



UFRJ

**ENTENDENDO OS MECANISMOS  
MOLECULARES ATIVADOS PELO SÓDIO:  
*ESTUDO IN VIVO E IN VITRO***

Alessandro Miranda de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Prof<sup>a</sup>. Lucienne da Silva Lara Morcillo

Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Prof<sup>a</sup> Valéria do Monti Nascimento Cunha

Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Rio de Janeiro

Abril/2015

Souza, Alessandro Miranda.

ENTENDENDO OS MECANISMO MOLECULARES ATIVADOS PELO SAL: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*/ Alessandro Miranda de Souza. – Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015

x,85f.: il.; 31cm

Orientador: Lucienne da Silva Lara/ Valéria do Monti Nascimento Cunha

Dissertação (Mestrado)-UFRJ/ ICB / Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química medicinal (PPFQM), 2015.

Referências Bibliográficas: f.70-85.

1. Rim, 2. Dieta Hipersódica, 3. DOCA-Sal, 4. LLC-PK1.- Teses. I. Lara, Lucienne da Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal (PPFQM). III. Título.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meus pais, Telma e Alberto, que sempre me deram condições para continuar, sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e que me ensinaram a ser a pessoa que eu sou hoje. Obrigado as minhas irmãs Erika, Tamara e Tatiana que sempre aturam aos meus estresses e implicâncias sendo sem dúvidas irmãs melhores que eu mereço.

Um agradecimento especial a minha namorada Priscilla, que sofre e comemora comigo, que sempre me incentiva a tentar melhorar, que me atura e que me faz feliz.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Lucienne da Silva Lara, que sempre se mostrou preocupada comigo e se eu estava feliz com o que eu fazia, até mesmo em seus períodos de licença e férias. Obrigado pela dedicação e pelo esforço, pelos conselhos e pela experiência passada que com certeza me ajudaram a ser um profissional melhor.

Agradeço também a minha co-orientadora, Dra. Valéria do Monti Nascimento Cunha, que durante todo o tempo em que estive no laboratório sempre se preocupou comigo, com a minha desenvoltura e sempre tentando extrair ao máximo minhas qualidades e melhorar meus pontos fracos.

As minhas amigas de laboratório que me acompanharam nessa caminhada compartilhando minhas angustias e preocupações. A Luiza que por vezes era mais como uma mãe preocupada com a minha alimentação e etc., Sabrina que me deu inúmeras caronas, conselhos e ajudas, a Fernanda que sempre me auxiliou em tudo que eu precisei. Fernandinha que chegou depois, mas conquistou seu espaço, sempre estressada, mas que nunca me deixou na mão sendo uma grande companheira.

Gostaria de agradecer ao alunos de iniciação, espero que tenha ajudado a vocês em algum momento. Em especial gostaria de agradecer ao Dayvid que me ajudou a desenvolver toda essa dissertação.

Ao laboratório de Físico-Química Biológica (Biofísica) obrigado pela colaboração e amizade. Em especial à professora Jennifer Lowe e ao professor Marcelo Einicker que sempre foram solícitos em me auxiliar, ao Humberto que me ajudou a dar os primeiros passos na vida científica e a Rose que sempre esteve disposta a me ajudar na sala de cultura.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal por me dar a chance de aperfeiçoar meus conhecimentos. À professora Dra. Josiane Neves por aceitar ser a revisora desta dissertação. À professora Dra. Minolfa Prieto, ao professor Dr. Maurilo Leite e ao professor Dr. Luís Quintas por terem aceitado o convite para compor minha banca examinadora.

Agradeço também à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao programa Ciências sem Fronteiras pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

# Resumo

## **Entendendo os Mecanismos Moleculares Ativados pelo Sal: Estudo *in vivo* e *in vitro***

Alessandro Miranda de Souza

Orientador(es): Lucienne da Silva Lara Morcillo e Valéria do Monti Nascimento Cunha

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (farmacologia).

O  $\text{Na}^+$  *per se* sensibiliza o eixo cardiovascular-renal acarretando na hipertensão sensível ao sal e na lesão renal. Porém não são conhecidos os mecanismos moleculares e a influência do componente pressórico. O objetivo desta dissertação foi determinar o efeito exclusivo do  $\text{Na}^+$  sobre a função renal elucidando os mecanismos moleculares associados e a sua modulação pelo componente pressórico. Foram utilizados os modelos (i) *in vitro*: células LLC-PK<sub>1</sub> foram incubadas com soluções isosmóticas contendo 140 ou 170 mEq NaCl por 1 h e (ii) *in vivo*: ratos Wistar uninefrectomizados foram submetidos ou não à injeção subcutânea com acetato de deoxicorticosterona (8 mg/Kg, DOCA) e receberam dieta normosódica ou hipersódica (4% NaCl), formando os grupos CONT, CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal. O aumento localizado do  $\text{Na}^+$  na face luminal das células LLC-PK<sub>1</sub> aumentou  $\approx 270\%$  as atividades da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e da  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  de retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), mas não as atividades  $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$  e  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPásica}$  de membrana plasmática (PMCA). O CONT/Sal apresentou pressão arterial e filtração renal normais, apesar do acúmulo de uréia plasmática e da proteinúria. O  $\text{Na}^+$  aumentou a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e o conteúdo da cinase induzida por

sal (SIK). No DOCA, onde a hipertensão foi estabelecida, a função renal e o transporte renal de  $\text{Na}^+$  foram preservados. No DOCA/Sal a hipertensão foi agravada associada à diminuição da filtração renal, acúmulo de ureia e proteinúria. A atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$  e o conteúdo de SIK diminuíram  $\approx 45\%$ . Estes dados sugerem que na ausência de um componente pressórico, o  $\text{Na}^+$  contribui para o processo de lesão renal silencioso, sendo a  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e a SIK os seus principais alvos moleculares e sensíveis à hipertensão dependente de volume.

**Palavras-chaves:** rim, dieta hipersódica,  $\text{LLC-PK}_1$ , DOCA/Sal,  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e cinase induzida por sal.

Rio de Janeiro

Abril/2015

# Abstract

## Understanding the Molecular Mechanisms Activated by Salt: *in vivo* and *in vitro* studies

Alessandro Miranda de Souza

Orientador(es): Lucienne da Silva Lara Morcillo e Valéria do Monti Nascimento Cunha

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (farmacologia).

$\text{Na}^+$  per se sensitizes the cardiovascular-renal axis resulting in salt-sensitive hypertension and renal injury. However, the molecular mechanisms and the influence of the pressure component are unknown. The aim of this work was to determine the unique effect of  $\text{Na}^+$  on renal function elucidating the molecular mechanisms and their modulation by the pressure component. Two models were used (i) *in vitro*: LLC-PK1 cells were incubated with iso-osmotic solutions containing 140 or 170 mEq NaCl for 1 h and (ii) *in vivo*: uninephrectomized Wistar rats were submitted or not to subcutaneous injection of deoxycorticosterone acetate (8 mg / kg, DOCA) and received regular or high salt (4% NaCl), leading to the groups CONT, CONT/Salt, DOCA and DOCA/Salt. The localized increase of  $\text{Na}^+$  on the luminal surface of LLC-PK1 cells increased  $\approx 270\%$  the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$  activity and the  $\text{Ca}^{2+} \text{-ATPase}$  sarco(endo)plasmatic reticulum activity (SERCA), but  $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$  and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+} \text{-ATPase}$  (PMCA) activities were not modified. The CONT/Sal presented normal blood pressure and renal filtration, despite the plasma urea accumulation and proteinuria. The high  $\text{Na}^+$  intake increased the activity of the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$  and salt inducible kinase (SIK) content. DOCA rats, which hypertension was established, the renal function and renal transport of  $\text{Na}^+$  ions were preserved. DOCA/Salt established

exacerbated hypertension, renal filtration decreased, urea accumulation and proteinuria. The  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  activity and the SIK content decreased  $\approx 45\%$ . These data suggest that in the absence of a pressure component,  $\text{Na}^+$  contributes quietly to kidney damage, and  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  and SIK as the main molecular targets and sensitive to volume dependent hypertension.

**Palavras-chaves:** kidney, high salt diet, LLC-PK<sub>1</sub>, DOCA/Salt,  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  and salt inducible kinase.

Rio de Janeiro

Abril/2015

# Sumário

Abreviaturas	1
1. Introdução	3
1.1. O íon sódio	4
1.1.1. Histórico do consumo de NaCl	5
1.1.2. Doenças associadas ao alto consumo de sódio	6
1.1.3. Programas de redução do consumo de NaCl	8
1.2. Hipertensão arterial	9
1.2.1. Epidemiologia	11
1.2.2. Regulação da pressão arterial	12
1.2.3. Hipertensão sensível ao sal	15
1.3. Os rins como órgãos alvo da HA	18
1.3.1. Fisiologia dos rins	18
1.3.2. Estrutura e localização	19
1.3.3. Túbulo proximal	21
1.3.4. Medida da função renal	24
1.3.5. Sinalização do sódio	25
1.4. Modelo DOCA/Sal: Um modelo clássico para responder questões atuais	28
2. Objetivo	31
2.1. Objetivos específicos	32
3. Métodos	33
3.1. Materiais	34
3.2. Cultura de células	34
3.3. Modelo DOCA/SAL	35
3.4. Cirurgia de uninefrectomia	36
3.5. Medida não-invasiva da pressão arterial:	36
3.6. Análise dos parâmetros fisiológicos renais:	37
3.7. Preparação renal:	37
3.8. Atividade (Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> )ATPásica	38
3.9. Atividade Na <sup>+</sup> -ATPásica	38
3.10. Medida de atividade das ATPases transportadoras de Ca <sup>2+</sup>	38

3.11.	Eletroforese e imunodeteccção	39
3.12.	Imunohistoquímica e imunofluorescência	39
3.13.	Medida de mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular	40
3.14.	Análise estatística	41
4.	Resultados	42
4.1.	Modelo <i>in vitro</i>	43
4.1.1.	A. Determinação da influência de altas concentrações de $\text{Na}^+$ localizadas na face luminal de células LLC-PK1 sobre as atividades ATPásicas transportadoras de $\text{Na}^+$ e $\text{Ca}^{2+}$	43
4.1.2.	Alterações na mobilização de cálcio intracelular	46
4.2.	Modelo <i>in vivo</i>	46
4.2.1.	Determinação da alterações da função renal promovidas pela alta ingestão crônica de sódio	46
4.2.2.	Definição de quais ATPases transportadoras de $\text{Na}^+$ são moduladas pelo aumento crônico no consumo de sal	54
4.2.3.	Avaliação do envolvimento da proteína SIK	56
5.	Discussão	60
6.	Conclusão	68
7.	Referências bibliográficas	70

# Abreviaturas

ADH: Hormônio anti-diurético  
ADP: Adenosina difosfato  
AGT: Angiotensinogênio  
AMPK: Proteína cinase ativada por AMP  
AMP: Adenosina monofosfato  
Ang I: Angiotensina I  
Ang II: Angiotensina II  
ANP: Peptídeo atrial natriurético  
AT1R: Receptores de Ang II do tipo 1  
ATP: Adenosina trifosfato  
AVC: Acidente vascular cerebral  
BPM: Batidas por minuto  
CaMK: Proteína cinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina  
CAMKII:  $Ca^{2+}$ -calmodulina cinase II  
CEUA: Comissão de ética para o uso de animais  
DAB: Diaminobenzidina  
DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilindole  
DCE: Depuração de creatinina endógena  
DCV: Doença cardiovascular  
DOCA: Acetato de desoxicorticosterona  
DRC: Doença renal crônica  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
ECA: Enzima conversora de angiotensina  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ENaC: Canal de sódio sensível a amilorida  
FC: Frequência cardíaca  
GAG: Glicosaminoglicana  
HA: Hipertensão arterial  
HRP: Horseradish peroxidase  
HVE: Hipertrofia ventricular esquerda  
IRC: Insuficiência renal crônica

LLC-PK<sub>1</sub>: Linhagem celular de células epiteliais renais derivadas de túbulo proximal de porco

MR: Receptor mineralocortióide

NCX: Trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

NA: Na<sup>+</sup>ATPase

NKA: (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase

OMS: Organização mundial de saúde

PA: Pressão arterial

PAGE: Poliacrilamida

PAHO: Pan american health organization

PAS: Pressão arterial sistólica

PBS: Tampão fosfato-salino

PMCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPase de membrana plasmática

PME-1: Proteína fosfatase metilesterase-1

PMSF: Fluoreto de fenil-sulfonil-metano

PP2A: Proteína fosfatase 2A

RFG: Ritmo de filtração glomerular

RVP: Resistência vascular periférica

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

SERCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo sarco(endo)plasmático

SFB: Soro fetal bovino

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SIK: Cinase induzida por sal

SNC: Sistema nervoso central

SRA: Sistema renina angiotensina

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

SUS: Sistema único de saúde

TBS: Tampão tris-salina

TSR: Terapia de substituição renal

VEC: Volume extra celular

VSP: Vasos sanguíneos periféricos

# 1. Introdução



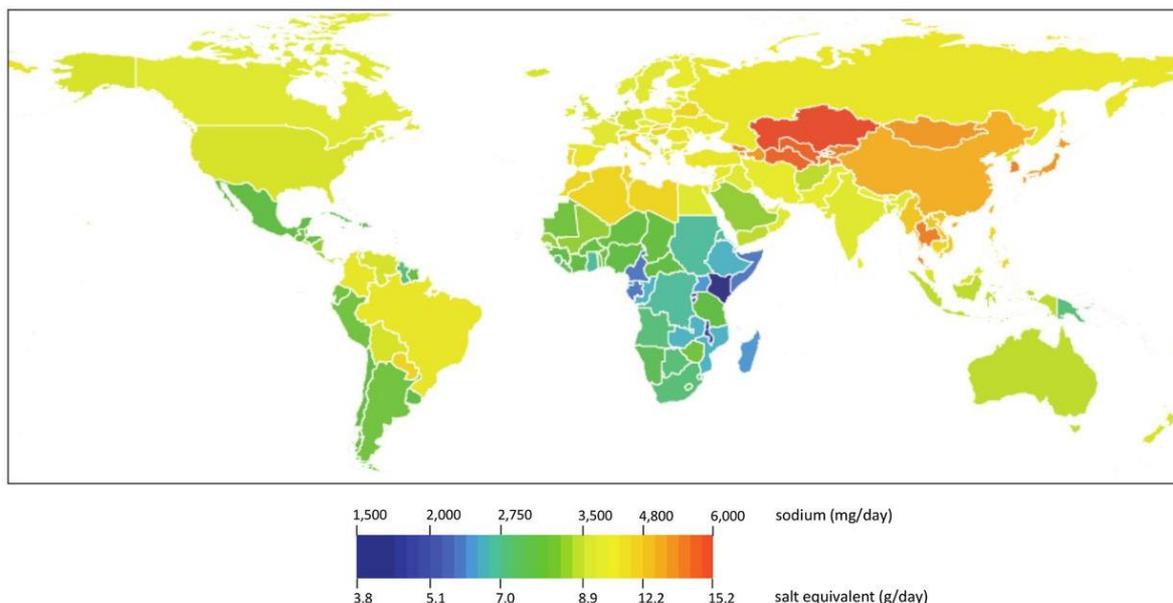
### 1.1.1. Histórico do consumo de NaCl

Há pelo menos dois milhões de anos atrás a dieta dos ancestrais hominídeos dos humanos continha menos de 1 g de NaCl, uma vez que eles eram expostos somente ao sal presente naturalmente na água e na comida (DENTON, 1982). Com o desenvolvimento da agricultura, a cerca de 5-10 mil anos atrás, veio a necessidade de se estocar alimentos e com isso o consumo de sódio foi aumentado porque era utilizado como conservante na estocagem de alimentos impedindo o crescimento de microorganismos (HE & MACGREGOR, 2014; STAMLER, 1993).

Como conservante dos alimentos, o sal foi um dos produtos mais comercializados no mundo, servindo inclusive como forma de pagamento para os soldados romanos, dando origem ao termo salário (BATUMAN, 2011). A quantidade de sal consumida era utilizada como censo populacional, uma vez que era diretamente relacionada com o tamanho da população. Os altos impostos cobrados pelo sal influenciaram momentos históricos importantes como a revolução francesa e a independência da Índia (HEIMANN, 2000).

