Guilherme da Silva Ferreira

**Treinamento físico aeróbio previne a resistência insulínica e
o acúmulo hepático de triglicérides em camundongos
dislipidêmicos alimentados cronicamente com dieta restrita em
sódio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2021

Guilherme da Silva Ferreira

**Treinamento físico aeróbio previne a resistência insulínica e
o acúmulo hepático de triglicérides em camundongos
dislipidêmicos alimentados cronicamente com dieta restrita em
sódio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Guilherme da Silva

Treinamento físico aeróbio previne a resistência insulínica e o acúmulo hepático de triglicérides em camundongos dislipidêmicos alimentados cronicamente com dieta restrita em sódio / Guilherme da Silva Ferreira. -- São Paulo, 2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Dieta hipossódica 2.Exercício físico 3.Fígado gorduroso 4.Dislipidemias 5.Resistência à insulina 6.Camundongos knockout

USP/FM/DBD-277/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM-10) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com colaboração do Laboratório de Carboidratos do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo.

Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº: 1210/2019).

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – projeto temático # 2016/15603-0

DEDICATÓRIA

À Tatiane Andrade e ao Bernardo Ferreira, minha esposa e filho.

AGRADECIMENTOS

Sempre fui extremamente curioso. Desde muito pequeno, a ciência me fascina. Descobrir aquilo que ninguém sabe, aquilo que eu não sei, sempre me pareceu uma viagem espetacular. Como assim: o tempo é, literalmente, relativo! O espaço se curva! Comer sal aumenta a pressão arterial! Pessoas que sofreram um infarto devem fazer exercícios físicos para melhorar a função cardiovascular! Apesar de hoje serem afirmações amplamente conhecidas, não eram imaginadas há pouco tempo. Penso no caminho percorrido, o número de pessoas engajadas, cada uma aprimorando um conhecimento anterior, e agora, de alguma forma eu faço parte disso. O doutorado fecha um ciclo que se iniciou na minha adolescência, ou antes, num tempo em que ser pesquisador era história de filme, muito distante da minha realidade. Por isso, sinto-me extremamente feliz pela produção dessa tese e agradeço do fundo do meu coração, todos que me incentivaram e ajudaram, direta ou indiretamente.

Geralmente ignoramos o poder do acaso em nossas realizações. Na verdade, até queremos distância. Parece que, de alguma forma, atribuir à sorte uma fatia do nosso sucesso é como se diminuíssemos nosso esforço e competência. Mas, eu não consigo pensar em outra palavra ao pensar no laboratório de Lípidos. Que sorte eu tive! Tem algo de extraordinário nas pessoas desse lugar. Respeito, humanidade, família, amizade, competência, conhecimento, trabalho. Hoje, o profissional e pessoa que sou devo as pessoas que estão nesse lugar. Espero ter passado a diante, com os mais novos, a cultura de acolhimento e trabalho duro que, pela ação, me ensinaram.

E, claro, de todos, a Dra. Marisa Passarelli teve um papel especial. Formar, orientar, guiar, aconselhar, acalmar, incentivar, estimular, cobrar. Ao longo desses anos, e foram muitos (9, já!), meu muito obrigado é pouco. Gostaria que soubesse que te admiro demais, que te tenho como referência. Eu não poderia ter tido orientadora melhor. Se um dia eu abro as asas e voou para longe do laboratório de Lípidos é por obrigação. Se por 100 vezes me pedissem pra escolher uma orientadora, em 100 vezes eu escolheria a Marisa.

Ao lado da Marisa, não posso deixar de citar o Dr. Sergio Catanozi, meu “co-orientador”. Foi o primeiro a me apresentar, de modo mais amplo e crítico, a restrição de sódio dietético como campo de pesquisa. Mas, mais do que isso, foi uma companhia extremamente agradável nas discussões científicas, profissionais e pessoais. Sem o Sergio, minha formação não seria completa.

Esse trabalho foi produzido por muitas mãos. Além de mim, nosso grupo da dieta hipossódica foi composto pelos alunos de pós-graduação: Ana Paula Bochi, Letícia Gomes Rodrigues, Paula Ramos Pinto e Vanessa Del Bianco. Cada um estudando um órgão diferente, mas utilizando os mesmos animais. Obrigado pelo profissionalismo e amizade. À Paulinha devo um agradecimento especial, pois desde meu primeiro dia na faculdade estive ao meu lado, me ensinado e completando, muito obrigado!

Somam-se a esse grupo auxílios externos. O professor Dr. Ubiratan Fabres Machado, pelas discussões sobre o desenho experimental e resultados do projeto; Mychel Raony Paiva Teixeira Moraes e Kely Cristina Soares Bispo pela grande ajuda com a histologia; a Dra. Aritania S. Santos e o Dr. Chin J. Lin por fornecerem os equipamentos para análise da expressão gênica, bem como seus conhecimentos sobre as técnicas, meu muito obrigado. Todos sempre me receberam prontamente e prestativamente, muito obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

Por fim, gostaria de agradecer a minha família, pelo apoio incondicional a tudo que faço. Amo vocês!

EPÍGRAFE

“Nenhum de nós é apenas preto ou branco, ou nunca certo e sempre errado. Ninguém. Ninguém existe sem polaridades. Todos temos forças boas e más trabalhando junto de nós, contra nós e dentro de nós”.

Suzy Kassen, *Rise up and Salute the Sun: The Writings of Suzy Kassem*

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Acaca</i>	Acetil-CoA carboxilase alfa
ACC	Acetil-CoA carboxilase
<i>Actb</i>	Beta-actina
<i>Ager</i>	Receptor para produtos de glicação avançada
AGER1	Receptor 1 de produtos de glicação avançada
AG	Ácido graxo
AKT	RAC-alfa serina/treonina cinase
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ApoB	Apoliproteína B
<i>Apoc 2</i>	Apolipoproteína C-II
<i>Apoc 3</i>	Apolipoproteína C-III
ApoE	Apolipoproteína E
AT1-R	Receptor de angiotensina II Tipo I
AT2-R	Receptor de angiotensina II Tipo I
AT4-R	Receptor de angiotensina II Tipo IV
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
<i>Ddost</i>	Dolicil difosfo-oligossacarídeo, subunidade não catalítica de proteína glicosiltransferase
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FAS	Ácido graxo sintase
<i>Fasn</i>	Ácido graxo sintase
<i>Foxa2</i>	<i>Forkhead box A2</i>
<i>Foxo1</i>	<i>Forkhead box A1</i>
<i>G6pc</i>	Glicose-6-fosfato, subunidade catalítica
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2

HS	Grupo hipossódico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HDLc	Colesterol da fração de lipoproteína de densidade alta
<i>Hprt</i>	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
<i>Il6</i>	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS2	Substrato do receptor de insulina 2
ITT	Teste de tolerância à insulina
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDLr-KO	Camundongos <i>knockout</i> para o receptor de lipoproteína de densidade baixa
LDLc	Colesterol da fração de lipoproteína de densidade baixa
LDLr	Receptor de lipoproteína de densidade baixa
<i>Lipe</i>	Lipase E, tipo hormônio sensível
LHS	Lipase hormônio sensível
LPL	Lipoproteína lipase
<i>Lrp1</i>	Proteína-1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
MTP	Proteína de transferência de triglicerídeos microssomal
<i>Mttp</i>	Gene que codifica a proteína “proteína de transferência de triglicérides microssomal”
NEP	Neprilisina
NFkB	Fator nuclear kappa B
NS	Grupo normossódico
OMS	Organização mundial da saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
<i>Pck1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI-3K	Fosfatidil-inositol 3 cinase
<i>Plin1</i>	Perilipina 1
<i>Ppara</i>	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
<i>Ppib</i>	Peptídeo-prolil isomerase b

<i>Pparpgc1a</i>	Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma gama
<i>Prkaa1</i>	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina, subunidade catalítica alfa 1
<i>Prkaa2</i>	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina, subunidade catalítica alfa 2
PURE	<i>Prospective Urban Rural Epidemiological Study</i>
QM	Quilomícron
RAGE	Receptor de produtos de glicação avançada
<i>Rela</i>	RELA proto-oncogene, subunidade NF-kB
RIN	Número de integridade do RNA
<i>Rplp0</i>	Proteína ribossomal lateral stalk p0
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S	Grupo Sedentário
<i>Sc12a2</i>	Carreador de soluto, membro 2, família 2
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<i>Srebf1</i>	Fator de transcrição do elemento regulador do esterol 1
<i>Srebf2</i>	Fator de transcrição do elemento regulador do esterol 2
SREBP1a	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol 1a
SREBP1c	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol 1c
T	Grupo treinado
TFA	Treinamento físico aeróbio
TG	Triglicérides
TGF-beta1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
<i>Tnf</i>	Fator de necrose tumoral
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDLc	Colesterol da fração de lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	28
Figura 2 - Resistência hepática à insulina	33
Figura 3 - Protocolo Experimental.....	42
Figura 4 - Excreção urinária de sódio.....	54
Figura 5 - Consumo de ração durante o protocolo experimental.....	55
Figura 6 - Tempo para exaustão no teste de esforço máximo pré e pós-treinamento físico aeróbio.....	56
Figura 7 - Distribuição percentual de CT e TG plasmáticos nas frações de lipoproteínas.....	59
Figura 8 - Decaimento de glicose no teste de tolerância à insulina.....	60
Figura 9 - Concentração de lípidos e glicogênio e massa do fígado	61
Figura 10 - Correlações entre TG hepático e variáveis diversas.....	63
Figura 11 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de genes relacionadas ao metabolismo lipídico e glicídico e inflamação	65
Figura 12 - Atividade da enzima citrato sintase no homogenato de fígado e sua correlação e com tempo para exaustão no teste de esforço máximo	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associação entre consumo de sódio e morte por todas as causas e indicadores clínicos de DCV em estudos prospectivos de 2015 a 2019	21
Tabela 2 - Principais erros metodológicos identificados nos estudos observacionais prospectivos de consumo de sal e morte CV	23
Tabela 3 - Composição nutricional das dietas experimentais.....	43
Tabela 4 - Lista de genes avaliados.....	49
Tabela 5 - Estabilidade da expressão de genes candidatos a controle endógeno	50
Tabela 6 - Caracterização dos grupos antes do protocolo de intervenção.....	57
Tabela 7 - Caracterização dos grupos experimentais após intervenção	57

Esta dissertação está de acordo com a seguinte norma, em vigor no momento da publicação:

Referências: Elsevier – Vancouver (Autor-data)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julha de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

Ferreira GS. *Treinamento físico aeróbio previne a resistência insulínica e o acúmulo hepático de triglicérides em camundongos dislipidêmicos alimentados cronicamente com dieta restrita em sódio*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2021.

A restrição dietética de sódio reduz a pressão arterial e morbimortalidade cardiovascular. No entanto, a redução intensa no consumo de sódio aumenta a atividade do sistema-renina-angiotensina-alosterona, reduz a sensibilidade periférica à insulina e eleva os lípides plasmáticos, fatores de risco para doenças metabólicas e cardiovasculares. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio (TFA) é uma ferramenta para prevenção e tratamento das disfunções metabólicas, especialmente devido à sua ação positiva sobre a sensibilidade periférica à insulina. O objetivo do presente estudo foi avaliar em camundongos dislipidêmicos, *knockout* para o receptor de LDL (LDLr-KO), os efeitos da restrição de sódio dietético e TFA sobre a resistência periférica à insulina, conteúdo de lípides e expressão de genes relacionados ao metabolismo de lípides e resistência à insulina no fígado. Para isso, camundongos LDLr KO machos com 12 semanas de idade, alimentados com dieta nomossódica (NS) ou hipossódica (HS) foram mantidos sedentários (S) ou treinados (T) por 90 dias. Foram determinados massa corporal, lípides plasmáticos, resistência periférica à insulina, conteúdo hepático de triglicérides (TG), atividade da enzima citrato sintase e a expressão de genes associados ao metabolismo de lípides, bem como a resistência periférica à insulina. Os resultados foram comparados por ANOVA de 2 fatores e pós-teste de Tukey. Comparado ao grupo NS, o grupo HS apresentou maior massa corporal, menor sensibilidade periférica à insulina e conteúdo aumentado de TG plasmático e hepático. Tanto a menor sensibilidade periférica à insulina quanto a concentração de TG hepático, induzidos pela dieta HS, foram prevenidos pelo TFA. No fígado, o grupo HS, comparado ao grupo NS, apresentou aumento na expressão de genes associados à resistência à insulina (*Apoc3*, *G6pc*, *Pck1*) e redução de genes relacionados à capacidade oxidativa (*Prkaa1*, *Prkaa2*, *Ppara*, *Lipe*) e montagem de lipoproteínas (*Mttp*). O grupo HS-T apresentou maior a atividade hepática da enzima citrato sintase, quando comparado aos demais grupos. Em conclusão, o TFA preveniu o acúmulo de TG hepático, induzido pela dieta HS, devido ao seu papel protetor sobre sensibilidade periférica à insulina e estímulo à expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo hepático.

Descritores: Dieta hipossódica; Exercício físico; Fígado gorduroso; Dislipidemias; Resistência à insulina; Camundongos knockout.

ABSTRACT

Ferreira GS. *Aerobic exercise training prevents insulin resistance and hepatic triglyceride accumulation in dyslipidemic mice chronically fed a sodium-restricted diet*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Low-sodium (LS) diet reduces blood pressure and cardiovascular morbidity and mortality. However, intense dietary sodium restriction increases the activity of renin-angiotensin-aldosterone system and worsens peripheral insulin sensitivity and plasma lipid profile, risk factors for metabolic and cardiovascular diseases. On the other hand, aerobic exercise training (AET) is an effective tool for the prevention and treatment of metabolic disorders, especially due to its positive action on peripheral insulin sensitivity. The aim of the present study was to evaluate the effects of LS diet and AET in peripheral insulin resistance, and hepatic TG content and expression of genes related to lipid metabolism and peripheral insulin resistance. Twelve-week-old male dyslipidemic mice - LDL receptor knockout mice (LDLr-KO) - fed normal sodium (NS) or LS diet were kept sedentary (S) or trained (T) for 90 days. Body mass, plasma lipids, peripheral insulin resistance, hepatic triglycerides (TG) content, activity of citrate synthase and expression of genes associated with lipid metabolism and peripheral insulin resistance were determined. Results were compared by 2-way ANOVA and Tukey's post-test. Compared to NS, LS group presented higher body weight, reduced peripheral insulin sensitivity and, elevated plasma and hepatic TG concentration. Both the impairment in peripheral insulin sensitivity and the increase in hepatic TG were prevented by the AET. In the liver, compared to NS group, LS group increased the expression of genes related to insulin resistance (*Apoc3*, *G6pc*, *Pck1*) and reduced those associated with oxidative capacity (*Prkaa1*, *Prkaa2*, *Ppara*, *Lipe*) and assembly of lipoproteins (*Mttp*). The LS-T group showed higher activity of citrate synthase in the liver, compared to other groups. In conclusion, AET prevented the accumulation of hepatic TG induced by the LS diet, due to its protective role on peripheral insulin sensitivity and stimulation of the expression of genes involved in hepatic oxidative metabolism.

Descriptors: Diet, sodium-restricted; Exercise; Fatty liver; Dyslipidemias; Insulin resistance; Mice, knockout.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Consumo de sódio, DCV e risco de morte	18
1.2. Potenciais efeitos deletérios da redução intensa de sódio dietético	25
1.2.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona	26
1.2.2 Resistência periférica à insulina e metabolismo lipídico.	30
1.4 Consumo de sódio e doença hepática gordurosa não alcoólica	34
1.5 Treinamento físico, sensibilidade à insulina e metabolismo lipídico	35
2.JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVO.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Protocolo experimental	41
4.3 Dieta.....	42
4.4 Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	44
4.5 Consumo de ração.....	45
4.6 Teste de esforço máximo	45
4.7 Coleta de sangue, hematócrito, glicemia e determinação de lípidos plasmáticos.....	45
4.8 Teste de tolerância à insulina	46
4.9 Perfil de lipoproteínas plasmáticas	46
4.10 Aferição da pressão arterial sistólica.....	47
4.11 Excreção urinária de sódio de 24 h.....	47
4.12 Coleta do fígado.....	47
4.13 Análise da expressão gênica por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	48
4.14 Determinação do conteúdo hepático de lípidos.	51

4.15	Quantificação de glicogênio hepático.....	51
4.16	Atividade da enzima citrato sintase hepática	52
4.17	Análise estatística	52
5.	RESULTADOS	54
5.1	Eficácia das intervenções	54
5.2	Parâmetros metabólicos	56
5.3	Perfil de lipoproteínas plasmáticas	58
5.4	Teste de tolerância à insulina	59
5.5	Conteúdo de TG, CT e glicogênio e massa do fígado	60
5.6	Expressão gênica no tecido hepático	63
5.7	Atividade da citrato sintase	65
6.	DISCUSSÃO	67
6.1	Limitações do estudo	75
7.	CONCLUSÃO.....	77
8.	ANEXO.....	78
9.	REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um importante problema de saúde pública devido à sua alta prevalência e contribuição para doenças renais e cardiovasculares (DCV). No ano de 2015 estimou-se que 1,13 bilhão de pessoas no mundo eram hipertensas (pressão arterial sistólica [PAS] ≥ 140 mmHg ou diastólica [PAD] ≥ 90 mmHg); contudo esse número pode ser cerca de 50% maior, se utilizada a nova definição de HAS definida pela *The American College of Cardiology/American Heart Association*, PAS > 130 mmHg ou PAD > 80 mmHg (GBD 2017 Causes of Death Collaborators, 2018; Muntner et al., 2018).

A incidência de HAS parece estar em franca expansão, impulsionada, especialmente, pelas regiões do leste, sul e sudeste da Ásia, Oceania e África-subsaariana. Entre os anos 2000 e 2010, houve um acréscimo de cerca de 50% no número absoluto de casos de HAS no mundo, favorecido pelo crescimento e envelhecimento populacional (Mills et al., 2016a). No Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Saúde (2013) demonstram que a prevalência de HAS está entre 20-30% da população adulta e, de modo semelhante ao que ocorre no mundo, aqui também se observa tendência de evolução nos casos (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis., 2019; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015).

De modo preocupante, no mundo, mais da metade das pessoas hipertensas tem desconhecimento da sua doença, e, mesmo dentre aquelas diagnosticadas, o percentual de controle é insatisfatório (Mills et al., 2016a). No Brasil, a consciência, tratamento e controle da HAS são de, 64,7%, 96,9% e 37,4%, respectivamente (Lamelas et al., 2019). Esse percentual é ainda menor se considerarmos, também, as pessoas hipertensas não diagnosticadas: 62,7% realizam tratamento e 23,4% possui controle da pressão arterial (PA) (Lamelas et al., 2019). Esses números são de extrema importância dado o impacto da HAS sobre a mortalidade geral e cardiovascular (CV).

As DCV constituem a principal causa de mortalidade no mundo, bem como no Brasil, levando ao óbito de 17,8 milhões de pessoas em 2017 (de um total de 56

milhões de mortes), o que representa um aumento de 21% em comparação a 2007 (GBD 2017 Causes of Death Collaborators, 2018). Cerca de 70% do risco de eventos cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE) e insuficiência cardíaca) é atribuído a uma pequena quantidade de fatores de risco metabólicos e comportamentais. Destes, a HAS isolada é o principal fator, representando 22% do risco total de eventos CVs (Yusuf et al., 2020).

Diversas publicações do *The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study Comparative Risk Assessment*, projeto lançado pelo Banco Mundial e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), demonstraram, consistentemente, que a elevação da PAS (> 115 mmHg) é o principal fator de risco para mortalidade por todas as causas, e o segundo relacionado a perda de anos de vida saudáveis (GBD 2017 Causes of Death Collaborators, 2018; GBD 2017 Diet Collaborators, 2019; Stanaway et al., 2018).

Nesse contexto, a OMS, no “Plano de Ação Global para a Prevenção e Controle de Doenças Crônicas Não Transmissíveis 2013-2020”, pontuou a redução de 25% na prevalência de HAS como uma das estratégias prioritárias no combate as doenças crônicas não transmissíveis (Organização Mundial da Saúde, 2013).

