

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Influência da Sobrecarga Salina no Perfil
Glicêmico e Lipídico

Natalia Nunes Peron

Trabalho apresentado à disciplina TCC II- 060029
como requisito parcial para graduação no
curso de Nutrição (Turma 72)

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

A handwritten signature in blue ink, reading "Silvia Lacchini".

São Paulo
2018

Influência da Sobrecarga Salina no Perfil Glicêmico e Lipídico

Natalia Nunes Peron

Trabalho apresentado à disciplina TCC II- 060029
como requisito parcial para graduação no
curso de Nutrição (Turma 72)

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

São Paulo
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais por sempre confiarem em mim e me encorajarem a correr atrás dos meus sonhos, mesmo quando eu achava que não era possível.

Ao Augusto por todo o companheirismo, paciência e amor.

A Professora Silvia Lacchini que me aceitou desde o começo da graduação, por toda a sua sabedoria, pelas conversas, ensinamentos e principalmente por permitir que eu desenvolvesse um projeto que eu amo tanto.

Aos amigos da faculdade e do Laboratório de Morfologia Aplicada a Cardiologia por compartilharem risadas, sonhos, momentos de desespero e sempre muito trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro prestado, fundamental para a elaboração deste projeto.

PERON N N; A influência da Sobrecarga Salina no Perfil Glicêmico e Lipídico.
(TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO) SÃO PAULO, FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA USP. 2018

O excesso de sal presente na alimentação da população brasileira já é bastante relacionado com as condições cardiovasculares, entretanto o excesso de sódio na dieta parece ter relação também com o metabolismo de glicose, principalmente através da sensibilidade a insulina e com o metabolismo de lipídios. Dessa forma avaliar glicose e insulina plasmáticas, em um modelo de sobrecarga salina em ratos, independente de alterações na pressão arterial, bem como relacionar estas alterações com modificações histológicas tecido adiposo pode auxiliar no entendimento de como o sódio se relaciona mais amplamente com o metabolismo.

Foram usados ratos Wistar divididos em três grupos: controle (água livre de sal), 2 e 12 semanas de sobrecarga salina na água de beber. Foi realizado o teste de tolerância à glicose no início e ao final do experimento (ARAUJO et al., 2015.) Semanalmente, os animais foram pesados, para que fosse avaliada a influência do sal no crescimento dos animais.

Na penúltima semana de tratamento, os animais foram adaptados e de avaliados em gaiola metabólica. Já na última semana de tratamento foi realizada medida do nível de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) de maneira indireta por meio de plestimografia de cauda.

Ao final do tempo experimental, os animais foram eutanasiados com sobrecarga de anestésico por meio de uma injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) e xylazina (20mg/kg). Os tecidos coletados foram: sangue, tecido adiposo branco subcutâneo (abdominal), tecido adiposo branco visceral (periepididimal e perirrenal), tecido adiposo marrom, coração, adrenal e pâncreas. Para as análises morfológicas foi realizada a coloração de picrossirius para avaliação da integridade tecidual bem como deposição de colágeno.

Ao final do estudo, verificou-se que não houve alteração da PAS e nem da FC, como esperado. Já a ingesta de água e o volume de urina aumentaram nos grupos sal-2 e sal-12. Tanto o peso corporal como o peso de coração e pâncreas também não mudaram entre os grupos. Tanto o tecido adiposo branco perirrenal como o periepididimal não apresentaram diferença de peso. Porém, o tecido adiposo branco

subcutâneo aumentou tanto no grupo Sal-2 como Sal-12. O tecido adiposo marrom apresentou pequenas alterações, mas não significantes. Tanto a avaliação da glicemia basal como a análise do GTT não mostraram diferenças significantes entre os grupos. A área de adipócitos foi maior nos grupos que receberam sobrecarga salina, independente do tipo de tecido. A deposição de colágeno, por sua vez, diminuiu nos grupos que receberam sobrecarga salina.

Os resultados mostram que a sobrecarga salina, como esperado, não alterou a pressão arterial, embora tenha aumentado ingestão de água e volume de urina. Embora não tenhamos observado grandes alterações de peso de diferentes tecidos e nem da glicemia e GTT, o aumento importante do tecido adiposo subcutâneo sugere uma alteração no metabolismo lipídico em resposta à sobrecarga.