Com a invenção da geladeira e o congelamento dos alimentos a utilização de sal como conservante não foi mais necessário, acarretando na drástica redução do seu consumo. Foi na transição do século 20 para o 21 que a taxa de ingestão de sal atingiu níveis muito próximos aos da era agrícola, chegando a 9 a 12 g por dia com o aumento do consumo de comidas processadas e *fast-foods* (HE & MACGREGOR, 2009).

Um estudo publicado em 2013 estima que no mundo 181 de 187 países pesquisados consumiam uma quantidade de sal maior que a prescrita pela OMS e, dentre eles, 51 países consumiam mais que o dobro. O trabalho ainda mostrou que a região da Ásia central é a que apresenta o maior consumo de sal enquanto que os países do leste da África são os que consomem menos (Figura 2) (POWLES *et al*, 2013).



**Figura 2:** Média de consumo de sal mundial em adultos com mais de 20 anos e de ambos os sexos. Fonte: POWLES et al, 2013

No Brasil estima-se que a média do consumo de  $\text{Na}^+$  seja de 4,5 g por dia, o que equivale a 11,4 g de NaCl, um valor aproximadamente duas vezes superior ao preconizado pela OMS. A maior parte do sal ingerido é originária do sal de cozinha, que representa 71,5% do total de  $\text{Na}^+$  consumido (sendo 59,7% consumido nos domicílios e 11,8% na alimentação fora de casa). O restante está dividido entre alimentos industrializados (13,8%), no pão francês (6,0%), nos alimentos *in natura* (4,7%) e nos alimentos semi-elaborados (4,1%) (ABIA, 2013).

### 1.1.2. Doenças associadas ao alto consumo de sódio

A hipertensão arterial (HA) é a doença mais comumente associada a alta ingestão de  $\text{Na}^+$ . Estudos já demonstraram que existe uma correlação direta e progressiva entre o alto consumo de NaCl e a elevação da pressão arterial (PA), assim como a redução do consumo de sódio se mostra eficaz na diminuição da mesma (FENG & MACGREGOR, 2002 e 2004). A hipertensão, a sua sensibilidade ao sal e suas consequências serão apresentadas com maiores detalhes posteriormente no decorrer desta introdução.

Evidências epidemiológicas relatam que populações onde o consumo de sal é inferior a 3 g por dia, apresentam ausência de hipertensão enquanto que onde o consumo é superior a 20 g por dia apresentam uma alta incidência de hipertensos. Em algumas tribos presentes na América do Sul, África e Ártico, que consomem

pouquíssimo sal, apresentam valores de pressão arterial ótimos mesmo em idades avançadas. Já no Japão onde no norte do país o consumo de sal chega a 27 g por dia, 70% da população entre as idades de 50 e 60 anos apresentam pressão arterial elevada. Enquanto que no sul do país, onde a ingestão de sal é de 14 g por dia, apenas 10% da população entre as idades de 50 e 60 anos apresentam aumento da pressão arterial (MENETON *et al*, 2005).

Além da hipertensão, existem relatos de que o alto consumo de sal está diretamente relacionado a outras doenças que podem ou não envolver alterações da PA. Entre elas destacam-se o risco de acidente vascular cerebral (AVC), hipertrofia do ventrículo esquerdo e doenças renais. Está relacionado também com a incidência de litíase renal, osteoporose, asma e câncer de estômago (FRISOLI *et al*, 2012).

Estudos epidemiológicos demonstram que uma dieta rica em sal possui relação direta com o risco de morte por AVC independente de alterações na PA. Essa associação é significativamente positiva nas mortes por AVC isquêmico e por hemorragia intracerebral principalmente em homens (PERRY & BEEVERS, 1992; NAGATA *et al* 2014). A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e já foi demonstrado que existe uma relação positiva entre a sua incidência com a alta ingestão de sal em indivíduos hipertensos e normotensos (DU CAILAR *et al*, 1992). Já foi demonstrado que a redução do consumo de Na<sup>+</sup> é eficaz na redução da HVE assim como na redução da PA (JULA & KARANKO, 1994).

A alta ingestão de Na<sup>+</sup> está relacionada positivamente com os níveis de albuminúria (presença de albumina na urina). Essa relação parece ser mais pronunciada em indivíduos obesos. Uma possível explicação seria de que o Na<sup>+</sup> atua diretamente nas paredes das artérias gerando uma disfunção endotelial permitindo que a albumina passe através das paredes dos vasos aumentando sua excreção urinária (VERHAVE *et al*, 2004). Um estudo realizado com negros mostrou que a redução no consumo de sal de 10 g para 5 g reduz os níveis de albuminúria (SWIFT *et al*, 2005). Além disso é indicado que pacientes com doenças renais reduzam o consumo de sal pois nesses casos os rins retêm Na<sup>+</sup> e água podendo agravar o dano renal e alterar a PA (HE & MACGREGOR, 2009). Também durante uma dieta com alto sal a excreção urinária de Ca<sup>2+</sup>, envolvido na litíase renal, está aumentada (CAPPuccio *et al*, 2000). Em resposta a essa eliminação exagerada ocorre um

aumento da absorção intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  e ainda mobilização do íon presente nos ossos contribuindo assim para a osteoporose (DEVINE *et al*, 1995).

A mortalidade por câncer de estômago está também correlacionada com um alto consumo de  $\text{Na}^+$  (JOOSSENS *et al*, 1996). Isso pode ser devido à relação que existe entre a *H.pylori* e a ingestão de sal. Alimentos salgados poderiam irritar o estômago tornando a infecção pela bactéria mais severa levando ao desenvolvimento do câncer de estômago (BEEVERS *et al*, 2004). A influência do sal na asma ainda não é totalmente compreendida, porém existem indícios de que o sal não atuaria como causador da doença, mas influenciaria na severidade (BURNEY, 1987). Embora existam relatos indicando que uma dieta com baixo  $\text{Na}^+$  melhora o funcionamento dos pulmões em asmáticos (MICKLEBOROUGH & FOGARTY, 2006), isso não é consenso na literatura uma vez que estudos também demonstram que a redução do sal não influencia no quadro clínico (POGSON *et al*, 2008).

### **1.1.3. Programas de redução do consumo de sal**

A redução do consumo de sal atualmente é uma das grandes preocupações mundiais. De acordo com a OMS a redução da ingestão de sal é uma das intervenções com melhor custo benefício para a redução da morbidade por doenças não transmissíveis como hipertensão, DCV e AVC (OMS, 2011). Em um estudo realizado no Canadá, estimou-se que uma redução na ingestão de  $\text{Na}^+$  para 1840 mg por dia (4,6 g de NaCl) poderia reduzir cerca de 30% a prevalência da hipertensão (o equivalente a cerca de 1.078.000 pacientes hipertensos). Essa diminuição ainda acarretaria em uma redução de 18% por ano (cerca de 430 milhões de dólares) com gastos em tratamentos, exames e visitas médicas (JOFFRES *et al*, 2007)

Um outro estudo realizado com 23 países de rendas baixa a média foi estimado que a redução de 15% da média de ingestão de sal seria suficiente para evitar cerca de 8,5 milhões de mortes por DCV ao longo de 10 anos, e o custo para implementar um programa de redução de consumo de  $\text{Na}^+$  nesses países seria de aproximadamente 9 centavos de dólares por pessoa por ano (ASARIA *et al*, 2007).

Diversos países vem criando políticas de redução do consumo de sal. O modelo de maior influência é o adotado pelo Reino Unido que se baseia em uma redução voluntária e metas a serem alcançadas pelas indústrias de alimentos (HE & MACGREGOR, 2009). Inicialmente, as pessoas deveriam reduzir 40% do sal de cozinha que era adicionado nos alimentos e as indústrias de alimentos deveriam

reduzir cerca de 10 a 20% em alimentos processados. A iniciativa funcionou e, atualmente, a redução de sal por parte da indústria gira em torno de 20 a 30%. Associado a isso foi desenvolvido um sistema de rotulagem utilizando cores diferentes como verde, laranja e vermelha para alimentos com baixa, média e alta quantidades de sal, gordura, açúcar e calorias, e também é indicado a quantidade de sal por porção (HE & MACGREGOR, 2009).

No Canadá o processo adotado foi similar ao processo adotado no Reino Unido. Esse modelo também propõe metas voluntárias definidas a partir de reuniões técnicas baseadas no consumo alimentar da população, nas quantidades de Na<sup>+</sup> nos alimentos, na participação dos produtos no mercado, análises do processo produtivo, do comércio e da aceitação do consumidor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No Brasil, desde 2010 vem sendo trabalhado um plano de redução do consumo de sal tendo como base os modelos canadense e britânico. A meta de redução é que o consumo chegue a 5 g de sal diários até 2020. Para isso foram determinados as seguintes estratégias: (a) aumento e estímulo do consumo de alimentos saudáveis; (b) redução voluntária dos níveis de Na<sup>+</sup> em alimentos processados e vendidos em restaurantes e lanchonetes; (c) melhora dos rótulos informando ao consumidor a quantidade de Na<sup>+</sup>; (d) promoção da educação e sensibilização dos consumidores, indústrias, profissionais de saúde; (e) regulação dos ingredientes com Na<sup>+</sup> utilizados pela indústria.

## **1.2. Hipertensão arterial**

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica definida por altos níveis de pressão arterial, sendo uma condição clínica multifatorial que normalmente está relacionada com alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos que recebem grande aporte de sangue, além do sistema circulatório (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Desta forma, o aumento da pressão arterial é um dos principais fatores de risco para DCV, além de gerar diversas complicações como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). O diagnóstico da HA é realizado através da medida regular da PA. A HA pode ser caracterizada de acordo com a sua gravidade ou de acordo com a sua fisiopatologia. A classificação por gravidade é caracterizada

de acordo com os valores médios de PA aferidos em indivíduos com idade superior a 18 anos (Tabela 1) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Diversos fatores estão envolvidos com o desenvolvimento da HA. A idade está diretamente relacionada com a hipertensão sendo estimado uma prevalência de 60% em pessoas acima de 65 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Com relação ao gênero a incidência é maior em homens até os 50 anos, após essa idade o perfil passa a se inverter com as mulheres apresentando um maior número de casos. Já em relação aos grupos étnicos a incidência é duas vezes maior em indivíduos não brancos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

<b>Tabela 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (&gt; 18 anos)</b>		
<b>Classificação</b>	<b>Pressão sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão diastólica (mmHg)</b>
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Pré-Hipertenso	130–139	85–89
Hipertensão estágio 1	140–159	90–99
Hipertensão estágio 2	160–179	100–109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90
Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.		
Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010		

Do ponto de vista fisiopatológico, a hipertensão pode ser classificada em primária (essencial ou idiopática) ou secundária. No primeiro caso são classificados os casos em que o aumento da pressão não apresenta causa definida. Ela é considerada um transtorno multifatorial uma vez que diferentes fatores levam a seu desenvolvimento em diferentes pacientes (CARRETERO & OPARIL, 2000). Embora não se possa afirmar qual a origem da hipertensão essencial, alguns fatores estão relacionados. A obesidade, resistência à insulina, o alto consumo de álcool, dieta com alto sal, sedentarismo, estresse, dislipidemia e baixa ingestão de K<sup>+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> podem

levar ao aumento da PA sendo considerados fatores hipertensinogênicos (CARRETERO & OPARIL, 2000). Já a hipertensão secundária é aquela em que o aumento da pressão ocorre em consequência de outras patologias como doenças renovasculares, insuficiência renal, utilização de medicamentos entre outros (CARRETERO & OPARIL, 2000).

Com relação à prevenção indica-se uma mudança de estilo de vida adotando a prática de atividades físicas, redução da ingestão de álcool e uma dieta com menos Na<sup>+</sup> e gorduras e mais frutas e vegetais. As alterações na PA através da mudança do estilo de vida podem ser tão boas quanto intervenções farmacológicas (WHELTON *et al*, 2002)

### **1.2.1. Epidemiologia**

A HA é a doença crônica que gera alto número de consultas médicas, levando a um grande impacto socioeconômico. Devido a sua alta prevalência e baixas taxas de controle, é um dos mais importantes problemas de saúde pública (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Com o aumento da expectativa de vida associado a problemas da sociedade moderna como a obesidade, alimentação não saudável e sedentarismo, a HA vem se tornando uma das doenças mais comuns no mundo (WHELTON *et al*, 2002).

Estima-se que um a cada 3 adultos apresentem pressão arterial superior a 140/90 mmHg. Desses, apenas um terço sabem que apresentam a doença e, uma em cada 3 pessoas adequadamente tratadas não consegue diminuir a PA para menos de 140/90 mmHg (PAHO, 2013).

Um estudo avaliou que no ano 2000 aproximadamente 26,4% da população adulta mundial, cerca de 972 milhões de pessoas, apresentava hipertensão, sendo desses 34% (333 milhões) em países desenvolvidos e 66% (639 milhões) em países em desenvolvimento. Foi projetado que até o ano de 2025 esse valor aumentaria para 29,2%, o equivalente a 1,56 bilhões de pessoas (KEARNEY *et al*, 2005). Em 2008, de acordo com a OMS, 40% dos adultos com idade acima de 25 anos (1 bilhão de pessoas) era hipertenso. A prevalência da doença é menor em países com alta renda, em torno de 35%, do que nos demais países, encontrando a maior prevalência nos países africanos, em torno de 46% (OMS, 2013).

Anualmente ocorrem em torno de 17 milhões de mortes por doenças cardiovasculares no mundo, o que equivale a cerca de um terço do total de mortes.

Desse total, 9,4 milhões de mortes são decorrentes de complicações da HA. Pelo menos 45% dos casos de falecimento por doenças cardíacas e 51% da mortalidade por AVC estão relacionadas com aumento da PA (OMS, 2013).

No Brasil a prevalência da hipertensão encontra-se acima de 30%. Estudos mostram que esse valor está entre 22,3% e 43,9%, alcançando a média de 32,5%. Dentro da população idosa, cerca de 50% dos indivíduos com idade entre 60 e 69 anos e 75% com idade acima de 70 anos apresentam hipertensão. Com relação ao gênero a prevalência é de 35,8% para os homens e de 30% em mulheres, semelhante à média mundial, sendo para homens de 37,8% e para mulheres 32,1% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). De acordo com dados de 2003, o número de óbitos por DCV corresponde a 27,4%, chegando a 37% quando excluídos os casos com causas mal definidas e em função de violência. Desse percentual, a HA está relacionada a 40% dos óbitos por AVC e 25% dos óbitos por doenças coronarianas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006).

Em 2005, os custos hospitalares para o Sistema Único de Saúde (SUS) com internações por HA e suas principais complicações foi de R\$ 1,9 trilhão, sendo que 49% dos casos foram relativos a eventos cardiovasculares precoces equivalendo a 33,5% do gasto total. Nesse mesmo ano foi previsto um gasto de R\$ 101.358.451,00 com aquisição de medicamentos para a assistência básica da hipertensão (LESSA, 2006).

