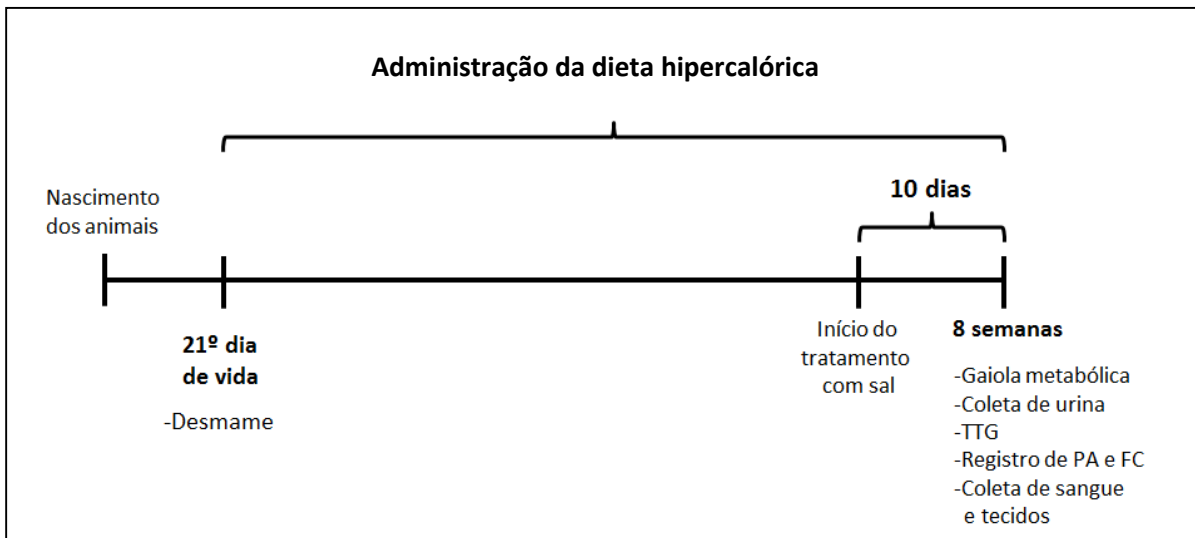
Amostras de rim direito foram homogeneizadas em tampão de extração acrescido de inibidor de protease com EDTA (marca ROCHE) na proporção de  $600\ \mu\text{L}$  para cada  $150\text{mg}$  de tecido. A cada  $100\ \mu\text{L}$  de tampão, foi acrescentado  $100\ \mu\text{L}$  de TRITON. Em seguida, foram centrifugados a  $12000\ \text{rpm}$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga

Eppendorf Centrifuge 5804R). Parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e parte foi armazenada a -80°C para posterior realização de ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

Para a quantificação da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), foi empregado o método de quantificação por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) direto, utilizando os kits comerciais da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (SpectraMax i3). A expressão das citocinas foi normalizada pelo conteúdo proteico total, obtido pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

Para a análise da expressão proteica das proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBP1 e SREBP2), os tecidos renais foram centrifugados a 4°C, 5000 RPM, por 1 hora (centrífuga HARRIER 18/80) e o sobrenadante foi coletado. Após a preparação das amostras, na proporção de 1:1 (50 $\mu$ l de solução tampão com azul de bromofenol e 50 $\mu$ l de homogenato) as mesmas foram aplicadas no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (30 $\mu$ g de proteína/poço) para a realização da eletroforese (Mini-Protean Tetra-cel, Biorad). Em seguida as proteínas contidas no gel foram submetidas à eletrotransferência das proteínas para a membrana (Mini-Protean Tetra-cel, Biorad). A membrana foi encubada com anticorpo primário anti-SREBP 1 e anti-SREBP 2, durante toda a noite, e no dia seguinte foi lavada em TBS-T e encubada com anticorpo secundário. O substrato antígeno-anticorpo foi visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Thermo Scientific). A membrana foi exposta ao filme de raio-X (Kodak) para revelação, e a quantificação das bandas protéicas de SREBP 1 e SREBP 2 foi realizada através do programa Scion Image (Frederick Maryland, EUA).

Todos os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística comparativa foi feita utilizando o software Graphpad Prism 6.0 através da análise de variância (ANOVA) de duas vias para todos os parâmetros, seguido do *post-hoc* de Tukey quando necessário. Diferenças que apresentaram probabilidade de acaso menores que 5% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas significativas.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 mostra que todos os animais consumiram a mesma quantidade de ração por dia independente do tratamento recebido. Após analisar a quantidade de calorias ingeridas, observamos um aumento nas calorias totais nos animais que receberam a dieta hipercalórica em comparação aos animais que receberam a dieta padrão. Quando analisamos as calorias ingeridas de cada componente nutricional, observamos que o aumento das calorias ingeridas nos animais HD e HDS se deve às calorias oriundas dos lipídeos uma vez que a ingesta calórica lipídica foi significativamente maior nesses animais em relação aos animais HC e HS.

**Tabela 1:** Valores de consumo de ração e ingesta calórica em 24 horas dos grupos SHR controle (HC), SHR sal (HS), SHR Hiperlipídico (HD) e SHR Hiperlipídico Sal (HDS).

	Consumo de Ração (g)	Ingesta Calórica Total (Kcal)	Ingesta calórica lipídica (Kcal)	Ingesta calórica proteica (Kcal)	Ingesta calórica glicídica (Kcal)
HC	20±0,6	66±2,1	12±0,4	18±0,6	36±1,1
HS	22±0,9	74±3,0	13±0,5	21±0,8	40±1,6
HD	24±5,8	107±26*	43±10*	17±4,0	47±11
HDS	33±6,6	146±29*	58±12*	23±4,6	65±13

Valores em média ± EPM. \*p<0,05 vs HC e HS

Os grupos experimentais iniciaram o protocolo com pesos iniciais semelhantes (40 - 50g) e, ao final da 8ª semana, os grupos HD e HDS apresentaram menor peso corporal do que os demais grupos. O índice de Lee foi calculado a fim de normalizar os pesos dos animais entre os grupos. O índice foi feito com o peso e comprimento naso-anal dos animais no início do protocolo de eutanásia dos animais. Houve um aumento no índice de Lee nos animais HD em relação aos outros grupos. Também se observou aumento significativo do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal nos grupos que receberam a dieta hipercalórica (tabela 3).

**Tabela 3:** Pesos corporais finais e iniciais, índice de Lee e pesos corrigidos de gordura retroperitoneal e gordura epididimal dos animais submetidos ao protocolo experimental

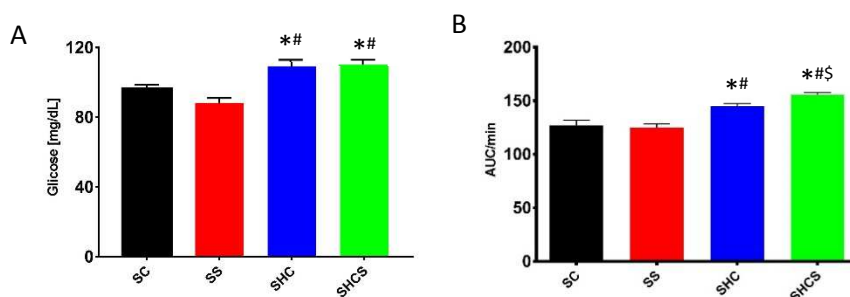
	HC	HS	HD	HDS
<b>Peso Corporal inicial (g)</b>	44±2	47±2	47±2	43±2
<b>Peso Corporal final (g)</b>	264±6	275±7	242±5**	242±**
<b>Índice de Lee</b>	29,6± 0,2	29,7 ± 0,3	30,3 ± 0,2**\$	29,7 ± 0,2
<b>Gordura retro (g)</b>	0,76 ± 0,04	0,63 ± 0,07	1,44±0,09**	1,33±0,04**
<b>Gordura epid (g)</b>	0,54 ± 0,03	0,45 ± 0,05	1,02±0,06**	0,98±0,03**

Os dados são apresentados como média ± EPM. Grupos: HC: SHR Controle (n=12), HS: SHR Sal (n=12), HD: SHR Hipercalórica (n=12), HDS: SHR Hipercalórica e Sal (n=12). \*p<0,05 vs HC, #p<0,05 vs HS e \$ p<0,05 vs HDS.