Palavras chave: Sobrecarga salina; Perfil Lipídico; Perfil Glicêmico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 SOBRECARGA SALINA	13
1.2 INSULINA.....	14
1.3 TECIDO ADIPOSEO MARROM (TAM).....	15
1.4 TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB)	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. METODOLOGIA	19
3.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO	19
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	19
3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (GTT).....	20
3.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	20
3.5 GAIOLA METABÓLICA	21
3.6 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	22
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E MEDIDA DA ÁREA DOS ADIPÓCITOS	23
3.7.1 Picrossirius	23
3.7.2 Análise em Microscópio	23
3.7.3 Deposição de Colágeno.....	24
3.7.4 Área de Adipócitos.....	24
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS	25
5. IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA CLÍNICA	25
6. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 SOBRECARGA SALINA

O sal é um ingrediente amplamente utilizado pela indústria alimentar para dar sabor e também como conservante além do seu uso difundido na preparação de alimentos (NAKASATO et al., 2004). O sal comum, como é conhecido comercialmente, é composto por cloreto de sódio (Na Cl), onde se encontra aproximadamente 40% de sódio (CAPPUCCIO, 2013).

Segundo a OMS, é recomendável que o consumo diário de sal por pessoa seja de até 5g/dia o que representa aproximadamente 2g de sódio por dia. Contudo, no Brasil, o consumo médio diário de sal por dia está em torno de 11g (OPAS,2015).Portanto, o padrão alimentar atual da população brasileira apresenta consumo excessivo de sal, apresentando níveis alarmantes para a saúde da população (SARNO et al., 2013).Em termos evolutivos esse aumento na ingesta de sal é recente, o que se apresenta como um desafio adaptativo aos sistemas fisiológicos para realizar a excreção adequada de sódio (SILVA,2013).

Entre as diversas funções do sódio no organismo destacam-se auxílio no equilíbrio dos líquidos corporais (em conjunto com outros íons), manutenção do equilíbrio acidobásico, excitabilidade de músculos e controle da pressão osmótica, além de atuar diretamente no transporte de diversas substâncias essenciais aos processos fisiológicos, como a glicose (SHILLS et al., 2009).

Apesar de sua importância na homeostasia, já é bastante conhecida a relação entre dietas hiperssódicas e maiores riscos cardiovasculares (INTERSALT, 1988), ainda que essa dependa de diversos outros fatores como a sensibilidade ao sal (LIMA et al., 2009).

O desbalanço na capacidade de regular constantemente as concentrações de sódio pode resultar em um quadro de hipertensão arterial, principal fator de risco para doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (MOLINA et al., 2003). O aumento da pressão arterial é dependente de diversos fatores, divididos entre ambientais e genéticos (IRIGOYEN, et al. 2008).

Entre os fatores ambientais destacam-se o estresse, sedentarismo, climatério, resistência à insulina e o consumo elevado de sódio. Já os fatores genéticos relacionam-se a alterações monogênicas e poligênicas, e também a sensibilidade ao

sal. O conjunto desses fatores é importantíssimo para explicar a relação entre sal e hipertensão, uma vez que pessoas normotensas e hipertensas podem apresentar elevado ou baixo consumo de sal na dieta (IRIGOYEN, et al. 2008).

Assim, são necessários mais estudos para descobrir os efeitos da sobrecarga salina em indivíduos normotensos.

1.2 INSULINA

A insulina é o principal hormônio anabólico do organismo, produzido pelas células B do pâncreas endócrino, sendo este essencial ao metabolismo glicêmico do organismo (GUYTON et al., 2011). Responsável em vários níveis pela regulação da homeostase da glicose no organismo, a insulina é secretada mediante o aumento de glicose sanguínea, aumentando a captação periférica de glicose especialmente nos tecidos adiposo e muscular (bem como aumento da lipogênese e redução da lipólise nesses tecidos), além de reduzir a produção hepática de glicose (via diminuição de gliconeogênese e glicogenólise) (CARVALHEIRA et al., 2002).

A relação da insulina com o aumento da pressão arterial pode ser associada à ativação do sistema nervoso, aumento do cálcio intracelular ou retenção crônica de sódio uma vez que a insulina estimula a reabsorção de sódio pelos túbulos renais (FARIA, et al. 2002).

Apesar de todos os mecanismos relacionados ao sal conhecidos no desenvolvimento a hipertensão arterial e outras doenças crônicas, ainda são necessários outros estudos para um melhor entendimento da relação entre o sal e sua relação com a insulina no organismo (THAKUR; RICHARDS; REISIN, 2001).

Existe a hipótese de que a resistência à insulina possa atuar como um marcador para processos patológicos, o qual poderia ser o mecanismo principal para aumentar a pressão arterial (CARVALHEIRA et al., 2002).

Diversos estudos publicados apresentam resultados controversos quanto à relação do consumo de sal e a insulina; porém, a maioria deles associa a restrição crônica de sal a menor sensibilidade à insulina além de alterações em lipoproteínas e marcadores de inflamação (SARNO et al., 2009).