Devido à estreita relação entre o consumo de sódio e elevação da PA, o referido documento orientou as políticas públicas dos países membros a reduzirem o consumo de sal em 30% até o ano de 2025 (Organização Mundial da Saúde, 2013). Ainda, considerando esta associação, estima-se que a elevada ingestão de sódio seja o fator de risco dietético mais importante para mortalidade associada às doenças crônicas não transmissíveis (GBD 2017 Diet Collaborators, 2019; Micha et al., 2017).

1.1 Consumo de sódio, DCV e risco de morte

O elevado consumo de sódio produz efeitos negativos à saúde humana, dentre eles destacam-se o desenvolvimento da HAS e DCV. Por outro lado, recentemente, o entendimento de “quanto menos sal melhor” tem sido desafiado por estudos de coorte e meta-análises que propõem uma relação não linear, em formato de U ou J, entre o consumo de sódio e a morbimortalidade cardiovascular. Ou seja, tanto o

consumo elevado quanto o reduzido de sódio contribuiriam para o aumento do risco de morte.

Segundo a OMS (2012), a ingestão adequada de sódio para crianças (2–15 anos) e adultos (≥ 16 anos) é de até 2 g ao dia (equivalente a 5 g sal) (Organização Mundial da Saúde, 2012). Esta recomendação foi seguida pela Sociedade Brasileira de Hipertensão, na “Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia — 2019” (Précoma et al., 2019) e em documentos do Ministério da Saúde (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde., 2008). Enquanto o *The American Heart Association Presidential Advisory Committee* propõe conduta mais rigorosa, apresentando como alvo uma ingestão de até 1,5 g de sódio / dia (Whelton et al., 2012). Oguia alimentar americano é mais permissivo, recomendando o consumo de até 2,3 g de sódio / dia para maiores de 14 anos, mas com a sugestão de que indivíduos hipertensos e pré-hipertensos poderiam se beneficiar de um consumo de até 1,5 g / dia (U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture, 2015).

Essas recomendações são comparáveis ao consumo de populações rurais e indígenas isoladas (Carvalho et al., 1989), mas são extremamente baixas quando comparadas ao consumo usual das sociedades industrializadas. Estima-se que a média de ingestão diária de sódio na população mundial e brasileira esteja entre 3,7-4,7 g / dia, sendo que menos de 1% dos países atingem as recomendações da OMS e, quase 90%, a superam em pelo menos 50% (Mill et al., 2019; Mozaffarian et al., 2014).

O conceito de sal / sódio como fator de modulação da PA emergiu já no início dos anos 1900, com Ambard e Beaujard, transferindo conhecimentos da formação de edema para hipertensão, e ganhou força nos anos 80, devido ao estudo INTERSALT (DiNicolantonio and O’Keefe, 2017; Intersalt Cooperative Research Group, 1988). Este estudo epidemiológico além de demonstrar uma relação linear entre sódio e PAS em uma população de mais de 10 mil pessoas de diversos países, ainda observou que comunidades isoladas, não ocidentalizadas e com consumo de sódio extremamente baixo não apresentavam aumento da PAS com a idade (Carvalho et al., 1989; Intersalt Cooperative Research Group, 1988).

Nos anos 2000, o estudo DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) teve grande influência nas diretrizes atuais, ao demonstrar, em estudo clínico randomizado e com grande número de pessoas ($n = 412$), os benefícios da redução intensa de sódio sobre a PA (Sacks et al., 2001). Neste estudo, o consumo de 1,5 g de sódio / dia produziu redução da PAS mais acentuada quando comparado ao consumo de sódio recomendado (2,3g / dia) (Sacks et al., 2001).

Atualmente, diversas metanálises demonstram uma relação linear e sem platô aparente entre redução do consumo de sódio e PAS (Filippini et al., 2021; He et al., 2013; Huang et al., 2020). Dentre elas, Huang et al. (2020) em metanálise de estudos clínicos randomizados com avaliação da ingestão de sódio pela excreção urinária de 24 h, observaram queda de 2,2 mmHg na PAS e 0,66 mmHg na PAD associada à redução de 2,3 mg de sódio / dia. A magnitude do efeito foi maior em indivíduos com valores mais elevados de PAS, mais velhos e em não brancos. Não existiu um efeito consistente relacionado ao tempo de intervenção e estudos com curta (< 14 dias) e longa duração (6 meses ou 3 meses) (Filippini et al., 2021) apresentaram efeito mais discreto, esse último, talvez, devido à redução na aderência ao tratamento (Huang et al., 2020; Filippini et al., 2021).

As metanálises de Filippini et al. (2021) e He et al. (2013) observaram o dobro do efeito reportado por Huang et al. (2020). Os dois primeiros utilizaram pesquisas com duração de, no mínimo, 4 semanas, enquanto o último incluiu todos os estudos de intervenção, independentemente do tempo. Filippini et al. (2021) e He et al. (2013) reportaram que a redução de 2,3 mg/dia no consumo de sódio promoveu a queda de 5,5 e 5,8 mmHg na PAS, respectivamente.

Por outro lado, as evidências que sugerem benefícios da “intensa” restrição de sódio sobre eventos clínicos, em especial sobre a mortalidade por todas as causas, são menos robustas. Em geral, pesquisas sobre esses tópicos são de natureza observacional, e uma grande parcela não utiliza a coleta urinária de 24 h para inferir o consumo de sódio. Essas particularidades dificultam a interpretação de causa-efeito e produzem muitos resultados conflitantes. A **tabela 1**, adaptada de Overwyk et al. (2020), demonstra todos os estudos que avaliaram a influência do consumo de sódio sobre a o desenvolvimento de DCV e morte por todas as causas, entre 2015 e 2019.

Tabela 1 - Associação entre consumo de sódio e morte por todas as causas e indicadores clínicos de DCV em estudos prospectivos de 2015 a 2019

Mortalidade por todas as causas		DCV	
Referência	Associação	Referência	Associação
Cook et al. (2016)	+	Lamelas et al. (2016) ^{1,2,3}	+
Lamelas et al. (2016) ^{1,2,3}	+	Liu et al. (2018) ^{2,3}	+
Doukky et al. (2016) ^{1,2}	0	Mente et al. (2018) ^{1,2,3}	+
He et al. (2016)	0	Merino et al. (2015) ^{2,3}	+
Kalogeropoulos et al. (2015) ^{1,2}	0	Mills et al. (2016b)	+
Liu et al. (2018) ^{2,3}	0	Polonia et al. (2016) ^{1,3}	+
Merino et al. (2015) ^{2,3}	0	Saleh et al. (2021) ^{1,3}	+
Singer et al. (2015) ^{1,2,3}	0	Zhao et al. (2017) ^{1,3}	+
Welsh et al. (2019a) ^{2,3}	0	Doukky et al. (2016) ^{1,2}	0
Lelli et al. (2018) ³	-	Kalogeropoulos et al. (2015) ^{1,2}	0
Saulnier et al. (2017) ^{1,2,3}	-	Lelli et al. (2018) ^{1,3}	0
Mente et al. (2016) ^{1,2,3}	U	Prentice et al. (2017) ²	0
		Singer et al. (2015) ^{1,2,3}	0
		Welsh et al. (2019a) ^{2,3}	0
		Kieneker et al. (2018)	-
		Saulnier et al. (2017) ^{1,2,3}	-
		Mente et al. (2016) ^{1,2,3}	U-shaped

FONTE: Tabela adaptada de Overwyk et al., 2020. Em negrito estão as referências que avaliaram o consumo de sódio por múltiplas coletas urinárias não consecutivas de 24 h (≥ 3). Classificação de alto potencial de viés para: ¹controle dos principais fatores de confusão; ² Alto potencial para erro sistemático (consumo de sódio avaliado por método diferente da coleta urinária de 24h); ³ Alto potencial para erro aleatório (≤ 3 avaliações não consecutivas por coleta de urinária de 24 h, ou utilização de questionário diferente do questionário de frequência alimentar). Polonia et al., (2016) realizou 2 coletas urinárias de 24 h não consecutivas. + = relação positiva; - = relação negativa; U = relação em formato de U.

Dentre os estudos prospectivos observacionais destaca-se o *TOHP Follow-up Study*, com segmento médio de mais de 20 anos, avaliação do consumo de sódio por sucessivas coletas urinárias de 24 h (método de referência) e baixo risco de vieses. Neste, demonstrou-se uma relação direta entre mortalidade por todas as causas e consumo de sódio (razão de risco = 1,12 para cada incremento de 1000 mg/24hr; 95% IC = 1,00 - 1,26; $p = 0,05$, apesar do valor de p o resultado foi considerado significativo) (Cook et al., 2016).

Em revisão sistemática e metanálise de 16 estudos observacionais com um total de mais de 10 mil pessoas, Jayedi et al. (2019) encontraram relação linear entre consumo de sódio e incidência de mortalidade por AVE, sem evidência de curva em formato de J/U. Ainda, Milajerdi et al. (2019) em revisão sistemática e metanálise de 20 estudos prospectivos (222.189 participantes, segmento entre 1 e 20 anos) encontraram associação não-linear entre consumo de sódio e mortalidade CV (risco elevado a partir de 2,4 g / dia). Resultado obtido somente quando avaliados os estudos que estimaram o consumo de sódio por excreção de sódio urinário de 24 h. Nesse estudo, não foi observado associação entre consumo de sódio e mortalidade por todas as causas.

Um dos estudos mais populares a desafiar essa visão hegemônica foi o “*Prospective Urban Rural Epidemiological*” (PURE), que incluiu mais de 100 mil pessoas, com idade entre de 35 e 70 anos, oriundos de diversos países (mediana de seguimento de 8,2 anos). Nele, observou-se aumento da mortalidade geral e CV em indivíduos com consumo de sódio < 3 e >7 g / dia, quando comparados aqueles com consumo de 3-5 g / dia (O'Donnell et al., 2019). A principal crítica ao PURE diz respeito ao meu método de avaliação do consumo de sódio, realizado por meio de coleta pontual (consumo de 24 h estimado a partir de coleta urinária única).

A hipótese de associação em U ou J entre risco CV e consumo de sódio é fortalecida por metanálises. Graudal et al. (2014) avaliaram 23 estudos de coorte e 2 ensaios clínicos randomizados (n = 274,683) e observaram aumento do risco de morte por todas as causas e eventos CV tanto com baixo (< 2,65 g/ dia) quanto com alto (> 4,95 g/ dia) consumo sódio. Zhu et al. (2018) em metanálise de estudos prospectivos (16 estudos, n = 205.575) verificaram maior risco de morte cardíaca com consumo de sódio menor que 3 g / dia.

Esses resultados têm suscitado intensos debates. Alguns autores os relacionam a potenciais vieses metodológicos, dos quais os principais são: a causalidade reversa e a metodologia de avaliação do consumo de sódio. A **Tabela 2** demonstra os principais erros metodológicos em estudos que associam o consumo de sódio com a DCV e morte por todas as causas.

Tabela 2 - Principais erros metodológicos identificados nos estudos observacionais prospectivos de consumo de sal e morte CV

Erros com maiores potenciais para alterar a direção da associação

Erro sistemático na avaliação do consumo de sódio

- Menor Risco: Coletas de urina de 24 h que não fazem parte da prática clínica de rotina, sem garantia de qualidade, sem excluir a coleta incompleta.
- Maior risco: Outras formas de coleta de urina de 24 h, todas as avaliações dietéticas, coleta de urina pontual.

Causalidade Reversa

- Menor risco: participantes recrutados da população em geral e exclusão daqueles com DCV pré-existent
- Risco intermediário: populações doentes incluídas; presença de fatores de risco para DCV; populações doentes específicas
- Maior risco: populações doentes específicas (por exemplo: pessoas com insuficiência cardíaca, doença renal, diabetes); a remoção dos participantes doentes da análise muda a direção da associação.

Erros com potencial para alterar a direção da associação

Potencial confusão residual

- Ajuste incompleto: não incluindo 2 ou mais dos quais, idade, sexo, raça, estado socioeconômico, colesterol, índice de massa corporal (IMC) ou peso, tabagismo, diabetes; se for baseado em dieta, calorias totais; se excreção de urina, peso, IMC ou creatinina
- Desequilíbrio entre os valores de ingestão de sódio: diferença de idade entre os grupos de consumo de sódio > 5 anos; distribuição por sexo ou raça em grupos de consumo de sódio > 20%
- Seguimento inadequado: baixo grau de acompanhamento (< 80%) ou qualidade incerta para avaliação dos resultados

Erros com potencial para levar a um resultado falso nulo

Erro aleatório na avaliação de sódio

- Menor risco: mais de quatro avaliações de urina de 24 h, em média; questionário de frequência alimentar
- Risco intermediário: entre 2 e 4 coletas de urina de 24 h ou correção para viés

de diluição da regressão; relatório alimentar
<ul style="list-style-type: none"> • Maior risco: coleta de urina < 24 h ou coleta única de 24 h; Investigação do consumo alimentar de 1 dia.
Poder insuficiente
<ul style="list-style-type: none"> • Menos de 80% de potência para detectar uma redução de 10% no risco relativo para cada desvio padrão na ingestão de sódio.

FONTE: Cappuccio et al. (2019) e Cobb et al. (2014).

A causalidade reversa é a possibilidade de o evento preceder a causa provável, o que torna a relação de causa-efeito inadequada. No estudo do sal, a causalidade reversa pode estar presente quando pessoas doentes reduzem seu consumo por recomendação ou por ingestão calórica inadequada, tornando o grupo de menor ingestão, também, o de maior risco. Essa possibilidade foi recentemente explorada por Welsh et al. (2019a). Esses autores estudaram um banco de dados longitudinal (7 anos) contendo mais de 300 mil pessoas sem DCV de base que possuíam avaliação do consumo de sódio (coleta urinária pontual). Os autores descrevem que existiu uma sugestão de resultados adversos com consumo menor que 3 g / dia, que não se sustentou após exclusão dos pacientes com comorbidades (índice de comorbidade de Charlson > 1) Welsh et al., (2019b). De fato, para esses autores a maior mortalidade observada abaixo de 3 g de sódio / dia pode estar relacionada, pelo menos em parte, à causalidade reversa.

Como dito anteriormente, o estudo PURE (O'Donnell et al., 2019) avaliou o consumo de sódio por excreção urinária de sódio em coleta pontual, e extrapolaram seus valores para excreção de 24 h utilizando equações matemáticas. Apesar de a validação da equação na população de estudo (índice de correlação intraclasse entre excreção de sódio de 24 h estimada e a avaliada de 0,7), existe a possibilidade que esse método introduza erro sistemático à análise, considerando que elementos da fórmula, como idade e creatinina, também, são relacionados à mortalidade.

Nesse sentido, tem sido observado distorção da associação linear entre consumo de sódio e mortalidade pela avaliação por coleta pontual. Em outras palavras quando o consumo de sódio era inferido por sucessivas coletas de 24h, método considerado referência, sua relação com a mortalidade era linear, mas

transformava-se em J quando avaliado por coleta única (He et al., 2018; Olde Engberink et al., 2017).

Mente, O'Donnell e Yussuf (2019) defendem seu estudo e método de coleta, destacando a correlação entre os valores de consumo de sódio e a PA observadas, assumindo que esse é um importante teste para confiabilidade dos dados (Mente et al., 2019). E, apesar de concordarem que:

“...para estimar com maior precisão a ingestão de sódio em um indivíduo, várias medidas sejam necessárias ao longo de vários meses. Mas, múltiplas medidas não são necessárias quando o objetivo é estimar o consumo de sódio em uma comunidade ou comparar diferenças entre grupos de indivíduos”.

Importante comentar que, além do PURE, outros estudos observaram maior mortalidade ou eventos CV com a redução do consumo de sódio, utilizando múltiplas coletas urinárias de 24 h. Por exemplo, Ekinçi et al. (2011) em população com diabetes mellitus tipo 2, e Kieneker et al. (2018), em indivíduos livre de DCV, relataram maior risco de evento CV com menor consumo de sódio.

1.2. Potenciais efeitos deletérios da redução intensa de sódio dietético

Em 2017, o alto consumo de sódio se associou a mais da metade das mortes e dois terços das perdas de anos de vida saudável atribuídas aos fatores alimentares. Assim, os autores do *Global Burden of Disease* estimaram que o consumo de sódio fosse o principal elemento dietético relacionado à morte, ficando na frente de outros fatores de risco nutricionais tradicionais, como o baixo consumo de frutas, vegetais e alto consumo de gordura trans (GBD 2017 Diet Collaborators, 2019). No Brasil, Nilson et al. (2020) sugeriram que 6,4% de todas as mortes e 15% das mortes CV poderiam ser prevenidas pela redução do consumo de sódio.

De fato, esses números são impressionantes, mas consideram prioritariamente os efeitos do sódio sobre a PA e desconsideram os estudos entre sódio e mortalidade. As estimativas do *Global Burden of Disease* e de vários estudos semelhantes (Mozaffarian et al., 2014; Nilson et al., 2020) primeiro calculam o quanto da PAS é alterada pelo atual consumo de sódio, tendo como referência

uma ingestão “ideal”, e posteriormente extrapolam o quanto a mudança na PA influenciaria a mortalidade geral e CV.

Essa abordagem desconsidera inúmeros efeitos fisiológicos do sódio independentes da PA, sejam eles positivos ou negativos. O risco de morte ou eventos CVs relativos ao consumo de sódio não deve ser visto como uma simples transferência da modulação da PA, mas sim como o efeito líquido de todas as suas funções no organismo. Desse modo, a associação entre essas variáveis deve ser verificada diretamente.

A plausibilidade fisiológica dos estudos populacionais que associam a restrição de sódio a efeitos adversos está na maior atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), secreção de catecolaminas, redução da sensibilidade periférica à insulina e na alteração da concentração dos lípides plasmáticos.

Além de cada um desses ser um fator de risco para DCV e morte, é possível que essas alterações influenciem, também, no desenvolvimento de outras doenças, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

1.2.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Graudal *et al.*, (2020) observaram aumento na atividade de renina plasmática associado à restrição dietética de sódio. Além disso, índios Yanomamis, população com consumo de sódio extremamente baixo, apresentam maiores valores de renina plasmática, o que demonstra uma associação crônica entre essas variáveis (Oliver *et al.*, 1975). A ativação do SRAA pela restrição dietética de sódio garante a manutenção da PA e natremia. O SRAA é um importante mecanismo de controle crônico da PA, agindo em resposta à hipoperfusão glomerular, redução da concentração de sódio na mácula densa no túbulo contorcido distal e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (Fountain and Lappin, 2020).

Resumidamente, na via clássica de ativação do SRAA, a protease renina é produzida nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais e liberada para corrente sanguínea, onde cliva o angiotensinogênio em angiotensina 1 (ANG I). A ANG I é convertida em angiotensina II (ANG II), sua forma biologicamente ativa, por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA) presente, principalmente, no

endotélio vascular pulmonar e renal (Fountain and Lappin, 2020). Os efeitos fisiológicos da ANG II, em geral, ocorrem após sua ligação ao receptor de angiotensina II tipo I (AT1-R) na vasculatura e localmente em diversos órgãos, como fígado, coração, cérebro e rim.

No rim, a ANG II, por si, ou por estimular a liberação de aldosterona, aumenta a reabsorção de sódio. No cérebro, induz sede, ingestão hídrica e estimula a liberação do hormônio antidiurético. Ao agir sobre as células da musculatura lisa vascular, desempenha um dos mais potentes efeitos vasoconstritores endógenos. Esses eventos combinados culminam na elevação do volume plasmático e da PA (Fountain and Lappin, 2020).

Para além das funções clássicas, o eixo renina/ANG II/AT1-R é um sistema com ampla atuação endócrina, parácrina e autócrina, de ação pró-inflamatória, pró-oxidativa, pró-fibrótica e pró-trombótica. Sua hiperativação tem sido associada a doenças como: obesidade (Schütten et al., 2017), diabetes mellitus (Simões e Silva et al., 2017), aterosclerose (Silva et al., 2020), doença renal crônica (Laffer et al., 2020), DHGNA (Li et al., 2019a), entre outras.