Embora o peso final nos grupos HD e HDS foi significativamente menor do que os dos grupos HC e HS, o comprimento naso-anal (índice de Lee) do grupo HD foi maior, assim como o tecido adiposo, representado pelos depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal apresentou-se maior nos grupos que receberam a dieta hipercalórica (HD e HDS) quando comparados com os grupos HC e HS. Assim sendo, considerando esses dados em conjunto podemos sugerir que a dieta hipercalórica foi capaz de causar um quadro de obesidade nesses animais.

A glicemia basal foi realizada previamente ao teste de intolerância à glicose, com os animais em jejum. De acordo com a figura 1 podemos observar que a glicemia basal de ambos os grupos das dietas hipercalóricas (HD e HDS) foi mais elevada tanto em

relação a HC, quanto a HS. Quanto ao teste de intolerância à glicose, os grupos tratados com a dieta hipercalórica, tanto SHC e SHCS, apresentaram um aumento da área sob a curva em suas curvas glicêmicas, em relação aos grupos de ingestão da dieta padrão, SC e SS.



**Figura1:** A: Avaliação da glicemia sanguínea em jejum de 8 horas (n = 6/grupo). B: Área sob a curva (Area Under Curve – AUC) dividida pelo tempo total de 120 minutos, adquirida pelo teste de intolerância a glicose, realizado nos tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (n =6/grupo). HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Hipercalórico; HDS: Grupo Hipercalórico + Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \* p<0,05 vs. HC, # p<0,05 vs. HS, \$ p < 0,05 vs. HD.

Apesar dos animais SHR apresentarem, pela literatura, resistência a insulina, a administração da dieta hipercalórica foi capaz de exacerbar a resistência ao hormônio e piorar os índices glicêmicos sérico. Os animais que receberam a dieta hipercalórica (HD e HDS) apresentaram maior glicemia sérica de jejum (8 horas) do que os animais tratados com dieta padrão (HC e HS). Além disso, os valores da área sob a curva no teste de tolerância à glicose mostram que o consumo de dieta hipercalórica foi capaz de determinar um quadro de intolerância à glicose. Isso foi observado tanto nos animais que receberam a dieta hipercalórica com sobrecarga salina, quanto nos animais tratados apenas com a dieta hipercalórica. A intolerância à glicose é um dos sintomas presentes em pacientes com síndrome metabólica. Estudos recentes envolvendo modelos animais de síndrome metabólica também demonstraram aumento da área sob a curva no teste de tolerância à glicose (MORRIS *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2014; CALO *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2016). Por outro lado, o grupo que ingeriu apenas sal 1% na água, apresentou redução na glicemia basal que não foi acompanhada de diminuição da curva glicêmica. Há relatos na literatura, em estudos com humanos em dietas hipersódicas, que demonstram uma redução da glicemia e da curva glicêmica (IWAOKA *et al.* 1988). Em estudo com humanos hipertensos, Frisoli *et al.* (2012) relataram observar redução

da curva glicemia no TTG quando submetidos a sobrecarga salina. A literatura demonstra que o sal age nos mecanismos de captação e utilização da glicose, insulino-dependente, mas ainda há dados contraditórios sobre os mecanismos de ação (SHARMA *et al*, 1991). Assim sendo, esses resultados sugerem que os animais submetidos à dieta hipercalórica estão desenvolvendo um quadro de diabetes tipo 2.

A Tabela 4 apresenta os valores de triglicérides, colesterol total e suas frações (lipoproteína de muito baixa densidade -VLDL, lipoproteína de baixa densidade -LDL e lipoproteína de alta densidade -HDL), obtidos através das amostras de soro coletadas ao final do protocolo e que representam o perfil lipídico desses animais. A dieta hipercalórica causou um aumento nos triglicérides nos animais HD e HDS em relação aos animais HC e HS.

**Tabela 4:** Perfil lipídico. Perfil lipídico composto pelas análises de triglicérides, colesterol total, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL). Os resultados estão expressados em mg/dL. (n = 6). HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Hipercalórico; HDS: Grupo Hipercalórico + Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \* p<0,05 vs. HC, # p<0,05 vs. HS, \$ p<0,05 vs. HD.

	HC	HS	HD	HDS
<b>Triglicérides</b>	26 ± 2	26 ± 3	48 ± 3**	37 ± 2**
<b>Colesterol total</b>	40 ± 3	42 ± 3	62 ± 6*	58 ± 4
<b>VLDL</b>	6 ± 0,4	6 ± 0,5	8 ± 0,7	7 ± 0,5
<b>LDL</b>	22 ± 3	25 ± 2	27 ± 5	32 ± 4
<b>HDL</b>	12 ± 1	11 ± 1	28 ± 1**	19 ± 3**\$

O colesterol total estava elevado nos animais que receberam a dieta hipercalórica do grupo HD, enquanto que no grupo HDS aparece uma tendência ao seu aumento. As frações de colesterol VLDL e LDL não apresentaram diferenças entre os grupos. Entretanto, a lipoproteína HDL apresentou-se mais elevada nos grupos tratados com a dieta hipercalórica do que na dieta comercial.

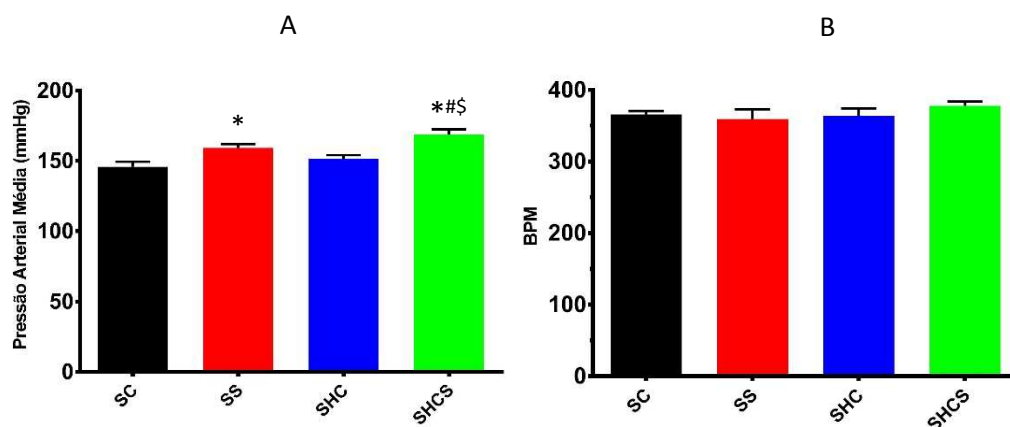
Observando o perfil lipídico desses animais, podemos observar que a dieta hipercalórica altera o perfil lipídico dos animais. O aumento dos níveis de HDL nos

grupos HD e HDS pode ser devido à composição do amendoim na ração hipercalórica. O amendoim é um alimento altamente energético, mas seus óleos são predominantemente ácidos graxos insaturados, considerável benéficos ao organismo por consequente aumento nos níveis de HDL séricos (BASODE *et. al.*, 2012; PASCHOAL *et. al.*, 2007; PROENÇA *et. al.*, 2002).