### **1.2.2. Regulação da pressão arterial**

Como descrito por GUYTON e colaboradores (1972), existem pelo menos 8 principais formas de regular a pressão arterial (Figura 3):

Regulação nervosa:

- Barorreceptores: Com o aumento da PA ocorre ativação dos barorreceptores presentes principalmente no seio carotídeo e no arco da aorta, com isso ocorre uma sinalização para o sistema nervoso central (SNC). Esta informação gera respostas do sistema nervoso autônomo parassimpático que levam à redução da frequência cardíaca e à dilatação dos vasos sanguíneos periféricos (VSP), normalizando a PA. (HAIBARA & SANTOS, 2000)
- Quimiorreceptores: com a redução da PA ocorre uma redução nos níveis de oxigênio que leva a ativação de quimiorreceptores presentes nos corpos

carotídeos e aórtico, que então transmitem sinais para o centro vasomotor e sistema nervoso autônomo simpático que por sua vez aumenta a PA. (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001)

- Resposta isquêmica do SNC: com a queda da PA para níveis muito baixos, ocorre isquemia do centro vasomotor no bulbo, que gera um sinal pelo sistema nervoso autônomo simpático que leva à constrição dos vasos periféricos e aumento da atividade cardíaca aumentando a PA. (GUYTON & HALL, 2006)

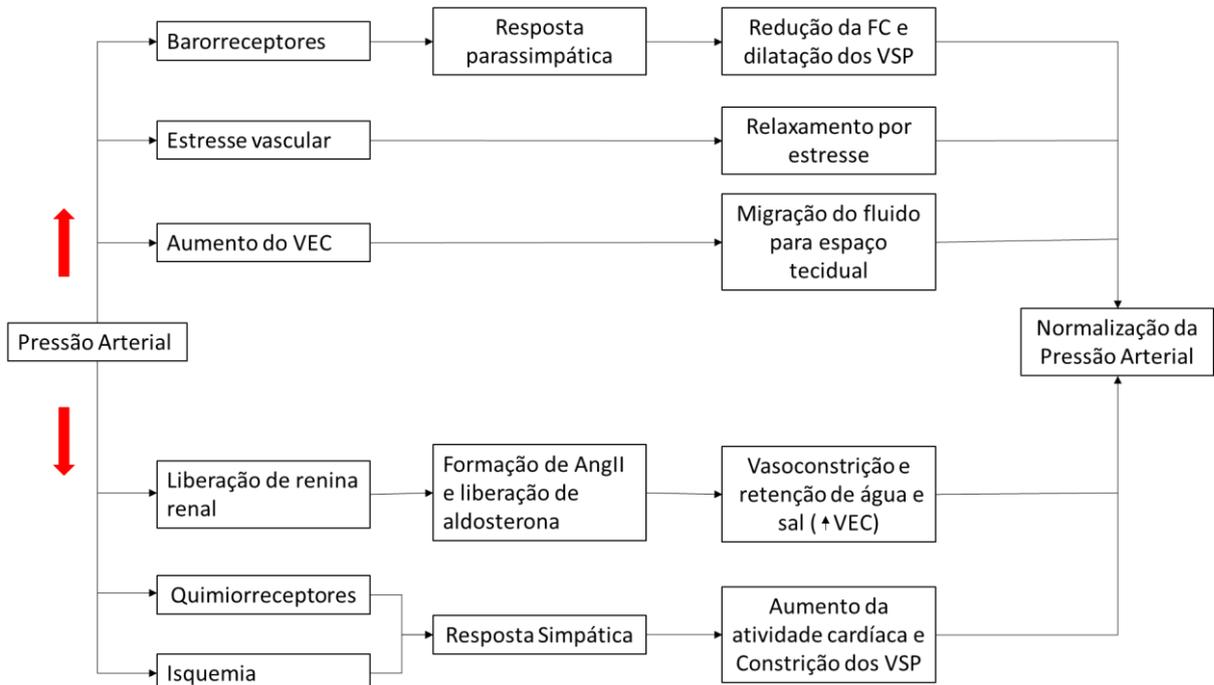
Regulação vascular:

- Relaxamento por estresse: quando a PA atinge níveis muito elevados, os vasos sanguíneos ficam estirados, gerando um fenômeno de relaxamento por estresse que leva a uma diminuição da PA. (GUYTON & HALL, 2006)
- Troca de fluido capilar: Quando ocorre aumento da PA por aumento de fluido extravascular, a pressão hidrostática dos capilares também fica elevada, isso faz com que os fluidos passem da circulação para o espaço tecidual, levando a redução do fluido capilar gerando redução da pressão arterial. (GUYTON & HALL, 2006)
- Sistema renina angiotensina (SRA) hormonal: Com a redução da PA o rim libera renina para a circulação. Esta hidrolisa o angiotensinogênio (AGT), formando angiotensina I (Ang I), substrato da enzima conversora de angiotensina (ECA), formando angiotensina II (Ang II). Ang II, desempenha um papel vasoconstritor e associado à liberação de aldosterona que promove o aumento da reabsorção renal de Na<sup>+</sup>. (SILVERTHORN, 2010; MENDOZA & LAZARTIGUES, 2015)

Regulação renal:

- Controle renal dos fluidos: quando ocorre o decaimento da PA, os rins reduzem a eliminação de sal e água, através de sistemas hormonais anti-natriuréticos e anti-diuréticos (principalmente o SRA), acumulando líquido extracelular e elevando a PA. (GUYTON & HALL, 2006)
- Aldosterona: com a redução da PA, ocorre um aumento da liberação de aldosterona pela Ang II. Esta atua sobre os túbulos renais levando a um aumento na reabsorção Na<sup>+</sup>. O aumento da osmolaridade plasmática ativa a liberação do hormônio antidiurético (ADH) pela hipófise, promovendo a retenção de água, e em

último caso o aumento da PA. (SILVERTHORN, 2010; MENDOZA & LAZARTIGUES, 2015)



**Figura 3:** Esquema representativo dos mecanismos de regulação da pressão arterial. Onde FC: Frequência Cardíaca; VSP: Vasos Sanguíneos Periféricos; AngII: Angiotensina II VEC: Volume Extracelular.

Como mencionado anteriormente, o  $\text{Na}^+$  desempenha um papel importante na regulação da PA. O alto consumo de  $\text{Na}^+$  ativa mecanismos centrais de sede que, associado ao aumento da osmolaridade plasmática, promove a expansão do VEC e, em última análise, ao aumento do peso corporal. Esta expansão do VEC ativa respostas hemodinâmicas renais e hormonais aumentando a pressão de perfusão renal e a excreção renal de  $\text{Na}^+$ . Desta forma, a PA é mantida constante, frente a uma faixa de quantidade de  $\text{Na}^+$  ingerida. Por outro lado, quando a quantidade de  $\text{Na}^+$  ingerida ultrapassa esta faixa, ou se a ingestão elevada de  $\text{Na}^+$  é constante por um longo período, os mecanismos regulatórios renais são perdidos e o aumento do VEC leva, em última instância, ao aumento do débito cardíaco e da PA (GUYTON & HALL, 2006). A hipertensão se estabelece e se agrava com o aumento da resistência vascular periférica (RVP) sustentada pela ativação errônea do sistema nervoso simpático (GUYTON, 1992).

Recentemente foi demonstrado que nem todo  $\text{Na}^+$  ingerido é osmoticamente ativo, ou seja, aumenta diretamente o VEC. O  $\text{Na}^+$  também pode se acumular em

tecidos como pele e músculo através da ligação com glicosaminoglicanos (GAGs) e ácido hialurônico sem promover a retenção de fluido. Esses componentes da matriz extracelular apresentam características polianiónicas com cargas negativas ao longo de sua estrutura que permite que os íons com cargas positivas, como o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$ , se acumulem formando um estoque osmoticamente inativo (TITZE & MACHNIK, 2010). Estes GAGs funcionam como um tampão, não permitindo que ocorra grandes alterações na concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático, apesar da aumentada ingestão de  $\text{Na}^+$ , impedindo a variação de VEC e consequente aumento na PA (MACHNIK *et al*, 2009)

### 1.2.3. Hipertensão sensível ao sal

A alta ingestão de sal está relacionada com aumento da PA, porém a intensidade da elevação é variável. A sensibilidade ao sal é definida como um aumento da PA superior a 10 mmHg quando ocorre a ingestão de uma dieta hipersódica precedida de uma depleção do sódio (dieta com baixo sódio ou uso de diuréticos) (WEINBERGER, 1996a).

Estudo realizado na população japonesa mostrou que a DCV acontece com mais frequência em pessoas sensíveis ao sal e, este, por si só, é um fator de risco para o seu desenvolvimento (MORIMOTO *et al*, 1996). Um outro estudo mostrou que indivíduos sensíveis ao sal apresentam maiores taxas de mortalidade independentemente do aumento da pressão arterial (WEINBERGER *et al*, 2001).

A sensibilidade ao sal está relacionada diretamente com a idade, 50% dos hipertensos com mais de 40 anos e 80% dos com mais de 60 anos apresentam sensibilidade ao sal. É principalmente detectada em indivíduos afrodescendentes, obesos, com síndrome metabólica ou doença renal crônica. Indivíduos normotensos sensíveis ao sal apresentam maior probabilidade de desenvolverem a HA (BOMBIG *et al*, 2014).

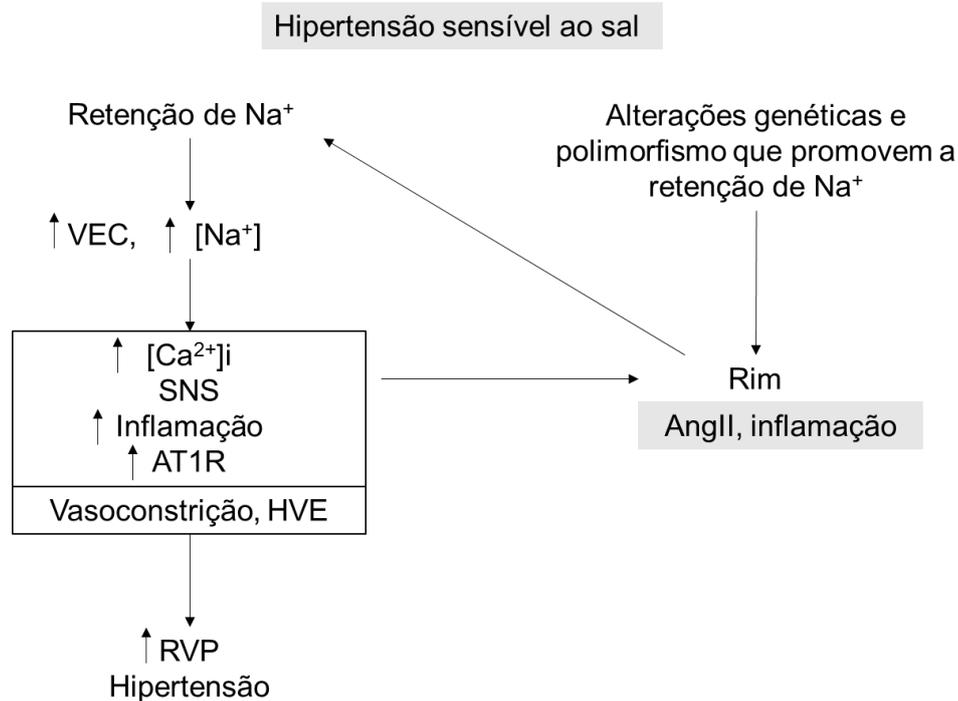
Ainda não existe um preciso mecanismo que explique a sensibilidade ao sal, porém alguns fatores podem ser responsáveis pela sensibilização da PA ao consumo de  $\text{Na}^+$  (WEINBERGER, 1996b) (Figura 4):

- Função renal: Pacientes hipertensos sensíveis ao sal apresentam um ritmo de filtração glomerular (RFG) maior que os resistentes ao sal. Associado a isso ocorre também uma redução no fluxo sanguíneo renal, com o aumento da pressão intraglomerular, da albuminúria e da fração filtrada. Existem hipóteses que

apontam para a ocorrência da redução no número de nefrões ou na área de superfície glomerular (PARMER *et al*, 1994; CAMPESE *et al*, 1991; BIGAZZI *et al*, 1994; WEDLER *et al*, 1992; BRENNER & ANDERSON, 1992).

- Peptídeo atrial natriurético (ANP, do inglês *atrial natriuretic peptide*): Este peptídeo é liberado em resposta à hipervolemia e atua nos néfrons promovendo a excreção de sal e água. Indivíduos hipertensos sensíveis ao sal apresentam menores valores de ANP quando comparados com os resistentes ao sal, porém isso não é uma realidade para todos os hipertensos dessa classe (WEINBERGER, 1996b).
- Sistema nervoso simpático: A dopamina está associada a natriurese e o bloqueio dos receptores da dopamina ou da produção da mesma a partir do seu precursor a dopa, podem atenuar a resposta natriurética. Foi demonstrado que em resposta a uma dieta com alto sal, hipertensos sensíveis ao sal apresentam uma menor excreção urinária de dopamina, sugerindo que o sistema dopaminérgico possa estar alterado nesses casos (GILL *et al*, 1991).
- Receptores  $\beta$ -Adrenérgicos: A ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos promovem aumento da frequência cardíaca e da força de contração além de estar envolvido no processo de vasodilatação. Foi identificado que o fibroblasto de pacientes hipertensos sensíveis ao sal apresentam uma menor quantidade de receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos e que esse fato está relacionado com a variação da PA em resposta ao aumento do consumo de  $\text{Na}^+$  (KOTANKO *et al*, 1992).
- Fatores Genéticos: Diversas alterações genéticas podem ocorrer para contribuir com a sensibilidade ao sal. Mutações em canais de  $\text{Na}^+$ , ou em proteínas renais podem resultar em uma desregulação do metabolismo do  $\text{Na}^+$  (RODRIGUEZ-ITURBE & VAZIRI, 2007).
- Inflamação: Estudos em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) mostraram que a inibição do NF- $\kappa$ B melhora a hipertensão levando a crer que a inflamação intra-renal exerce um papel importante na fisiopatologia da hipertensão sensível ao sal (RODRÍGUEZ-ITURBE *et al*, 2005).
- Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA): Apesar do aumento extracelular de NaCl deprimir o SRA em indivíduos normotensos (INGELFINGER *et al*, 1986), tem sido postulado que a ativação inapropriada e sustentada do SRA está envolvida nos efeitos adversos do sal. Este evento é corroborado pelo fato de que seu bloqueio farmacológico previne ou melhora os danos renais induzidos

pelo Na<sup>+</sup> (VARAGIC *et al*, 2008). Susic e colaboradores (2011), demonstraram que a atividade do SRA em ratos SHR não é suprimida após 4 semanas de alta ingestão de Na<sup>+</sup> indicando a manutenção da atividade do SRA e contribuindo para a exacerbação do dano renal observado no rato SHR. Atribui-se ao SRA intrarenal essa ativação inapropriada e sustentada (MAITLAND *et al*, 2006; MATAVELLI *et al*, 2007), uma vez que a ativação do SRA sistêmico pela baixa ingestão de sal não leva ao aumento do angiotensinogênio (AGT) e da angiotensina II (Ang II) intratubular e no dano renal (SHAO *et al*, 2013). Além disso, existem relatos de que ocorra uma redução da atividade da renina plasmática assim como uma redução nos níveis de aldosterona em pessoas sensíveis ao sal (GERDTS *et al*, 1994). Nosso grupo demonstrou que a dieta rica em Na<sup>+</sup> administrada a ratos Sprague-Dawley por 2 semanas exacerba a hipertensão dependente de Ang II onde foram observados sintomas de hipertensão maligna (LARA *et al*, 2012). A elevada ingestão de Na<sup>+</sup> estimula inapropriadamente a atividade intrarenal do SRA (devido ao aumento dos níveis de angiotensinogênio urinário) apesar da sua inibição sistêmica (pela inibição da atividade da renina plasmática). Franco e colaboradores (2007) demonstraram que a pressão arterial apresenta uma correlação positiva com a concentração renal de Ang II, mas não a plasmática. Em conjunto a isso um maior consumo de sal promove o aumento dos receptores de Ang II do tipo 1 (AT1R) que quando ativados promovem vasoconstrição (RUAN *et al*, 1997).



**Figura 4:** Mecanismos da fisiopatologia da hipertensão sensível ao sal. Onde: AngII: Angiotensina II; VEC: Volume Extracelular; SNS: Sistema Nervoso Simpático; AT1R: receptores de Ang II do tipo 1 ; HVE: Hipertrofia Ventricular Esquerda; RVP: Resistencia Vascular Periferica. Adaptado de: RODRIGUEZ-ITURBE & VAZIRI, 2007.

### 1.3. Os Rins como órgãos alvo da HA

Por todo exposto anteriormente, os rins são órgãos altamente irrigados e responsáveis pelo ajuste corporal de  $\text{Na}^+$  e, portanto, qualquer alteração da pressão arterial afeta a sua função. De fato, a HA e os rins apresentam caráter ambivalente uma vez que disfunções renais podem causar a hipertensão e ao mesmo tempo a hipertensão pode diminuir a função dos rins. Desta forma, estabelece-se um ciclo vicioso que, na ausência de uma assistência clínica adequada, culmina na perda do órgão (LEVEY *et al*, 2003).