Atualmente, entende-se o eixo renina/ANG II para além do modelo clássico, com tecidos, como tecido adiposo, rim, pâncreas e fígado expressando seu completo sistema renina-angiotensina local. A própria ANG II pode se ligar ao receptor de angiotensina II tipo II (AT2-R), receptor expresso em menor quantidade no adulto, estimulando resposta hipotensora. Ainda, outros peptídeos originários a partir da clivagem de ANG I ou ANG II pela ECA 2 ou neprilisina (NEP), como por exemplo a angiotensina (1-9), angiotensina (1-7) vão ter ações opostas ao eixo ANG II/AT1-R, não apenas sobre a PA, mas também relacionados a sua ação anti-inflamatória, antioxidante, antifibrótica e antitrombótica. **Figura 1** demonstra a formação dos principais componentes do sistema renina-angiotensina, seus receptores e função.

FONTE: Adaptado de Paz Ocaranza et al. (2020).

Figura 1 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Na via clássica, o angiotensinogênio é clivado pela renina formando angiotensina I. Essa proteína sofre ação da enzima conversora de angiotensina, produzindo angiotensina II, peptídeo que age especialmente por meio do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1-R), estimulando vasoconstrição, fibrose, inflamação, estresse oxidativo, liberação de aldosterona e hormônio antidiurético, e reduz a natriurese. Diversos receptores participam da via contrarregulatória, na figura estão demonstrados os receptores de angiotensina tipo 2 (AT2-R) e tipo 4 (AT2-R), receptor Mas proto-oncogênese (MasR) e receptor acoplado à proteína G relacionado ao MAS membro D (MrgD). NEP = neprilissina; ECA = enzima conversora de angiotensina; ECA 2 = enzima conversora de angiotensina 2. Os círculos coloridos ao lado de cada função demonstram a atuação de cada receptor. Esta figura foi produzida utilizando imagens do banco de imagens *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com.br/contente/banco-de-imagens>).

A atividade ou concentração de renina plasmática é um marcador de pior prognóstico CV (de Boer et al., 2012a; Tomaschitz et al., 2010; Verma et al., 2011). No estudo *Prevention of RENal and Vascular ENd-stage Disease* (PREVEND), a concentração de renina plasmática foi associada ao risco de evento CV em todas as faixas de PAS (de Boer et al., 2012b). Mais recentemente, Joseph et al. (2017), em afro-americanos, e Tomaschitz et al. (2010), em pacientes com doença arterial coronariana, demonstraram que a elevação da concentração de aldosterona plasmática também direciona ao maior risco de eventos CV e mortalidade total, mesmo após correção estatística para HAS e outros fatores de risco.

Os componentes do SRAA podem promover o desenvolvimento (Takata et al., 2015a) e desestabilização da placa aterosclerótica (Li et al., 2016; Sun et al., 2017). A infusão de ANG II em camundongos hipercolesterolêmicos, mesmo em doses subpressóricas contribuiu para o desenvolvimento do ateroma quando comparados à hipercolesterolemia isolada (Takata et al., 2015b). Por outro lado, a inibição

farmacológica ou genética do AT1-R reduziu o acúmulo de gordura na parede arterial (Lee et al., 2012; Tiyerili et al., 2013). Em geral, esses resultados foram associados a modelos de hipercolesterolemia, o que dificulta o entendimento da elevação de ANG II por si.

O maior estresse oxidativo e inflamatório parecem ter papéis fundamentais no desenvolvimento da aterosclerose promovido pela ANG II. Esses, e outros processos secundários ao estímulo da ANG II, direcionam a disfunção endotelial, peroxidação lipídica, formação de lipoproteína de densidade baixa (LDL) oxidada, proliferação de células musculares lisas, migração e adesão de monócitos/macrófagos.

Fusco et al. (2017), observaram que restrição alimentar de sódio estimulou o aumento do infiltrado lipídico na aorta de camundongos hipercolesterolêmicos com hipertensão renovascular dependente de ANG II. Este resultado se relacionou à ação da dieta em piorar o perfil lipídico plasmático e aumentar as concentrações de carboximetil-lisina, um produto de glicação avançada, e do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), ambos associados à piora do perfil inflamatório na parede arterial. A aterogênese foi prevenida pelo tratamento com bloqueador do AT1-R, losartana, mas não pela hidralazina, medicação que atua por mecanismo independente do SRA. É importante mencionar que todos esses efeitos ocorreram mesmo na presença de menor PAS nos animais sob restrição alimentar de sódio.

O sistema renina-angiotensina, sistêmico e local, também atua na patogênese das doenças hepáticas crônicas. Isso é evidenciado pela observação de maior concentração plasmática de renina e ANG II em pessoas diagnosticadas com cirrose ou DHGNA (Asbert et al., 1992; Li et al., 2019b). Polimorfismo AGTR1A1166C, que confere maior atividade do AT1R, aumenta o risco de desenvolvimento de DHGNA em 60% (AC/CC vs AA) (Musso et al., 2019). Inibidores do SRAA, em especial os bloqueadores do AT1-R, são eficientes em reduzir a fibrose hepática e seus marcadores no plasma, como TGF beta, MMP2 e TIMP-1, em pessoas com doença hepática crônica (Kim et al., 2016; Zhu et al., 2016). Em ratos, a infusão de ANG II humana, por 14 d, elevou a secreção de TG no plasma e esteatose hepática de modo dose-dependente (Ran et al., 2004).

No fígado, a ativação do sistema renina-angiotensina local ocorre em resposta ao dano celular, e atua no reparo e desenvolvimento de fibrose (Bataller et al., 2003).

Células estreladas ativadas começam a produzir ANG II que, uma vez mais, promove sua ativação, proliferação e diferenciação fenotípica para miofibroblastos, principal responsável pela deposição de matriz extracelular (Rajapaksha et al., 2021a).

Em modelo animal de doença hepática colestática crônica, e outros, a infusão de ANG II contribuiu para progressão da fibrose hepática, elevação de proteínas e células inflamatórias e estresse oxidativo (Rajapaksha et al., 2021b). Apesar de ocorrerem outros danos, o desenvolvimento de fibrose não foi observado nos animais falso operados que receberam ANG II. Desta forma, os autores teorizam que a ANG II poderia exacerbar o desenvolvimento de fibrose secundariamente a um insulto anterior (Bataller et al., 2005). No mesmo modelo experimental, o tratamento com telmisartana, um bloqueador do AT-1R, atenuou o desenvolvimento da fibrose (Yi et al., 2012).

Estudos experimentais associam a superativação do sistema renina-angiotensina a prejuízos a sinalização insulínica e síntese lipídica. A ANG II induz a disfunção das células beta pancreáticas, reduzindo a secreção de insulina estimulada pela glicose (Graus-Nunes and Souza-Mello, 2019). No músculo esquelético, a ativação do SRA vincula-se à menor translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), com consequente redução da captação muscular de glicose (Wei et al., 2006). Camundongos deficientes para angiotensinogênio hepático são protegidos contra elevação do peso corporal, tecido adiposo, resistência à insulina e esteatose hepática induzidas por dieta rica em gordura (Tao et al., 2019). Enquanto, camundongos transgênicos com superexpressão de ANG II possuem maior concentração de hepática de triglicérides (TG) e fibrose, apesar de não apresentarem elevação do peso corporal quando comparados aos controles (Wei et al., 2009, 2008). Além de estimular a resistência à insulina, o SRA promove a lipogênese, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamatório que juntos explicam sua influência na esteatose hepática (Silva et al., 2017).

1.2.2 Resistência periférica à insulina e metabolismo lipídico.

As dislipidemias, em especial a hipercolesterolemia, estão entre os principais fatores de risco para a DCV aterosclerótica. Isso se deve ao fato de a entrada de

LDL e outras partículas contendo apolipoproteína B (apoB) na íntima arterial ser o mecanismo central da aterosclerose. A lipoproteína de densidade alta (HDL), por sua vez, ao retirar o colesterol de macrófagos da lesão aterosclerótica possui importante função antiaterogênica. Muitos estudos epidemiológicos evidenciam a relação linear positiva e inversa, respectivamente, entre colesterol nas partículas de LDL (LDLc) e HDL (HDLc), com DCV aterosclerótica (Mach et al., 2020).

Inconsistências e dúvidas permanecem sobre o real papel das lipoproteínas ricas em TG sobre a DCV. Apesar de alguns artigos sugerirem papel independente dos TG sobre a aterogênese, em outros essa associação desapareceu após correção para o HDLc e colesterol não-HDL (Laufs et al., 2020). Visto que os TG não se acumulam na íntima arterial, é provável que o colesterol presente nessas partículas seja o fator preponderante.

Devido ao seu tamanho, as partículas ricas em TG possuem maior dificuldade para penetrar na parede do vaso quando comparadas com lipoproteínas menores (LDL e HDL). Por outro lado, remanescentes de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), são associados à disfunção endotelial e inflamação crônica de baixo grau (Sandesara et al., 2019), podem ser captadas por macrófagos diretamente sem a necessidade de modificações oxidativas e, devido ao seu tamanho, conduzem de 5 a 20 vezes mais colesterol por partícula que a LDL (Rosenson et al., 2014; Sandesara et al., 2019).

A piora do perfil lipídico, induzida pela redução crônica de sódio, foi revisada recentemente em meta-análise feita por Graudal et al. (2020). Para análise das variáveis lipídicas foram avaliados entre 18 e 27 estudos clínicos randomizados que incluíram entre 696 a 917 pessoas. O alto e baixo consumo de sódio foi definido por cada artigo, e poderia ter como referência tanto as recomendações de instituições de saúde quanto o consumo usual. A baixa ingestão de sódio resultou em aumento do colesterol total (CT; 5,19 mg/dL) e TG (7,10 mg/dL), sem alteração nos valores de HDLc e LDLc plasmáticos, quando comparada ao alto consumo de sódio.

Ratos Wistar alimentados com dieta pobre em sódio hipossódica apresentam maiores concentrações plasmáticas de ácidos graxos (AG), TG e CT, quando comparados àqueles alimentados com dieta controle normossódica (Catanozi et al., 2001). Uma vez que a taxa de produção de lipoproteínas ricas em TG foi alterada, o distúrbio no metabolismo lipídico foi atribuído ao retardo da remoção dessas

lipoproteínas do plasma, secundariamente à menor atividade da lipoproteína lipase (LPL), em decorrência da resistência à insulina (Catanozi et al., 2001). Em humanos normotensos, a restrição dietética de sódio, por 3 semanas, também elevou a trigliceridemia e a concentração circulante de citocinas inflamatórias. Estes eventos foram vinculados à piora no índice HOMA-IR, evidenciando menor sensibilidade periférica à insulina (Nakandakare et al., 2008). Interessantemente, estudo de Hattori et al. (2014) observou, em modelo de síndrome metabólica e obesidade (DahlS.Z-Lepr^{fa}/Lepr^{fa}), aumento dos lípides plasmático secundário a restrição de sódio, mesmo com verificação de melhora da sensibilidade periférica à insulina (Hattori et al., 2014).

Os mecanismos exatos pelos quais a restrição de sódio dietético piora a sensibilidade insulínica ainda estão sendo elucidados, contudo, especula-se que a elevação das concentrações plasmáticas de aldosterona, ANG II, norepinefrina e a ativação do sistema nervoso simpático possam desempenhar papel preponderante (Garg et al., 2011). Ainda, a dieta hipossódica favorece o aumento da massa corporal e adiposidade de ratos, fatores importantes na modulação da sensibilidade insulínica (Prada et al., 2005; Xavier et al., 2003).

A resistência hepática à insulina prejudica a ação deste hormônio sobre a supressão da gliconeogênese e glicogênese, mas não altera, ou mesmo exacerba, sua função sobre a expressão de genes lipogênicos, aumentando a síntese de AG e o acúmulo de TG no fígado (**Figura 2**). Prejuízo da sinalização insulínica por meio do substrato do receptor de insulina (IRS2), mas não por IRS1, parece ser a causa da seletiva resistência hepática à insulina (Kubota et al., 2016).

FONTE: Adaptado de Petersen e Shulman (2018).

Figura 2 - Resistência hepática à insulina. Na resistência hepática à insulina, ocorre perda da função inibitória sobre as proteínas *forkhead box O1* (FOXO1), glicogênio sintase cinase (GSK) e fosforilase cinase. Assim, a GSK ao bloquear a glicogênio sintase, e a fosforilase cinase ao estimular a glicogênio fosforilase, respectivamente, reduzem a síntese e aumentam a hidrólise do glicogênio. Enquanto a FOXO1, por sua vez, fica livre para ir ao núcleo, onde estimula a expressão de genes associados à gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato cinase 1 (*Pck1*) e a glicogênio-6-fosfatase (*G6pc*). Paradoxalmente, a via de síntese de lipídios (SREBP1c) está estimulada na resistência à insulina, conduzindo à expressão de genes lipogênicos (acetil-CoA carboxilase (*Acc*), ácido graxo sintase (*Fasn*), glicerol-3-fosfatase aciltransferase (*Gpm*), entre outros). Na vigência de resistência à insulina no tecido adiposo, ocorre aumento da taxa de lipólise, com sobrecarga de ácido graxo ao fígado. Figura produzida utilizando imagens do banco de imagens *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com.br/contente/banco-de-imagens>).

Na vigência de resistência periférica à insulina, observa-se maior aporte de AG ao fígado, dada a maior lipólise do tecido adiposo. Além disso, na presença de hiperinsulinemia compensatória, há maior ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol 1a (SREBP1a) e c (SREBP1c), com consequente aumento da lipogênese *de novo*. O TG formado é transferido à apoB-100 nascente no retículo endoplasmático com alta eficiência, uma vez que a proteína de transferência de TG (MTP) apresenta atividade aumentada na resistência hepática à insulina. Assim, na resistência à insulina são formadas grandes partículas de VLDL ricas em TG promovendo importante elevação da trigliceridemia.

Existem poucos dados na literatura acerca dos efeitos da restrição crônica de sódio dietético sobre a sinalização insulínica no fígado e sua repercussão sobre o metabolismo lipídico. Menor ativação da via IRS-fosfatidil inositol 3 cinase - AKT (IRS/PI-3K/AKT), tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos Wistar

alimentados com dieta hipossódica, foi observada em comparação a animais em dieta normossódica, devido a maior fosforilação em serina do IRS (Prada et al., 2005). Corroborando esse resultado, no mesmo modelo experimental, observou-se maior síntese hepática de lípidos, após 3 meses de redução do sódio dietético, em comparação aos animais em dieta normossódica, embora nesse estudo não se evidenciou aumento da concentração de TG hepático (Xavier et al., 2003). Dessa forma, é possível que a restrição dietética de sódio possa contribuir para o maior conteúdo de gordura intra-hepático e desenvolvimento da DHGNA.

1.4 Consumo de sódio e doença hepática gordurosa não alcoólica

A DHGNA é representada por um contínuo que se inicia com a esteatose simples, evoluindo, em um pequeno percentual dos indivíduos, para esteatohepatite, cirrose e, em último caso, carcinoma hepatocelular. Ela é a doença hepática com maior prevalência, ~25%, e incidência global, 20,7 casos /100.000 pessoas, com um aumento de 13% comparado ao ano 2000 (Moon et al., 2020). Seu desenvolvimento está intimamente relacionado a doenças metabólicas, em especial a obesidade. Além disso, hábitos dietéticos são reconhecidamente um fator importante no seu manejo.

Poucos estudos em humanos e animais buscaram entender a influência do consumo de sódio sobre o desenvolvimento da DHGNA (van den Berg et al., 2019; Choi et al., 2016; Emamat et al., 2021; Lanaspá et al., 2018; Zhou et al., 2021). Todas as pesquisas em humanos, até então realizadas, apontaram para uma associação positiva entre o consumo de sódio e marcadores da DHGNA. Contudo, o fato de todos serem estudos observacionais e, com exceção de Lanaspá et al. (2018), transversais, dificultam a interpretação de causa e efeito.

É esperado que o consumo de sódio seja associado a diversos outros fatores, com consumo energético e de alimentos ultraprocessados, IMC, doenças metabólicas, sexo masculino, estado socioeconômico, entre outros, que podem interferir na análise, em especial, quando não adequadamente controlados (de Mestral et al., 2017).

Ao contrário dos estudos em humanos, em animais, tanto o maior quanto o menor consumo de sódio parecem influenciar o metabolismo hepático de lípidos.

Lanaspa et al. (2018), em camundongos selvagens com consumo de água contendo 1% de sódio por 30 semanas, e Uetake et al. (2015), em camundongos *Knockout* para apoE com superexpressão de LOX-1, em dieta hipergordurosa e hipersódica por 8 semanas, reportaram aumento no conteúdo de lípidos ou esteatose hepática. Outros autores ainda reportaram aumento de marcadores inflamatórios nessa condição. Nesses artigos, o bloqueio do estresse oxidativo e da metabolização de frutose reverteram esses resultados (Lanaspa et al., 2018; Uetake et al., 2015).

Por outro lado, recentemente, Cabrera et al. (2021) observaram proteção contra DHGNA em camundongos em dieta hipersódica, em dois modelos experimentais diferentes: camundongos selvagens em dieta hipergordurosa (12 semanas) ou deficiente em colina e metionina (6 semanas). Cabrera et al. (2021) reportaram menor ganho de massa corporal, glicemia e resistência à insulina no grupo hipersódico (3% Na⁺), em comparação ao grupo com consumo convencional de sódio (0,3% Na⁺) ou com baixo consumo de sódio (0,03%Na⁺). Além disso, no fígado, o grupo com maior consumo de sódio apresentou menor concentração hepática de TG, expressão de proteínas associadas à síntese de TG (SCD1) e aumento das metaloproteinases de matriz (MMP9 e MMP13), proteínas associadas negativamente com o grau de fibrose. Cabrera et al. (2021) associaram o efeito protetor do maior conteúdo de sódio à redução da concentração plasmática de aldosterona e da influência desse hormônio sobre o receptor hepático de mineralocorticoide. Nesse mesmo artigo, os autores observam maior acúmulo de diacilglicerol e colesterol esterificado, bem como, maior expressão genética de marcadores inflamatórios (TNF e MCP1) e de desenvolvimento de fibrose (TIMP-1) no fígado dos camundongos alimentados com baixo sódio dietético.

Os resultados de Cabrera et al. (2021) fortalecem os dados descritos anteriormente de maior resistência hepática à insulina e síntese de lípidos no fígado de ratos submetidos a restrição dietética de sódio (Prada et al., 2005; Xavier et al., 2003).

1.5 Treinamento físico, sensibilidade à insulina e metabolismo lipídico

O treinamento físico é uma importante ferramenta no manejo das doenças metabólicas e reduz a incidência e complicações decorrentes de doenças crônicas

não transmissíveis. Diversos mecanismos estão subjacentes a esses benefícios do exercício físico, sendo um dos principais a melhora da sensibilidade à insulina.

A insulina é um hormônio anabólico com função de controle do metabolismo dos macronutrientes, preponderantemente, no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. No primeiro, estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio; no segundo, inibe a gliconeogênese e promove a glicogênese e a lipogênese; no último, diminui a lipólise e aumenta a captação de glicose e a lipogênese. A resistência à insulina descreve condição em que maiores concentrações de insulina são necessárias para manutenção da homeostase glicídica.

Existe uma associação positiva entre quantidade de atividade física e sensibilidade à insulina (Balkau et al., 2008). Estudos longitudinais demonstraram o papel do treinamento físico em diminuir a incidência de diabetes mellitus em indivíduos com tolerância à glicose reduzida (Pan et al., 1997). Isso é ainda mais evidente quando a atividade física está inserida em um conjunto de intervenções no estilo de vida, como dieta e redução da massa corporal.

No “*Diabetes Prevention Program*”, estudo com 3234 participantes com pré-diabetes, seguidos por uma média de 2,8 anos, observou-se redução na incidência de diabetes mellitus tipo 2 de 58% no grupo intervenção no estilo de vida e 31% no grupo metformina vs placebo (Placebo, n = 1082; Metformina 850 mg duas vezes ao dia, n = 1073; Intervenção no estilo de vida, n = 1079) (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002).