## 5.1 Objetivo específico 1: Avaliar os efeitos da dieta hipercalórica e do sal na função cardiovascular

### 5.1.1 Pressão arterial e Frequência Cardíaca avaliados diretamente

Como podemos observar na figura 2, a dieta hipercalórica não foi capaz de alterar os valores de pressão arterial nos animais hipertensos, entretanto houve discreto aumento da pressão arterial nos animais que apenas receberam a sobrecarga salina e a associação da dieta hipercalórica com a sobrecarga salina exacerbou esse aumento da pressão arterial. É importante salientar, que as alterações na pressão arterial não foram acompanhadas de alterações na frequência cardíaca.



**Figura 2:** A - Pressão arterial média; B – Frequencia cardíaca. HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Hipercalórico; HDS: Grupo Hipercalórico + Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \*  $p < 0,05$  vs. HC, #  $p < 0,05$  vs. HS, §  $p < 0,05$  vs. HD.

O aumento da pressão arterial induzido pela sobrecarga salina observado nos animais HS e HDS é característico de hipertensão sal-sensível, compondo o grupo dos pacientes que apresentam “hipertensão essencial” (RODRIGUEZ-ITURBE *et al.*, 2007). Esta direta associação a ingestão de sal na dieta com as variações de pressão arterial tem sido obtida tanto em estudos clínicos quanto experimentais em ratos normotensos e hiperetensos (DENTON *et al.*, 1995; ELLIOTT *et al.*, 1996; GALLETI *et al.*, 1997; CHOBANIAN *et al.*, 2000; PETERSEN *et al.* 2001, ARAUJO *et al.*, 2016). A sobrecarga salina possui diversos mecanismos de ação na elevação da pressão arterial, entre os quais podemos destacar o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona a nível sistêmico e tecidual (ARAUJO, 2014; CHOLEWA *et al.*, 2001).

Não foi possível observar diferença de PAM entre os animais tratados com a dieta hipercalórica (HD). Alguns estudos com uso de dieta hipercalórica na literatura também não demonstraram capacidade da dieta em elevar a pressão arterial tanto em animais normotensos como em animais hipertensos (PASTORE *et al.*, 2010; MUNTZEL *et al.*, 2012). Entretanto, a associação dos dois fatores, a dieta hipercalórica e a sobrecarga salina, foi capaz de exacerbar os níveis pressóricos verificados nos animais que receberam apenas a sobrecarga salina (HS).

### **5.1.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial Sistólica**

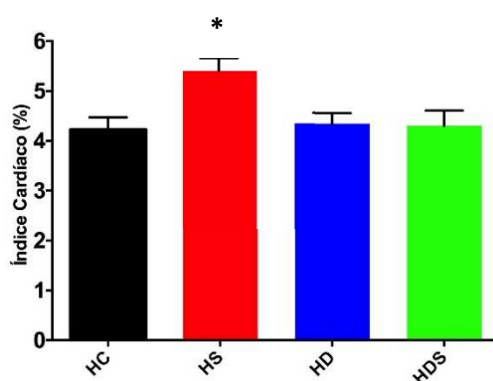
A variabilidade da frequência cardíaca avaliada pela análise espectral mostrou um aumento significativo nos animais hipertensos submetidos a sobrecarga salina quando comparados com os outros grupos experimentais. Entretanto, não foram observadas alterações significativas no índice RMSSD, indicador relacionada à ativação vagal, no índice LF absoluto e relativo (%), relacionado à modulação simpática cardíaca da frequência cardíaca, no índice HF absoluto e relativo (%), relacionado à modulação parassimpática cardíaca da frequência cardíaca e no balanço simpato-vagal (LF/HF) entre os grupos experimentais. (Tabela5).



**Tabela 5** : Variabilidade da frequência cardíaca. Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca, sendo variância e RMSSD parâmetros do domínio do tempo e LFs e HFs parâmetros do domínio da frequência. HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Dieta; HDS: Grupo Dieta e Sal; RMSSD: *Root Mean Square of the Successive Differences* (Raiz Quadrada da Média do Quadrado das Diferenças entre Intervalos R-R); LF: Low Frequency (Bandas de baixa frequência); HF: High Frequency (Bandas de alta frequência) Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \* p<0,05 vs. HC, # p<0,05 vs HS.

	HC	HS	HD	HDS
Variância (ms <sup>2</sup> )	56 ± 5	88 ± 8*	58 ± 7	56 ± 11
RMSSD (ms)	4 ± 0,2	5 ± 0,4	5 ± 0,4	5 ± 0,2
LF absoluto (ms <sup>2</sup> )	2 ± 0,2	2 ± 0,2	3 ± 0,3	3 ± 0,5
HF absoluto (ms <sup>2</sup> )	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
LF (%)	9 ± 1	9 ± 1	10 ± 1	12 ± 1*#
HF (%)	28 ± 2	25 ± 5	28 ± 3	33 ± 3
LF/HF	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,06

O índice cardíaco, que compreende o quanto a frequência cardíaca foi capaz de variar percentualmente ao decorrer do tempo, foi aumentado em HS em relação a todos os outros grupos, corroborando o fato de que a variância da frequência cardíaca nos animais submetidos a sobrecarga salina está aumentada em relação ao grupo controle.



**Figura 3**: Índice Cardíaco. Variação percentual da frequência cardíaca ao decorrer do tempo (n=6/grupo). HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Dieta; HDS: Grupo Dieta e Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \* p<0,05 vs. HC

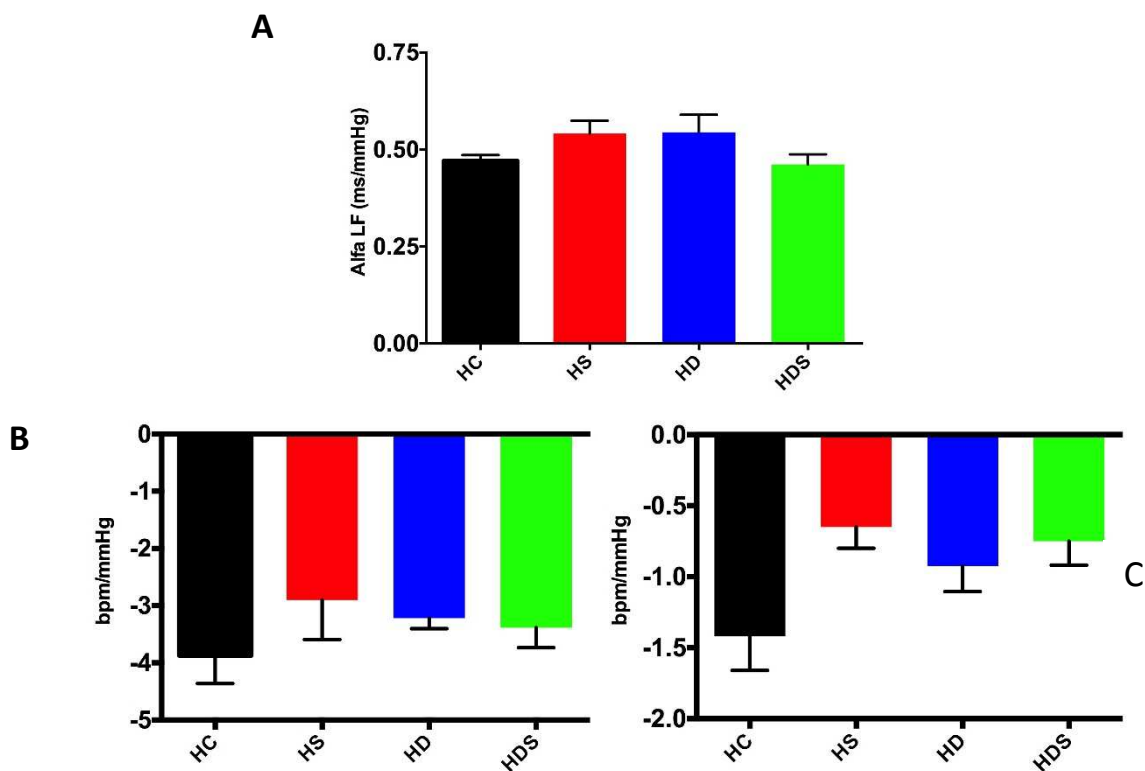
A Tabela 6 apresenta os resultados da variabilidade da pressão arterial nos grupos experimentais. Os resultados demonstraram uma diminuição da variabilidade da pressão sistólica no domínio do tempo (Variância) nos animais hipertensos submetidos a dieta hipercalórica, entretanto não foram observadas alterações da variabilidade no domínio da frequência, LF absoluto e LF%.