A doença renal crônica (DRC) é definida pela perda progressiva e irreversível da função dos rins associada à lesão tecidual. É uma doença de progressão lenta e assintomática até que o funcionamento dos rins seja menor que um décimo do normal (JUNIOR, 2004). Em sua fase mais avançada (chamada de fase terminal de insuficiência renal crônica - IRC), os rins já não funcionam e o paciente necessita de uma terapia de substituição renal (TSR) como diálise, hemodiálise, transplante (BASTOS *et al*, 2004). A utilização da terapia celular pode ser uma estratégia preventiva para a TSR, mas ainda é questionável.

No Brasil estima-se que existam cerca de 10 milhões de portadores de DRC e em torno de 24% desses pacientes apresentam HA. O gasto com o programa de diálise e transplante renal no Brasil é em torno de 1,4 bilhões de reais ao ano (JUNIOR, 2004; BASTOS *et al*, 2004). Desta forma, o entendimento dos mecanismos associados ao Na<sup>+</sup> isoladamente e como eles são influenciados pelo aumento da pressão induzido pelo aumento do volume plasmático são necessários para o desenvolvimento de uma farmacoterapia eficiente e que previna a perda do rim. Para melhor compreensão da relação do trinômio hipertensão – rim – sal é necessário conhecer a fisiologia renal.

### **1.3.1. Fisiologia dos rins:**

Os rins são órgãos altamente vascularizados recebendo aproximadamente 25% do débito cardíaco, o que corresponde a 0,5% do peso corpóreo (MELLO-AIRES, 2008). No indivíduo adulto os rins filtram aproximadamente 180 L de sangue por dia, onde 99% dos eletrólitos, solutos e fluidos são reabsorvidos e retornam à circulação. Apenas 1% do filtrado é excretado na forma de urina (ZHUO & LI, 2013). Estas características permitem ao rim exercer, além da sua função primordial de eliminação de fármacos, toxinas e produtos do metabolismo que não apresentam mais utilidade para o organismo, a manutenção da homeostase corporal. Desta forma os rins mantêm a composição do meio interno dentro de uma estreita faixa de variação e realizam o ajuste do equilíbrio ácido-básico, da tonicidade, do volume do fluido extracelular e o controle a longo prazo da pressão arterial (MOE *et al.*, 2004; KHANNA & KURTZMAN, 2006; MOE & HUANG, 2006). Os rins apresentam um papel secretor importante para algumas funções do organismo. Eles são responsáveis pela secreção de eritropoietina que é responsável pela estimulação da síntese de hemácias. Eles produzem também calcitriol (1,25 dihidroxi vitamina D<sub>3</sub>) que é importante na absorção de cálcio pelo trato gastrointestinal assim como pela sua deposição nos ossos. E ainda liberam substâncias vasoativas como a renina, enzima que dá início à cascata de proteólise do SRA, além da própria Ang II que está relacionada com o controle da PA como mencionado anteriormente (GUYTON & HALL, 2006; ZHUO & LI, 2013; PRIETO-CARRASQUERO *et al*, 2009).

### 1.3.2. Estrutura e localização:

Os rins localizam-se na parte posterior do abdômen fora da cavidade peritoneal. Na sua porção medial eles apresentam uma região chamada de hilo por onde passam as veias, artérias, vasos linfáticos, suprimento nervoso e ureter. Eles são envoltos por uma capsula fibrosa que apresenta a função de proteger as estruturas internas (GUYTON & HALL, 2006).

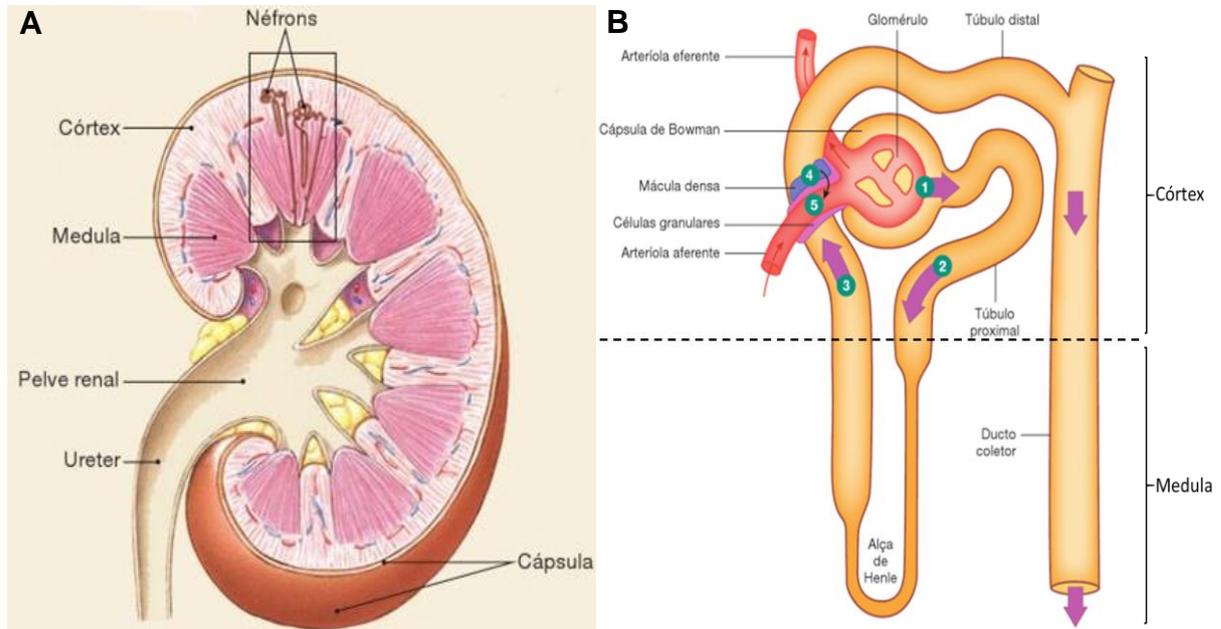
O parênquima renal é dividido em duas partes: uma mais externa, denominada região cortical ou córtex renal e uma mais interna, chamada de região medular ou medula (Figura 5A). Cerca de 90% do fluxo sanguíneo renal é distribuído pela camada cortical e apenas 10% se distribui pela região medular (PRIETO-CARRASQUERO *et al*, 2009).

A unidade morfofuncional dos rins é o néfron. Cerca de aproximadamente 1,2 milhões de néfrons compõem cada rim, que funcionam de forma independente (SOUZA & ELIAS, 2006). Os néfrons não se regeneram e, portanto, a idade, doenças e lesões no órgão diminuem a função do rim. Estima-se que cerca de 10% dos néfrons sejam perdidos a cada 10 anos após os 40 anos de idade (GUYTON & HALL, 2006).

O néfron é a unidade responsável por filtrar o sangue, reabsorver os eletrólitos, solutos e fluidos ultrafiltrados, e excretar o excesso de eletrólitos e água. Ele é composto por uma parte vascular composta pelo corpúsculo renal, constituído pelo glomérulo (tufos de capilares) envolvido pela cápsula de Bowman, e uma parte tubular dividida em túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e o ducto coletor (Figura 5B). A camada cortical do rim é constituída principalmente pelos glomérulos, túbulos proximais e distais dos néfrons. Já a camada medular é constituída principalmente pela alça de Henle e túbulos coletores, que se juntam em túbulos maiores até formarem a pelve renal (SOUZA & ELIAS, 2006). O glomérulo é o responsável pela filtração do sangue que chega aos rins, e os segmentos tubulares por reabsorver os eletrólitos, solutos e água do ultrafiltrado de volta a circulação, além de secretar H<sup>+</sup>, ácidos, substâncias estranhas e amônia (SELDIN D & GIEBISCH G, 2008).

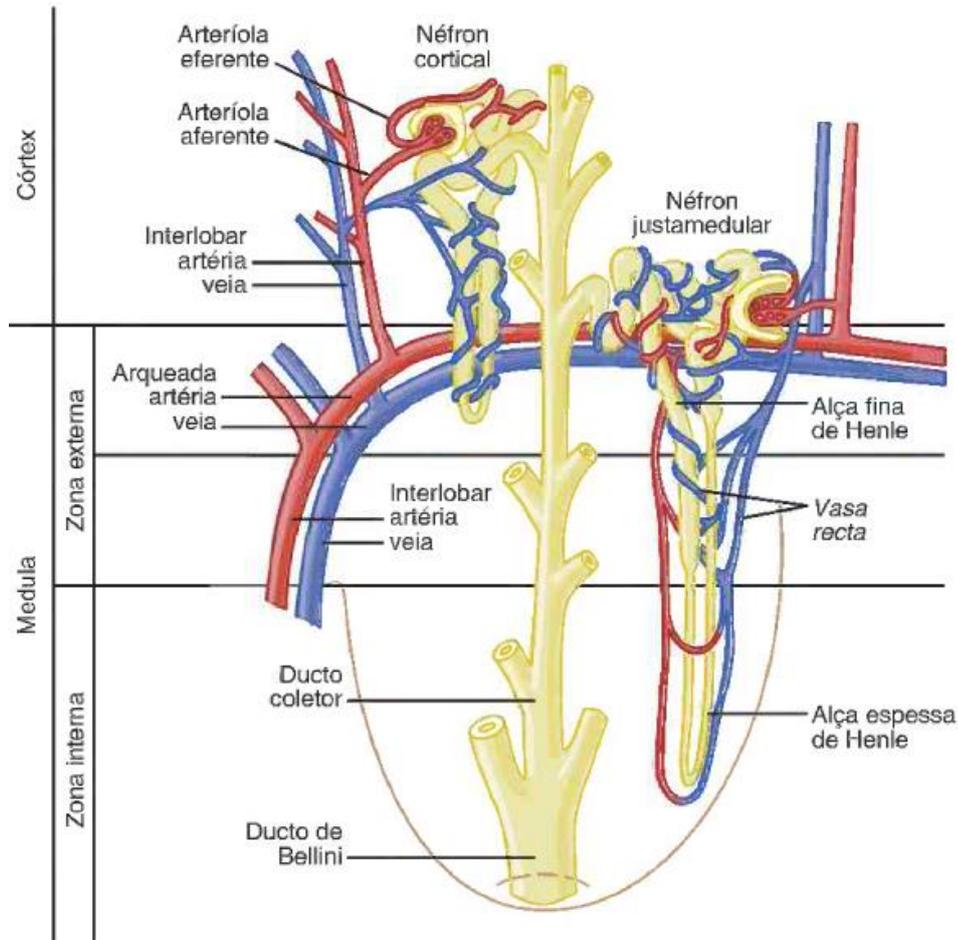
O processo de formação da urina se inicia no glomérulo, onde o sangue é filtrado, formando o ultrafiltrado. Este percorre os segmentos tubulares, onde ocorrem processos de reabsorção (de água e solutos necessários ao organismo que retornam ao sangue) e secreção (no qual solutos em excesso no organismo são

adicionados à luz do túbulo para serem excretados na urina). No final desses segmentos a urina estará formada (MELLO-AIRES, 2008).



**Figura 5:** Organização dos rins. Em A, morfologia geral dos rins mostrando a divisão do parênquima renal em córtex e medula. Em B, a estrutura da unidade morfofuncional renal (néfron) destacando a localização de suas estruturas no parênquima renal. Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2010.

Os néfrons podem ser classificados dependendo de quão profundo ele esteja no parênquima renal. A maioria dos néfrons apresenta glomérulos presentes na camada cortical do rim. Eles são chamados de néfrons corticais e possuem alça de Henle curta chegando apenas em uma pequena extensão da medula. Cerca de 20 a 30% do néfrons apresentam glomérulos mais próximos da medula e são denominados néfrons justamedulares. Eles apresentam uma alça de Henle mais longa que vai até o interior da medula, sendo os principais responsáveis pelo mecanismo de concentração urinária (Figura 6).



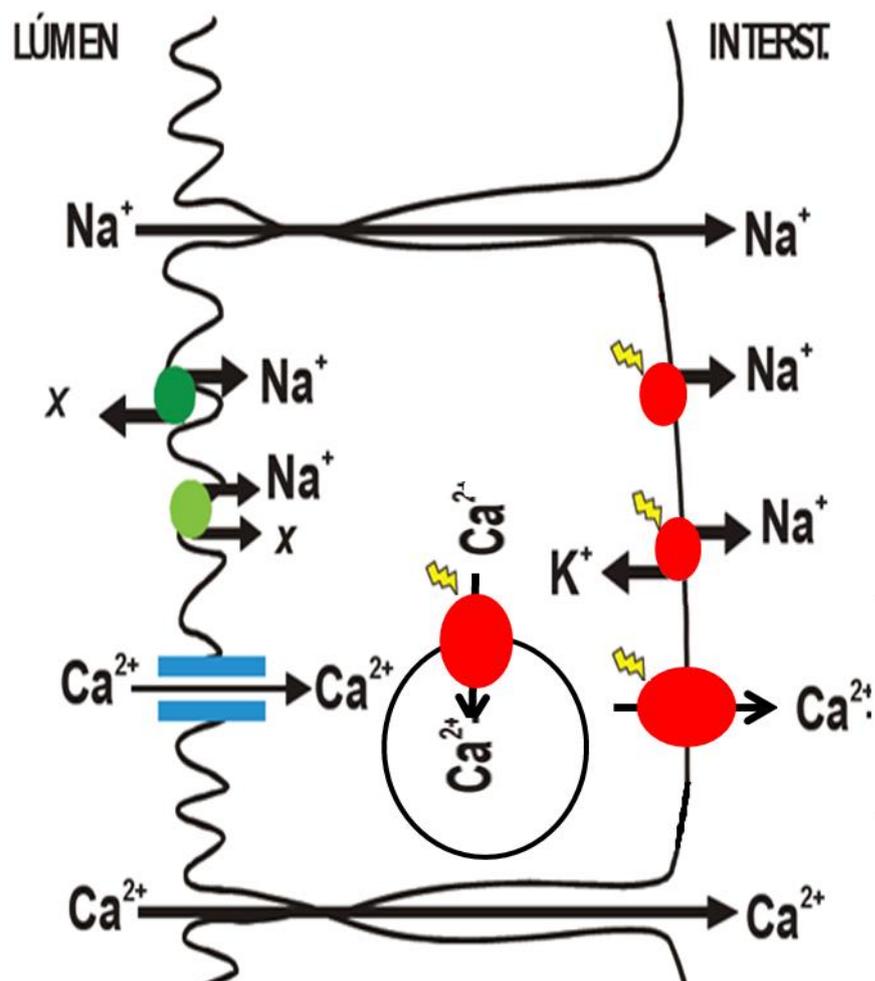
**Figura 6:** Representação esquemática dos néfrons quanto a sua localização no parênquima renal. Fonte: GUYTON & HALL, 2011

### 1.3.3. Túbulo proximal

O túbulo proximal é a primeira porção tubular dos néfrons e é responsável por reabsorver aproximadamente 65% de água e solutos filtrados como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ , e glicose, aminoácidos e proteínas de baixo peso molecular. Dessa forma qualquer pequena alteração no processo de reabsorção no túbulo proximal pode contribuir para grandes alterações no conteúdo e volume do meio extracelular (MELLO-AIRES, 2008; ZHUO & LI, 2013). A maioria das doenças renais agudas e crônicas se manifestam primeiramente causando algum distúrbio no túbulo proximal. Devido a seu grande número de transportadores e a sua enorme necessidade energética para que tudo funcione, as células do túbulo proximal são altamente sensíveis a lesões e processos isquêmicos oriundos de doenças renais. Danos nas células epiteliais do túbulo proximal renal são o primeiro passo na progressão da doença crônica renal (NAKHOUL & BATUMAN, 2011; WALSH & UNWIN, 2012).