A melhora da resposta à insulina estimula atividade da LPL. O treinamento físico aeróbio ainda melhora a afinidade das lipoproteínas ricas em TG pela LPL, favorecendo a hidrólise dessas partículas, com redução da trigliceridemia. Aliado a essa maior eficiência está a formação de LDL maiores, e a produção de partículas de HDL, a partir do desprendimento de componentes de superfície das VLDL. Todas essas alterações colaboram na proteção as dislipidemias e produzem um perfil de lipoproteínas menos aterogênico. Além disso, alterações qualitativas como maior efluxo de colesterol para HDL e maior resistência à oxidação da LDL também são observadas após exercício crônico (Iborra et al., 2008; Medlow et al., 2015; Rocco et al., 2011).

Modificações agudas e crônicas, dependentes e independentes de insulina, estão envolvidas na melhora da captação da glicose e sensibilidade à insulina pelo exercício físico. Durante a sessão de treinamento, a contração muscular e maior formação de AMP direcionam a ativação da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) que fosforila/desativa a TBC1D1, proteína membro da família 1 do domínio TBC1, codificada pelo gene *TBC1D1*. A TBC1D1 tem efeito inibitório sobre o deslocamento das vesículas contendo GLUT4, por isso quando inativo permite a translocação dessa proteína ao sarcolema e estimula a captação de glicose. A elevação na concentração de cálcio muscular também está envolvida no aumento de GLUT4 disponível na membrana plasmática. Esses efeitos normalizam a captação de glicose durante o exercício físico, mesmo em pessoas com intolerância à glicose, e influenciam a sensibilidade à insulina por até 72 h (Kubota et al., 2016; Whillier, 2020a). Em via dependente de insulina, proteínas mais distantes da cascata de eventos, como AKT, PI3K e TBC1D4, podem ser ativadas pelo exercício agudo, especialmente nas primeiras horas pós-exercício (Whillier, 2020b).

Por aumentar a capilarização (exercício aeróbio), a massa muscular (exercício resistido), a eficiência na utilização dos substratos energéticos, a concentração e a ativação de proteínas envolvidas na sinalização insulínica, o treinamento físico, cronicamente, melhora a resposta a esse hormônio em ~40% (Conn et al., 2014). Efeitos similares de melhora na sensibilidade à insulina podem ser observados em outros tecidos, incluindo o fígado, especialmente em condições metabólicas deletérias (Marinho et al., 2012).

Na esteatose hepática, o treinamento físico, a dieta e a perda de peso representam a primeira linha de intervenção. Existe uma relação inversa entre atividade física e DHGNA. A prática de exercícios físicos (150 min/semana) reduz em 40% o risco de esteatose hepática após ajuste para fatores de confusão. Mesmo doses menores de exercícios físicos (<150 min/semana) são protetoras sobre o acúmulo hepático de lípidos (Kim et al., 2020).

No fígado, a melhora da sensibilidade à insulina, local e periférica, interfere na concentração de lípidos por favorecer o bloqueio da lipólise do tecido adiposo, com consequente redução do aporte de AG à circulação e, por fim, ao fígado e por reduzir as ações lipogênicas desse hormônio sobre o tecido hepático, devido à

menor insulinemia basal. Isto é importante, uma vez que o mecanismo de síntese lipídica não sofre resistência, ou seja, quanto maior a concentração de insulina maior será a produção de lípidos; sendo oposto também verdadeiro.

O treinamento físico favorece os dois mecanismos descritos acima por estimular a remoção de AG da circulação pelo tecido muscular com maior capacidade oxidativa e, possivelmente, por diminuir a lipogênese *de novo* e enzimas lipogênicas. Ainda, a capacidade oxidativa hepática é aumentada pelo treinamento físico, garantindo o para garantir fornecimento de ATP aos processos metabólicos, em especial a gliconeogênese. Esses mecanismos ajudam a explicar o papel protetor do exercício físico frente a desafios metabólicos induzidos por dieta. Frantz et al. (2017) e Ok et al. (2018) demonstraram que o treinamento físico se contrapõe ao acúmulo de lípidos intra-hepático induzido por frutose e dieta rica em gordura. Dessa forma, espera-se que o treinamento físico possa se contrapor aos efeitos deletérios sobre o metabolismo lipídico induzidos pela restrição dietética de sódio.

2.JUSTIFICATIVA

A restrição de sódio alimentar reduz a PA, embora sejam descritos efeitos adversos dessa intervenção sobre o metabolismo de lipoproteínas ricas em TG, sensibilidade periférica à insulina, ativação do SRAA, piora do perfil inflamatório e aterogênese. Especificamente no fígado, já foi descrito que a restrição dietética de sódio reduz a sensibilidade local à insulina e estimula a lipogênese, o que pode interferir negativamente na concentração de lípides hepático. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio é uma ferramenta na prevenção e tratamento das doenças metabólicas e CV, atuando ao lado da redução alimentar como primeira linha de tratamento na esteatose hepática.

A hipótese desta investigação foi de que o treinamento físico pudesse se contrapor aos efeitos deletérios, induzidos pela restrição dietética de sódio, sobre a sensibilidade periférica à insulina e metabolismo hepático de lípidos

3. OBJETIVO

Avaliar em camundongos dislipidêmicos o efeito da restrição de sódio dietético e treinamento físico aeróbio sobre a resistência periférica à insulina, conteúdo de lípidos e expressão de genes envolvidos na sinalização insulínica e metabolismo de lípidos no fígado.

.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº: 1210/2019, Anexo) e estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos (Brasil, 2013).

4.1 Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos C57BL/6 *knockout* para o receptor de LDL (LDLr KO), machos, com 3 meses, cujas matrizes foram adquiridas comercialmente do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA) e reproduzidos em colônias homozigóticas. Os animais foram mantidos em biotério convencional (2–4 animais por gaiola), com ciclo de 12 h claro/12 h escuro, a temperatura de 22 ± 2 °C, recebendo água filtrada e ração padrão *ad libitum* (Centro de Manutenção e Experimentação de Animais da Clínica Médica - Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

Os animais foram separados em 4 grupos que diferiram quanto à quantidade de sódio da dieta e realização de TFA em um desenho fatorial 2x2, sendo: 1) normossódico sedentário (NS-S; n = 14); 2) normossódico treinado (NS-T; n = 13); 3) hipossódico sedentário (HS-S; n = 13) e 4) hipossódico treinado (HS-T; n = 13) (**Figura 3**). A similaridade entre os grupos, no período inicial, foi controlada pela alocação balanceada dos animais, tendo como referências as avaliações de massa corporal, CT, TG, glicose e capacidade de esforço máximo. O protocolo de intervenção teve duração de 90 dias (**Figura 3**).

Antes e após a intervenção, foram determinadas a capacidade máxima de exercício, massa corporal, PAS, PAD e hematócrito, CT, TG e glicose plasmática. Além disso, foram avaliados apenas ao fim da intervenção a excreção urinária de sódio de 24 h, o perfil qualitativo das lipoproteínas plasmáticas e o teste de tolerância à insulina (ITT) (**Figura 3**). Durante o período experimental, o consumo de ração foi avaliado semanalmente.

Os camundongos foram submetidos à eutanásia com sobredose intraperitoneal de tiopental sódico (THIOPENTAX®; 150 mg / kg de massa corporal) e o fígado foi removido.

Figura 3 - Protocolo Experimental. Camundongos LDLr KO machos foram divididos em 4 grupos experimentais. O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira rolante, em velocidade de 15 m/min, 60 min/dia, 5 vezes na semana. O protocolo experimental teve duração de 90 dias. Antes e após a intervenção, foram determinadas a capacidade máxima de exercício, massa corporal, PAS, PAD, hematócrito e CT, TG e glicose plasmáticos. Além disso, apenas ao fim da intervenção a excreção urinária de sódio de 24 h, perfil qualitativo das lipoproteínas plasmáticas e teste de tolerância à insulina (ITT) foram mensurados. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por sobredose de tiopental sódico e o fígado coletado para avaliação da quantidade de lipídeos, glicogênio, expressão gênica e atividade da enzima citrato sintase.

4.3 Dieta

As dietas foram adquiridas da empresa *Envigo Teklad Diets* (Indianapolis, Indiana, USA). As rações normossódica (TD92140) e hipossódica (TD 92141) foram

compostas de, respectivamente, 0,5% e 0,06% Na⁺ ou 1,27% e 0,15% NaCl. A composição das dietas e as informações nutricionais estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Composição nutricional das dietas experimentais		
Fórmula (g/Kg de ração)	Normossódica (0,5% Na⁺)	Hipossódica (0,06% Na⁺)
Caseína	287	287
Sacarose	313,4	313,4
Amido de milho	200	200
Óleo de Soja	60	60
*Celulose	86,6	97,92
Mistura de vitaminas, Teklad (40060)	10	10
Etoxicina, antioxidante	0,012	0,012
Citrato de potássio monohidratado	7,7	7,7
Sulfato de potássio	1,820	1,820
Óxido de magnésio	0,840	0,840
Carbonato de manganês	0,123	0,123
Citrato férrico	0,21	0,21
Carbonato de zinco	0,056	0,056
Carbonato cúprico	0,011	0,011
Iodato de potássio	0,0004	0,0004
Selenito de sódio penta-hidratado	0,0004	0,0004
Sulfato de cromo e potássio, dodecaidratado	0,019	0,019
Fosfato de cálcio dibásico	13,4	13,4
Carbonato de cálcio	6,23	6,23
*Cloreto de sódio	12,59	1,272
Informação nutricional (% do peso / % Kcal)		
Proteína	25 / 28,1	25 / 28,1
Carboidrato	49,8 / 56	49,8 / 56
Gordura	6,3 / 15,9	6,3 / 15,9
Kcal/g	3,6	3,6
FONTE: Envigo Tekland customer diet - TD92140 e TD 92141		
* Constituintes com diferenças entre as dietas		

A necessidade diária de consumo de sódio para adequado crescimento, manutenção, gestação e lactação de camundongos não está bem definida, e em

grande parte é extrapolada a partir de estudos com ratos. Comumente, as concentrações de sódio em rações comerciais para modelos murinos são de 0,5 g de Na⁺/Kg de peso da dieta, o que está alinhado às recomendações do *National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995)*. Assim, um camundongo adulto irá consumir, ~ 1,75 mg / dia de sódio (considerando um consumo de 3,5 g / dia). Por outro lado, quando dada opção de escolha, ratos consomem de sete a nove vezes menos sódio do que o disponibilizado pelas rações convencionais (Martus et al., 2005). A concentração de sódio utilizada na dieta hipossódica utilizada no presente estudo (0,06%) representa a menor concentração necessária para o desenvolvimento normal de ratos Holtzman (Grunert et al., 1950). A título de comparação, um ser humano em dieta de 2.000 Kcal, alimentado com as dietas normossódica e hipossódica teria uma ingestão de, respectivamente, 2,8 g e 0,3 g de sódio, o que corresponde a 7 g e 0,7 g de NaCl.

4.4 Protocolo de treinamento físico aeróbio

Previamente ao protocolo de intervenção, todos os camundongos foram submetidos a 3 sessões de adaptação à esteira rolante (10 min, com velocidade inicial de 9 m/min com aumento progressivo de até 15 m/min). Foram incluídos no estudo apenas os animais que se adaptaram a corrida na esteira rolante.

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira rolante própria para camundongos (15 m/min, 60 min) ao longo de 90 dias, sendo a primeira semana de aclimação. A aclimação foi realizada a 12 m/min, com duração de 30 min no primeiro dia, com acréscimo de 10 min por dia até atingir 60 min. Cada sessão de treinamento consistiu de: 1) aquecimento (5 min); 2) velocidade alvo do treinamento (50 min); 3) desaquecimento (5 min).

Dos animais admitidos no estudo e submetidos ao treinamento físico, 3 (10%) foram excluídos ao longo do protocolo experimental por incapacidade de correr, definido pela incapacidade de manter o padrão de corrida mesmo após estímulo manual.

Todas as avaliações foram realizadas 24 h após a última sessão de exercício físico, com exceção da eutanásia e coleta do fígado (36 h após a última sessão).

Este protocolo de treinamento, utilizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa com duração de 6 semanas (Ferreira et al., 2017), foi escolhido por sua eficiência na redução da área de lesão aterosclerótica avançada, estímulo ao transporte reverso de colesterol e à expressão de genes antioxidantes.

4.5 Consumo de ração

O consumo de ração por grupo de camundongos foi avaliado pela diferença de peso (g) entre a ração ofertada e a ração restante ao término de cada semana. O consumo de ração médio foi obtido pela equação: consumo de ração grupo = (ração ofertada – ração restante) / número de animais da gaiola / dias de consumo. Para análise estatística cada grupo de animal/gaiola foi considerado uma unidade experimental.

4.6 Teste de esforço máximo

A capacidade máxima de exercício foi avaliada por meio de teste progressivo em esteira até a exaustão (Ferreira et al., 2007). O teste iniciou com velocidade de 9 m/min, sem inclinação na esteira, sendo acrescidos 3 m/min a cada 3 min até a completa exaustão. A exaustão foi definida sempre pela mesma avaliadora que observou a incapacidade dos camundongos em manter o exercício físico mesmo após estímulo manual.

O tempo para exaustão, tempo máximo que o animal conseguiu correr até a completa exaustão (em segundos [s]), foi utilizado como parâmetro de condicionamento físico.

4.7 Coleta de sangue, hematócrito, glicemia e determinação de lípides plasmáticos

As coletas de sangue da veia caudal (~200 µL) foram realizadas com os animais em privação alimentar de 12 h, por pequena amputação caudal e auxílio de tubos capilares heparinizados. Para isso, o corpo dos animais, excetuando-se a cauda, foi envolvido em toalha, com dimensão apropriada, objetivando-se um

procedimento adequado de imobilização e coleta. A glicemia foi avaliada a partir da primeira gota de sangue utilizando glicosímetro comercial (Accu-Chek® Performa). O hematócrito foi mensurado pela técnica de micro-hematócrito e o CT e TG no plasma foram determinados por *kits* enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.8 Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi realizado com os camundongos em privação alimentar de 4 h. A glicemia foi avaliada antes e após (0, 10, 20, 30 min) a administração intraperitoneal em bolus de insulina (1 U/kg – Humulin, Lilly). Durante o teste, a glicemia foi aferida em sangue total por glicosímetro comercial (Accu-Chek® Performa). A análise dos dados foi realizada baseada na constante de decaimento de glicose durante o teste (KITT), calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicemia.

4.9 Perfil de lipoproteínas plasmáticas

O perfil das lipoproteínas plasmáticas (VLDL, LDL e HDL) foi determinado em 100 µL de plasma, por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC), utilizando o sistema AKTA Purifier (GE *Healthcare Bio-Sciences –Uppsala – Sweden*) com coluna Superose 6HR 10/30 (GE Healthcare 17-5172-01). A separação foi realizada após eluição da coluna em fluxo constante de 0,5 mL/min com tampão Tris (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e NaN₃ 0,03%, pH 7,0). Foram coletadas frações de 0,2 mL em placas de 96 poços utilizando o coletor de frações. As identificações dos picos correspondentes às lipoproteínas foram observadas após determinação da absorbância do CT das frações coletadas. TG e CT foram avaliados utilizando *kit* enzimático colorimétrico (Labtest do Brasil, Lagoa Santa, MG, Brasil). As concentrações percentuais de CT e TG foram calculadas pelo percentual correspondente a área sob a curva dos picos de cada fração de lipoproteína.

4.10 Aferição da pressão arterial sistólica

A PA foi avaliada por método não invasivo indireto de fotopletismografia com sistema de manguito de cauda computadorizado (*Visitech Systems*, modelo *BP-2000 Blood Pressure Analysis System™* - Apex, NC, EUA). Para avaliação da PA, os camundongos foram colocados em contentor metálico sobre placa de aquecimento (36°C) com o manguito e o sensor ótico posicionados na base da cauda. A PA e FC foram mensuradas após dois dias de adaptação ao procedimento, no qual as medidas não foram consideradas, e calculadas pela média de seis aferições completas.

4.11 Excreção urinária de sódio de 24 h

Para coleta de urina, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, posicionadas sobre recipiente coletor contendo vaselina, por 24 h. O acesso à água e ração foi livre durante todo o período. As amostras foram centrifugadas a 392 x g por 15 min para separação entre a urina e a vaselina. A determinação de excreção urinária de sódio (mEq/24h) foi realizada por fotometria de chama (FC280, CELM).

4.12 Coleta do fígado

Após eutanásia com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (THIOPENTAX®) em sobredose anestésica (150 mg/kg de peso corporal), os animais foram submetidos à toracolaparotomia crânio-caudal para extração total do fígado (hepatectomia total). O fígado foi perfundido com solução fisiológica gelada, secado delicadamente em papel filtro e pesado em balança de precisão *Mettler Toledo* (Columbus, OH, EUA). Fragmentos do lobo médio foram guardados em tubos contendo *RNA later™ Stabilization Solution* (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA), ou imersos em formol 10% e encaminhados para análises histológicas. Os lobos restantes foram envolvidos em papel alumínio. As amostras em papel alumínio foram, imediatamente, congeladas por imersão em nitrogênio líquido e, aquelas imersas em *RNA later™ Stabilization Solution*, foram

acondicionadas 24 h à -4 °C, com posterior armazenamento a -80 °C. Fragmentos imersos em formol 10% foram encaminhados para inclusão em parafina.

4.13 Análise da expressão gênica por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Fragmento do lobo médio hepático (~ 30 mg) imersos em *RNAlater™* foram macerados e ressuspensos em 600 µL de tampão de lise (RLT, Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Alemanha) com 1% de beta-mercaptoetanol. A extração e purificação do RNA foi realizada por meio do conjunto *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Esse procedimento permite excluir seletivamente todos os RNA menores que 200 nucleotídeos, tais como 5.8S rRNA, 5S rRNA e tRNAs, que juntos compreendem entre 15 e 20% do RNA total.

A caracterização quantitativa e qualitativa das amostras foi realizada pelo sistema Lab-on-Chip Agilent RNA 6000 Nano Chips (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando equipamento 2100 Bioanalyzer (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A medida objetiva da qualidade do RNA é fornecida pelo número de integridade do RNA (RIN). No presente estudo, foram utilizadas amostras com $RIN \geq 7$.

A quantificação da expressão dos genes descritos na **tabela 4** foi realizada pela técnica de RT-qPCR utilizando sistema de amplificação *Taqman Two Step* RT-qPCR (*Applied Biosystem, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA*). Nesse método, primeiro é sintetizado DNA complementar (cDNA) a partir do RNA da amostra pela transcriptase reversa. Em um segundo momento o cDNA é usado como molde para reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR) em tempo real.