**Tabela 6:** Variabilidade da pressão arterial sistólica. HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Dieta; HDS: Grupo Dieta e Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM. \*  $p < 0,05$  vs. HC.

	HC	HS	HD	HDS
<b>Variância (mmHg<sup>2</sup>)</b>	69 ± 6	50 ± 5	43 ± 8*	54 ± 9
<b>LF absoluto (mmHg<sup>2</sup>)</b>	10 ± 1	8 ± 1	10 ± 2	10 ± 2
<b>LF (%)</b>	35 ± 2	37 ± 3	45 ± 3	42 ± 4

### 5.1.3 Sensibilidade do barorreflexo

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada pelo índice alfa que nos indica a sensibilidade espontânea do barorreflexo pelo método de análise espectral e após a administração de drogas vasoativas induzindo alterações pressóricas e as respostas de bradicardia e taquicardia reflexas. Conforme podemos observar na figura 4, não houve alteração da sensibilidade do barorreflexo entre os grupos experimentais.



**Figura 4** : Sensibilidade do Barorreflexo. A - Índice alfa; B - Índice de Bradicardia reflexa induzida pela fenilefrina e C - Índice de Taquicardia reflexa induzida pelo Nitroprussiato de sódio. HC: Grupo Controle; HS: Grupo Sal; HD: Grupo Dieta; HDS: Grupo Dieta e Sal. Resultados expressados em MÉDIA ± EPM.

## 5.2 Objetivo específico 2: Avaliar os efeitos da dieta hipercalórica e do sal na função renal

### 5.2.1 Função renal *in vivo*

A tabela XX apresenta os valores de ingestão hídrica e volume de urina excretada em 24 horas, obtidos por meio de gaiola metabólica, ao final da oitava semana de protocolo. Como podemos observar, os animais que receberam sal (HS e HDS) ingeriram mais água e excretaram mais urina.

**Tabela 7**: Valores de ingestão hídrica e urina excretada em 24 horas dos grupos SHR controle (HC), SHR sal (HS), SHR Hipercalórica (HD) e SHR Hipercalórica e Sal (HDS).

	Ingesta Hídrica (mL)	Urina Excretada (mL)
HC	36±1,4	12±1,2
HS	65±7,5*#	39±4,6*#
HD	23±1,8	9±1,3
HDS	53±4,1*#	35±8,0*#

Valores em média ± EPM. \*p<0,05 vs HC; #p<0,05 vs HD.

As tabela 8 e 9 apresentam os valores séricos e urinários de creatinina, proteínas totais, sódio, potássio e osmolaridade. Os valores de creatinina, proteínas totais, sódio e potássio das análises realizadas na urina foram corrigidos pelo volume urinário de 24 horas. Podemos observar que não houve alteração da osmolaridade sérica entre os grupos experimentais, assim como os valores de sódio e potássio sérico. Entretanto, como esperado, observamos aumento do sódio excretado na urina nos animais que receberam sobrecarga salina.

**Tabela 8:** Níveis séricos de creatinina, proteínas totais, osmolaridade, sódio e potássio dos grupos SHR controle (HC), SHR sal (HS), SHR Hiperlipídico (HD) e SHR Hiperlipídico Sal (HDS).

	HC	HS	HD	HDS
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,5±0,0	0,4±0,1	0,8±0,2	0,6±0,1
<b>Proteínas Totais (mg/dL)</b>	5,3±0,3	5,0±0,1	5,1±0,2	5,2±0,2
<b>Osmolaridade (mOsm/L)</b>	293±38	369±68	310±27	305±26
<b>Sódio (mmol/L)</b>	139±12	146±6	141±1	144±1
<b>Potássio (mmol/L)</b>	4,6±0,3	4,5±0,2	4,6±0,2	4,0±0,1

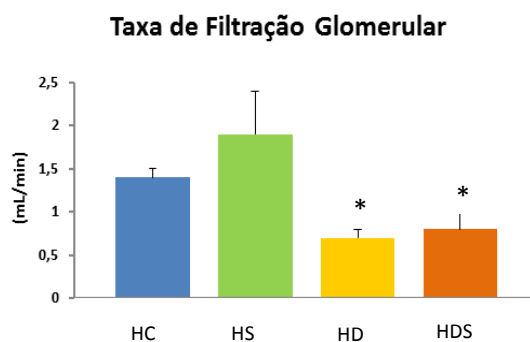
Valores em média ± EPM.

**Tabela 9:** Níveis urinários de creatinina, proteínas totais, osmolaridade, sódio e potássio dos grupos SHR controle (HC), SHR sal (HS), SHR Hiperlipídico (HD) e SHR Hiperlipídico Sal (HDS).

	HC	HS	HD	HDS
<b>Creatinina urinária (mg/24h)</b>	1078±46	975±69	754±36*#	646±103*#
<b>Proteínas Totais (mg/24h)</b>	4,4±0,5	5,8±1,7	3,4±0,3	4,4±0,5
<b>Osmolaridade (mOsm/L)</b>	1947±106	1051±168*§	1620±212	766±103*§
<b>Sódio (mmol/24h)</b>	2,2±0,3	26±6,2*§	1,7±0,4	27±4,1*§
<b>Potássio (mmol/24h)</b>	13±1,0	14±1,5	6,3±1,8*#	6,5±1,3*#

Valores em média ± EPM. \*p<0,05 vs HC; #p<0,05 vs HS; § p<0,05 vs HD.