Esse segmento é formado por um epitélio cúbico simples, e suas células são unidas por junções do tipo aderentes (“tight junctions”) (DAVIES *et al*, 2001), que criam uma barreira seletiva à passagem paracelular de água e solutos pelo epitélio. Estas junções também permitem que a membrana plasmática se torne polarizada, sendo dividida em duas porções: a membrana luminal ou apical e a membrana basolateral. Estas membranas apresentam composição de transportadores e redes regulatórias diferentes (ANDERSON, 2001).

A reabsorção tubular de  $\text{Na}^+$  depende diretamente da atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ , havendo uma correlação direta entre sua distribuição e abundância e a capacidade de reabsorção de  $\text{Na}^+$  nos diferentes segmentos do néfron, sendo 60% da carga filtrada é reabsorvida (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). A  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  está localizada na membrana basolateral, gerando um gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  favorável à sua entrada pela membrana luminal. Esse gradiente é utilizado para o transporte de outros solutos (tais como glicose, aminoácidos,  $\text{H}^+$  e solutos orgânicos) através de diferentes transportadores ativos secundários (MELLO-AIRES, 2008) (Figura 7). Entretanto, o transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  não é realizado exclusivamente pela  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Uma segunda bomba de  $\text{Na}^+$ , denominada  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  foi inicialmente descrita na década de 70 (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). Este transportador de sódio se difere bioquimicamente da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  por ser insensível ao  $\text{K}^+$  e a ouabaína, além de apresentar sensibilidade à furosemida (PROVERBIO *et al*, 1991). As redes de sinalização intracelular que regulam a atividade das duas bombas também parecem ser diferentes (CARUSO-NEVES *et al*, 1997; CARUSO-NEVES *et al*, 2004), de forma que a atividade da  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  está aumentada em ratos espontaneamente hipertensos (QUEIROZ-MADEIRA *et al*, 2010). Recentemente, esta enzima foi isolada e clonada (ROCAFULL *et al*, 2011; CARUSO-NEVES *et al*, 2002; FÉRAILLE & DOUCET, 2001). A reabsorção de água acompanha a de  $\text{Na}^+$  através das células por canais de água presente que permitem que a água seja reabsorvida do ultrafiltrado de volta aos capilares peritubulares. Assim sendo, a regulação do volume extracelular ocorre nos rins, através da regulação das atividades das bombas de  $\text{Na}^+$  no túbulo proximal (NIELSEN *et al*, 2002).



**Figura 7:** Esquema representativo da célula de túbulo proximal. A reabsorção dos íons sódio e cálcio podem ocorrer por duas vias: a paracelular, que ocorre entre as células e a via transcelular, que ocorre através das células. Nesta última via, os solutos atravessam duas barreiras: a membrana luminal e a membrana basolateral. Esse transporte vetorial é dependente de ATPases que geram um gradiente eletroquímico, favorecendo a entrada luminal de solutos por meio de canais iônicos ou transportadores ativos secundários presentes, exclusivamente, na membrana luminal.

Uma das principais redes regulatórias que modulam o transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  é aquela que envolve o  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensageiro intracelular. O  $\text{Ca}^{2+}$  é reabsorvido no túbulo proximal principalmente pela via paracelular (cerca de 2/3) sendo apenas 1/3 por via transcelular. Existem duas ATPases transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  que mantêm o gradiente eletroquímico favorável à entrada do íon através de canais iônicos presentes na membrana luminal. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA), bombeia esse íon do citoplasma para o interstício, sendo responsável pelo transporte transepitelial de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), é a responsável por bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma para dentro do retículo, contra seu gradiente de concentração. Em conjunto, as duas ATPases mantêm baixas as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma (na faixa nM).

A rápida mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular ativa vias de sinalização que promovem o aumento da reabsorção proximal de  $\text{Na}^+$  (IBARRA *et al*, 2002).

#### **1.3.4. Medida da função renal:**

A medida do ritmo de filtração glomerular (RFG) é o padrão ouro para a avaliação da função renal. O RFG é igual à soma da taxa de filtração de todos os néfrons. Uma redução da RFG pode ser devido à perda do número de néfrons ou diminuição da filtração de todos, por fenômenos fisiológicos ou farmacológicos (NUNES, 2007).

Não é possível medir o RFG diretamente, mas sim estimá-lo pela depuração urinária de um marcador ideal de filtração (que não seja reabsorvido, metabolizado e nem secretado no rim), como a inulina. Nestas condições, a concentração plasmática da inulina depende diretamente da depuração renal. Desta forma, a quantidade de inulina detectada na urina é similar à quantidade no plasma (NUNES, 2007). Uma vez que a utilização da inulina é um método invasivo, os métodos mais comumente utilizados são concentração da creatinina sérica ou a depuração da creatinina endógena (DCE) como estimativa do RFG. A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo e não reabsorvida nem metabolizada pelo rim. Entretanto, de 10% a 40% da creatinina urinária é derivada da secreção tubular de cátions orgânicos no túbulo proximal, sendo mais significativa quanto menor estiver a RFG (NUNES, 2007). A dosagem de ureia plasmática foi um dos primeiros métodos utilizados para avaliação da função renal. Porém sua utilização não é totalmente adequada uma vez que a ureia não é produzida constantemente durante o dia e sua concentração varia de acordo com a ingestão de alimentos ricos em proteínas, sangramentos gastrointestinais e uso de medicamentos. Além disso, ela é parcialmente reabsorvida (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011).

Na avaliação de outras funções dos rins, além da filtração glomerular, a investigação por proteinúria e microalbuminúria traz informações importantes como indicativo de lesão renal. A presença de proteinúria é um fator indicativo de nefropatia e insuficiência renal crônica (KIRSZTAJN, 2009).

O curso da DRC é frequentemente assintomático, até que a doença atinja seu estágio avançado, o que resulta na busca de cuidados médicos quando já apresenta uma ou mais complicações da doença. A ausência de sintomas nos estágios iniciais da DRC exige que sempre se mantenham suspeitas da possibilidade de existência da

doença. Qualquer alterações funcional, em especial no RFG e proteinúria, são importantes no diagnóstico e classificação da DRC.

<b>Tabela 2 - Estadiamento da doença renal crônica (DRC)</b>		
<b>Estágios da DRC</b>	<b>Ritmo de filtração glomerular (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Proteinúria</b>
1	≥ 90	Presente
2	60-89	Presente
3A	45-59	Presente ou ausente
3B	30-44	Presente ou ausente
4	15-29	Presente ou ausente
5	<15	Presente ou ausente

Fonte: BASTOS MG & KIRSZTAJN GM, 2011

### 1.3.5. Sinalização do sódio

A maneira como a entrada de Na<sup>+</sup> em células não excitáveis, como as do epitélio tubular renal, ativa vias de sinalização específicas ainda não é totalmente compreendida embora existam indícios de que o Na<sup>+</sup> altere vias de sinalização intracelular específicas. Fisiologicamente, o aumento intracelular de Na<sup>+</sup> está associado com aumento da atividade da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase, porém não é o íon Na<sup>+</sup> *per se* o responsável por essa elevação. Foi descrita em células do túbulo proximal a presença de uma proteína cinase cuja a atividade é induzida por sal, denominada cinase induzida por sal (SIK, do inglês *salt-inducible kinase*) (OKAMOTO *et al*, 2004).

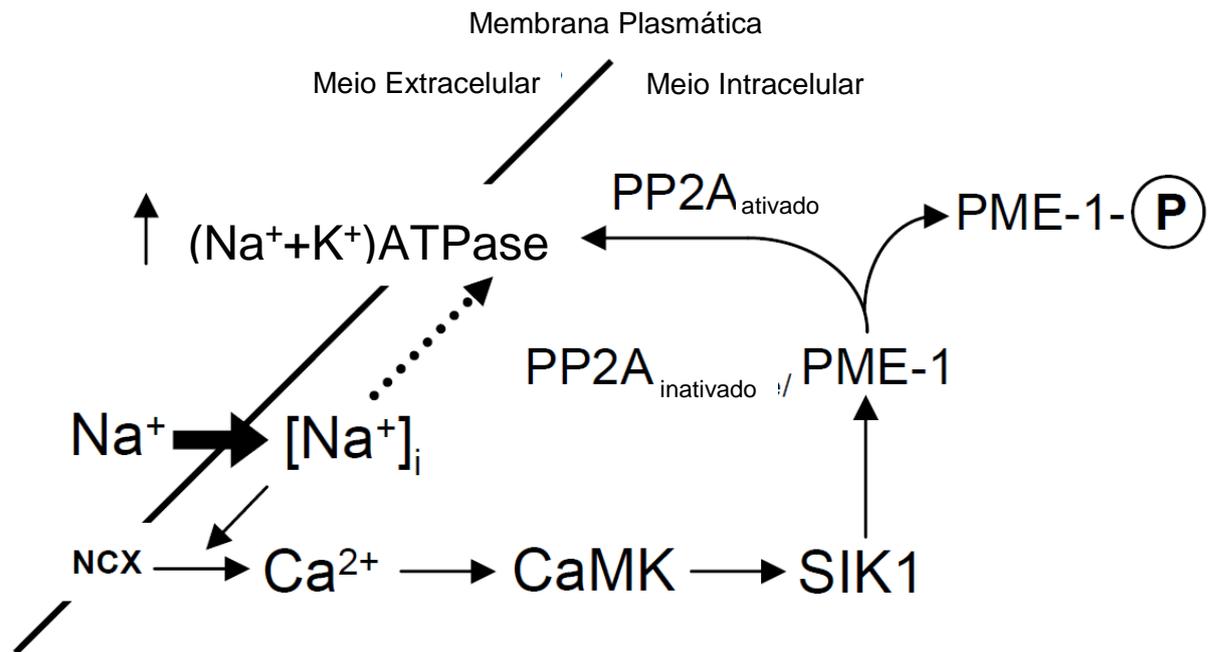
A SIK é um proteína cinase da família das proteínas cinases ativadas por AMP (AMPK) e foi originalmente encontrada nas glândulas suprarrenais onde está associada à regulação da expressão de enzimas esteroidogênicas (OKAMOTO *et al*, 2004). São descritas três isoformas de SIK que apresentam funções específicas variáveis de acordo com o tecido que são expressas. Por exemplo, no tecido adiposo a SIK2 está envolvida na regulação do metabolismo energético (OKAMOTO *et al*, 2004) enquanto que nos pulmões a SIK1 é descrita como sendo importante para a ação β-adrenérgica relacionada com o tratamento edema pulmonar (ENELING *et al*, 2011). A SIK1 está envolvida na diferenciação de cardiomiócitos e no desenvolvimento do coração desempenhando um papel central na regulação da

proliferação e diferenciação de células cardíacas (ROMITO *et al*, 2010). Ainda a nível cardíaco, estudo realizado em cultura de células mostrou que o aumento da concentração intracelular de sódio pode provocar a ativação de fatores de transcrição e genes associados tanto com o crescimento cardíaco normal quanto hipertrofia de cardiomiócitos em um mecanismo dependente da ativação da SIK1 (POPOV *et al*, 2012). Já a SIK2 foi demonstrada como responsável por eventos celulares/moleculares em miócitos que levam ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda (POPOV *et al*, 2014).

A SIK atua como um reguladora da expressão de E-caderina, uma molécula de adesão celular importante na polarização das células, sendo importante para a integridade, manutenção, e função de polarizada dos epitélios (pulmonar, renal e intestinal) (ENELING *et al* 2012).

Sabe-se que o aumento da concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ) acarreta no aumento da atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  (THERIEN & BLOSTEIN, 2000) . De maneira oposta ao que se havia pensado, a  $[\text{Na}^+]_i$  não ativa diretamente a atividade da ATPase. No cerne desta ativação se encontra a SIK e uma cascata de sinalização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (SJÖSTRÖM *et al* 2007).

Inicialmente, o aumento gradual da  $[\text{Na}^+]_i$  induzido pela monensina (um ionóforo de  $\text{Na}^+$ ) através de diferentes tempos de incubação em células de túbulo proximal de gambá (OK) leva a uma lentificação e possível inversão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Com isso, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta levando à ativação da proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMK). Esta enzima fosforila e ativa a SIK, que por sua vez fosforila a proteína fosfatase metilesterase-1 (PME-1). Uma vez fosforilada PME-1 se dissocia da proteína fosfatase 2A (PP2A) que, quando liberada, desfosforila a subunidade  $\alpha$  da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ . O resultado final é o aumento da atividade da enzima (Figura 8) (SJÖSTRÖM *et al* 2007).



**Figura 8:** Provável mecanismo de ação pelo qual a atividade da  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  é aumentada em resposta a alterações intracelulares de  $\text{Na}^+$ . Onde:  $\text{CaMK}$ : proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina;  $\text{PME-1}$ : proteína fosfatase metilesterase-1;  $\text{PP2A}$ : proteína fosfatase 2A;  $\text{SIK}$ : Proteína cinase induzida por sal. Fonte: Adaptado de SJÖSTRÖM et al 2007.

Neste contexto, algumas perguntas ainda não foram respondidas:

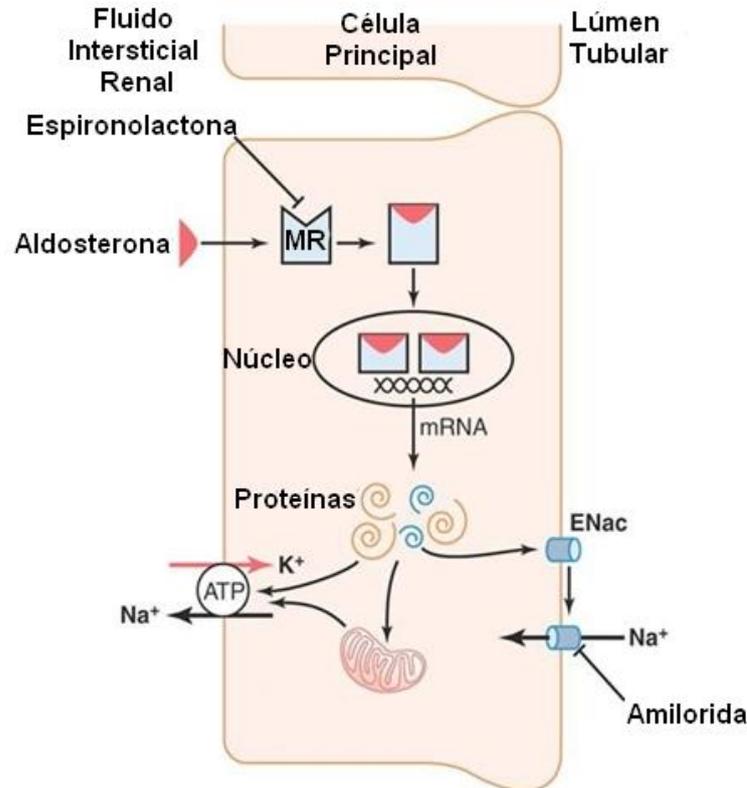
- Como o aumento do  $\text{Na}^+$  no compartimento extracelular acarreta o aumento do  $[\text{Na}^+]_i$ ? O trabalho de SJÖSTRÖM e colaboradores (2007) promove o  $[\text{Na}^+]_i$  com o uso de um ionóforo específico, a monensina. *In vivo*, os transportadores ativos secundários renais poderiam agir como sensores da concentração luminal de  $\text{Na}^+$ . FRINDT & PALMER (2009) investigaram a abundância das proteínas transportadoras de  $\text{Na}^+$  na membrana luminal de rim de rato através da biotinizilação *in situ* e imunodeteção em resposta ao conteúdo de  $\text{Na}^+$  na dieta. Quando ratos Sprague-Dawley foram submetidos a uma dieta rica em  $\text{Na}^+$  por uma semana, a expressão na superfície da membrana luminal dos co-transportadores  $\text{Na}^+\text{/Cl}^-$  e  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{/2Cl}^-$  e do trocador  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  não se alteraram. Por outro lado, foi observado um aumento da expressão da subunidade  $\beta$  do canal de sódio sensível a amilorida ( $\text{ENaC}$ ) e a detecção da forma clivada da subunidade  $\gamma$ . Mais recentemente foi demonstrado que na dieta contendo alto sal este canal, apesar da sua expressão aumentada, se encontra na forma fechada pela ação de receptores purinérgicos  $\text{P2Y}_2$  (POCHYNYUK *et al*, 2010).