O cDNA utilizado na reação de PCR foi produzido a partir de 1000 ng de RNA total utilizando conjunto comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (*Applied Biosystem, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA*). O volume de cDNA foi então diluído 10x em água livre de endonucleases e armazenada a -20°C. A amplificação do cDNA em tempo real foi realizada utilizando *primers* (iniciadores da replicação do

DNA) específicos para cada gene em solução contendo desoxirribonucleotídeos e a enzima Taq DNA polimerase (*Gene expression Master Mix*, Applied Biosystem, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A reação de RT-qPCR foi realizada em 40 ciclos de amplificação (*Step One Plus Real Time PCR*, Applied Biosystem, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Tabela 4 - Lista de genes avaliados

Genes	Identificação	Gene	Identificação
<i>Acaca</i>	Mm01304257_m1	<i>Lrp1</i>	Mm00464608_m1
<i>Actb</i>	Mm02619580_g1	<i>Mttp</i>	Mm00435015_m1
<i>Ager</i>	Mm00545815_m1	<i>Ppib</i>	Mm00478295_m1
<i>Apoc2</i>	Mm00437571_m1	<i>Pck1</i>	Mm01247058_m1
<i>Apoc3</i>	Mm00445670_m1	<i>Plin1</i>	Mm00558672_m1
<i>Ddost</i>	Mm00492100_m1	<i>Ppara</i>	Mm00440939_m1
<i>Fasn</i>	Mm00662319_m1	<i>Ppargc1a</i>	Mm01208835_m1
<i>Foxa2</i>	Mm00839704_mH	<i>Prkaa1</i>	Mm00443451_m1
<i>Foxo1</i>	Mm00490671_m1	<i>Prkaa2</i>	Mm01264789_m1
<i>G6pc</i>	Mm00839363_m1	<i>Rela</i>	Mm00501346_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	<i>Rplp0</i>	Mm00725448_s1
<i>Hprt</i>	Mm03024075_m1	<i>Sc12a2</i>	Mm00446229_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1	<i>Srebf1</i>	Mm00550338_m1
<i>Lipe</i>	Mm00495359_m1	<i>Srebf2</i>	Mm01306292_m1

FONTE: <https://www.thermofisher.com>; *Apoc3*, apolipoproteína c-III; *Lipe*, lipase, hormônio sensível; *Lrp1*, Proteína relacionada 1 ao receptor de densidade baixa; *Mttp*, Proteína de transferência microssomal de triglicérides; *Ppara*, receptor ativo por proliferador de peroxissomas alfa; *Prkaa1* and 2, proteína cinase, ativada por AMP, subunidade catalítica alfa 1 e 2; *Srebf1* and 2, fator de transcrição do elemento regulador de esterol 1 e 2; *G6pc*, glicose-6-fosfatase, catalítica; *Pck1*, fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1, citosólica; *Ddost*, Dolcil difosfo-oligossacarídeo, subunidade não catalítica de proteína glicosiltransferase; *Acaca*, acetil-Coenzima A carboxilase alfa; *Apoc2*, Apolipoproteína c-II; *Fasn*, ácido graxo sintase; *Plin1*, perilipina 1; *Ppib*, Peptídeo-prolil isomerase b; *Ppargc1a*, receptor ativo por proliferador de peroxissomas, gama, coativador 1 alfa; *Foxa2*, forkhead box A2; *Foxo1*, a forkhead box O1; *Sc12a2*, Carreador de

soluto, membro 2, família 2; *Ager*, receptor específico de produtos de glicação avançada *I16*, Interleucina-6; *I110*, Interleucina-10; *Rela*, v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A.

Os valores de expressão gênica foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (*cycle threshold* ou limiar do ciclo), de acordo com a fórmula $2^{-(\Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{grupo\ controle})}$, no qual: $\Delta CT = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(\text{controle endógeno})$ (Livak and Schmittgen, 2001). O grupo controle foi considerado o grupo NS-S. Como controle endógeno foi selecionado o gene *Actb* (beta actina), após teste de estabilidade com 5 genes candidatos em amostras de fígado (*Actb*, *Gapdh*, *Hprt*, *Rplp0*, *Ppib*). A estabilidade da expressão gênica foi avaliada por meio do software Normfinder (**Tabela 5**; o software Normfinder estava disponível em: <https://moma.dk/normfinder-software>; acessado em 30 de julho de 2019).

Tabela 5 - Estabilidade da expressão de genes candidatos a controle endógeno

Gene	Valor de estabilidade			
<i>Actb</i>	0,223			
<i>Gapdh</i>	0,270			
<i>Hprt</i>	0,299			
<i>Rplp0</i>	0,365			
<i>Ppib</i>	0,269			
Variação Intragrupo				
	NS-S	NS-T	HS-S	HS-T
<i>Actb</i>	0,014	0,010	0,092	0,011
<i>Gapdh</i>	0,200	0,012	0,078	0,135
<i>Hprt</i>	0,297	0,329	0,012	0,098
<i>Rplp0</i>	0,224	0,020	0,073	0,170
<i>Ppib</i>	0,109	0,470	0,004	0,007
Variação Intergrupo				
	NS-S	NS-T	HS-S	HS-T
<i>Actb</i>	-0,162	0,177	0,097	-0,111
<i>Gapdh</i>	0,135	0,135	0,027	-0,296
<i>Hprt</i>	-0,020	0,091	-0,161	0,090
<i>Rplp0</i>	-0,163	-0,436	0,168	0,430

<i>Ppib</i>	0,211	0,033	-0,131	-0,113
-------------	-------	-------	--------	--------

NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T= Hipossódico treinado. Quanto menor o valor de estabilidade mais estável é a expressão do gene. n = 3 por grupo. *Actb* = *beta actina*; *Gapdh* = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *Hrpt* = Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase; *Rpl0* = Proteína ribossomal lateral stalk p0; *Ppib* = Peptídeo-prolil isomerase b;

4.14 Determinação do conteúdo hepático de lípides.

A extração de lípides foi realizada utilizando de 100 mg de fígado, seguindo protocolo descrito por Carr et al. (1993). O tecido foi macerado em solução de clorofórmio:metanol (2:1) e deixado *overnight* a -20°C. A fase orgânica foi separada após adição de solução aquosa contendo 0,05% de H₂SO₄ e centrifugação (1690 x g). O solvente foi evaporado (concentrador de amostra marca Genivac Standard [EZ-2], Ipswich, Suffolk, Inglaterra), seguindo-se adição de 1 mL de solução de Triton X-100 (0,5% em clorofórmio) e, posterior secagem. A amostra foi ressuspensa em 500 µL de água e deixada em agitação por 15 min a 37°C para solubilização dos lípides. As concentrações de CT e TG foram determinadas por *kits* enzimáticos colorimétricos (Roche do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em equipamento automatizado (COBAS-MIRA - Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). A fração aquosa foi secada e diluída em 1 mL de solução de NaOH 1N. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As concentrações hepáticas de CT e TG foram corrigidas por g de tecido e g de proteína.

4.15 Quantificação de glicogênio hepático

Para avaliação do glicogênio hepático, secções de 3,0 µm de espessura do lobo hepático médio, incluído em parafina, foram coradas com ácido periódico reativo de Schiff. Os cortes histológicos foram fotografados ao redor de veias centrolobulares, com objetiva de 20x, utilizando microscópio óptico Olympus DP72 equipado com câmera fotográfica digital e auxílio do software Image-Pro Plus versão 6.3. Para cada animal, a área positiva para periódico reativo de Schiff de 10 campos microscópicos de pelo menos 2 cortes foram quantificadas utilizando o

programa Image J (National Institutes of Health, EUA). Os resultados foram apresentados por percentual de área marcada.

4.16 Atividade da enzima citrato sintase hepática

Atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em homogenatos de fígado (32 µg), por meio da taxa de formação de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB, quantificado no espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm) utilizando *kit* comercial da empresa Sigma-Aldrich (#CS0720, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A cinética foi realizada em placa de 96 poços, com volume final 105 µL da mistura de reação (acetil-CoA 30mM, ácido 5'5 – Ditio-bis-(2-nitrobenzóico), 10 mM, oxaloacetato 10 mM, 32 µg de proteína sobrenadante de fígado) por 2 min. A atividade da citrato sintase foi calculada por meio da fórmula: $\mu\text{mol/mL/min} = (\Delta A_{412})/\text{min} \times \text{Volume da reação (mL)} / \text{coeficiente de extinção do TNB } (\epsilon^{\text{mM}})^1 \times \text{comprimento de onda para avaliação em placa de 96 poços [L(cm)]}^2 \times \text{quantidade de amostra (mg de proteína)}$.

4.17 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Minitab 19. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição não normal foram transformadas utilizando $\log_{10}$ ou método de Jhonson antes da análise de variância. Diferenças no período basal foram testadas utilizando ANOVA de um fator. Após protocolo experimental, os resultados foram comparados por ANOVA de 2 fatores (modelo linear generalizado; fatores fixos: dieta e TFA) com pós-teste de Tukey. Para análise do teste de esforço máximo e consumo de ração foi utilizado ANOVA para medidas repetidas (modelo de efeito misto, fator aleatório: animal e fatores fixos: dieta, TFA e tempo) com pós-teste de Tukey. Correlações foram determinadas usando teste de correlação de Spearman. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Diferenças estatísticas podem ser indicadas para efeito da dieta (NS vs HS), efeito do TFA (S

¹ Coeficiente de extinção do TNB a 412nm = 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹

² Comprimento de onda para avaliação em placa de 96 = 0, 552 cm

vs T) ou interação entre os fatores. Quando a interação é observada, letras distintas demonstram que os grupos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Eficácia das intervenções

Demonstrando a eficácia da restrição de sódio dietético, os camundongos submetidos à dieta hipossódica apresentaram menor excreção urinária de sódio de 24 h quando comparados aqueles em dieta normossódica (**Figura 4**). O consumo de ração não foi alterado ao longo das semanas pela redução do conteúdo de sódio da dieta, nem pelo TFA (**Figura 5**).

Dieta: $p < 0,01$; TFA: $p = 0,76$; Interação: $p = 0,89$

Figura 4 - Excreção urinária de sódio (mEq / 24 h). A determinação da excreção urinária de sódio (mEq / 24h) foi realizada por fotometria de chama (FC280, CELM). Dados apresentados como média e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de dois fatores (modelo linear generalizado, fatores fixos: Dieta e TFA) com pós-teste de Tukey. O valor de p em destaque representa a diferença entre as dietas, NS vs HS. NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado.

Figura 5 - Consumo de ração durante o protocolo experimental (g / dia/ número de animais na gaiola). Dados apresentados como média e desvio padrão (grupos normossódicos com desvio padrão para cima e hipossódicos com desvio padrão para baixo). Resultados comparados por ANOVA de medidas repetidas (modelo de efeitos mistos, fatores fixos: dieta, TFA e tempo, fator aleatório: unidade experimental). Cada grupo de animal/gaiola foi considerado uma unidade experimental e o consumo de ração foi avaliado semanalmente. NS-S = Normossódico Sedentário (n = 14); NS-T = Normossódico treinado (n = 13); HS-S = Hipossódico sedentário (n = 13); HS-T= Hipossódico treinado (n = 13); TFA = treinamento físico aeróbio.

O protocolo de TFA foi capaz de aumentar a capacidade de esforço máximo dos grupos treinados quando comparados tanto com o período basal (60% de aumento) quanto com os grupos sedentários (79% de aumento, **Figura 6**).

Figura 6 - Tempo para exaustão (s) pré e pós-treinamento físico aeróbio no teste de esforço máximo. Dados apresentados como média e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de medidas repetidas (modelo de efeitos mistos, fatores fixos: dieta, treinamento e tempo, fator aleatório: animal) com pós-teste de Tukey. Os valores de P em destaque representam as diferenças estatísticas entre os grupos sedentários e treinados ao longo do tempo (TFA*Tempo). Os grupos treinados apresentaram maior capacidade de esforço pós TFA quando comparados ao período basal e aos grupos sedentários. NS-S = Normossódico Sedentário ($n = 14$); NS-T = Normossódico treinado ($n = 13$); HS-S = Hipossódico sedentário ($n = 13$); HS-T= Hipossódico treinado ($n = 13$); TFA = treinamento físico aeróbio.

5.2 Parâmetros metabólicos

Massa corporal, CT, TG, glicemia, hematócrito, PAS e PAD foram semelhantes entre os grupos no início do protocolo experimental (**Tabela 6**). Após a intervenção os camundongos submetidos à dieta restrita em sódio apresentaram maior massa corporal e concentração de TG e glicose plasmáticos, quando comparados aos normossódicos (**Tabela 7**). Os animais submetidos ao TFA apresentaram maior glicemia quando comparados aos sedentários. A concentração plasmática de CT e PAS, PAD, frequência cardíaca (FC) não foram alteradas nem pela dieta, nem pelo TFA (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Caracterização dos grupos antes do protocolo de intervenção

	NS-S (n = 12 - 14)	NS-T (n = 11-13)	HS-S (n = 11-13)	HS-T (n = 13 - 10)	p =
Massa corporal (g)	24 ± 2	25 ± 1	25 ± 2	24 ± 2	0,76
CT (mg / dL)	268 ± 36	255 ± 37	288 ± 34	265 ± 40	0,15
TG (mg / dL)	168 ± 36	150 ± 24	157 ± 32	152 ± 26	0,37
Glicose (mg / dL)	93 ± 12	93 ± 8	93 ± 14	95 ± 14	0,93
Hematócrito (%)	49 ± 5	49 ± 7	49 ± 7	51 ± 5	0,87
PAS (mmHg)	109 ± 8	113 ± 6	111 ± 6	111 ± 5	0,44
PAD (mmHg)	47 ± 8	44 ± 7	46 ± 14	48 ± 9	0,85
FC (bpm)	522 ± 75	481 ± 55	484 ± 53	475 ± 82	0,39

Dados expressos como média e desvio padrão. Resultados foram comparados por ANOVA de um fator. NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado; CT = colesterol total; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; FC = frequência cardíaca; TG = triglicérides.

Tabela 7 - Caracterização dos grupos experimentais após intervenção

	NS-S (n = 12-14)	NS-T (n = 11-13)	HS-S (n = 11-13)	HS-T (n = 10-13)	p =	
					Dieta	TFA
Massa corporal (g)	26 ± 3	26 ± 2	29 ± 5	27 ± 2	< 0,01	-
CT* (mg / dL)	271 ± 103	304 ± 91	254 ± 96	292 ± 83	-	-
TG* (mg / dL)	101 ± 9	100 ± 27	152 ± 36	130 ± 51	0,03	-
Glicose (mg / dL)	100 ± 15	115 ± 20	115 ± 20	124 ± 22	0,03	0,03
Hematócrito (%)	48 ± 3	50 ± 3	50 ± 3	51 ± 5	0,06	-
PAS (mmHg)	106 ± 6	106 ± 6	105 ± 8	102 ± 5	-	-
PAD (mmHg)	46 ± 8	49 ± 14	44 ± 9	46 ± 11	-	-
FC (bpm)	519 ± 51	531 ± 46	535 ± 61	530 ± 63	-	-

Dados expressos como média e desvio padrão. Resultados foram comparados por ANOVA de dois fatores (Modelo linear generalizado; fatores fixos: dieta e TFA). NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado; TFA = treinamento físico aeróbio; CT = colesterol total; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; FC = frequência cardíaca; TG = triglicérides.* n = 3 - 5.

5.3 Perfil de lipoproteínas plasmáticas

A restrição de sódio alterou a distribuição dos lípides plasmáticos nas frações de lipoproteínas, aumentando a fração percentual de CT e TG transportadas pelas partículas de LDL (**Figura 7b**) e VLDL (**Figura 7d**), respectivamente. Concomitantemente, a dieta hipossódica reduziu a porcentagem, destes lípides na HDL (**Figura 7c e 7f**). O TFA não alterou a distribuição dos lípides nas frações de lipoproteínas.

Figura 7 - Distribuição percentual de CT e TG plasmáticos nas frações de lipoproteínas. (a) VLDLc; (b) LDLc; (c) HDLc; (d) VLDLtg; (e) LDLtg; (f) HDLtg. As frações de lipoproteínas plasmáticas foram separadas a partir de ~100 μ L de plasma por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) e seus lípidos foram mensurados por método enzimático colorimétrico. Dados apresentados como média e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de dois fatores (modelo linear generalizado, fatores fixos: dieta e TFA) com pós-teste de Tukey. Os valores de P em destaque representam as diferenças entre as dietas, NS vs HS. NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado.

5.4 Teste de tolerância à insulina

O grupo HS-S apresentou menor decaimento de glicose no teste de tolerância à insulina quando comparado ao grupo NS-S, indicando maior resistência à insulina. Este prejuízo na sensibilidade periférica à insulina foi prevenido pelo TFA nos animais do grupo HS-T (**Figura 8**).

Figura 8 - Decaimento de glicose (kITT; % min) no teste de tolerância à insulina. Os animais foram submetidos ao teste de tolerância a insulina (ITT) após 4 h de jejum alimentar. A constante de decaimento de glicose (kITT) foi calculada por meio da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicose entre 10 e 30 min após injeção intraperitoneal de insulina (1 U/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de dois fatores (modelo linear generalizado, fatores fixos: dieta e TFA) com pós-teste de Tukey. Letras distintas demonstram diferenças estatisticamente significantes entre grupos ($P < 0,05$). NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado; TFA = Treinamento físico aeróbio

75.5 Conteúdo de TG, CT e glicogênio e massa do fígado

A restrição de sódio e o TFA modularam a concentração de TG hepático, o primeiro fator aumentando, e o segundo reduzindo (**Figura 9a e 9c**). A falta de interação entre os fatores evidencia que o TFA produziu resposta similar em ambas as dietas. Para saber se o grupo HS-T reduziu a concentração de TG a valores semelhantes ao grupo controle (NS-S) foi realizado o pós-teste de Tukey mesmo com $p > 0,05$ para interação. Como indicado na **figura 9a e 9c**, não houve diferença na concentração de TG entre o grupo NS-S e o grupo HS-T demonstrando que o TFA foi um fator protetor.

O conteúdo de CT (**Figura 9b e 9d**) e de glicogênio hepático (**Figura 9e**) foram semelhantes entre os grupos. A massa do fígado foi reduzida nos grupos com restrição de sódio (**Figura 9f**).

Figura 9 - Concentração de lipídeos e glicogênio e massa do fígado. (a) TG (mg / g de tecido); (b) CT (mg / g de tecido); (c) TG (mg / g de proteína); (d) CT (mg / g de proteína); (e) Glicogênio (% de área marcada); (f) massa do fígado (g / 100g de massa corporal). Lipídeos extraídos a partir de ~100mg de fígado e mensurados por método enzimático colorimétrico segundo Carr et al. (1993). Glicogênio avaliado pela quantificação da área positiva ao ácido periódico reativo de Schiff. Dados apresentados como média e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de dois fatores (modelo linear generalizado,

fatores fixos: dieta e treinamento) com pós-teste de Tukey. Em a e c, devido ao interesse em saber se o grupo HS-T reduziu a concentração de TG a valores semelhantes ao grupo NS-S foi realizado o pós-teste de Tukey mesmo com $p > 0,05$ para interação. Em a e c: letras distintas demonstram diferenças estatisticamente significantes entre grupos ($p < 0,05$). Em G, O valor de P em destaque representam as diferenças entre as dietas, NS vs HS. NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T= Hipossódico treinado; TFA = Treinamento físico aeróbio.

A concentração de hepática de TG se correlacionou positivamente com a massa corporal (**Figura 10a**) e TG plasmático ($p = 0,06$; **Figura 10b**) e negativamente com a excreção de sódio urinário (**Figura 10c**), sensibilidade à insulina (**Figura 10d**) e capacidade de esforço máximo (**Figura 10e**). Todas as correlações apresentaram uma força de associação moderada.

Figura 10 - Correlações entre TG hepático (mg / g de proteína) e variáveis diversas. (a) TG hepático (mg/ g de proteína) e excreção de sódio urinário (mEq/24h); (b) TG hepático (mg/ g de proteína) e decaimento de glicose (kITT, % min); (c) TG hepático (mg/ g de proteína) e TG plasmático (mg/dL) (D) TG hepático (mg/ g de proteína) e massa corporal (g); (e) TG hepático (mg/ g de proteína) e tempo para exaustão no teste de esforço máximo (s). Correlações avaliadas por teste de Spearman de acordo com a normalidade dos dados. Alguns animais não possuíam avaliações de duas variáveis concomitantes

5.6 Expressão gênica no tecido hepático

A restrição de sódio dietético modulou a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lípidos. A dieta hipossódica aumentou a expressão de *Apoc3* (proteína que reduz lipólise no plasma ao bloquear LPL) e *Lrp1* ($p = 0,06$, receptor de lipoproteínas que contêm ApoE), e reduziu *Ppara* e *Prkaa1* ($p = 0,06$) e 2 (que codificam para as proteínas PPARalfa, AMPK alfa 1 e 2 proteínas-chave no metabolismo oxidativo), *Lipe* (que codifica a proteína lipase hormônio sensível), *Mttp* (que codifica para proteína MTP, responsável pela montagem das VLDL), e *Srebf2* (que codifica para proteína SREBP2, responsável pela síntese e captação de colesterol) (**Figura 11a**). O menor consumo de sódio ainda aumentou a expressão de genes relacionados à gliconeogênese: *G6pc* (que codifica para proteína glicose-6-fosfatase) e *Pck1* (que codifica para proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase), e à ação anti-inflamatória: *AGER1* (*Ddost*) (**Figura 11a**). O TFA elevou a expressão da *Lipe* no grupo alimentado com dieta normossódica em comparação a todos os outros grupos (**Figura 11a**).