Um estudo feito em ratos submetidos à sobrecarga salina em sua dieta visando analisar os efeitos do sal sobre a captação de glicose em adipócitos isolados, obteve como resultados maiores níveis de pressão arterial e captação de glicose. Além disso, nos mesmos animais foram observados menores níveis de insulina durante os testes de tolerância à glicose, quando comparados a animais submetidos a uma dieta hipossódica (LIMA et al., 1997).

Porém a literatura conta com dados conflitantes, Donovan e colaboradores (1993) em seu estudo observaram aumento na sensibilidade à insulina em ratos após 5 dias de dieta hipossódica.

A resistência à insulina, estado no qual há redução na captação periférica de glicose estimulada pela insulina, está relacionada a diversas doenças crônicas e também é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (CARNEIRO et al., 2014). O quadro de resistência à insulina, geralmente associado a obesidade (devido ao maior acúmulo de tecido adiposo visceral) pode estar presente por anos antes do desenvolvimento de doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias ou outras doenças cardiovasculares (MORAIS et al., 2016).

Dessa forma, pode-se considerar que a alta ingestão de sal facilita a entrada de glicose na célula, promovendo maior oxidação de glicose e conseqüentemente maior formação de ácidos graxos (GUYTON et al., 2011). Assim, a resistência à insulina, além de estar relacionada a distúrbios ligados a síndrome metabólica (diabetes, obesidade, hipertensão) acarreta em uma diminuição da glicogênese hepática e ativação da glicólise e lipólise (SARNO et al., 2009).

1.3 TECIDO ADIPOSEO MARROM (TAM)

O tecido adiposo Marrom é encontrado em maior quantidades em fetos e recém-nascidos. Porém, diferente do que se imaginava, também encontra-se presente (ainda que em menores quantidades) em humanos adultos.

Sua principal característica está associada a termogênese, ou seja, capacidade de produzir calor (FONSECA-ALANIZ, 2007). Em roedores o tecido adiposo marrom é encontrado na região Inter escapular (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

Morfologicamente, diferencia-se do tecido adiposo branco pela presença de múltiplas gotículas lipídicas em seu citoplasma, além da presença abundante de mitocôndrias, o que se relaciona a sua capacidade termogênica, pois a partir destas ocorre liberação de calor para a oxidação de ácidos graxos.

O pigmento mais escuro desse tecido se deve à alta concentração de citocromo oxidase presente nas mitocôndrias (FONSECA-ALANIZ,2007).

1.4 TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB)

O tecido adiposo branco possui ampla distribuição no organismo (subcutâneo e visceral) (FONSECA-ALANIZ, 2007). O tecido adiposo visceral está localizado junto a órgãos como o coração e também associado ao mesentério intestinal e no retroperitônio. A gordura visceral tem acesso direto à circulação portal e vem sendo amplamente relacionada a diversas doenças como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

Comparado ao tecido adiposo marrom, o potencial do TAB na termogênese é mínimo, e além das funções conhecidas como proteção mecânica e proteção térmica, nos últimos anos vem ganhando destaque na literatura o caráter endócrino desse tecido, devido às diversas substâncias, denominadas adipocinas que este produz e secreta. Esta descoberta colocou o tecido adiposo branco como uma peça chave no controle das funções metabólicas (FONSECA-ALANIZ,2007).

As adipocinas possuem estruturas e funções variadas como proteínas de sistema imune, fatores de crescimento, adipocinas envolvidas na regulação da pressão, coagulação sanguínea, angiogênese, entre outros.

As adipocinas de maior destaque relacionadas à homeostase glicêmica são a adiponectina e leptina (FONSECA-ALANIZ, 2007).

A adiponectina possui efeitos metabólicos que incluem ação anti-inflamatória e anti-aterogênica ,aumento na sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, mediado por oxidação de gordura nos tecidos.Os níveis plasmáticos de adiponectina apresentam uma relação inversa aos índices de massa corporal (IMC) e também à adiposidade visceral, inclusive apresentando um efeito hepatoprotetor

para esteatose não alcoólica, ao mesmo tempo em que hipoadiponectinemia demonstrou o favorecimento ao desenvolvimento de aterosclerose (BALSAN et al., 2015).

Em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, síndrome metabólica e doença arterial coronária foram observados níveis reduzidos de adiponectina, o que pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina (BALSAN et al, 2015). Estudos in vitro, realizados em adipócitos com 60% na redução da expressão de adiponectina foi capaz de demonstrar um aumento significativo na resistência à insulina (FONSECA-ALANIZ, 2007).