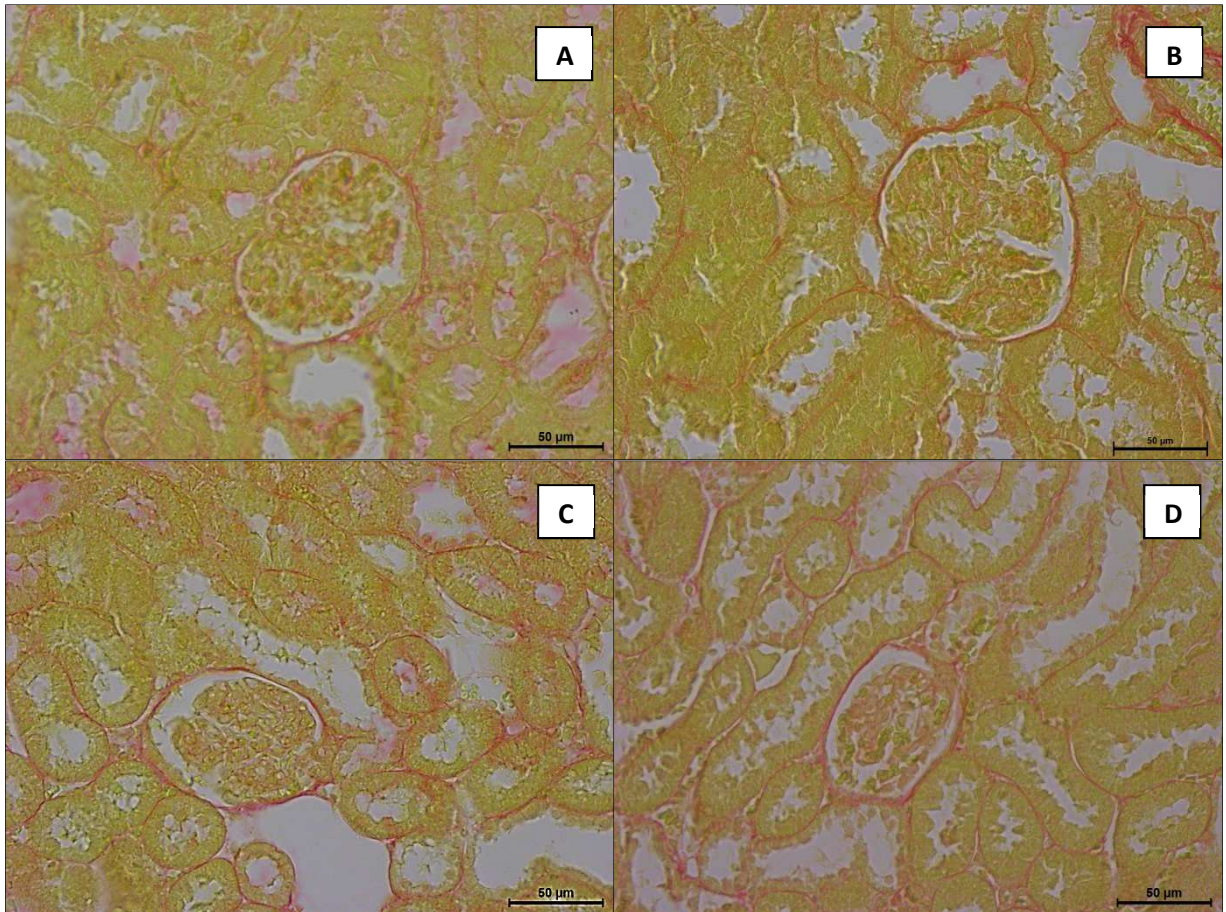
A avaliação da função renal *in vivo* foi realizada através da determinação da taxa de filtração glomerular baseada na depuração da creatinina ao final do protocolo. Conforme apresentado no gráfico abaixo, observamos que os animais submetidos à dieta hipercalórica apresentaram uma significativa redução da taxa de filtração glomerular.



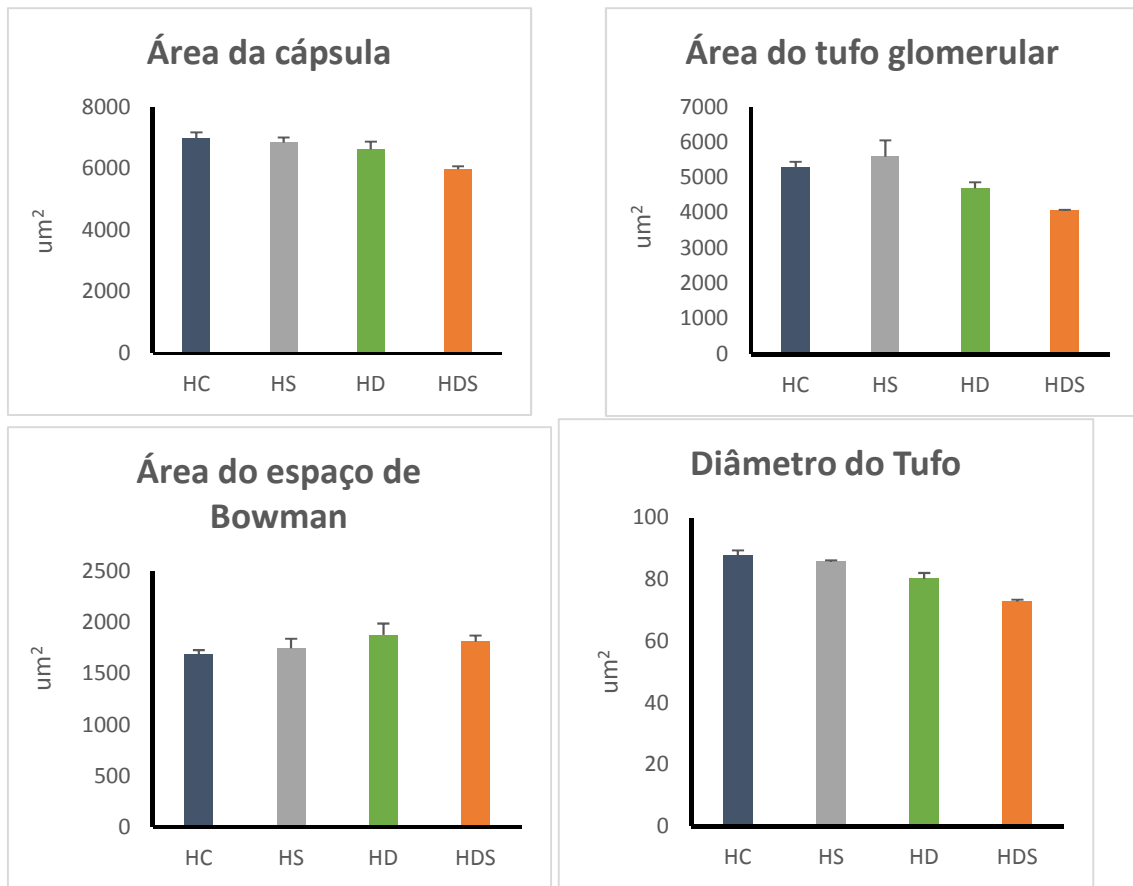
**Figura 5:** Taxa de filtração glomerular (TFG) dos grupos HC: SHR Controle (n=7), HS: SHR Sal (n=6), HD: SHR Hipercalórica (n=8), HDS: SHR Hipercalórica Sal (n=7). Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs HC e HS.

### 5.2.2 Análise da morfometria glomerular, da deposição lipídica e da deposição de colágeno

A figura 6 apresenta fotomicrografias representativas da morfologia glomerular dos grupos submetidos ao protocolo experimental. Como podemos observar na figura 7, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa quanto à área da cápsula de Bowman, área do espaço de Bowman e a área do tufo glomerular entre os grupos estudados. Entretanto, foi possível observar diminuição do diâmetro do tufo glomerular nos grupos que receberam a dieta hipercalórica, HD e HDS, em relação aos animais controle (HC) e aos animais que receberam apenas a sobrecarga salina (HS).

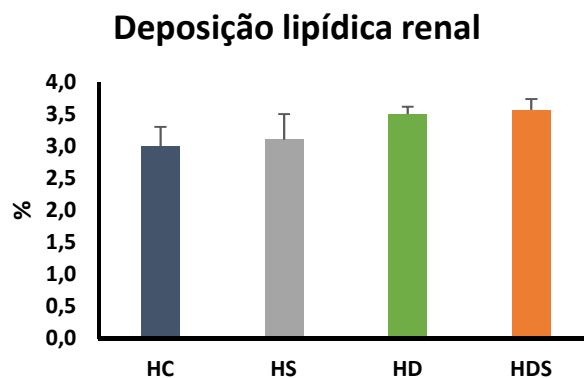


**Figura 6:** Fotomicrografia representativa da morfologia glomerular dos grupos A- SHR Controle (HC); B- SHR Sal (HS); C- SHR Hiperlipídico (HD); D- SHR Hiperlipídico Sal (HDS). Barra = 50 µm.