Não foram influenciados nem pela dieta, nem pelo TFA a expressão dos genes: *Acaca*, *Fasn*, *Apoc2*, *Plin1*, *Ppargc1a*, *Srebf1*, *Foxa2*, *Foxo1*, *Sc12a2*, *Ager*, *Il6*, *Il10* e *Rela* (**Figura 11b**), que codificam para as proteínas, respectivamente,

ACC, ácido graxo sintase, apoC-II, perilipina, PGC1 alfa, FOXA2, FOXO1, GLUT2, RAGE, IL6, IL10 e NFkB.

a

b

Figura 11 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de genes relacionadas ao metabolismo lipídico e glicídico e inflamação. (a) Genes modulados pela dieta ou TFA; (b) Genes não influenciados pela dieta ou TFA. Expressão gênica foi avaliada em homogenatos de fígado por RT-qPCR. Actb (β -actina) foi utilizada como gene normalizador da reação. Expressão gênica calculada pela fórmula: $2^{-([CT \text{ do gene alvo} - \text{média dos CT do controle endógeno}] - \text{calibrador})}$, tendo a média do C_T do grupo normossódico sedentário como calibrador ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Dados apresentados como *fold change* e desvio padrão. Resultados comparados por ANOVA de dois fatores (modelo linear generalizado, fatores fixos: dieta e TFA) com pós-teste de Tukey. “Dieta” indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos normossódicos e hipossódicos. Quando “Dieta” denota tendência o valor exato de p é descrito abaixo. “TFA” indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos sedentários e treinados. Letras distintas demonstram diferenças estatisticamente significantes entre grupos. NS-S = Normossódico Sedentário; NS-T = Normossódico treinado; HS-S = Hipossódico sedentário; HS-T = Hipossódico treinado; TFA = Treinamento físico aeróbio. *Apoc3*, apolipoproteína c-III; *Lipe*, lipase, hormônio sensível; *Lrp1*, Proteína relacionada 1 ao receptor de densidade baixa; *Mttp*, Proteína de transferência microssomal de triglicérides; *Ppara*, receptor ativo por proliferador de peroxissomas alfa; *Prkaa1* and 2, proteína cinase, ativada por AMP, subunidade catalítica alfa 1 e 2; *Srebf1* e 2, fator de transcrição do elemento regulador de esterol 1 e 2; *G6pc*, glicose-6-fosfatase, catalítica; *Pck1*, fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1, citosólica; *Ddost*, Dolcil difosfo-oligossacarídeo, subunidade não catalítica de proteína glicosiltransferase; *Acaca*, acetil-Coenzima A carboxilase alfa; *Apoc2*, Apolipoproteína c-II; *Fasn*, ácido graxo sintase; *Plin1*, perilipina 1; *Ppargc1a*, receptor ativo por proliferador de peroxissomas, gama, coativador 1 alfa; *Foxa2*, forkhead box A2; *Foxo1*, a forkhead box O1; *Slc2a2*, Carreador de soluto, membro 2, família 2; *Ager*, receptor específico de produtos de glicosilação avançada; *Il6*, Interleucina-6; *Il10*, Interleucina-10; *Rela*, v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A.

5.7 Atividade da citrato sintase

Dado o papel do TFA sobre metabolismo oxidativo e a modulação da expressão de fatores de transcrição de enzimas oxidativas pela dieta hipossódica, decidimos avaliar a atividade da enzima citrato sintase, um marcador de conteúdo mitocondrial. O metabolismo oxidativo hepático, avaliado pela atividade da enzima citrato sintase, foi elevado no grupo HS-T em comparação aos demais (**Figura 12a**). Em consonância com dados prévios da literatura, a atividade dessa enzima se correlacionou positivamente com a capacidade física dos animais (**Figura 12b**).

a

b

Figura 12 - Atividade da enzima citrato sintase hepática e sua correlação e com tempo para exaustão no teste de esforço máximo. (A) Atividade da citrato sintase (nmol/min/mg); (B) Correlação entre atividade da citrato sintase e tempo para exaustão (s). A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em homogenatos de fígado total (32 μ g), por meio da taxa de formação de TNB (412 nm) em 2 minutos de reação, utilizando *kit* comercial da empresa Sigma-Aldrich (#CS0720, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A atividade da citrato sintase foi calculada por meio da fórmula: $\mu\text{mol/mL/min} = (\Delta A_{412})/\text{min} \times \text{volume da reação (mL)} / \text{coeficiente de extinção do TNB } (\epsilon^{\text{mM}}) \times \text{comprimento de onda para avaliação em placa de 96 poços [L(cm)]} \times \text{quantidade de amostra (mg de proteína)}$. Correlações avaliadas por teste de Spearman.

6. DISCUSSÃO

A restrição dietética de sódio (< 2 g/dia) é recomendada como estratégia de saúde pública para o enfrentamento da morbimortalidade CV. Contudo, o aumento da atividade do SRAA, concentração dos lípides plasmáticos e redução da sensibilidade periférica à insulina são apontados como efeitos adversos ao seu uso em humanos e modelos animais. Neste contexto, é sugerido por alguns autores, que essas modificações poderiam até aumentar a mortalidade, quando comparado ao consumo usual (Ekinci et al., 2011; Kieneker et al., 2018; O'Donnell et al., 2019; Saulnier et al., 2017).

Pouco se sabe sobre os efeitos da restrição de sódio sobre o tecido hepático. Assim, analisou-se, em camundongos LDLr-KO, o efeito de 90 dias de restrição de sódio dietético sobre a resistência periférica à insulina, concentração de lípides plasmáticos e hepáticos (CT, TG) e a expressão de genes envolvidos na sinalização insulínica e metabolismo de lípides no fígado. Dado o papel protetor do exercício físico regular sobre metabolismo glicolipídico, avaliou-se a capacidade de o TFA de se contrapor aos potenciais efeitos adversos induzidos pela dieta hipossódica nesse órgão.

Os resultados evidenciaram que a restrição de sódio dietético induziu ao aumento da massa corporal, trigliceridemia e glicemia e reduziu a sensibilidade periférica à insulina. No tecido hepático, o menor consumo de sódio modulou a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolipídico, direcionando ao aumento da concentração hepática de TG. O TFA protegeu os animais submetidos à dieta hipossódica contra o acúmulo hepático TG, efeito explicado pela manutenção da sensibilidade periférica à insulina e maior atividade da citrato sintase.

A eficiência das intervenções pôde ser observada pela redução da excreção de sódio urinário de 24 h nos camundongos que receberam a dieta hipossódica, e pela maior capacidade de exercício dos grupos treinados quando comparado tanto ao período inicial (60%), quanto aos grupos sedentários no final da intervenção (79%). A velocidade máxima de corrida no teste de esforço máximo é um parâmetro

de fácil avaliação, apresenta boa correlação com Vo_2 máximo e é frequentemente utilizada para controle da intensidade de treinamento em ratos e camundongos (Høydal et al., 2007). Embora não se tenha bem estabelecido na literatura pontos de corte para classificação de diferentes intensidades em camundongos, Ferreira et al. (2007) reportou que a máxima fase estável de lactato (ponto de transição entre exercício moderado e intenso) foi detectada a 15m/min em teste de carga constata de 28 minutos. Essa velocidade correspondeu a 60% máxima velocidade de corrida no teste de esforço máximo.

O protocolo de TFA utilizado na presente investigação manteve a velocidade de corrida constante ao longo das semanas em 15 m/min (a partir da segunda semana). Essa velocidade correspondeu a 56% da velocidade de pico no teste de esforço progressivo máximo na primeira semana, e 39% no final da intervenção, sugerindo um treinamento físico de intensidade de moderada a baixa. Esse modelo de exercício físico aeróbio é amplamente utilizado na literatura (Ferreira et al., 2017; Kadoglou et al., 2013). Em estudos anteriores do nosso laboratório, tal protocolo reduziu o acúmulo de lípidos na parede arterial e melhorou o transporte reverso de colesterol (Ferreira et al., 2017; Rocco et al., 2011).

A maior massa corporal observada nos animais alimentados com dieta hipossódica pode ser um fator determinante da piora da sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, de todas as respostas observadas no fígado atribuídas ao menor consumo de sódio. De fato, a massa corporal foi uma das principais variáveis a se correlacionar com o aumento da concentração de TG hepático. Por outro lado, a interpretação da análise estatística referente à concentração de TG hepático não foi alterada quando a massa corporal foi inserida no modelo como covariável, sugerindo atuação de outros fatores. Corroborando esse resultado, Prada et al. (2000) observaram que ratos alimentados com dieta pobre em sódio apresentam menor sensibilidade periférica à insulina, comparado aqueles com alto consumo, mesmo quando o peso dos animais foi controlado por ajuste na oferta de ração.

Na vigência de restrição crônica de sódio, o ganho de massa corporal e de tecido adiposo se deve a redução no gasto energético, em detrimento de alterações no consumo alimentar ou atividade locomotora (Coelho et al., 2006; Xavier et al., 2003). Coelho et al. 2006 e Xavier et al. (2003) reportaram um menor efeito termogênico do tecido adiposo marrom em camundongos submetidos à dieta pobre

em sódio, o que explicaria, pelo menos em parte, a redução do gasto energético. Ainda, é possível que o efeito adipogênico da ANG II estimule o desenvolvimento do tecido adiposo nos animais alimentados com dieta hipossódica.

Diversos parâmetros metabólicos, como a trigliceridemia, glicemia, LDLc, HDLc e VLDL-TG e sensibilidade periférica à insulina foram influenciados negativamente pela restrição crônica de sódio, fortalecendo dados anteriormente publicados (Catanozi et al., 2003; Fusco et al., 2017; Okamoto et al., 2004; Prada et al., 2005; De Prada et al., 2000). De modo semelhante à massa corporal, o TG plasmático e a sensibilidade à insulina se associaram a concentração de TG hepático, demonstrando que essas mudanças foram importantes e influenciaram a resposta hepática a restrição de sódio alimentar.

Apesar de a colesterolemia não ter sido alterada pela dieta hipossódica, observamos maior fração de CT nas partículas de LDL e redução nas HDL. Estas modificações são reconhecidamente aterogênicas e estão em linha com o aumento do infiltrado lipídico no arco aórtico de camundongos submetidos à dieta hipossódica (Fusco et al., 2017).

Em estudo anterior, Catanozi et al. (2001) observaram aumento 71% na trigliceridemia e 10% na colesterolemia de ratos alimentados com dieta hipossódica. A elevação da concentração dos lípides plasmáticos não está restrito aos roedores, metanálise realizada por Graudal et al. (2020) encontrou resultado semelhante em humanos, porém mais discreto, 7 mg/dL e 5 mg/dL de aumento nas concentrações de, respectivamente, TG e CT plasmático. Esta resposta é atribuída a menor taxa de catabolismo de VLDL do plasma, e não a maior produção de TG hepático (Catanozi et al., 2001).

A LPL é a enzima limitante para a hidrólise dos TG presentes nas lipoproteínas da circulação sanguínea. Sua atividade apresenta forte relação positiva com a sensibilidade à insulina. Esse mecanismo explica a diminuição da atividade da LPL e a maior trigliceridemia secundária a restrição de sódio alimentar (Catanozi et al., 2001).

A apoC-III é, principalmente, produzida no fígado e intestino. Ela reduz a atividade da LPL ao deslocar a apoC-II, cofator desta enzima, da superfície da lipoproteína por competição aos sítios de ligação. Em nosso estudo, a expressão

da *Apoc3* foi regulada positivamente no fígado pela dieta hipossódica, o que pode representar um mecanismo adicional para menor atividade da LPL.

Na dieta hipossódica, a maior expressão de *Pck1* e *G6pc*, enzimas determinantes da gliconeogênese, sugere quadro de resistência insulínica local e poderiam explicar a maior glicemia dos animais desse grupo. A PEPCK (proteína codificada pelo gene *Pck1*) é a enzima limitante da via gliconeogênica, responsável pela conversão de oxaloacetato em malato. A *G6pc* também está na via gliconeogênica, sendo responsável pela hidrólise de D-glucose 6-fosfatase em D-glucose e ortofosfato. Ambas as enzimas são estimuladas pelo fator de transcrição FOXO1, que é fosforilado e inativado pela insulina. Na vigência de resistência à insulina, esse hormônio perde a capacidade de fosforilar/inibir a FOXO1, conduzindo a maior expressão de seus genes alvo, como a *Pck1* e *G6pc*.

Outros estudos corroboram nossa hipótese de maior resistência à insulina hepática. Okamoto et al. (2004) observou redução do conteúdo hepático da subunidade beta do receptor de insulina e de IRS1 fosforilado em tirosina em ratos alimentados com dieta hipossódica por 3 meses, em comparação aqueles em dieta normo e hipersódica. Ainda nesse estudo, a fosforilação em tirosina do IRS1 após estímulo com insulina estava deprimida no grupo hipossódico. De modo semelhante, Prada et al. (2005) demonstrou que a cascata da sinalização insulínica estava prejudicada em ratos com restrição de sódio alimentar. Os autores observaram menor eficiência da insulina em estimular a via hepática do receptor de insulina/IR/PI3-K/AKT, com consequente prejuízo da fosforilação/inibição da FOXO1. A maior resistência à insulina foi explicada com base na observação de aumento na ativação da proteína c-Jun N-terminal kinases (JNK) e fosforilação do IRS-1^{ser307} (Prada et al., 2005). Interessantemente, esses eventos parecem ser tecido dependente, uma vez que no tecido adiposo a restrição de sódio melhorou a resposta à insulina (Prada et al., 2005).

A concentração de glicogênio hepático, outro marcador de sensibilidade à insulina, não foi alterada pela dieta ou pelo TFA. Em indivíduos resistentes à insulina, o bloqueio da glicogenólise (via inibição da enzima glicogênio fosforilase) e estímulo da glicogeniogênese (via bloqueio da enzima glicogênio sintase cinase e ativação da enzima glicogênio sintase) por esse hormônio estão prejudicados, frequentemente, resultando em menor conteúdo hepático de glicogênio. Contudo,

nos hepatócitos a concentração de glicogênio é menos dependente da insulina, quando comparada ao músculo esquelético, dada a entrada de glicose independente desse hormônio. Nesse órgão, hiperglicemia, por si, pode ser suficiente para inativar, por via alostérica, enzimas que catalisam a quebra do glicogênio (Petersen e Shulman, 2018). É possível que o grau de resistência hepática à insulina provocada pela restrição de sódio em nosso protocolo, seja insuficiente para estimular alterações na concentração de glicogênio.

Em quadros de resistência insulínica hepática está bem caracterizado que o acúmulo lipídico segue em paralelo. Isso é bem observado na DHGNA, no qual a resistência à insulina, classicamente, representa um dos pilares da patogênese. Ao estimular a lipólise do tecido adiposo e atividade de SREBP-1c hepática, a resistência à insulina aumenta a entrega de AG e produção de produção de TG no fígado. Maior síntese hepática de ácidos graxos foi previamente descrita em modelo experimental de restrição de sódio (Xavier et al., 2003). Contudo, na presente investigação, a expressão dos genes lipogênicos *Srebp1* (gene que codifica para as isoformas SREBP1a e SREBP1c) e *Acaca* (gene que codifica para ACC) não foram modificados pela dieta hipossódica, sugerindo que mecanismos pós-transcricionais podem estar modulando a síntese lipídica.

Outros mecanismos relacionados ao metabolismo hepático de lípidos foram alterados nos camundongos alimentados com a dieta hipossódica. A expressão gênica nos sugere elevação da captação de lipoproteínas ricas em TG contendo apoE (*Lrp1*), redução da montagem de VLDL (*Mttp*), lipólise (*Lipe*) e do metabolismo oxidativo (*Prkaa1 e 2* e *Ppara*). Esses mecanismos, de modo complementar, poderiam explicar o aumento da concentração hepática de lípidos.

Em um contexto de resistência à insulina é esperada redução da captação de lipoproteínas ricas em TG e aumento da montagem e secreção de VLDL, o que contribui para hipertrigliceridemia. Contudo, com dieta hipossódica o oposto foi observado (aumento na expressão do gene *Lrp1*, e redução de *Mttp*). Em nosso contexto de prejuízos em processos oxidativos a maior captação e menor montagem/secreção de VLDL podem favorecer o aprisionamento de lípidos no tecido hepático, por aumentar a captação e diminuir a secreção. Sugerimos que essa resposta seja dependente não da resistência à insulina, mas sim da elevação da atividade do sistema-renina-angiotensina. Estudos anteriores observaram

aumento na expressão de LRP1 na aorta de camundongos, células de músculo liso vascular e monócitos tratados com ANG II, de modo dose e tempo dependente (Gamboa et al., 2021; Sendra et al., 2008).

As duas principais enzimas responsáveis pelo catabolismo de TG são a lipase do tecido adiposo (ATGL) e a lipase hormônio sensível (LHS). Conjuntamente, elas são responsáveis por mais de 90% e 40% da hidrólise de TG no tecido adiposo e hepático de camundongos, respectivamente. Nesse último, a LHS isoladamente, contribui com 10% (Reid et al., 2008; Schweiger et al., 2006). No tecido adiposo, principal local de produção LHS, sua maior atividade eleva a disponibilidade de AG para a circulação. Contudo, pouca informação está disponível sobre a importância da lipase para hidrólise de TG no fígado. A atividade da LHS é finamente controlada por ação hormonal, sendo a insulina um potente inibidor, e as catecolaminas estimuladoras. O eixo ANG II/AT1-R possui funções antilipolíticas no tecido adiposo e músculo esquelético, pelo menos em parte, devido regulação negativa da LHS (Oh et al., 2012; Yvan-Charvet e Quignard-Boulangé, 2011). No fígado, o bloqueador da ECA, captopril, aumentou a expressão de HSL (Premaratna et al., 2012).

A deficiência de LHS geral tem sido associada ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos e esteatose hepática em humanos e camundongos (Albert et al., 2014; Xia et al., 2017). A superexpressão da LHS hepática reduziu a concentração de TG hepático em mais de 50%, em camundongos (Reid et al., 2008). Em pacientes com esteatose hepática há redução de 80% na expressão da LHS hepática (Kohjima et al., 2007). Assim, é possível que a redução da expressão da LHS observada com a restrição de sódio dietético interfira na concentração hepática de lípidos. Por outro lado, em relação ao acúmulo lipídico hepático, outros autores sugerem pouca influência da LHS local, com papel predominante da LHS do tecido adiposo e ATGL hepática.

Modificações em proteínas relacionadas ao metabolismo de AG, como AMPK e receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), são reconhecidamente associadas à resistência insulínica e à modulação da concentração de TG hepático. Esses fatores de transcrição são responsáveis pela expressão de genes envolvidos na β -oxidação e biogênese mitocondrial, captação e estoque de lípidos.

A expressão de PPAR alfa se correlaciona negativamente com o grau de esteato-hepatite não alcoólica (Francque et al., 2015). Camundongos com deleção genética de *Ppara*, alimentados com dieta rica em gordura apresentam maior acúmulo intra-hepático de TG e maior escore de esteato-hepatite comparados àqueles que expressavam essa proteína (Abdelmegeed et al., 2011; Patsouris et al., 2006). Mais interessante é que nos camundongos *knockout* para PPAR alfa no fígado, não é necessária sobrecarga de gordura alimentar, sendo que 24 h de jejum foi estímulo suficiente para o aumento de TG neste órgão. Esse resultado demonstra a importância dessa proteína na utilização dos AG advindos do tecido adiposo (Montagner et al., 2016). Ainda, sua ativação farmacológica previne a esteatose (Liss e Finck, 2017). Em murinos, moduladores seletivos de PPAR alfa reduzem a esteatose hepática induzida por dieta por melhorar a metabolização lipídica (Honda et al., 2017). De modo muito semelhante, a ativação farmacológica ou por engenharia genética da AMPK (mesmo que especificamente no fígado) é associada à redução da concentração de gordura hepática e melhora da sensibilidade à insulina (Boudaba et al., 2018).