Assim, permanece desconhecido como as células renais detectam variações na concentração luminal de  $\text{Na}^+$ .

- O aumento da concentração luminal de  $\text{Na}^+$ , como consequência do aumento da ingestão de  $\text{Na}^+$  também acarreta na ativação de vias de sinalização intracelulares como aquelas descritas por SJÖSTRÖM e colaboradores (2007)?
- A ativação momentânea ou constante ocasionadas pelo aumento localizado da concentração de  $\text{Na}^+$  determina vias de sinalização associadas à lesão renal? Não se sabe se as alterações promovidas na homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  ou se a ativação da SIK, descritas anteriormente, estão envolvidas na evolução da lesão renal ou no desenvolvimento da HA.

#### **1.4. Modelo DOCA/Sal: um modelo clássico para responder questões atuais**

A utilização de mineralocorticoides para induzir a hipertensão é uma prática antiga com os primeiros relatos na década de 40. Nesses estudos SEYLE e colaboradores (1943) demonstraram que a administração de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) induz a hipertensão em ratos. Os mineralocorticóides são hormônios secretados pela zona glomerulosa do córtex das glândulas adrenais são responsáveis pelo ajuste da concentração plasmática de  $\text{K}^+$ , e evitar a perda rápida de  $\text{Na}^+$  e água (GUYTON AC & HALL JE, 2006). A aldosterona é o principal mineralocorticoide endógeno e exerce os seus efeitos ao se ligar ao receptor mineralocorticoide (MR). No rim a ativação dos receptores MR estimula a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e água e aumenta a excreção de  $\text{K}^+$  no ducto coletor (Figura 9). Fisiologicamente, a liberação de aldosterona é mediada pela Ang II que juntos promovem o aumento do volume plasmático e da pressão arterial. Em outros tecidos, como o cardíaco, a aldosterona promove o aumento da deposição de colágeno, favorecendo a fibrose e a hipertrofia (CONNELL & DAVIES, 2005).



**Figura 9:** Esquema representativo da ação da aldosterona nas células do túbulo distal. A aldosterona se liga ao seu receptor intracelular que ao ser ativado migra para o núcleo e promove a síntese da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$  e do ENaC aumentando a reabsorção de  $\text{Na}^+$ . Onde: MR: Receptor de mineralocorticoide; ENaC: Canal de sódio sensível a amilorida. Fonte: Adaptado de GUYTON & HALL, 2011

Ratos uninefrectomizados tratados cronicamente com DOCA e dieta com alto sal são um importante modelo de hipertensão dependente de volume (modelo DOCA/Sal). São utilizados ratos jovens pois são mais suscetíveis à hipertensão promovida por esse modelo. Os animais nessas condições desenvolvem uma hipertensão severa, associada a nefro-esclerose, necrose miocárdica focal, miocardite e periarterite. A severidade da hipertensão se correlaciona, diretamente, com o teor total de sódio na dieta (CARRETERO & ROMERO, 1977).

A fisiopatologia desse modelo não é totalmente conhecida porém está relacionada com a excessiva retenção de  $\text{Na}^+$  e água, com consequente aumento de volemia, além de uma reduzida atividade da renina plasmática. Nesse modelo a participação da vasopressina é essencial tanto a nível periférico, induzindo vasoconstrição, quanto a nível central, atuando em áreas hipotalâmicas relacionadas ao controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Além disso, fatores endógenos semelhantes à ouabaína podem estar inibindo a atividade da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ , reduzindo a reabsorção de sódio e favorecendo a excreção renal (ZICHA & KUNES, 1999). Os

animais apresentam o peso cardíaco aumentado em 30% e ocorrem alterações renais como proteinúria e glomerulosclerosis, além de alterações no endotélio (PINTO et al 1998).

Com a recente proposta de que o  $\text{Na}^+$ , per se, exerce efeitos teciduais independente do aumento do volume plasmático que contribuem para a progressão da hipertensão arterial, o modelo DOCA/Sal tem sido utilizado experimentalmente com o intuito de entender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença, comparando-se com modelos que não apresentam hipertensão apesar da elevada ingestão de sal.

## **2. Objetivo**

O objetivo central deste estudo é determinar o efeito exclusivo do aumento localizado de Na<sup>+</sup> sobre as células do túbulo proximal e a função renal elucidando os mecanismos moleculares associados, bem como a sua modulação pelo componente pressórico.

### **2.1. Objetivos específicos:**

Modelo *in vitro*: definir o efeito do aumento localizado e agudo Na<sup>+</sup> na face luminal da célula tubular proximal.

- Determinar a influência de altas concentrações de Na<sup>+</sup> localizadas na face luminal de células LLC-PK<sub>1</sub> sobre as atividades ATPásicas transportadoras de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>.

Modelo *in vivo*: investigar a influência do aumento do volume plasmático e da pressão arterial sobre o efeito da ingestão crônica de sal e a função renal.

- Determinar alterações da função renal promovidas exclusivamente pela alta ingestão crônica de sal
- Definir quais ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> são moduladas exclusivamente pelo aumento crônico no consumo de sal.
- Avaliar o envolvimento da SIK na ingestão crônica de sal e sua modulação pelo aumento do volume plasmático e da pressão arterial.

## **3. Métodos**

### 3.1. Materiais:

ATPNa<sub>2</sub>, ouabaína, Hepes, Tris, PMSF, furosemida, glicina, acrilamida, bis-acrilamida, inibidor de tripsina (tipo II-S), EDTA e albumina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, folin, DMSO, acrilamida, BIS-acrilamida, glicose, EDTA, fosfato de sódio hepta-hidratado, xilol, éter e álcool etílico foram obtidos de VETEC química, Xerém, Duque de Caxias, RJ.

Todos os outros reagentes foram do mais alto grau de pureza. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q pelo sistema (PURELAB Option-Q). O [32Pi] foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN, São Paulo, Brasil).

Os kits colorimétricos utilizados para quantificação de ureia, creatinina e proteinúria foram obtidos da Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil). O kit para dosagem de sódio plasmático foi obtido da In Vitro Diagnóstica Ltda. (Itabira, MG, Brasil).

O anticorpo anti-SIK produzido em coelho (catálogo: SAB500552) e o anticorpo monoclonal anti  $\beta$ -actina produzido em camundongo (catálogo: A5441) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), A membrana de nitrocelulose (Hybond) foi comprada da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, RU). O tampão de bloqueio e os anticorpos secundários IRDye® 680RD (catálogo:926-68073) e IRDye® 800CW (catálogo: 926-32212) foram obtidos da LI-COR Biosciences (NE, USA).

Os reagentes HRP, DAB, DAPI, Rodente Deacloker™, e o Rodent Block foram adquiridos na Biocare Medical (CA, USA). O anticorpo Alexa Fluor® 488 *anti-rabbit*, da Invitrogen.

As rações padrão e modificada com 4% de NaCl foram adquiridas na Rhooster Industria e Comércio Ltda. (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil).

### 3.2. Cultura de células

Células epiteliais de túbulo proximal de rim de porco imortalizadas (LLC-PK1 - ATCC® CL-101™) foram cultivadas em meio 199 suplementado com 3% de soro fetal bovino e mantidas em garrafas de plástico (TPP-25 cm<sup>2</sup>), a 37 °C, em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, por 72 h ou até atingirem o estado de confluência. Após isso,

as células foram repicadas e lavadas com PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM + NaCl 13,7 mM +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,7 mM + KCl 2,7 mM), a pH 7,5. As culturas lavadas foram então incubadas por 5 min em solução de tripsina em EDTA 0,5%. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio 199 com 3% de SFB e essa suspensão celular foi, então, distribuída em garrafas de cultura (FERRÃO *et al*, 2012).

Para os experimento, as células foram plaqueadas ( $5 \times 10^5$  células) e mantidas em meio 199 contendo SFB 3%, a 37 °C e 5%  $\text{CO}_2$  durante três dias até atingirem a confluência. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e a cultura lavada com PBS. As células foram incubadas por 60 min a 37 °C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  com soluções de diferentes concentrações de NaCl (140 e 170 mEq) e a osmolaridade foi mantida a 310 mOsm/Kg com manitol. Após a incubação das células nas diferentes condições, as células foram lavadas em PBS, raspadas das garrafas e transferidas para tubos Falcon (15 mL) e centrifugadas (1500 rpm por 2 min à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante ressuspensão em solução contendo EDTA 1 mM, HEPES-Tris 20 mM pH 7,0, sacarose 250 mM e inibidor de tripsina 0,15 mg/mL. As células ressuspensas na solução foram então lisadas com um homogeneizador do tipo Potter e pistilo de teflon por 10 vezes. O lisado celular foi mantido em gelo para a preservação das proteínas. A concentração de proteína e a atividade ATPásica do lisado celular foram medidas no mesmo dia. A concentração de proteína foi dosada segundo o método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando a albumina bovina como padrão.

### 3.3. Modelo DOCA/Sal:

O protocolo para a manipulação de ratos Wistar machos foi realizado segundo as normas de boa prática em pesquisa e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro IBCCS087. Os ratos foram mantidos durante o período de estudo em um biotério com temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C), no ciclo padrão claro/escuro (12/12 h). O número total de ratos utilizados neste estudo foi de 60, ocorrendo a perda de 10% desses animais devido a mortes.

Ratos Wistar machos com 8 semanas de idade sofreram uma cirurgia de uninefrectomia do rim esquerdo e aleatoriamente foram separados em 4 grupos: CONT: grupo controle recebendo dieta; CONT/Sal: grupo controle recebendo dieta hipersódica contendo 4% de NaCl, DOCA: grupo tratado com injeções via

subcutâneas de acetato de desoxicorticosterona 8mg/Kg duas vezes por semana e recebendo dieta controle; e DOCA/Sal: grupo tratado com injeções via subcutâneas de acetato de desoxicorticosterona 8mg/Kg duas vezes por semana e recebendo dieta contendo 4% de NaCl. Os animais tiveram livre acesso à água e comida.

O tratamento se manteve por 4 semanas, e após esse tempo foram aferidas a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca. Durante todo o período (pré e pós-operatório) os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas sob temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C), no ciclo padrão claro/escuro (12/12 h). 24 h antes do sacrifício os animais foram separados em gaiolas metabólicas para coleta de urina e controle de água ingerida. Por último, os animais foram eutanasiados por decapitação consciente para recolhimento de sangue e remoção do rim direito.

### **3.4. Cirurgia de uninefrectomia**

A cirurgia iniciou-se com a sedação dos ratos por anestesia geral através de injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de quetamina 5% 50 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2 g 5 mg/ Kg de peso corporal. O rato foi considerado anestesiado quando não reagia ao se realizar pressão nas patas traseiras. O rato foi então fixado em uma prancha cirúrgica e preso com fita adesiva pelos membros inferiores e superiores. Foi realizada assepsia da região abdominal com detergente e gaze, e tricotomia com uma lâmina. A laparotomia (abertura da cavidade abdominal) foi realizada através de uma incisão abdominal de aproximadamente 6 cm. Após identificação das veias e artérias renais foi aplicado um grampo vascular não traumático nas artérias renais. Em seguida, as artérias renais foram amarradas com linha de algodão e o rim esquerdo foi removido. A incisão foi fechada com sutura feita com pontos simples separados, afrontando as bordas (pele e músculo) em plano único, com linha de algodão 3-0.

### **3.5. Medida não-invasiva da pressão arterial:**

A pressão arterial foi medida utilizando o pletismógrafo de manguito de cauda ("tail-cuff") usando o aparelho Letica LE 5000 (Barcelona, Espanha). Para essa determinação os animais foram mantidos a 30-32°C por 30 min de forma que as pulsações na artéria caudal fossem detectáveis. No momento em que três medidas consecutivas de pressão arterial fossem obtidas sem distúrbio do sinal, os valores das pressões sistólica e frequência cardíaca eram aferidos. Para evitar estresse do animal

no dia anterior a realização da medida os ratos foram expostos a todo o procedimento, em uma forma de treinamento para realização do método.

### **3.6. Análise dos parâmetros fisiológicos renais:**

Uma semana antes da eutanásia os ratos foram treinados e adaptados em gaiolas metabólicas. As gaiolas foram colocadas em uma sala com a temperatura e ciclo claro-escuro controlados ( $23 \pm 2$  °C ; 12-12h) e com livre acesso à água e ração. Os animais foram colocados nas gaiolas pelas 24 h que antecederam à eutanásia. O sangue foi centrifugado a 2.000xg por 10 min para obtenção do plasma e as amostras de urina foram coletadas e centrifugadas a 3.000xg por 5 min. Os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C até o dia da análise bioquímica.

Foram utilizados kits enzimáticos específicos para as medidas de Na<sup>+</sup> plasmático (Sodium rapid, InVitro), de creatinina (no plasma e na urina) (Creatinina, Analisa), ureia plasmática (Uréia-PP, Analisa) e de proteinúria (Proteinúria-PP, Analisa) que se baseiam na formação de complexos coloridos cuja absorbância é captada pelo espectrofotômetro UV/VIS.

O RFG foi calculado a partir da depuração (clearance) de creatinina de acordo com a seguinte formula:

$$Cl_{Cr} = U_{Cr} \times V/P_{Cr};$$

Onde, U<sub>Cr</sub> e P<sub>Cr</sub>: concentração urinária e plasmática de creatinina (µmol/mL) e V: volume da urina (mL/24 h).

### **3.7. Preparação renal:**

Para investigar as possíveis alterações das ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e para a análise do conteúdo proteico de proteínas foram utilizadas preparações de homogeneizado purificado do córtex renal. Imediatamente após a retirada, os rins foram imersos em solução isotônica tamponada gelada contendo: sacarose 250 mM, HEPES-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, inibidor de tripsina 0,15 mg/ml e fluoreto de fenilmetanesulfonil (PMSF) 1 mM. Os pólos renais foram retirados e armazenados em formaldeído 10%. A região cortical externa (segmento de aproximadamente 5 mm de espessura), porção composta predominantemente por túbulos proximais foi dissecada. Ao córtex externo foram adicionados 3 mL da solução descrita acima, o tecido foi picotado e essa suspensão homogeneizada utilizando homogeneizador de

tecido tipo Potter com pistilo de teflon. Este homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 2.000xg, a 4 °C, em uma centrífuga Sorvall RC-5B, utilizando um rotor SS-34. Nesta centrifugação, as células não rompidas durante a homogeneização, núcleos e citoesqueleto sedimentam e foram descartados após a retirada do sobrenadante. Este sobrenadante constitui o homogeneizado purificado de córtex renal externo, o qual foi aliquotado em tubos *Eppendorf* e armazenado à -20 °C (VERDOORN *et al*, 2010). A concentração de proteínas de cada preparação foi determinada através de método colorimétrico modificado de Lowry *et al.* (1951), utilizando a albumina bovina como padrão.

### **3.8. Atividade (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPásica**

A atividade da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase foi determinada através da quantificação da diferença de fosfato inorgânico (Pi), liberado pela hidrólise de ATP, na presença e ausência de ouabaína (inibidor específico). O homogeneizado (0,2 mg/ml) foi pré-incubado ou não com ouabaína (1 mM) para assegurar completa inativação da enzima. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição das proteínas no meio de reação contendo: HEPES-Tris 20 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 120 mM, KCl 30 mM e ATPNa<sub>2</sub> 5 mM na presença de traços [ $\gamma$ 32P]ATP. Após 20 minutos à 37 °C a reação foi parada pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N (2 vezes o volume de reação). Após centrifugação o Pi liberado foi quantificado por cintilação líquida (Packard/Tri-carb 2100TR).

### **3.9. Atividade Na<sup>+</sup>-ATPásica**

A atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase foi determinada conforme descrito por CARUSO-NEVES e colaboradores (2000), através da quantificação da diferença de Pi liberado pela hidrólise do [ $\gamma$ 32P]ATP na presença e ausência de furosemida (inibidor da enzima). O homogeneizado (0,2 mg/ml) foi pré-incubado com e sem furosemida (2 mM) em meio de reação contendo: HEPES-Tris 20 mM (pH 7,0), ouabaína 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 120 mM na presença de traços de [ $\gamma$ 32P]ATP e parada após a reação de 10 minutos à 37 °C, pela adição de carvão ativado em HCl a 0,1 N (2 vezes do volume de reação). Após centrifugação, o Pi liberado no meio foi quantificado empregando-se um contador de cintilação líquida Packard Tri-carb 2100TR.