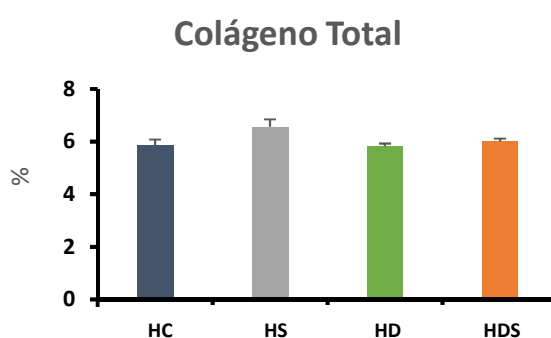
**Figura 7:** Morfometria glomerular dos grupos HC: SHR Controle (n=6), HS: SHR Sal (n=6), HD: SHR Hipercalórico (n=4), HDS: SHR Hipercalórico Sal (n=3). A - Área da cápsula de Bowman; B - Área do tufo glomerular ; C - Área do espaço de Bowman e D - Diâmetro do tufo glomerular . Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs HC; # $p < 0,05$  vs HS.

Como podemos observar na figura 8, onde estão representadas as médias da análise semiquantitativa das lâminas coradas pelo Oil Red, não foi possível evidenciar alteração significativa na deposição lipídica no tecido renal entre os grupos experimentais.



**Figura 8:** Deposição lipídica renal dos grupos HC: SHR Controle (n=5), HS: SHR Sal (n=4), HD: SHR Hipercalórica (n=3), HDS: SHR Hipercalórica Sal (n=3). Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM.

A coloração de Picosirius permitiu a quantificação da porcentagem de fibras colágenas, em relação a área de tecido analisado. Não foram observadas diferenças significativas na deposição de colágeno no tecido renal entre os grupos experimentais. (Figura 9)



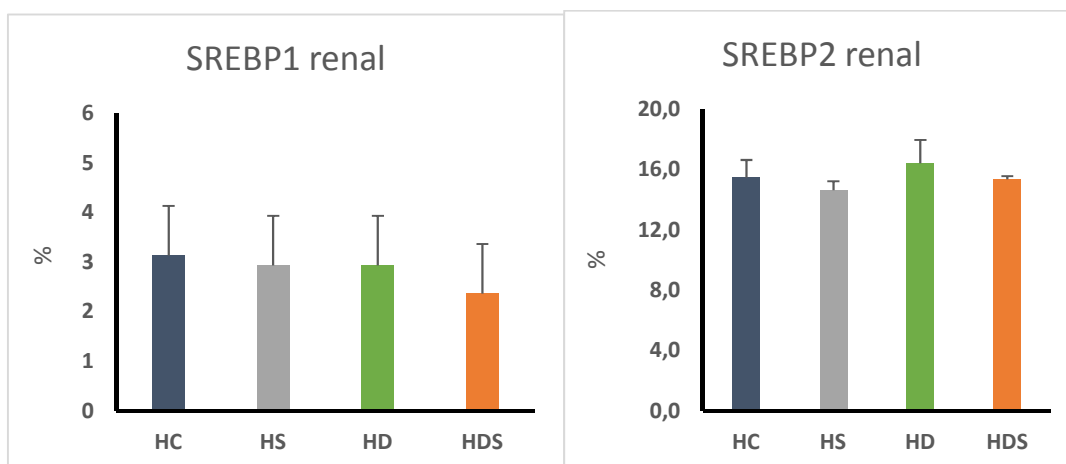
**Figura 9:** Quantificação da porcentagem de fibras colágenas no rim dos grupos HC: SHR Controle (n=7), HS: SHR Sal (n=7), HD: SHR Hipercalórico (n=4), HDS: SHR Hipercalórico Sal (n=3). Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM.

### 5.2.3 Avaliação da expressão proteica das proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBP1 e SREBP2)

As proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBP1 e SRBP2) desempenham importante papel na regulação do metabolismo dos ácidos graxos e do colesterol intracelular uma vez que regulam sua síntese intracelular (ABRASS 2004). Conforme observa-se na figura 10 não houve diferença significativa na expressão proteica das



proteínas de ligação reguladoras de esteróis (SREBP1 e SREBP2) entre os grupos estudados. Esses dados estão de acordo com nossos achados histológicos que não observaram aumento na deposição lipídica renal induzida pela dieta hipercalórica nos animais hipertensos.

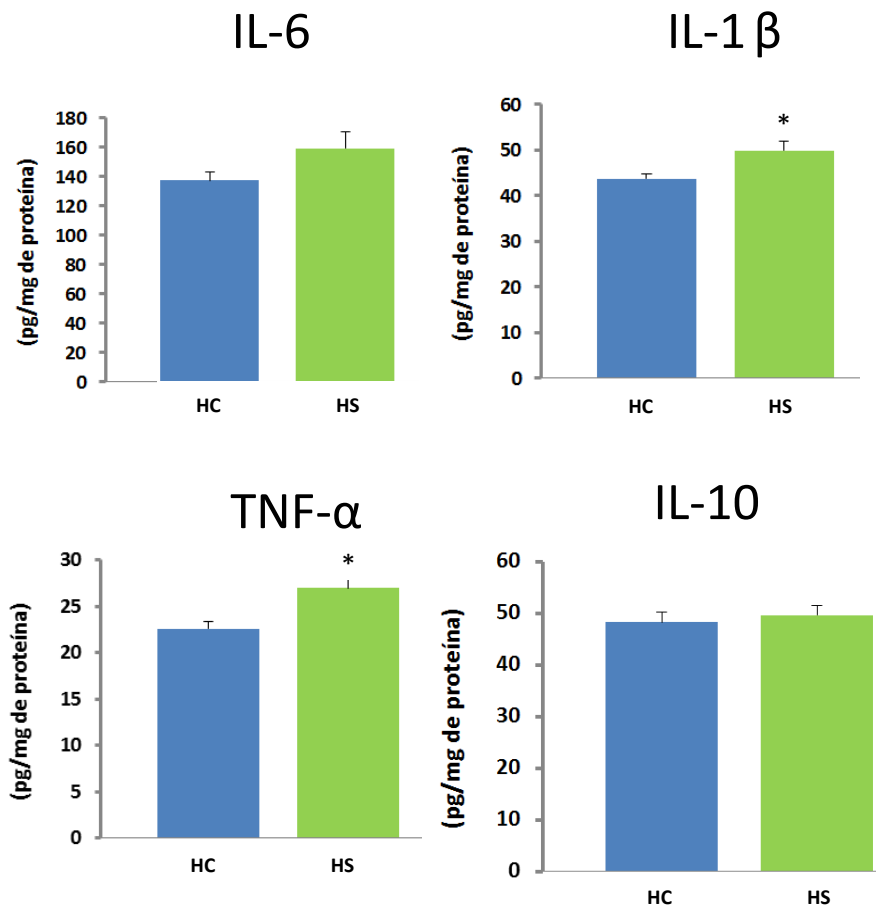


**Figura 10:** Expressão da SREBP1 e SREBP2 renal dos grupos HC: SHR Controle (n=3), HS: SHR Sal (n=3), HD: SHR Hipercalórico (n=3), HDS: SHR Hipercalórico Sal (n=3). Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM.

#### 5.2.4 Avaliação das citocinas inflamatórias renais

Até o presente momento, foram realizadas as avaliações das citocinas pró-inflamatórias: IL-6; IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos SHR controle (HC, n=7) e SHR submetido a sobrecarga salina (HS, n=8).

Não houve diferença na expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 entre os grupos. Entretanto, foi observado aumento na expressão da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  no tecido renal do grupo SS, em comparação com os demais grupos. A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se significativamente reduzida com o tratamento da dieta hiperlipídica, independentemente do fator sal (figura 11).