Nossos achados concordam com trabalhos anteriores, demonstrando redução da expressão e/ou atividade da AMPK no rim e músculo esquelético de modelos animais submetidos à dieta pobre em sal ou ao tratamento com ANG II (Liu et al., 2019; Udwan et al., 2017). Além disso, a deleção do AT1-R, atenuou a esteatose estimulada por dieta deficiente em metionina-colina com concomitante elevação da expressão de PPAR alfa (Nabeshima et al., 2009).

Na esteatose hepática, modificações no estilo de vida representam a primeira linha de intervenção e são eficientes para mais de 90% dos pacientes (Vilar-Gomez et al., 2015). Diversos estudos demonstram o efeito protetor do TFA sobre o acúmulo de gordura hepática, independentemente da perda massa corporal (Hashida et al., 2017; Johnson et al., 2009), sendo seus efeitos mediados pelo aumento da sensibilidade à insulina, oxidação de ácidos graxos, biogênese mitocondrial e redução da síntese de lípidos no fígado e tecidos periféricos. Mesmo exercícios aeróbios de baixa intensidade e volume são eficientes para redução da concentração de gordura hepática (Bagheri et al., 2020; Keating et al., 2015). De fato, observamos um efeito protetor do TFA sobre a queda da sensibilidade periférica à insulina secundária a restrição de sódio alimentar. Além disso, o TFA

impediu a elevação da concentração de TG hepático, efeito que foi associado a maior atividade da enzima citrato sintase, um marcador de conteúdo mitocondrial e metabolismo oxidativo, no grupo HS-T.

Interessantemente, nenhum marcador de resistência hepática à insulina foi alterado pelo TFA, como: concentração de glicogênio hepático e expressão de enzimas gliconeogênicas e lipogênicas. É possível que a baixa intensidade de treinamento tenha limitado sua influência sobre esses parâmetros.

O metabolismo lipídico muscular também está alterado durante a restrição crônica de sódio, neste mesmo modelo animal, o que se vincula à maior suscetibilidade à aterosclerose (Bochi et al., 2021; Fusco). Recentemente, Pinto et al. (2021) observaram alteração na lipidômica do gastrocnêmio, frente à dieta HS, com aumento de AGs, fosfadilcolina e fosfatidiletanolamina, e redução de cardiolipinas. Estas alterações são, reconhecidamente, associadas à resistência à insulina e prejuízo da função mitocondrial na musculatura esquelética. No tronco braquiocefálico destes animais, Bochi et al. (dados não publicados)³ evidenciaram maior infiltrado de lipídes, marcadores de peroxidação lipídica (4-hidroxinonenal) e glicação (carboximetil-lisina e RAGE), e conteúdo de AT1-R, frente à restrição de sódio dietético. Interessantemente, todas estas modificações na parede arterial foram prevenidas pelo TFA. Em conjunto, nossos dados sugerem que apesar dos benefícios CV da restrição de sódio dietético, sua utilização em longo prazo favorece prejuízos metabólicos que contribuem para o acúmulo hepático de TG. A associação do TFA à dieta com baixo teor de sódio pode beneficiar o uso da restrição de alimentar de sódio sobre saúde CV.

Uma vez que, em humanos, o consumo de sódio é associado a hábitos alimentares e consumo de outros componentes nutricionais, estudos de intervenção são necessários para validar os resultados obtidos na presente investigação.

³ Bochi APG, Ferreira GS, Pinto PR, et al. Aerobic exercise training reduces insulin resistance and atherogenesis induced by low-sodium diet in LDL receptor Knockout mice. (Apresentado ao 89th European atherosclerosis Society Congress – Virtual Congress; 30 maio – 2 jun 2021)

6.1 Limitações do estudo

O presente estudo apresentou algumas limitações. A escolha do modelo experimental é uma decisão difícil, uma vez que cada modelo possui suas particularidades. A utilização dos camundongos LDLr-KO introduz variáveis para interpretação dos resultados: dislipidemia e a própria ausência do receptor. Por outro lado, sua utilização nos permitiu verificar alterações na concentração de lípidos, estimulados pela restrição de sódio, independentemente do uso de dieta rica em gordura ou outras intervenções na dieta. Ainda, nossos resultados concordam com estudos anteriores em ratos Wistar (Xavier et al., 2003) e camundongos selvagens (Cabrera et al., 2021) que observaram maior lipogênese e concentração de diacilglicerol, respectivamente, induzido pela dieta hipossódica.

Não existem modelos animais ideais que mimetizem de modo completo o metabolismo glicolipídico humano, bem como a fisiopatologia da dislipidemia, resistência à insulina e síndrome metabólica. Vários modelos animais estão estabelecidos na literatura para o estudo das doenças cardiometabólicas, cada um com suas vantagens e desvantagens. Camundongos selvagem, diferentemente dos humanos, não apresentam expressão da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), o que eleva sua fração de colesterol transportado pela partícula de HDL e os protege da aterosclerose. Nesses animais, é frequente a utilização de dieta rica em gordura, frutose ou deficiente em colina e metionina (entre outros) para induzir síndrome metabólica e hepatotoxicidade, o que poderia dificultar a interpretação dos resultados. Camundongos LDLr-KO representam modelo experimental que mimetiza a fisiopatologia da dislipidemia humana. Devido à ausência do LDLr, esses animais apresentam prejuízo na depuração de LDLc, produzindo moderada elevação na colesterolemia. Em associação à dieta rica em gordura, desenvolvem aterosclerose e esteatose hepática, embora, nesse primeiro, a dieta hipossódica sozinha estimulou a elevação de CT e TG plasmáticos e o acúmulo de gordura arterial (Fusco et al., 2017). Além disso, a utilização dos camundongos LDLr-KO permitiu a avaliação das mesmas unidades experimentais, em diferentes projetos, o efeito da restrição de sódio e do TFA sobre o desenvolvimento da aterosclerose no tronco braquiocéfálico, resistência insulínica no tecido muscular e adiposo e concentração de gordura no tecido hepático.

É importante salientar que embora os resultados se refiram à expressão gênica, que podem não representar as concentrações, eles estão de acordo com as modificações metabólicas observadas e prejuízos na fosforilação da cascata insulínica hepática, relatadas por outros grupos. No entanto, apesar de adicionar informação, o conteúdo das proteínas pode não refletir adequadamente sua atividade, a qual é modulada pela insulina e hormônios contrarreguladores.

7. CONCLUSÃO

Em camundongos LDLr-KO, a restrição intensa de sódio alimentar aumentou a massa corporal, trigliceridemia, glicemia e resistência periférica à insulina. No fígado, a dieta hipossódica favoreceu o acúmulo de TG, o que foi associado à modulação da expressão de genes relacionados à gliconeogênese, captação e montagem de VLDL, lipólise e metabolismo oxidativo. O TFA evitou a elevação de TG hepático por preservar a sensibilidade periférica à insulina e estimular o metabolismo oxidativo.

8. ANEXO

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO E PREVENÇÃO DA DISLIPIDEMIA INDUZIDA PELA RESTRIÇÃO DIETÉTICA DE SÓDIO EM CAMUNDONGOS: MODULAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E RESISTÊNCIA INSULÍNICA NO TECIDO HEPÁTICO**” registrada com o nº 1210/2019, sob a responsabilidade de Marisa Passarelli e Guilherme da Silva Ferreira, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 18.04.2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-05-2019 Término: 19-09-2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Knockout - C57BL6/J LDLR KO
Nº de animais	80
Peso/Idade	12 semanas
Sexo	machos
Origem	Centro de Manutenção e Experimentação de Animais da Clínica Médica

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 18 de Abril de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

Anexo. Documento de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais

9. REFERÊNCIAS⁴

Abdelmegeed MA, Yoo S-H, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song B-J. PPAR α Expression Protects Male Mice from High Fat–Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *J Nutr* 2011;141:603–10. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135210>.

Albert JS, Yerges-Armstrong LM, Horenstein RB, Pollin TI, Sreenivasan UT, Chai S, et al. Null mutation in hormone-sensitive lipase gene and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2014;370:2307–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315496>.

Asbert M, Jiménez W, Gaya J, Ginés P, Arroyo V, Rivera F, et al. Assessment of the renin-angiotensin system in cirrhotic patients. *J Hepatol* 1992;15:179–83. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(92\)90033-L](https://doi.org/10.1016/0168-8278(92)90033-L).

Bagheri M, Azamian-Jazi A, Banitalebi E, Kazeminasab F, Hossein Nasr-Esfahani M. Both high-intensity interval training and low-intensity endurance training decrease intrahepatic lipid deposits via alterations of the expression of HIF-1 α , HIG2 in a murine model of NAFLD. *Sci Sports* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2020.01.006>.

Balkau B, Mhamdi L, Oppert J-M, Nolan J, Golay A, Porcellati F, et al. Physical Activity and Insulin Sensitivity: The RISC Study. *Diabetes* 2008;57:2613–8. <https://doi.org/10.2337/db07-1605>.

Bataller R, Gäbele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, et al. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2005;41:1046–55. <https://doi.org/10.1002/hep.20665>.

Bataller R, Sancho-bru P, Ginès P, Lora JM, Al-garawi A, Solé M, et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003;125:117–25. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00695-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00695-4).

van den Berg EH, Gruppen EG, Blokzijl H, Bakker SJL, Dullaart RPF. Higher

⁴ Referências produzidas com auxílio do software Mendeley. Estão de acordo com as normas de Vancouver (Elsevier – Vancouver [Autor-data])

Sodium Intake Assessed by 24 Hour Urinary Sodium Excretion Is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The PREVEND Cohort Study. *J Clin Med* 2019;8:2157. <https://doi.org/10.3390/jcm8122157>.

de Boer RA, Schrotten NF, Bakker SJL, Mahmud H, Szymanski MK, van der Harst P, et al. Plasma renin and outcome in the community: data from PREVEND. *Eur Heart J* 2012a;33:2351–9. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs198>.

de Boer RA, Schrotten NF, Bakker SJL, Mahmud H, Szymanski MK, van der Harst P, et al. Plasma renin and outcome in the community: data from PREVEND. *Eur Heart J* 2012b;33:2351–9. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs198>.

Boudaba N, Marion A, Huet C, Pierre R, Viollet B, Foretz M. AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development. *EBioMedicine* 2018;28:194–209. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.008>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. Brasília: 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados b. 2019.

Brasil. Resolução Normativa Nº 12 de 20 de setembro de 2013. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins de Científicos e Didáticos - DBCA. Brasil: 2013.

Cabrera D, Rao I, Raasch F, Solis N, Pizarro M, Freire M, et al. Mineralocorticoid receptor modulation by dietary sodium influences NAFLD development in mice. *Ann Hepatol* 2021;24:100357. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100357>.

Cappuccio FP, Beer M, Strazzullo P. Population dietary salt reduction and the risk of cardiovascular disease. A scientific statement from the European Salt Action Network. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2019;29:107–14. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.11.010>.

Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem* 1993;26:39–42. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(93\)90015-X](https://doi.org/10.1016/0009-9120(93)90015-X).

Carvalho JJM, Baruzzi RG, Howard PF, Poulter N, Alpers MP, Franco LJ, et al. Blood pressure in four remote populations in the INTERSALT study. *Hypertension* 1989;14:238–46. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.14.3.238>.

Catanozi S, Rocha JC, Nakandakare ER, Passarelli M, Mesquita CH, Silva AA, et al. The rise of the plasma lipid concentration elicited by dietary sodium chloride restriction in Wistar rats is due to an impairment of the plasma triacylglycerol removal rate. *Atherosclerosis* 2001;158:81–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00415-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00415-4).

Catanozi S, Rocha JC, Passarelli M, Guzzo ML, Alves C, Furukawa LNS, et al. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. *J Lipid Res* 2003;44:727–32. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200330-JLR200>.

Choi Y, Lee JE, Chang Y, Kim MK, Sung E, Shin H, et al. Dietary sodium and potassium intake in relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Br J Nutr* 2016;116:1447–56. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003391>.

Cobb LK, Anderson CAM, Elliott P, Hu FB, Liu K, Neaton JD, et al. Methodological issues in cohort studies that relate sodium intake to cardiovascular disease outcomes: A science advisory from the american heart association. *Circulation* 2014;129:1173–86. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000015>.

Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, et al. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: Effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:148–55. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.09.001>.

Conn VS, Koopman RJ, Ruppar TM, Phillips LJ, Mehr DR, Hafdahl AR. Insulin Sensitivity Following Exercise Interventions. *J Prim Care Community Health* 2014;5:211–22. <https://doi.org/10.1177/2150131913520328>.

Cook NR, Appel LJ, Whelton PK. Sodium Intake and All-Cause Mortality Over 20 Years in the Trials of Hypertension Prevention. *J Am Coll Cardiol* 2016;68:1609–

17. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.07.745>.

Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512>.

DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH. The History of the Salt Wars. *Am J Med* 2017;130:1011–4. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.04.040>.

Doukky R, Avery E, Mangla A, Collado FM, Ibrahim Z, Poulin M-F, et al. Impact of Dietary Sodium Restriction on Heart Failure Outcomes. *JACC Hear Fail* 2016;4:24–35. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2015.08.007>.

Ekinci EI, Clarke S, Thomas MC, Moran JL, Cheong K, Macisaac RJ, et al. Dietary salt intake and mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:703–9. <https://doi.org/10.2337/dc10-1723>.

Emamat H, Farhadnejad H, Movahedian M, Tangestani H, Mirmiran P, Hekmatdoost A. Dietary sodium intake in relation to non-alcoholic fatty liver disease risk: a case-control study. *Nutr Food Sci* 2021;51:541–50. <https://doi.org/10.1108/NFS-05-2020-0183>.

Ferreira GS, Pinto PR, Iborra RT, Del Bianco V, Santana MFM, Nakandakare ER, et al. Aerobic exercise training selectively changes oxysterol levels and metabolism reducing cholesterol accumulation in the aorta of dyslipidemic mice. *Front Physiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00644>.

Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:760–5. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>.

Filippini T, Malavolti M, Whelton PK, Naska A, Orsini N, Vinceti M. Blood Pressure Effects of Sodium Reduction. *Circulation* 2021;143:1542–67. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050371>.

Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Renin Angiotensin System. 2020.

Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;63:164–73.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.019>.

Frantz EDC, Medeiros RF, Giori IG, Lima JBS, Bento-Bernardes T, Gaique TG, et al. Exercise training modulates the hepatic renin–angiotensin system in fructose-fed rats. *Exp Physiol* 2017;102:1208–20. <https://doi.org/10.1113/EP085924>.

Fusco FB, Gomes DJ, Bispo KCS, Toledo VP, Barbeiro DF, Capelozzi VL, et al. Low-sodium diet induces atherogenesis regardless of lowering blood pressure in hypertensive hyperlipidemic mice. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177086>.

Gamboa R, Jaramillo-Estrella MJ, Martínez-Alvarado M del R, Soto ME, Torres-Paz YE, Gonzalo-Calvo D de, et al. Expressão de Proteína-1 Relacionada a Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (LRP1) em Monócito em Correlação com EIMC em Pacientes Mexicanos Hipertensos. *Arq Bras Cardiol* 2021;116:56–65. <https://doi.org/10.36660/abc.20190535>.

Garg R, Williams GH, Hurwitz S, Brown NJ, Hopkins PN, Adler GK. Low-salt diet increases insulin resistance in healthy subjects. *Metabolism* 2011;60:965–8. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.09.005>.

GBD 2017 Causes of Death Collaborators. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1736–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7).

GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2019;393:1958–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30041-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30041-8).

Graudal N, Jürgens G, Baslund B, Alderman MH. Compared With Usual Sodium Intake, Low- and Excessive-Sodium Diets Are Associated With Increased Mortality: A Meta-Analysis. *Am J Hypertens* 2014;27:1129–37. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu028>.

Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jurgens G. Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride. *Cochrane Database Syst Rev* 2020.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD004022.pub5>.

Graus-Nunes F, Souza-Mello V. The renin-angiotensin system as a target to solve the riddle of endocrine pancreas homeostasis. *Biomed Pharmacother* 2019;109:639–45. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.191>.

Grunert RR, Meyer JH, Phillips PH. The Sodium and Potassium Requirements of the Rat for Growth. *J Nutr* 1950;42:609–18. <https://doi.org/10.1093/jn/42.4.609>.

Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatol* 2017;66:142–52. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.023>.

Hattori T, Murase T, Takatsu M, Nagasawa K, Matsuura N, Watanabe S, et al. Dietary Salt Restriction Improves Cardiac and Adipose Tissue Pathology Independently of Obesity in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc* 2014;3. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001312>.

He FJ, Campbell NRC, Ma Y, MacGregor GA, Cogswell ME, Cook NR. Errors in estimating usual sodium intake by the Kawasaki formula alter its relationship with mortality: implications for public health†. *Int J Epidemiol* 2018;47:1784–95. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy114>.

He FJ, Li J, MacGregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev* 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004937.pub2>.

He J, Mills KT, Appel LJ, Yang W, Chen J, Lee BT, et al. Urinary Sodium and Potassium Excretion and CKD Progression. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:1202–12. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010022>.

Honda Y, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Fujita K, et al. Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/srep42477>.

Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:753–60. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3281eacef1>.

Huang L, Trieu K, Yoshimura S, Neal B, Woodward M, Campbell NRC, et al. Effect of dose and duration of reduction in dietary sodium on blood pressure levels: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 2020;m315. <https://doi.org/10.1136/bmj.m315>.

Iborra RT, Ribeiro ICD, Neves MQTS, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, et al. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:742–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2007.00748.x>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. 2015.

Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 1988;297:319–28. <https://doi.org/10.1136/bmj.297.6644.319>.

Jayedi A, Ghomashi F, Zargar MS, Shab-Bidar S. Dietary sodium, sodium-to-potassium ratio, and risk of stroke: A systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis. *Clin Nutr* 2019;38:1092–100. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.05.017>.

Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, et al. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 2009;50:1105–12. <https://doi.org/10.1002/hep.23129>.

Joseph JJ, Echouffo-Tcheugui JB, Kalyani RR, Yeh HC, Bertoni AG, Effoe VS, et al. Aldosterone, Renin, Cardiovascular Events, and All-Cause Mortality Among African Americans: The Jackson Heart Study. *JACC Hear Fail* 2017;5:642–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.05.012>.

Kadoglou NPE, Moustardas P, Kapelouzou A, Katsimpoulas M, Giagini A, Dede E, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. *Eur J Histochem* 2013;57:3. <https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e3>.

Kalogeropoulos AP, Georgiopolou V V., Murphy RA, Newman AB, Bauer DC, Harris TB, et al. Dietary Sodium Content, Mortality, and Risk for Cardiovascular Events in Older Adults. *JAMA Intern Med* 2015;175:410. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.6278>.

Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol* 2015;63:174–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.022>.

Kieneker LM, Eisenga MF, Gansevoort RT, de Boer RA, Navis G, Dullaart RPF, et al. Association of Low Urinary Sodium Excretion With Increased Risk of Stroke. *Mayo Clin Proc* 2018;93:1803–9. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.05.028>.

Kim D, Vazquez-Montesino LM, Li AA, Cholaneril G, Ahmed A. Inadequate Physical Activity and Sedentary Behavior Are Independent Predictors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2020. <https://doi.org/10.1002/hep.31158>.

Kim G, Kim J, Lim YL, Kim MY, Baik SK. Renin–angiotensin system inhibitors and fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Hepatol Int* 2016;10:819–28. <https://doi.org/10.1007/s12072-016-9705-x>.

Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20:351–8.

Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, Iwamura T, Kumagai H, Watanabe T, et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat Commun* 2016;7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12977>.

Laffer CL, Eljovich F, Sahinoz M, Pitzer A, Kirabo A. New Insights Into the Renin-Angiotensin System in Chronic Kidney Disease. *Circ Res* 2020;127:607–9. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317624>.

Lamelas P, Diaz R, Orlandini A, Avezum A, Oliveira G, Mattos A, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in rural and urban communities in Latin American countries. *J Hypertens* 2019;37:1813–21. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002108>.