Por outro lado, a leptina é expressa em diversos tecidos do organismo, como placenta, adenohipófise, mucosa do fundo gástrico, musculatura esquelética e epitélio mamário (FONSECA-ALANIZ, 2007). Sua ação ocorre no hipotálamo, modulando peso corporal, ingestão de alimentos e estoque de lipídios, apresenta um papel fundamental na regulação do apetite e o gasto de energia via sistema nervoso central (SNC), pois faz a sinalização acerca dos estoques corporais de energia. É importante salientar que os níveis plasmáticos de leptina estão relacionados positivamente com adiposidade corporal. Entretanto em indivíduos obesos pode se apresentar o caso de resistência a leptina (PROENÇA et al., 2014).

A leptina também está relacionada com a insulina, uma vez que é capaz de melhorar sua sensibilidade no tecido muscular e hepático. Além disso a leptina possui efeitos sob a redução de triacilglicerol intracelular hepático (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

Diante dos conhecimentos descritos e à conscientização de que a população atual tem feito uso de uma alimentação rica em sal, visa ser importante a melhor compreensão da relação entre consumo de sal metabolismo da glicose e lipídios, uma vez que pouco se conhece sobre este assunto.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a sobrecarga salina, mesmo sem alterar a pressão arterial, leva a mudanças na composição corporal e em aspectos metabólicos de ratos jovens e saudáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o impacto da sobrecarga salina sobre o perfil glicêmico, o perfil lipídico e a morfologia dos tecidos adiposos marrom e branco (subcutâneo e visceral).

2.2.2 Investigar possíveis alterações de pressão arterial induzidas pela sobrecarga salina.

2.2.3 Analisar o impacto da dieta rica em sal na ingestão de água e ração, bem como na sua excreção através da análise em gaiola metabólica.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Foram usados ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério de Experimentação animal do Instituto do Coração. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada, com dieta padrão e água administradas livremente. Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP. O protocolo foi aprovado pela CEUA da FMUSP no 183/14 e pela CEUA ICB no 55/2016.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em três grupos, sendo: 1) CONT (controle, recebendo água livre de NaCl, n=10), 2) SAL-2 (recebendo sobrecarga salina por 2 semanas, n=10) e 3) SAL-12 (recebendo sobrecarga salina por 12 semanas, n=10). Todos os animais iniciaram o protocolo com 4 semanas de vida. O grupo controle teve acesso a água livre de NaCl por todo o protocolo, enquanto os grupos com sobrecarga salina receberam NaCl 1% na água de beber. O grupo SAL-2 foi tratado com solução de NaCl 1% (salina) para beber por 2 semanas (últimas semanas de protocolo, entre 14 até 16 semanas de idade); já o grupo SAL-12 foi tratado com a mesma solução salina a 1% na água de beber, porém por todas as 12 semanas de protocolo (iniciando com 4 e terminando com 16 semanas de idade).

Desde o início do protocolo (com 4 semanas) até o final (16 semanas), os animais foram pesados semanalmente para que fosse avaliada a possível influência da sobrecarga salina no crescimento. Além da pesagem semanal, ao final do estudo, com os animais anestesiados, fizemos a medida do comprimento naso-anal, que confere boa informação sobre crescimento dos animais.

3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (GTT)

A fim de se avaliar o impacto da sobrecarga salina sobre o perfil glicêmico, foi realizado teste de tolerância à glicose na primeira e última semana do protocolo. Para isso, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam uma dose intraperitoneal de glicose (1,5g/kg), tendo a glicemia avaliada no momento basal (antes da injeção) e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção de glicose, a fim de se avaliar a eficácia da ação da insulina sobre a glicemia (ARAÚJO et al., 2015). Para complementar, foi feita a medida de glicemia basal nas semanas 0,6,12 de cada grupo experimental. As medidas de glicemia foram realizadas usando aparelho portátil Accu-ChekPerforma (Roche), usando fitas descartáveis. Embora o equipamento seja de uso comercial em humanos, se presta muito bem a análises pouco invasivas e periódicas em pequenos animais como ratos e camundongos, visto que exige um volume muito pequeno de sangue para cada medida. Desta forma, o estresse nestes animais é mínimo e o volume de sangue usado nas avaliações com o animal acordado não interfere no controle hemodinâmico.

3.4 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

Para confirmar que não haveria alteração de pressão arterial devido ao tratamento com sobrecarga salina, na última semana de tratamento foi realizada medida dos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) de maneira indireta, por meio de pletismografia de cauda. Esta técnica permite a avaliação de valores de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca com o animal acordado e de forma não invasiva.