### 3.10. Medida de atividade das ATPases transportadoras de $\text{Ca}^{2+}$ :

A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi medida pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP, segundo o método colorimétrico inicialmente descrito por TAUSSKY & SHORR (1953) e adaptado por FERRÃO *et al* (2012). A atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total foi calculada pela diferença entre as determinações feitas na presença de  $7,5 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  livre e na ausência deste íon, pela adição de EGTA  $2 \text{ mM}$ . A atividade correspondente à  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA) é aquela resistente à adição de tapsigargina  $1 \mu\text{M}$ , um inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco(end)plasmático (SERCA); enquanto a atividade da SERCA é aquela sensível à adição de tapsigargina. O meio de reação continha: Bis-tris-propano  $50 \text{ mM}$  (pH 7,4), ATP  $5 \text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $5 \text{ mM}$ ,  $\text{NaN}_3$   $10 \text{ mM}$ , KCl  $120 \text{ mM}$ , ouabaína  $0,1 \text{ mM}$ , EGTA  $0,2 \text{ mM}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  suficiente para a obtenção de  $7,5 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  livre –  $\text{CaCl}_2$   $226 \mu\text{M}$  em um volume final de  $500 \mu\text{L}$ . A reação foi iniciada com a adição de  $0,1 \text{ mg/mL}$  de proteína a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e interrompida após  $20 \text{ min}$  com a adição de carvão ativado em HCl  $0,1 \text{ N}$  para a adsorção de ADP e ATP não hidrolisado. Após centrifugação o Pi liberado foi quantificado em alíquotas de  $500 \mu\text{L}$  de sobrenadante.

### 3.11. Eletroforese e imunodeteção:

As proteínas presentes no homogeneizado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10%), transferidas para membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio com tampão de bloqueio LI-COR Odyssey, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (diluídos em TBS) durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T [Tris  $10 \text{ mM}$  (pH 7,4), Tween  $0,1\%$ ], re-incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à FITC ou PE (diluídos em tampão de bloqueio LI-COR Odyssey) e novamente lavadas com TBS-T. A imunomarcagem foi detectada pela fluorescência emitida pelo anticorpo secundário no sistema (LI-COR Odyssey). Todas as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau para controle da efetividade no processo de transferência das proteínas. Para cada grupo experimental foi realizada incubação com anticorpo anti- $\beta$ -actina para o controle de carregamento.

### 3.12. Imunohistoquímica e imunofluorescência:

A fixação dos rins foi feita em formaldeído a  $10\%$  em solução de tampão fosfato, por um período máximo de 3 dias. Após este tempo o tecido foi desidratado em

soluções aquosas de álcool etílico absoluto 4 vezes por 50 min em cada uma. Em seguida foi realizada a etapa de clareamento, isto é, a substituição do agente desidratante pelo líquido intermediário, o xileno, o qual possibilitará a inclusão da parafina (xileno-parafina 1:1, xileno-parafina 1:2 e parafina pura). Esta etapa foi realizada à temperatura de 60 °C mantida constantemente em estufa. Finalmente foi realizada a fabricação do bloco sólido utilizando moldes metálicos nos quais são colocadas as amostras embebidas com parafina líquida para resfriamento rápido e conseqüentemente solidificação. O tecido foi então seccionado em micrótomo, gerando cortes com a espessura de 5 µm que foram fixados em lâminas histológicas.

As lâminas prontas são então colocadas para secar por 1h a 60°C em estufa. Após esse tempo foi realizada uma bateria de soluções onde o material é exposto a três lavagens de 5 min com xileno, seguida de soluções de álcool etílico (100%, 95%, 75%) por um min em cada. Ao final dessa bateria de soluções as lâminas foram lavadas com TBS por 5 min, seguida da utilização de solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol por 15 min. Após esse tempo ocorreu uma lavagem com água e em seguida a utilização da solução Rodent Decloaker™ por 30 min a 95°C. Após isso foi realizado uma nova lavagem com água, porém dessa vez até retirar toda coloração do reagente, em seguida as lamínulas foram incubadas por 25 min à temperatura ambiente com solução de bloqueio. Após o bloqueio, as lâminas foram rinsadas com TBS e incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-SIK a 4°C.

Nesse momento as técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência se separam. No caso da primeira, as lâminas foram lavadas com TBS e incubadas com HRP por 25 min, seguida de outra lavagem. Após esse processo os cortes histológicos foram expostos ao DAB sob observação em microscópio até que fosse detectado a marcação. A reação foi então parada com água e as lâminas foram coradas com hematoxilina, lavadas em água e uma nova bateria de solução de álcool etílico (75 e 100%) e novamente três lavagens de 5 min em xileno. O material foi então preparado e levado para obtenção das fotos em microscópio acoplado a uma câmera.

Já no caso da imunofluorescência, após a incubação com anticorpo primário, as lâminas foram então lavadas com TBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 por 1 h a temperatura ambiente. Após este período, o núcleo das células foi marcado com DAPI e posteriormente o material foi analisado em microscópio confocal de fluorescência.

### **3.13. Medida de mobilização de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular:**

Alterações no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram medidas em células LLC-PK<sub>1</sub> plaqueadas em lamínulas de vidro. As células foram incubadas em solução contendo HEPES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 mM, glucose 6 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM, fluo-4 4 $\mu\text{M}$ , pluronic 0,04% e NaCl 140 mM por 45 min a 37°C, ao abrigo de luz. Após o tempo decorrido as lamínulas foram observadas em uma unidade de microscopia dinâmica sob fluxo constante de solução de fluorimetria contendo HEPES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 mM, glucose 6 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM, e NaCl 140 mM e no tempo de 3,5 min foi alterada para uma solução de fluorimetria contendo 170 mM de NaCl e depois de 10 min retornou para a solução com 140 mM.

### **3.14. Análise estatística:**

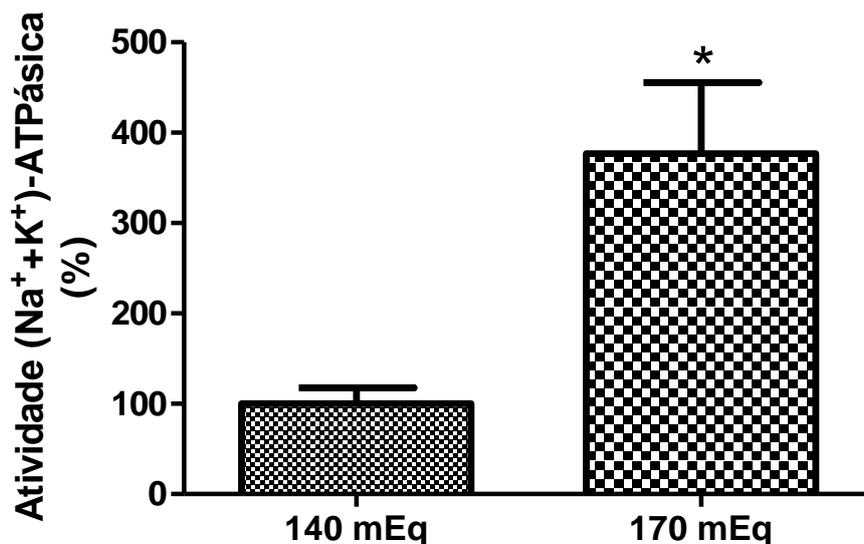
Os dados obtidos foram comparados por análises estatísticas feitas através do teste One-way ANOVA e pós-teste Tukey ou Teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 para calculá-los. Os resultados foram indicados como média  $\pm$  erro padrão da média, com o *n* amostral sendo indicado em cada figura.

# 4. Resultados

#### 4.1. Modelo *in vitro*:

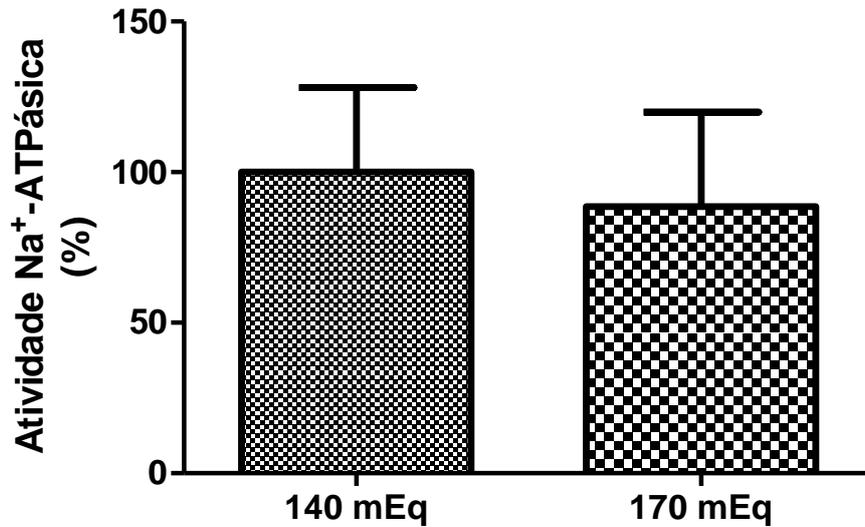
##### 4.1.1. Determinação da influência de altas concentrações de Na<sup>+</sup> localizadas na face luminal de células LLC-PK1 sobre as atividades ATPásicas das transportadoras de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>:

Inicialmente foi avaliada a influência da elevada concentração de Na<sup>+</sup> na face luminal de células LLC-PK1 sobre as atividades das ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup>. Foi observado que a atividade da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase, a principal responsável pela reabsorção de Na<sup>+</sup>, aumenta cerca de 4 vezes na presença de elevada concentração de Na<sup>+</sup> (170 mEq) quando comparada com a condição controle (140 mEq) ( $4,5 \pm 0,8$  vs.  $16,8 \pm 3,5$  nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p < 0,05$ ,  $n=4$ ) (Figura 10).



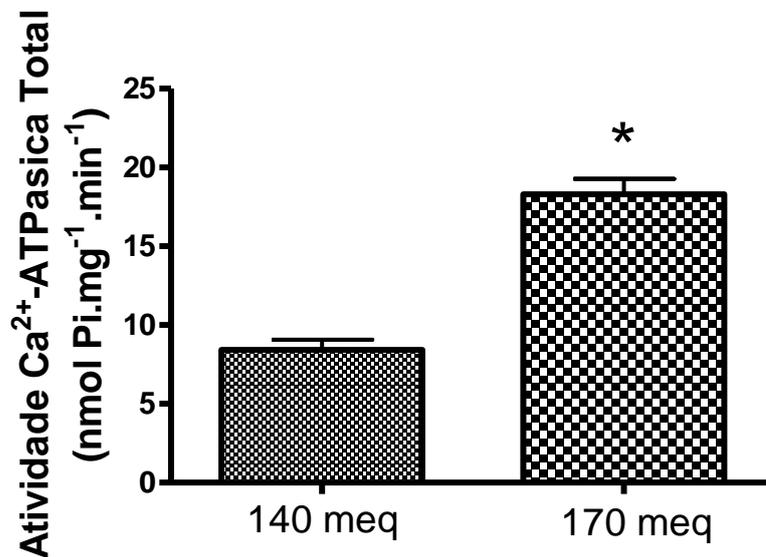
**Figura 10:** Efeito do aumento agudo da concentração de Na<sup>+</sup> (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a atividade da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM,  $n = 4$ . \*, representa valores estatisticamente diferentes (Student *t*-test,  $p < 0,05$ ).

Ao contrário do que acontece com a (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase, a Na<sup>+</sup>-ATPase é insensível ao aumento da concentração de Na<sup>+</sup> na face luminal de células LLC-PK1. ( $49,48 \pm 13,90$  vs.  $43,84 \pm 15,49$  nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $n=4$ ) (Figura 11).



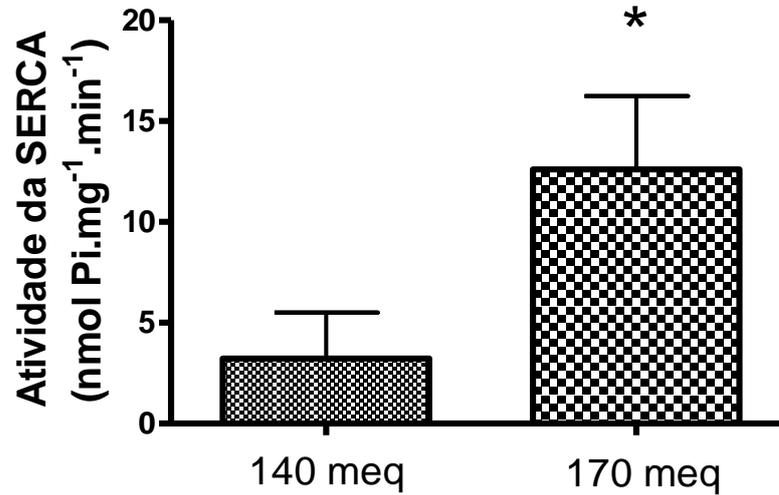
**Figura 11:** Efeito do aumento agudo da concentração do íon Na<sup>+</sup> (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase. Os resultados representam a média ± EPM, n = 4.

Em relação à atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica total, foi observado que em condições de alta concentração de Na<sup>+</sup> presentes na face luminal de células LLC-PK1 a atividade é cerca de 2 vezes superior que na condição controle (8,43±0,63 vs. 18,3±0,99 nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, p<0,05, n=3) (Figura 12).

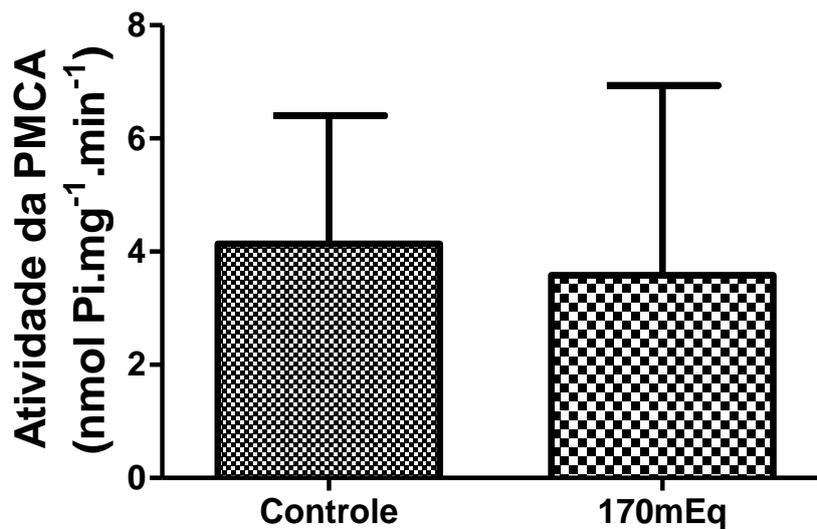


**Figura 12:** Efeito do aumento agudo da concentração do íon Na<sup>+</sup> (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica total. Os resultados representam a média ± EPM, n = 3. \*, representa valores estatisticamente diferentes (Student *t*-test, p<0,05).

A atividade da SERCA aumenta em torno de 4 vezes em resposta à alta concentração de  $\text{Na}^+$  na face luminal ( $3,2 \pm 2,3$  vs.  $12,6 \pm 3,6$   $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 13), enquanto que a atividade da PMCA se manteve inalterada ( $4,1 \pm 2,2$  vs.  $3,6 \pm 3,3$   $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (Figura 14).