Lamelas PM, Mente A, Diaz R, Orlandini A, Avezum A, Oliveira G, et al. Association of Urinary Sodium Excretion With Blood Pressure and Cardiovascular Clinical Events in 17,033 Latin Americans. *Am J Hypertens* 2016;29:796–805. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpv195>.

Lanaspa MA, Kuwabara M, Andres-Hernando A, Li N, Cicerchi C, Jensen T, et al. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115:3138–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713837115>.

Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA. Clinical review on triglycerides. *Eur Heart J* 2020;41:99-109c. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz785>.

Lee B-S, Choi JY, Kim JY, Han SH, Park JE. Simvastatin and Losartan Differentially and Synergistically Inhibit Atherosclerosis in Apolipoprotein E ^{-/-} Mice. *Korean Circ J* 2012;42:543. <https://doi.org/10.4070/kcj.2012.42.8.543>.

Lelli D, Antonelli-Incalzi R, Bandinelli S, Ferrucci L, Pedone C. Association Between Sodium Excretion and Cardiovascular Disease and Mortality in the Elderly: A Cohort Study. *J Am Med Dir Assoc* 2018;19:229–34. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2017.09.004>.

Li S, Wang Y-N, Niimi M, Ning B, Chen Y, Kang D, et al. Angiotensin II Destabilizes Coronary Plaques in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:810–6. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306871>.

Li Y, Xiong F, Xu W, Liu S. Increased Serum Angiotensin II Is a Risk Factor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Prospective Pilot Study. *Gastroenterol Res Pract* 2019a;2019:1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/5647161>.

Li Y, Xiong F, Xu W, Liu S. Increased Serum Angiotensin II Is a Risk Factor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Prospective Pilot Study. *Gastroenterol Res Pract* 2019b;2019:1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/5647161>.

Liss KHH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* 2017;136:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.009>.

Liu H, Gao X, Zhou L, Wu Yong, Li Y, Mai J, et al. Urinary sodium excretion

and risk of cardiovascular disease in the Chinese population: a prospective study. *Hypertens Res* 2018;41:849–55. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0091-8>.

Liu J, Li X, Lu Q, Ren D, Sun X, Rousselle T, et al. AMPK: A balancer of the renin–angiotensin system. *Biosci Rep* 2019;39. <https://doi.org/10.1042/BSR20181994>.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin. *J Biol Chem* 1951. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).

Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020;41:111–88. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>.

Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva ASR, Bertoli FC, et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol* 2012;227:2917–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.23037>.

Martus W, Kim D, Garvin JL, Beierwaltes WH. Commercial rodent diets contain more sodium than rats need. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2005;288. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00310.2004>.

Medlow P, McEneny J, Murphy MH, Trinick T, Duly E, Davison GW. Exercise training protects the LDL I subfraction from oxidation susceptibility in an aged human population. *Atherosclerosis* 2015;239:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.012>.

Mente A, O'Donnell M, Rangarajan S, Dagenais G, Lear S, McQueen M, et al. Associations of urinary sodium excretion with cardiovascular events in individuals with and without hypertension: a pooled analysis of data from four studies. *Lancet* 2016;388:465–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30467-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30467-6).

Mente A, O'Donnell M, Rangarajan S, McQueen M, Dagenais G, Wielgosz A, et al. Urinary sodium excretion, blood pressure, cardiovascular disease, and

mortality: a community-level prospective epidemiological cohort study. *Lancet* 2018;392:496–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31376-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31376-X).

Mente A, O'Donnell MJ, Yusuf S. Urinary sodium excretion measures and health outcomes – Authors' reply. *Lancet* 2019;393:1295–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30033-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30033-9).

Merino J, Guasch-Ferré M, Martínez-González MA, Corella D, Estruch R, Fitó M, et al. Is complying with the recommendations of sodium intake beneficial for health in individuals at high cardiovascular risk? Findings from the PREDIMED study. *Am J Clin Nutr* 2015;101:440–8. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.096750>.

de Mestral C, Mayén A-L, Petrovic D, Marques-Vidal P, Bochud M, Stringhini S. Socioeconomic Determinants of Sodium Intake in Adult Populations of High-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Public Health* 2017;107:e1–12. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303629>.

Micha R, Peñalvo JL, Cudhea F, Imamura F, Rehm CD, Mozaffarian D. Association between dietary factors and mortality from heart disease, stroke, and type 2 diabetes in the United States. *JAMA - J Am Med Assoc* 2017;317:912–24. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.0947>.

Milajerdi A, Djafarian K, Shab-Bidar S. Dose-response association of dietary sodium intake with all-cause and cardiovascular mortality: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Public Health Nutr* 2019;22:295–306. <https://doi.org/10.1017/S1368980018002112>.

Mill JG, Malta DC, Machado ÍE, Pate A, Pereira CA, Jaime PC, et al. Estimation of salt intake in the Brazilian population: Results from the 2013 national health survey. *Rev Bras Epidemiol* 2019;22. <https://doi.org/10.1590/1980-549720190009.supl.2>.

Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global disparities of hypertension prevalence and control. *Circulation* 2016a;134:441–50. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912>.

Mills KT, Chen J, Yang W, Appel LJ, Kusek JW, Alper A, et al. Sodium Excretion and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA* 2016b;315:2200. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4447>.

Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 2016;65:1202–14. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>.

Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18:2650–66. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.060>.

Mozaffarian D, Fahimi S, Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Engell RE, et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2014;371:624–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304127>.

Muntner P, Carey RM, Gidding S, Jones DW, Taler SJ, Wright JT, et al. Potential US Population Impact of the 2017 ACC/AHA High Blood Pressure Guideline. *Circulation* 2018;137:109–18. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032582>.

Musso G, Saba F, Cassader M, Paschetta E, De Michieli F, Pinach S, et al. Angiotensin II Type 1 Receptor rs5186 Gene Variant Predicts Incident NAFLD and Associated Hypertension: Role of Dietary Fat-Induced Pro-Inflammatory Cell Activation. *Am J Gastroenterol* 2019;114:607–19. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000154>.

Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol* 2009;50:1226–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.018>.

Nakandakare ER, Charf AM, Santos FC, Nunes VS, Ortega K, Lottenberg AMP, et al. Dietary salt restriction increases plasma lipoprotein and inflammatory marker concentrations in hypertensive patients. *Atherosclerosis* 2008;200:410–6. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.034>.

National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995. Washington, D.C.: National Academies Press; 1995. <https://doi.org/10.17226/4758>.

Nilson EAF, Metlzer AB, Labonté M-E, Jaime PC. Modelling the effect of compliance with WHO salt recommendations on cardiovascular disease mortality and costs in Brazil. *PLoS One* 2020;15:e0235514.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235514>.

O'Donnell M, Mente A, Rangarajan S, McQueen MJ, O'Leary N, Yin L, et al. Joint association of urinary sodium and potassium excretion with cardiovascular events and mortality: Prospective cohort study. *BMJ* 2019;364. <https://doi.org/10.1136/bmj.l772>.

Oh Y-B, Kim JH, Park BM, Park BH, Kim SH. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). *Peptides* 2012;37:79–85. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.005>.

Ok DP, Ko K, Bae JY. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. *Lipids Health Dis* 2018;17. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0852-z>.

Okamoto MM, Sumida DH, Carvalho CRO, Vargas AM, Heimann JC, Schaan BD, et al. Changes in dietary sodium consumption modulate GLUT4 gene expression and early steps of insulin signaling. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2004;286:R779–85. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00396.2003>.

Olde Engberink RHG, Van Den Hoek TC, Van Noordenne ND, Van Den Born BJH, Peters-Sengers H, Vogt L. Use of a single baseline versus multiyear 24-hour urine collection for estimation of long-term sodium intake and associated cardiovascular and renal risk. *Circulation* 2017;136:917–26. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029028>.

Oliver WJ, Cohen EL, Neel J V. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a “no-salt” culture. *Circulation* 1975;52:146–51. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.52.1.146>.

Organização Mundial da Saúde. 2013-2020 Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases. 2013.

Organização Mundial da Saúde. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva: 2012.

Overwyk KJ, Quader ZS, Maalouf J, Bates M, Webster J, George MG, et al. Dietary Sodium Intake and Health Indicators: A Systematic Review of Published Literature between January 2015 and December 2019. *Adv Nutr* 2020;11:1174–200. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa049>.

Pan X-R, Li G-W, Hu Y-H, Wang J-X, Yang W-Y, An Z-X, et al. Effects of Diet and Exercise in Preventing NIDDM in People With Impaired Glucose Tolerance: The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997;20:537–44. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.4.537>.

Patsouris D, Reddy JK, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology* 2006;147:1508–16. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1132>.

Paz Ocaranza M, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, et al. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:116–29. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>.

Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 2018;98:2133–223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.

Polonia J, Monteiro J, Almeida J, Silva JA, Bertoquini S. High salt intake is associated with a higher risk of cardiovascular events. *Blood Press Monit* 2016;21:301–6. <https://doi.org/10.1097/MBP.0000000000000205>.

Prada PO, Coelho MS, Gottardello Zecchin H, Dolnikoff MS, Gasparetti AL, Shinohara Furukawa LN, et al. Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in rat tissues. *J Endocrinol* 2005;185:429–37. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06028>.

De Prada PO, Okamoto MM, Furukawa LNS, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: Effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension*, vol. 35, 2000, p. 424–9. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.424>.

Précoma DB, Oliveira GMM de, Simão AF, Dutra OP, Coelho-Filho OR, Izar MC de O, et al. Updated Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - 2019. *Arq Bras Cardiol* 2019. <https://doi.org/10.5935/abc.20190204>.

Premaratna SD, Manickam E, Begg DP, Rayment DJ, Hafandi A, Jois M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice. *Int J Obes* 2012;36:233–43.

<https://doi.org/10.1038/ijo.2011.95>.

Prentice RL, Huang Y, Neuhouser ML, Manson JE, Mossavar-Rahmani Y, Thomas F, et al. Associations of Biomarker-Calibrated Sodium and Potassium Intakes With Cardiovascular Disease Risk Among Postmenopausal Women. *Am J Epidemiol* 2017;186:1035–43. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx238>.

Rajapaksha IG, Gunarathne LS, Angus PW, Herath CB. Update on New Aspects of the Renin-Angiotensin System in Hepatic Fibrosis and Portal Hypertension: Implications for Novel Therapeutic Options. *J Clin Med* 2021a;10:702. <https://doi.org/10.3390/jcm10040702>.

Rajapaksha IG, Gunarathne LS, Angus PW, Herath CB. Update on New Aspects of the Renin-Angiotensin System in Hepatic Fibrosis and Portal Hypertension: Implications for Novel Therapeutic Options. *J Clin Med* 2021b;10:702. <https://doi.org/10.3390/jcm10040702>.

Ramos Pinto P, Yoshinaga MY, Bianco V Del, Bochi AP, Ferreira GS, Pinto IFD, et al. Dietary sodium restriction alters muscle lipidomics that relates to insulin resistance in mice. *J Biol Chem* 2021;296:100344. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100344>.

Ran J, Hirano T, Adachi M. Chronic ANG II infusion increases plasma triglyceride level by stimulating hepatic triglyceride production in rats. *Am J Physiol Metab* 2004;287:E955–61. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00199.2004>.

Reid BN, Ables GP, Otlivanchik OA, Schoiswohl G, Zechner R, Blaner WS, et al. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 2008;283:13087–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800533200>.

Rocco DDFM, Okuda LS, Pinto RS, Ferreira FD, Kubo SK, Nakandakare ER, et al. Aerobic exercise improves reverse cholesterol transport in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Lipids* 2011;46:617–25. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3555-z>.

Rosenson RS, Davidson MH, Hirsh BJ, Kathiresan S, Gaudet D. Genetics and Causality of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Atherosclerotic Cardiovascular

Disease. J Am Coll Cardiol 2014;64:2525–40. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.09.042>.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (dash) diet. N Engl J Med 2001;344:3–10. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440101>.

Saleh ZT, Lennie TA, Alhurani AS, Almansour IM, Alduraidi H, Moser DK. High Dietary Sodium Intake is Associated with Shorter Event-Free Survival in Patients with Heart Failure and Comorbid Diabetes. Clin Nurs Res 2021;30:154–60. <https://doi.org/10.1177/1054773819888743>.

Sandesara PB, Virani SS, Fazio S, Shapiro MD. The Forgotten Lipids: Triglycerides, Remnant Cholesterol, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. Endocr Rev 2019;40:537–57. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00184>.

Saulnier P-J, Gand E, Ragot S, Bankir L, Piguel X, Fumeron F, et al. Urinary Sodium Concentration Is an Independent Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in a Type 2 Diabetes Cohort Population. J Diabetes Res 2017;2017:1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/5327352>.

Schütten MTJ, Houben AJHM, de Leeuw PW, Stehouwer CDA. The Link Between Adipose Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System Signaling and Obesity-Associated Hypertension. Physiology 2017;32:197–209. <https://doi.org/10.1152/physiol.00037.2016>.

Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. J Biol Chem 2006;281:40236–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608048200>.

Sendra J, Llorente-Cortes V, Costales P, Huesca-Gomez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. Cardiovasc Res 2008;78:581–9. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn043>.

Silva ACS, Miranda AS, Rocha NP, Teixeira AL. Renin angiotensin system in liver diseases: Friend or foe? World J Gastroenterol 2017;23:3396–406.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i19.3396>.

Silva GM, França-Falcão MS, Calzerra NTM, Luz MS, Gadelha DDA, Balarini CM, et al. Role of Renin-Angiotensin System Components in Atherosclerosis: Focus on Ang-II, ACE2, and Ang-1–7. *Front Physiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01067>.

Simões e Silva AC, Ferreira RN, Miranda AS. The Renin Angiotensin System and Diabetes. *Mech. Vasc. Defects Diabetes Mellit.*, Cham: Springer International Publishing; 2017, p. 275–91. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60324-7_11.

Singer P, Cohen H, Alderman M. Assessing the Associations of Sodium Intake With Long-Term All-Cause and Cardiovascular Mortality in a Hypertensive Cohort. *Am J Hypertens* 2015;28:335–42. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu141>.

Stanaway JD, Afshin A, Gakidou E, Lim SS, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018;392:1923–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32225-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32225-6).

Sun B, Zhao H, Li X, Yao H, Liu X, Lu Q, et al. Angiotensin II-accelerated vulnerability of carotid plaque in a cholesterol-fed rabbit model-assessed with magnetic resonance imaging comparing to histopathology. *Saudi J Biol Sci* 2017;24:495–503. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.017>.

Takata H, Yamada H, Kawahito H, Kishida S, Irie D, Kato T, et al. Vascular angiotensin II type 2 receptor attenuates atherosclerosis via a kinin/NO-dependent mechanism. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2015a;16:311–20. <https://doi.org/10.1177/1470320313491794>.

Takata H, Yamada H, Kawahito H, Kishida S, Irie D, Kato T, et al. Vascular angiotensin II type 2 receptor attenuates atherosclerosis via a kinin/NO-dependent mechanism. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2015b;16:311–20. <https://doi.org/10.1177/1470320313491794>.

Tao X-R, Rong J-B, Lu HS, Daugherty A, Shi P, Ke C-L, et al. Angiotensinogen in hepatocytes contributes to Western diet-induced liver steatosis. *J Lipid Res*

2019;60:1983–95. <https://doi.org/10.1194/jlr.M093252>.

Tiyerili V, Becher UM, Aksoy A, Lütjohann D, Wassmann S, Nickenig G, et al. AT1-receptor-deficiency induced atheroprotection in diabetic mice is partially mediated via PPAR γ . *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:30. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-30>.

Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Meinitzer A, Boehm BO, Marz W. Plasma aldosterone levels are associated with increased cardiovascular mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Eur Heart J* 2010;31:1237–47. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq019>.

U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans. 2015 – 2020 Diet Guidel Am (8th Ed 2015. <https://doi.org/10.1097/NT.0b013e31826c50af>.

Udwan K, Abed A, Roth I, Dizin E, Maillard M, Bettoni C, et al. Dietary sodium induces a redistribution of the tubular metabolic workload. *J Physiol* 2017;595:6905–22. <https://doi.org/10.1113/JP274927>.

Uetake Y, Ikeda H, Irie R, Tejima K, Matsui H, Ogura S, et al. High-salt in addition to high-fat diet may enhance inflammation and fibrosis in liver steatosis induced by oxidative stress and dyslipidemia in mice. *Lipids Health Dis* 2015;14:6. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0002-9>.

Verma S, Gupta M, Holmes DT, Xu L, Teoh H, Gupta S, et al. Plasma renin activity predicts cardiovascular mortality in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) study. *Eur Heart J* 2011;32:2135–42. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr066>.

Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367–378.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>.

Wei Y, Clark SE, Morris EM, Thyfault JP, Uptergrove GME, Whaley-Connell AT, et al. Angiotensin II-induced non-alcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG(mRen2)27(Ren2) rats. *J Hepatol* 2008;49:417–28. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.018>.

Wei Y, Clark SE, Thyfault JP, Uptergrove GME, Li W, Whaley-Connell AT, et al. Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction Contributes to Angiotensin II-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Transgenic Ren2 Rats. *Am J Pathol* 2009;174:1329–37. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080697>.

Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GME, Clark SE, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2006;281:35137–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601320200>.

Welsh CE, Welsh P, Jhund P, Delles C, Celis-Morales C, Lewsey JD, et al. Urinary Sodium Excretion, Blood Pressure, and Risk of Future Cardiovascular Disease and Mortality in Subjects Without Prior Cardiovascular Disease. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2019a;73:1202–9. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12726>.

Welsh CE, Welsh P, Jhund P, Sattar N, Mark PB. Response by Welsh et al to Letter Regarding Article “urinary Sodium Excretion, Blood Pressure, and Risk of Future Cardiovascular Disease and Mortality in Subjects without Prior Cardiovascular Disease.” *Hypertension* 2019b;74:e27–8. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13349>.

Whelton PK, Appel LJ, Sacco RL, Anderson CAM, Antman EM, Campbell N, et al. Sodium, blood pressure, and cardiovascular disease: Further evidence supporting the American Heart Association sodium reduction recommendations. *Circulation* 2012;126:2880–9. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e318279acbf>.

Whillier S. Exercise and Insulin Resistance, 2020a, p. 137–50. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_9.

Whillier S. Exercise and Insulin Resistance, 2020b, p. 137–50. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_9.

Xavier AR, Garófalo MAR, Migliorini RH, Kettelhut IC. Dietary sodium restriction exacerbates age-related changes in rat adipose tissue and liver lipogenesis. *Metabolism* 2003;52:1072–7. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00162-8).

Xia B, Cai GH, Yang H, Wang SP, Mitchell GA, Wu JW. Adipose tissue

deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice. *PLoS Genet* 2017;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007110>.

Yi E, Liu R, Wen Y, Yin C. Telmisartan attenuates hepatic fibrosis in bile duct-ligated rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:1518–24. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.115>.

Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, Islam S, Mente A, Hystad P, et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 2020;395:795–808. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32008-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32008-2).

Yvan-Charvet L, Quignard-Boulangé A. Role of adipose tissue renin–angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int* 2011;79:162–8. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.391>.

Zhao X, Zhang Y, Zhang X, Kang Y, Tian X, Wang X, et al. Associations of urinary sodium and sodium to potassium ratio with hypertension prevalence and the risk of cardiovascular events in patients with prehypertension. *J Clin Hypertens* 2017;19:1231–9. <https://doi.org/10.1111/jch.13104>.

Zhou L, Yang Y, Feng Y, Zhao X, Fan Y, Rong J, et al. Association between dietary sodium intake and non-alcoholic fatty liver disease in the US population. *Public Health Nutr* 2021;24:993–1000. <https://doi.org/10.1017/S136898001900483X>.

Zhu Q, Li N, Li F, Zhou Z, Han Q, Lv Y, et al. Therapeutic effect of renin angiotensin system inhibitors on liver fibrosis. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2016;17. <https://doi.org/10.1177/1470320316628717>.

Zhu Y, Zhang J, Li Z, Liu Y, Fan X, Zhang Yaping, et al. Association of sodium intake and major cardiovascular outcomes: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Cardiovasc Disord* 2018;18. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0927-9>.