Os animais foram colocados, um a um, em tubos cilíndricos de acrílico com ventilação adequada sob a plataforma aquecida do equipamento para que ocorresse maior vasodilatação, facilitando a captação das medidas. Para a medida, a cauda do animal é envolta por um manguito com tamanho adequado (Figura 1), sendo este

ligado a um sistema de detecção das oscilações de pressão pulsátil e acoplado a um conversor analógico-digital, captando e traduzindo os valores de pressão pulsátil e frequência dos pulsos de forma automática, realizando 15 medidas totais (MOURA JÚNIOR; JÚNIOR, 2009). A PAS e a FC calculadas para cada animal foram consideradas a média de no mínimo cinco medidas coerentes entre si.

É importante salientar que foi feita a adaptação dos animais por uma semana antes da medida oficial de pressão pulsátil, para que as condições ambientais ou possíveis condições de estresse do animal não fossem um viés para os resultados obtidos.

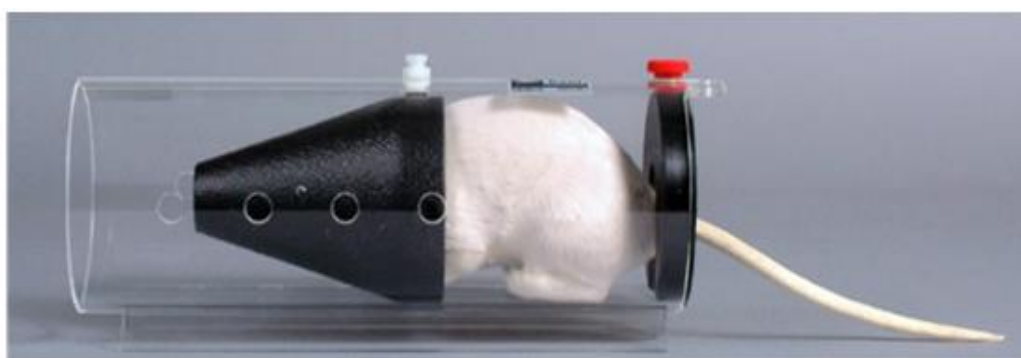
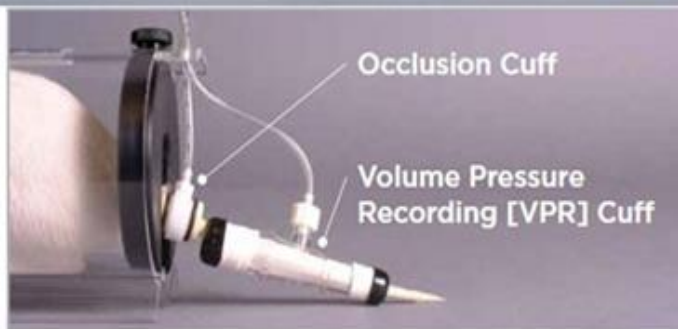


Figura 1 – A) Sistema de contenção do animal e exposição da cauda para a medida da pressão de pulso; B) mecanismo para medida de pressão de pulso, contendo manguito para insuflar e ocluir a passagem de sangue na artéria caudal e anel para captação dos sinais de pressão de pulso



3.5 GAIOLA METABÓLICA

Na última semana de tratamento, os animais foram avaliados em gaiola metabólica (Tecniplast), para mensuração precisa do volume ingerido de água e excreção de urina, consumo de ração e excreção de fezes (Figura 2). No dia anterior à medida, os animais foram adaptados às gaiolas metabólicas para que o consumo e excreção não se mostrasse alterado por questões de estresse do animal a este novo ambiente.

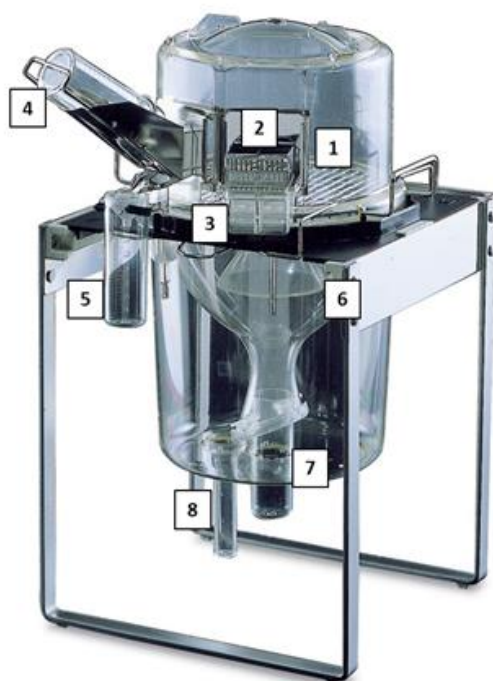


Figura 2 – Gaiola metabólica para ratos, usada no final do experimento para a avaliação de água e ração ingeridas, bem como a medida de fezes e urina excretadas