**Figura 21:** Avaliação das citocinas inflamatórias no tecido renal dos grupos HC: SHR Controle (n=7) e HS: SHR Sal (n=8). Os dados são expressos em Média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs HC

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Um grande diferencial do nosso trabalho foi o tempo de início da dieta hipercalórica nos animais hipertensos, ou seja, iniciamos a dieta logo após o desmame dos animais e continuamos durante 8 semanas até a fase adulta deles. Esse período se assemelha ao que observamos na população humana, onde a ingestão de alimentos ricos em calorias se inicia na infância e perdura até a fase adulta. Em suma, nossos resultados confirmaram a hipótese de que a ingestão de uma dieta hipercalórica nos animais hipertensos nessa fase de desenvolvimento é capaz de induzir a um quadro clínico semelhante a síndrome metabólica uma vez que foi capaz de ocasionar obesidade associada a intolerância à glicose e a dislipidemia.

Em relação a função cardiovascular, a dieta hipercalórica não foi capaz de agravar o quadro de hipertensão arterial dos ratos espontaneamente hipertensos. De maneira semelhante, em estudo realizado por Knight *et al.* (2010) envolvendo ratos SHR, uma dieta com 36% de gordura ao longo de 10 semanas também não foi capaz de causar alterações significativas nos níveis de pressão arterial, da mesma forma, dados recentes do nosso laboratório mostraram que a administração de uma dieta hiperlipídicas durante 8 semanas a partir do desmame também não foi capaz de alterar a pressão dos animais SHR (PEREIRA, 2017). Entretanto, os animais hipertensos submetidos à sobrecarga salina (HS) apresentaram discreto aumento da pressão arterial que foi mais acentuado nos animais que receberam a associação da dieta e sal (HDS). Esses dados sugerem que a associação de uma dieta hipercalórica com sobrecarga salina em animais hipertensos potencializa o aumento da pressão arterial. Entre os mecanismos envolvidos nessa potencialização podemos citar o sistema nervoso simpático e o sistema renina angiotensina.

Em relação a função renal, observamos uma significativa redução no ritmo de filtração glomerular induzida pela dieta que pode estar associada a redução do tufo glomerular observada nas análises morfológicas glomerulares. Entretanto, esses resultados não foram acompanhados de alteração na deposição lipídica renal e na expressão dos fatores de transcrição SREBP1 e SREBP2. Assim sendo, esses resultados, sugerem que a dieta hipercalórica induz alterações renais que podem iniciar um quadro de nefropatia nos indivíduos hipertensos.

**Em suma, nossos resultados mostraram que a associação de dois fatores de risco ambientais, sal e dieta hipercalórica, a partir da infância em ratos predispostos à hipertensão induzem o desenvolvimento de um quadro clínico de síndrome metabólica, com alterações nas funções cardiovascular e renal. Em conclusão, nosso estudo mostra a importância de se evitar o consumo de dietas hipercalóricas e/ou ricas em sal a partir da infância a fim de prevenirmos as morbimortalidades associadas a esses fatores de risco ambientais.**

## 7. REFERÊNCIAS

ABRASS, C. K. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. **American journal of nephrology**, v. 24, n. 1, p. 46-53, 2004.

ABRASS, C. K. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. **Am J Nephrol**, v. 24; p. 46-53, 2004.

AGHAMOHAMMADZADEH, R.; HEAGERTY, A. M. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. **Annals of medicine**, v. 44, n. S1, p. S74-S84, 2012.

ANDO, K. Increased Salt Sensitivity in Obese Hypertension: Role of the Sympathetic Nervous System. **Current hypertension reviews**, v. 9, n. 4, p. 264-269, 2013.

ARAÚJO, I. C. et al. Early developmental exposure to high fructose intake in rats with NaCl stimulation causes cardiac damage. **European journal of nutrition**, p. 1-9, 2016.

ARAÚJO, I.C. **Participação do sistema renina angiotensina na função cardiovascular de ratos recém-desmamados sob tratamento crônico com frutose e sobrecarga salina** [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2014.

BALL, J.M. et al. Corregulation of ion channel conductances preserves output in a computational model of a crustacean cardiac motor neuron. **Journal of Neuroscience**: v.30, n.25, p.37-49, 2010.

BARRETO-FILHO, J.A.S.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; LOPES, H.F. Hipertensão arterial e obesidade: causa secundária ou sinais independentes da síndrome plurimetabólica. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, n. 2, p. 174-84, 2002.

BASODE, RR; RANDOLPH, P; HURLEY, S; AHMEDNA, M. Evaluation of hypolipidemic effects of peanut skin-derived polyphenols in rats on Western-diet. **Food Chemistry**, v.135, p.1659–1666, 2012.

BELL, D. et al. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Pathology**, v.13, p.71-78, 2004

BERNARDIS, L. L. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 26, n. 7, p. 789-790, 1970

CALO, N. *et al.* Stress-activated miR-21/miR-21\* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1871–1881, 2016.

CHEN P.Y., SANDERS P.W. Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. **Hypertension**. v. 22, n. 6, p. 812-8, 1993.

CHOBANIAN, A. V.; HILL M. National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: a critical of current scientific evidence. **Hypertension**: v. 35, n. 4, p. 858-63, 2000.

CHOLEWA, BC & MATTSON DL. Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice. 2001

CHUNG, S. et al. Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.389-399, 11 set. 2009.

CONTRERAS, R. J.; WILLIAMS V. L. Dietary obesity and weight cycling: effects on blood pressure and heart rate in rats. **American Journal of Physiology**, v. 256, n. 6, p. R1209-R1219, 1989.  
control and diabetic rats. **Autonomic Neuroscience**. v.133, n.2, p.115-120, 2007.

DALL'AGO, P. et al. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**. n.30, p.119-124, 1997.

DE ANGELIS, K. et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2174-2178, 2004.

DE ANGELIS, K.L.D.; SANTOS, M.S.B.; IRIGOYEN, M. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v.13, n.3, p.01-07, 2004.

DE LUCA, C., OLEFSKY, J. M. Stressed out about obesity and insulin resistance. **Nature medicine**, v. 12, n. 1, p. 41-42, 2006.

DE OLIVEIRA, C.M.B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n.2, p. 255-265, 2011.

DENTON, D; WEISINGER, R *et al.* The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. **Nat Med**: v, 1, n. 10, p. 1009-16, 1995.

DIAS, D. P. et al. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 10, p. 969-975, 2010.

ELLIOT, P; STAMBLER, J *et al.* Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. Intersalt Cooperative Research Group. **BMJ**: v. 312, n. 7041, p. 1249-53, 1996.

ESTADELLA, D et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**. 20(2):218-24. 2004

FARAH, V. et al. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. **Autonomic Neuroscience**, v. 130, n. 1, p. 41-50, 2006.

FARAH, V. M. A. et al. Baroreflex depression persists in the early phase after hypertension reversal. **American Journal Of Physiology**. p. 1620-1626, 2001.

FARAH, V. M. A. et al. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p.361-369, 1999.

FARAH, V. M. et al. Acute and chronic stress influence blood pressure variability in mice. **Physiology & behavior**: v. 83, n.1, p.165-142, 2004.

FERNANDES, T. L. et al. Effect of carotid and aortic baroreceptors on cardiopulmonary reflex: the role of autonomic function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 7, p. 681-686, 2010.

FIORINO, P. et al. Effects of hyperlipidic diet consumption from weaning to adults rats, on renal and vascular function. **FASEB Journal**, v. 25, p. 778, 2011.

FIORINO, P. et al. Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. **Life Sci.** , v. 160, p.12-17, 2016.