1. espaço para o rato permanecer
2. cesto para a ração
3. caixa para o farelo de ração desprezado
4. garrafa de água
5. coletor de água desperdiçada
6. conjunto de funis para coleta e separação de fezes e urina
7. coletor de fezes
8. coletor de urina

3.6 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Ao final do tempo experimental, os animais foram eutanasiados com sobrecarga de anestésico por meio de uma injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) e xylazina (20mg/kg). Foi feita a toracotomia e exposição do coração. Após incisão no átrio direito, foi coletado sangue, e em seguida iniciou-se a perfusão do animal pelo ventrículo esquerdo, com solução salina. Após a perfusão com solução salina, os animais foram perfundidos com formol 4% tamponado em PBS. Os tecidos coletados foram: Coração, pâncreas tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal), tecido adiposo branco visceral (periepididimal e perirrenal) e tecido adiposo marrom. Todos os tecidos foram pesados e normalizados pelo comprimento naso-anal do animal. Após a coleta e perfusão, os tecidos foram fixados por mais 24 horas em formol 4% tamponado, processados e posteriormente incluídos em paraplast para estudo histológico.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA PARA AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E MEDIDA DA ÁREA DOS ADIPÓCITOS

3.7.1 Picrosirius

Os tecidos analisados foram: Tecido Adiposo Marrom, Tecido Adiposo Subcutâneo e Tecido Adiposo Periepididimal. Todos foram cortados em uma espessura de 5µm em micrótomo e as lâminas foram coradas com Picrosirius.

O uso dessa técnica teve como intuito avaliar a morfologia e integridade tecidual, bem como possível alteração de tamanho de adipócitos, a possível deposição de colágeno em tecido adiposo decorrente da sobrecarga salina.

Todas lâminas passaram pelo processo de diafanização e desidratação e posteriormente coradas seguindo o protocolo do Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia do ICB. Para picrosirius as lâminas ficaram em banho do corante durante 30 minutos e posteriormente diferenciadas em xilol e álcool (absoluto, 95% e 85%), sendo que as lâminas permaneceram 2 minutos em cada banho. Após o preparo das lâminas, todas foram montadas da mesma maneira utilizando Entellan.

3.7.2 Análise em Microscópio

Todas as imagens foram obtidas através de Microscópio Zeiss AxioScope II acoplado a sistema de digitalização de imagem (AxioCam MR3), sendo as imagens do tecido adiposo analisadas com o uso de um software específico ImageJ (software disponível no site do NIH: <https://imagej.nih.gov/ij/>).

Para todas as análises realizadas no ImageJ, foi feita a calibração do software usando imagem de régua de escala obtida no mesmo microscópio e com mesma objetiva de 20x. Após a calibração, foram avaliadas 5 imagens aleatórias de cada tecido de cada animal.

3.7.3 Deposição de Colágeno

Para a avaliação da deposição de colágeno foram utilizadas 5 imagens de cada tecido de cada animal, por grupo. O software permite a medida da porcentagem da área sobreposta por colágeno através da diferença na densidade de cor presente na imagem analisada.

Após a análise das imagens, foi realizado o cálculo médio da porcentagem da área com deposição de colágeno por animal e por grupo.

3.7.4 Área de Adipócitos

Foram usadas ao menos 5 imagens para cada tipo de tecido de cada animal de cada grupo, sendo todas as imagens também obtidas em objetiva de 20X. Após calibração da escala, foram mensuradas as áreas de 10 adipócitos por imagem de maneira aleatória, sem que houvesse repetição nas células analisadas, totalizando 50 adipócitos por tipo de tecido em cada animal.

Posteriormente, foi calculada a média e desvio padrão para cada tipo de tecido para cada animal (Por exemplo: A média de 50 adipócitos de tecido adiposo marrom do animal 1 do grupo controle). Após a obtenção de todas as médias individuais foi calculada a média e desvio padrão das áreas de adipócitos por grupo (Controle, Sal 2 e Sal 12).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como médias e desvio padrão da média. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de 1 caminho, complementada pelo teste post hoc de Bonferroni. Foram consideradas significantes diferenças com $p \leq 0,05$. Para esta análise, foi usado o software Prisma GraphPad 5.0.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse estudo serão publicados posteriormente em revista científica.

5. IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA CLÍNICA

Desde 2014, quando foi lançado o Guia Alimentar para a População Brasileira , os profissionais e pesquisadores da área da Nutrição vem trazendo cada vez mais a tona a discussão acerca do consumo exacerbado de produtos ultraprocessados em detrimento do padrão alimentar baseado em alimentos in natura e minimamente processados. Entre os malefícios no excesso do consumo desses produtos estão o excesso de açúcar, gorduras e sódio presentes nesses produtos.

No Guia Alimentar o Sal dietético é caracterizado como ingrediente alimentar, sendo orientado seu consumo de maneira moderada em preparações culinárias, entretanto o aumento no consumo de produtos industrializados ,que normalmente utilizam sal e também o sódio (para aumentar sabor e também o tempo de prateleira desses produtos), são em boa parte responsáveis pela distância entre a recomendação para ingestão de sódio da OMS e o que realmente é consumido pela população brasileira.

Como já foi explanado anteriormente, a relação entre o excesso de sal na dieta e doenças cardiovasculares já é bastante conhecida e pesquisado no meio científico. É importante salientar que essas descobertas se deram em grande parte devido a estudos experimentais que tinham como objetivo analisar o impacto do sal no desenvolvimento dessas doenças.

As condutas nutricionais atualmente propostas para o tratamento e prevenção de inúmeras doenças, bem como as recomendações diárias para cada nutriente derivam de muitos estudos científicos distintos , sejam eles estudos de coorte, metanálises e também estudos experimentais.

O objetivo do estudo aqui apresentado era dar continuidade no estudo do impacto do sal na dieta, em um modelo experimental, sem que o foco fossem as comorbidades cardiovasculares, uma vez que o excesso de sal no padrão dietético se dá em

pessoas normo e hipertensas. Ao estudar o impacto do sal através de outros parâmetros, pouco avaliados na literatura, como o metabolismo de glicose e lipídios podem ser feitas novas descobertas e a partir destas derivarem futuramente novas condutas e recomendações nutricionais.

Os estudos experimentais podem desempenhar um papel fundamental nas descobertas e desenvolvimento de novas perspectivas no âmbito da nutrição. No caso deste trabalho, a intenção seria tirar o foco das recomendações de sódio com as finalidades já amplamente disseminadas (hipertensão, ascite ou problemas renais por exemplo) e maximizar essa discussão para outros aspectos como a composição corporal de indivíduos saudáveis, uma vez que esse íon é fundamental em diversos processos do metabolismo.

Dito isso, acredito que o trabalho desenvolvido aqui apresentado tem um papel importantíssimo uma vez que traz a tona a discussão acerca de um ingrediente tão utilizado em todo mundo, em tanta quantidade e também aspectos do metabolismo . Ou seja, desperta o estudo de aspectos fundamentais as competências do nutricionista: Padrão alimentar da população e Metabolismo.

6. REFERÊNCIAS

1. Araujo IC, ANDRADE RP, SANTOS F, SOARES ES, YOKOTA R, MOSTARDA C, FIORINO P, DE ANGELIZ K, IRIGOYEN MC, MORRIS M, FARAH V. Early developmental exposure to high fructose intake in rats with NaCl stimulation causes cardiac damage. *Eur J Nutr*, DOI 10.1007/s00394-014-0826-5, 2015
2. BALSAN, GA, VIEIRA JR, OLIVEIRA AM, PORTAL VL Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 6, n. 1, p.72-80, fev. 2015.
3. CAPPUCCIO, Francesco P.. Cardiovascular and other effects of salt consumption. *Kidney International Supplements*, [s.l.], v. 3, n. 4, p.312-315, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2013.65>.

4. CARNEIRO, IBP, SAMPAIO HAC, CARIOCA AAF, JOSÉ F, PINTO M, DAMASCENO NRT Antigos e novos indicadores antropométricos como preditores de resistência à insulina em adolescentes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [s.l.], v. 58, n. 8, p.838-843, nov. 2014. FapUNIFESP (SciELO).
5. CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD, MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *ArqBrasEndocrinolMetab*, 46:419-425, 2002.
6. DECLERCQ, VC, GOLDSBY JS, McMURRAT DN, CHAPKIN RS al. Distinct Adipose Depots from Mice Differentially Respond to a High-Fat, High-Salt Diet. *The Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 146, n. 6, p.1189-1196, 4 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/jn.115.227496>.
7. Donovan DS et al, Effects of sodium intake on insulin sensitivity. *Am J Physiol*.1993;264(5 Pt 1): E730-4
8. FARIA, NA, ZANELLA MT, KOHLMAN O, RIBEIRO AB. Tratamento de Diabetes e Hipertensão no Paciente Obeso. *ArqBrasEndocrinolMetab*, São Paulo , v. 46, n. 2, p. 137-142, abr. 2002 .
9. FLISER, D. et al. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. *EuropeanJournalOfClinicalInvestigation*. Heidelberg, p. 39-43. Abril 1994.
10. FONSECA-ALANIZ MH, TAKADA J, AFONSO VALE MI, LIMA FBI. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5 Suppl):S192-203
11. FONSECA-ALANIZ, Miriam H. et al. High Sodium Intake Enhances Insulin-stimulated Glucose Uptake in Rat Epididymal Adipose Tissue. *Obesity*, [s.l.], v. 16, n. 6, p.1186-1192, 27 mar. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2008.69>.
12. GUYTON A et al. *Tratado de fisiologia médica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
13. INTERSALT Cooperative Research Group: INTERSALT Study. An international study of electrolyte excretion and blood pressure: results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BrMed J*, 297:319-28, 1988.
14. IRIGOYEN, MC ; LACCHINI, S ; ANGELIS, K ; PEREIRA, AC ; KRIEGER, JE; KRIEGER, EM . *Fisiopatologia da Hipertensão Arterial*. In: Carlos V. Serrano