FRISOLI, T. M. *et al.* Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort? **Am J Med**, v.125, n.5, p.433-439, 2012.

GALLETTI, F; FERRARA, I *et al.* Evaluation of a rapid protocol for the assessment of salt sensitivity against the blood pressure response to dietary sodium chloride restriction." **Am J Hypertens**. v. 10, n. 4, Pt 1, p. 462-6, 1997.

HALL, J. E. et al. Obesity-Induced Hypertension Interaction of Neurohumoral and Renal Mechanisms. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 991-1006, 2015.

HARTHMANN, A.D. et al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in

HEAD, G. A. et al. Central Nervous System Dysfunction in Obesity-Induced Hypertension. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 9, p. 1-8, 2014.

IRIGOYEN, M. et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998-1003, 2005.

IRIGOYEN, M.C. & KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**. n.31, p.1213-1220, 1998.

IWAOKA, T. *et al.* The effect of low and high NaCl diets on oral glucose tolerance. **Klin Wochenschr**, v.66, n.16, p.724-728, 1988.

JOHNSON, R. J. *et al.* Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 86, n. 4, p. 899-906, 2007.

JTM. JOINT TECHNICAL MEETING HELD BY WORLD HEALTH ORGANIZATION AND THE FOOD STANDARDS AGENCY. Creating an enabling environment for population-based salt reduction strategies. United Kingdom, 2010.

KNIGHT, S. F. *et al.* Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. **Ajp: Renal Physiology**, [s.l.], v. 298, n. 1, p.86-94, 11 nov. 2009. American Physiological Society.

KOTSIS, V. *et al.* Mechanisms of obesity-induced hypertension. **Hypertension Research**, v. 33, n. 5, p. 386-393, 2010.

LA ROVERE, M. T. *et al.* Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **The Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 478-484, 1998.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The sympathetic nervous system in obesity hypertension. **Current hypertension reports**, v. 15, n. 4, p. 409-416, 2013.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193: 265-275, 1951.

MENDONÇA, C. P.; DOS ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MORIMOTO, T. *et al.* Mechanism underlying flow stimulation of sodium absorption in the mammalian collecting duct. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 291, n. 3, p. F663-F669, 2006.

MORRIS, M. *et al.* Timing of fructose intake: an important regulator of adiposity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 57-62, 2012.

MOSTARDA, C. *et al.* Baroreflex Sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. **Journal of Cardiac Failure**, v.17, n.6, 519-525, 2011.

MUNTZEL, Martin S. et al. Cafeteria diet increases fat mass and chronically elevates lumbar sympathetic nerve activity in rats. **Hypertension**, Aaa, v. 6, n. 60, p.1498-1502, dez. 2012.

NKF. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. About chronic kidney disease, 2015: Disponível em: <<https://www.kidney.org/kidneydisease/aboutckd>>. Acesso em: 21 Jul 2015.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, n. 3, p. 282-293, 1963.

PAGANI, M. et al. Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 23, n. 2, p. 143-153, 1988

PASCHOAL, V; NAVES, A; FONSECA, A. B. L. **Nutrição clínica funcional - dos princípios à prática clínica**. São Paulo: v. 1, Editora Guanabara Koogan, 2007, 324p.

PASTORE, AP *et al.* Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar.. **J. Bras. Nefrol.** vol.32 no.2. p. 195-200, 2010  
Paulo, 2011.

PEREIRA, R. O. **AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL RENAL NA SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA A SOBRECARGA SALINA AGUDA EM RATOS HIPERTENSOS** [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2017.

PEREIRA, R. O. Estudo das interleucinas inflamatórias intrarrenais em modelo experimental de obesidade. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2015.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 3, p. 871S-873S, 2001.

PROENÇA, CR. Desafios Contemporâneos com Relação a Alimentação Humana. **Nutrição em Pauta**, v. 10, n. 52, p. 32-36, 2002.

RODRIGUEZ-ITURBE, B; ROMERO, F; JOHNSON, RJ Pathophysiological mechanisms of salt-dependent hypertension. *Am J Kidney Dis.*: v. 50, n. 4, p. 655-72, Outubro 2007.

RODRIGUEZ-ITURBE, B., ROMERO, F., JOHNSON, R. J. Pathophysiological mechanisms of salt-dependent hypertension. **American Journal of Kidney Diseases**: v. 50, n.4, p. 655-672, 2007.

RUILOPE, L.M.; SCHMIEDER, R.E. Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**, v.21, 500-508. 2008



SANTOS, FD. **Curso temporal das alterações autonômicas e metabólicas da hipertensão por sobrecarga de frutose: papel do barorreflexo.** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015.

SANTOS, R. S.; COSTA, V. A. V.; VIANNA, L. M. Cholecalciferol treatment changes urinary sodium–potassium ratio and plasma aldosterone of spontaneously hypertensive rats. **Clinica Chimica Acta**, [s.l.], v. 376, n. 1-2, p.253-254, fev. 2007.

SBN. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Proteja seus rins, salve seu coração. São

SERAVALLE, G. et al. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 21, n. 2, p. 89-105, 2014.

SHARMA et al., Salt sensitivity in young normotensive subjects is associated with a hyperinsulinemic response to oral glucose. **J Hypertens**, v. 9, n. 4, p.329-335, 1991.

SHIN, Chang-yong et al. Synergistic decrease in blood pressure by captopril combined with losartan in spontaneous hypertensive rats. **Archives Of Pharmacal Research**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.955-962, jun. 2009.

SILVA, I.C.M. Efeitos do treinamento físico aeróbio nas adaptações hemodinâmicas, autonômicas e morfofuncionais cardíacas da hipertensão espontânea: influência do barorreflexo. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SOARES, P.P. S. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 24-31, 2004.

SOFFER, R.L. (Ed). Biochemical Regulation of Blood Pressure. John Wiley & Sons, 1981.

TAI, M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes care**, v. 17, n. 2, p. 152-154, 1994.

TRICHES, R. M. et al. Obesidade, práticas alimentares e conhecimentos de nutrição em escolares. **Rev Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 541-7, 2005.

USDHHS. DEPARTMENT OF HEALTH HUMAN SERVICES; U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Dietary guidelines for Americans, United States of America, 2010.

VANĚČKOVÁ, I. et al. Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. R63-R78, 2014.

VARAGIC, J. et al. New angiotensins. **Journal of molecular medicine**, v. 86, n. 6, p. 663-671, 2008.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; PIMENTA, A. M.; KAC, G. Epidemiologia do sobrepeso e da obesidade e seus fatores determinantes em Belo Horizonte (MG), Brasil: estudo transversal de base populacional. **Rev Panam Salud Publica**, v. 16, n. 5, p. 308-14, 2004.

VIANNA, H. R. et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. bras. nefrol**, v. 33, n. 3, p. 351-364, 2011.

WEXLER B.C. Inhibition of the pathogenesis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by feeding a high fat diet. **Endocrinology**, v. 108, n.3, p.981-9,1981.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Guideline: Sodium intake for adults and children. World Health Organization, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 19 maio 2015.

WILLIAMS, L. M. *et al.* The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. 1-19, 2014.

WINBERG, S. L. et al. Taurocholate transport by rat intestinal basolateral membrane vesicles: evidence for the presence of an anion exchange transport system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n.1, p.44-50, 1986.

ZAMO, F.S. et al. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats – renin-angiotensin system modulation. **Clinics**, v.65, n.1, p.85-92, 2010.

ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. Cardiovascular reflexes and hypertension. **Hypertension**, v.18, n. 5, Supplement, p. III13, 1991.

ZHOU, M.S. et al. Thiazide diuretics, endothelial function, and vascular oxidative stress. **Journal of hypertension**, v. 26, n. 3, p. 494-500, 2008.