- Jr; Ari Timerman; Edson Stefanini. (Org.). Tratado de cardiologia. 2 ed. São Paulo: Manole, 2008, v. 1, p. 636-659
15. LIMA CNK, LIMA FB, DOS SANTOS EA, OKAMOTO MM, MATSUSHITA DH, HELL NS, HEIMANN JC .Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity. American Journal of Hypertension, 10:720-727, 1997.
 16. LIMA, NCK , TOZETTO DJ, LIMA LG, NOBRE F, MORIGUTI JC, FERRIOLI E, FOSS MC. Salt and insulin sensitivity after short and prolonged high salt intake in elderly subjects. Braz J Med Biol Res. 42(8):738-43, 2009.
 17. MOLINA, MCB, CUNHAB RS, HERKENHOFF LF, MILB JG et al. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 7, n. 6, p.43-50, jun. 2003.
 18. MORAIS, PRS, SOUZA ALL, JARDIM TSV, NASCENTE FMN, MENDONÇA KL, POVOA TIR, CARNEIRO CSC, FERREIRA VRF, SOUZA WKS, JARDIM PCBV Correlation of Insulin Resistance with Anthropometric Measures and Blood Pressure in Adolescents. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, [s.l.], p.319-326, nov. 2016
 19. MOURA JUNIOR, Manoel Ramos de; CHIANCA JÚNIOR, Deoclécio Alves. Avaliação Temporal da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda em Ratos Submetidos à Desnutrição Protéica e a Hipertensão de Goldblatt (2R-1C). 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
 20. NAKASATO, Miyoko. Sal e hipertensão arterial. Revista Brasileira de Hipertensão, Sp, v. 2, n. 11, p.95-97, jun. 2004.
 21. OPAS (Org.). Semana Mundial pela Conscientização do Consumo de Sódio. Disponível em:
<http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4797:semana-mundial-pela-conscientizacao-do-consumo-de-sodio&Itemid=821>. Acesso em: 21 mar. 2017.
 22. PRADA, Patrícia de O. et al. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. Hypertension, São Paulo, v. 35, n. 2, p.424-429, jan. 2000.

23. PROENÇA, AR, SERTIÉ RA, OLIVEIRA AC, CAMPAÃA AB, CAMINHOTTO RO, CHIMIN P, LIMA FB. et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, [s.l.], v. 47, n. 3, p.192-205, fev. 2014.
24. ROSEN, ED.; SPIEGELMAN, BM..Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, [s.i], v. 7121, n. 444, p.847-853, dez. 2006
25. Sarno F, Claro RM, Levy RB, Bandoni DH. Estimated sodium intake for the Brazilian population,2008-2009. *Rev Saúde Pública* 47(3):1-7, 2013.
26. SARNO, Flávio et al. Consumo de Sódio e síndrome metabólica: Uma revisão sistemática. *Arq Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, Sao Paulo, v. 5, n. 53, p.608-615, maio 2009.
27. SHILLS, M E. et al. *Nutrição moderna: na saúde e na doença*. 10. ed. [s.i]: Manole, 2009.
28. SILVA, JCS. Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Morfofuncionais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
29. SONG, Hong Ji; CHO, Young Gyu; LEE, Hae-jeung. Dietary sodium intake and prevalence of overweight in adults. *Metabolism*, [s.l.], v. 62, n. 5, p.703-708, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.11.009>.
30. SONG, Hong Ji; CHO, Young Gyu; LEE, Hae-jeung. Dietary sodium intake and prevalence of overweight in adults. *Metabolism*, [s.l.], v. 62, n. 5, p.703-708, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.11.009>.
31. THAKUR V, RICHARDS R, REISIN E. Obesity, Hypertension, and the Heart. *The American Journal of The Medical Sciences*, 321: 242-248, 2001.