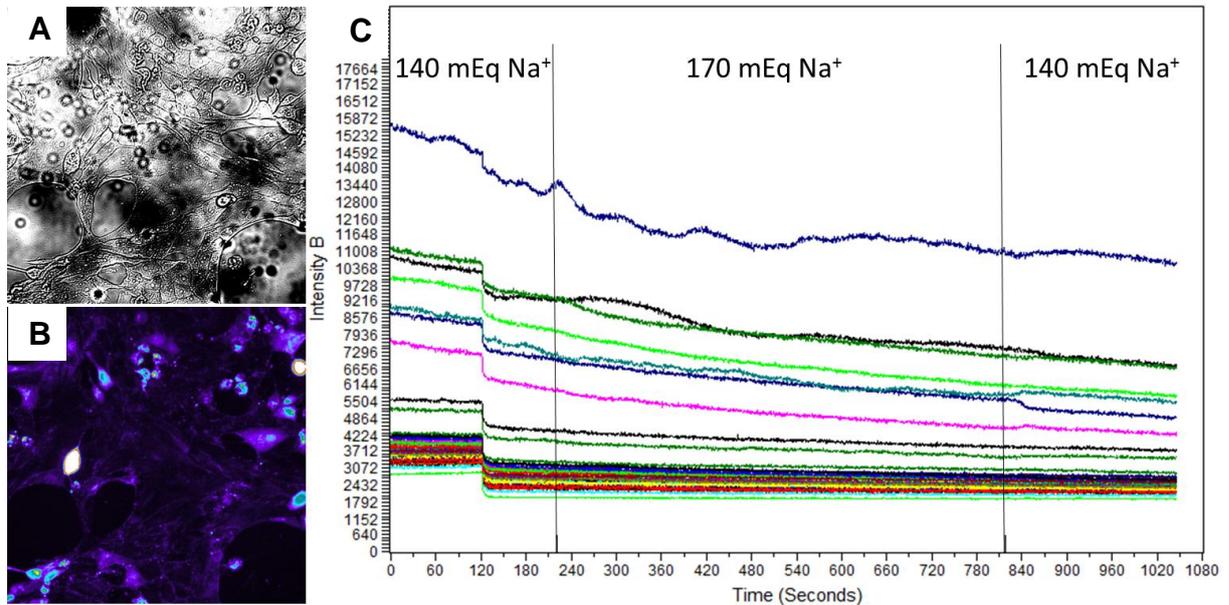
**Figura 13:** Efeito do aumento agudo da concentração do íon  $\text{Na}^+$  (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a atividade da SERCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM,  $n = 3$ . \*, representa valores estatisticamente diferentes (Student  $t$ -test,  $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Efeito do aumento agudo da concentração do íon  $\text{Na}^+$  (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a atividade da PMCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM,  $n = 3$ .

#### 4.1.2. Alterações na mobilização de cálcio intracelular:

O aumento da concentração extracelular de  $\text{Na}^+$ , de 140 para 170 mEq, não promoveu alterações significativas na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  como pode ser visto na Figura 15



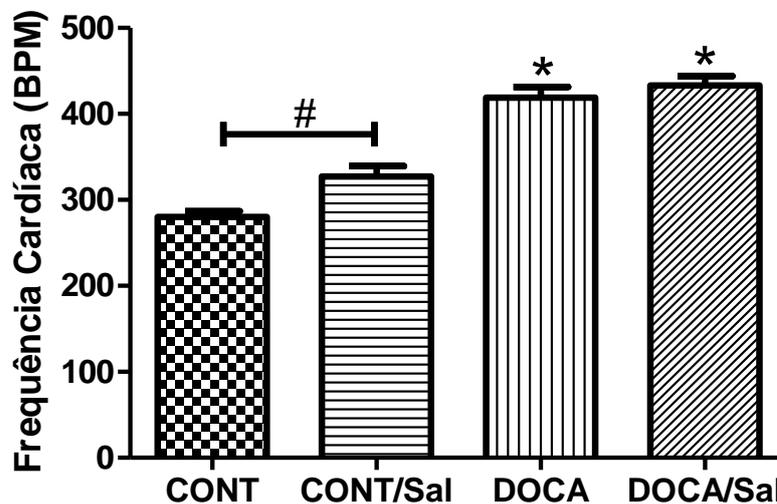
**Figura 15:** Efeito do aumento agudo da concentração do íon  $\text{Na}^+$  (170 mEq) na face luminal de células de túbulo proximal LLC-PK1 sobre a mobilização intracelular de cálcio. Em A fotomicrografias das células utilizadas no experimento em campo claro. Em B fotomicrografias células utilizadas no experimento em campo escuro. Em C registros da mobilização de cálcio onde cada linha representa uma célula.  $n=1$ .

#### 4.2. Modelo *in vivo*:

##### 4.2.1. Determinação das alterações funcionais renais promovidas pela alta ingestão crônica de sal:

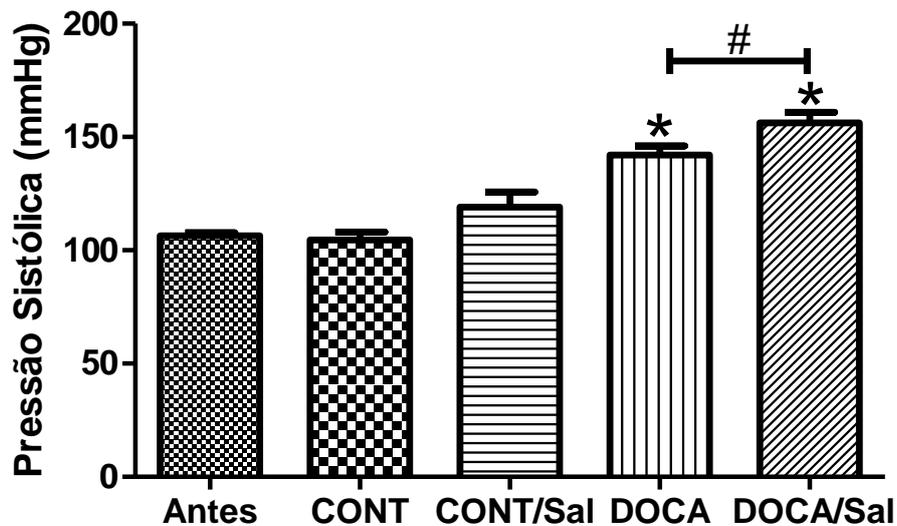
Com a finalidade de identificar qual o efeito exclusivo do  $\text{Na}^+$  sobre a função renal e determinar a influência do aumento da pressão arterial sobre este efeito, utilizamos o modelo DOCA/Sal. Com relação à frequência cardíaca observamos que os animais que receberam o tratamento crônico com DOCA apresentaram valores maiores quando comparados com os animais CONT, que sofreram apenas a uinefrectomia (figura 16). Em relação ao efeito da ingestão crônica de sal, observamos o CONT/Sal apresenta frequência cardíaca maior que os ratos que receberam a dieta normosódica (CONT). Esse efeito foi perdido nos ratos submetidos à injeção com

DOCA ( $280 \pm 7$ ;  $327 \pm 12$ ;  $419 \pm 13$  e  $433 \pm 11$  BPM, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal,  $p < 0,05$ )



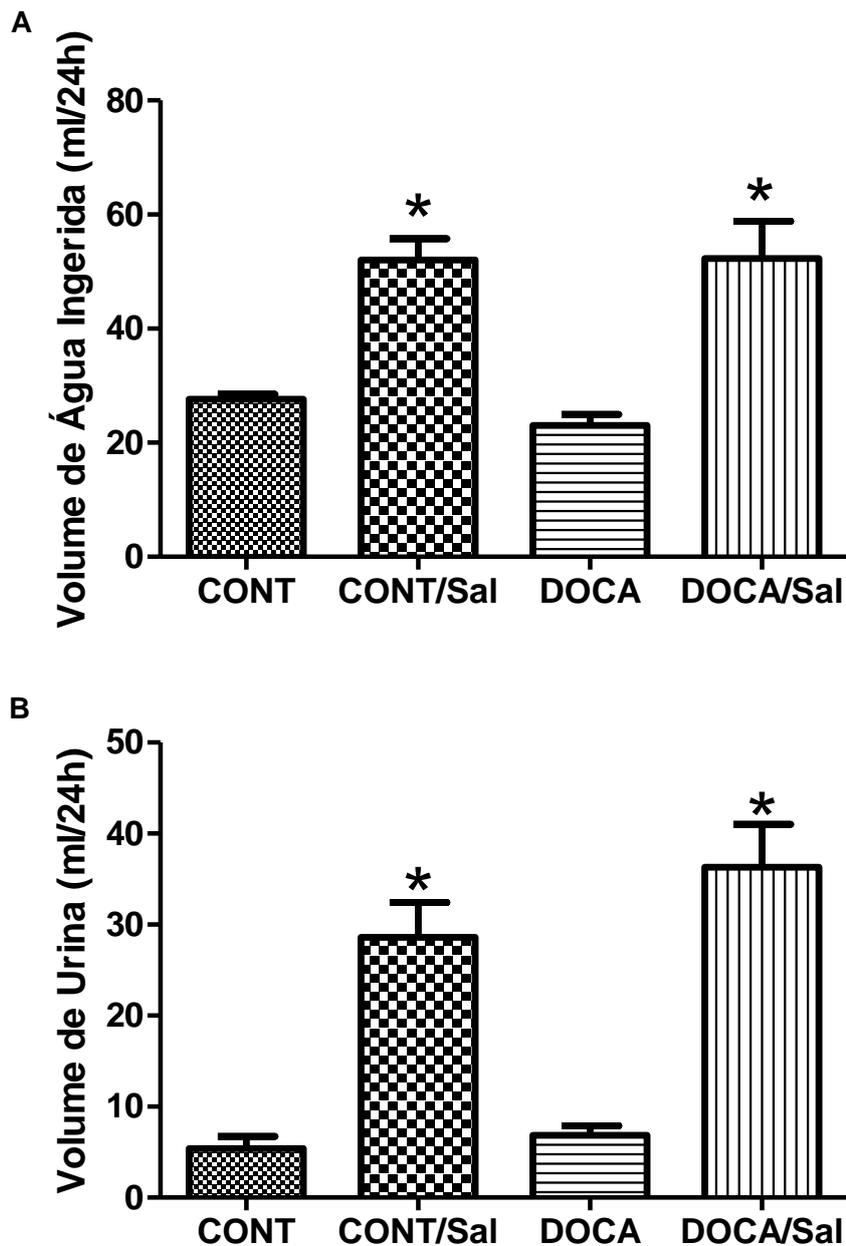
**Figura 16:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a frequência cardíaca. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Sendo BPM: batidas por minuto. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n = 5, 5, 15, 15$ . \*, Indica valores estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo CONT (One-way ANOVA com Tukey pós-teste,  $p < 0,05$ ); #, Indica valores estatisticamente diferentes comparado com o seu grupo par (Teste  $t$  Student,  $p < 0,05$ )

Em seguida, foi avaliada a pressão sistólica nos diferentes grupos experimentais, com a adição de um grupo de ratos escolhidos randomicamente para a aferição da pressão sistólica antes do processo de uninefrectomia. Este processo não influenciou os valores de pressão sistólica (valores antes vs CONT). Os ratos que receberam a injeção com DOCA apresentaram pressão arterial sistólica elevada (valores DOCA vs. Antes). A ingestão crônica de elevada quantidade de sal exacerbou o aumento da pressão sistólica no grupo DOCA, enquanto não modificou os valores obtidos no rato uninefrectomizado ( $104 \pm 4$ ,  $119 \pm 7$ ,  $142 \pm 4$ ,  $156 \pm 5$  mmHg, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal,  $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a pressão arterial sistólica. Antes: antes de iniciar o tratamento; CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n = 5, 5, 5, 15, 15$ . \*, Indica valores estatisticamente diferentes quando comparado ao CONT (One-way ANOVA com Tukey pós-teste,  $p < 0,05$ ); #, Indica valores estatisticamente diferentes comparado com o seu grupo par (Teste  $t$  Student,  $p < 0,05$ ).

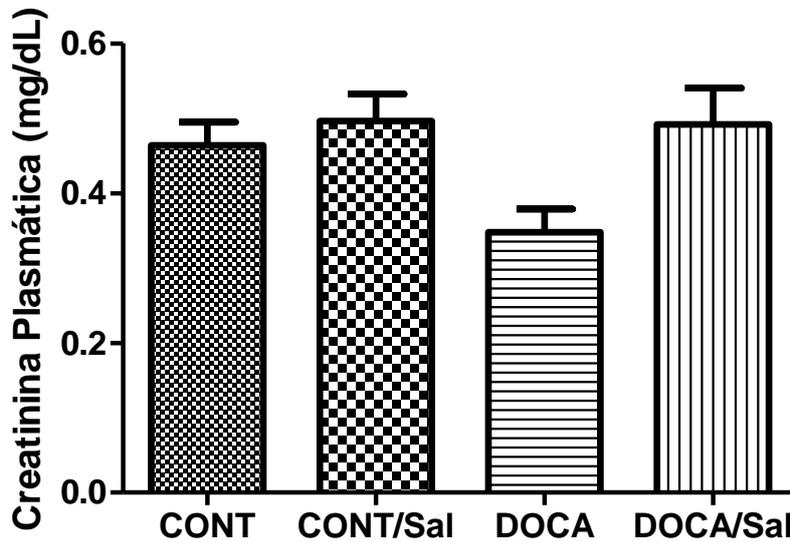
A Figura 18 mostra os valores de ingestão de água e volume de urina dos grupos experimentais. Observamos que os animais que receberam uma dieta hipersódica consumiram mais água que os animais que receberam dieta normosódica ( $28 \pm 1$ ,  $52 \pm 4$ ,  $23 \pm 2$  e  $52 \pm 6$  mL, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal,  $p < 0,05$ ) (Figura 18a). O volume urinário acompanhou esse perfil sendo maior nos ratos que ingeriram mais sal ( $5 \pm 1$ ,  $29 \pm 4$ ,  $7 \pm 1$  e  $36 \pm 5$  mL, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal,  $p < 0,05$ ) (Figura 18b).



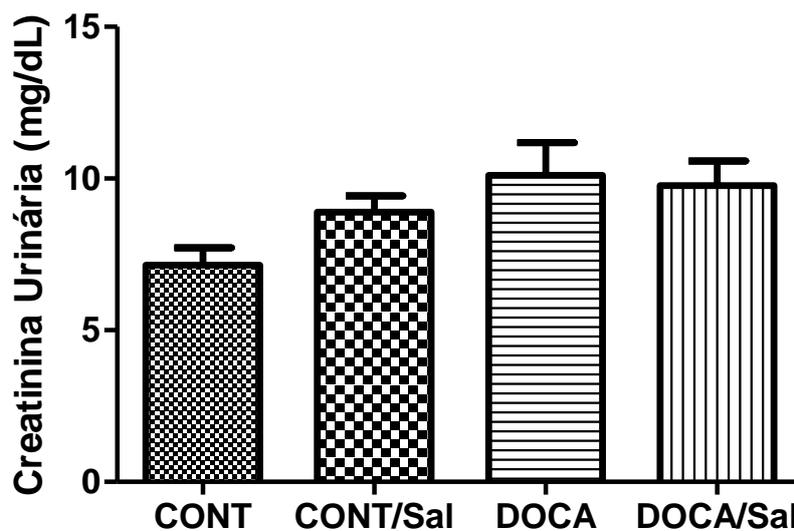
**Figura 18:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre, em A, o volume de água ingerida e, em B, volume urinário. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n=5,5,13,13$ .\*, Indica valores estatisticamente diferentes em relação ao CONT (One-way ANOVA com Tukey pós-teste,  $p<0,05$ ).

A partir da urina e do plasma dos animais realizamos as medidas de alguns parâmetros funcionais renais para avaliar o efeito do sal e da pressão arterial sobre os rins. Primeiramente medimos os níveis de creatinina plasmática e urinária a fim de se obter o RFG. Os níveis de creatinina plasmática não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $0,46\pm0,03$ ,  $0,50\pm0,04$ ,  $0,35\pm0,03$  e

0,49±0,05 mg/dL, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal) (Figura 19). Da mesma forma os níveis de creatinina urinária também não sofreram alterações estatísticas importantes (7,14±0,58, 8,90±0,53, 10,11±1,06 e 9,77±0,81 mg/dL, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal) (Figura 20).

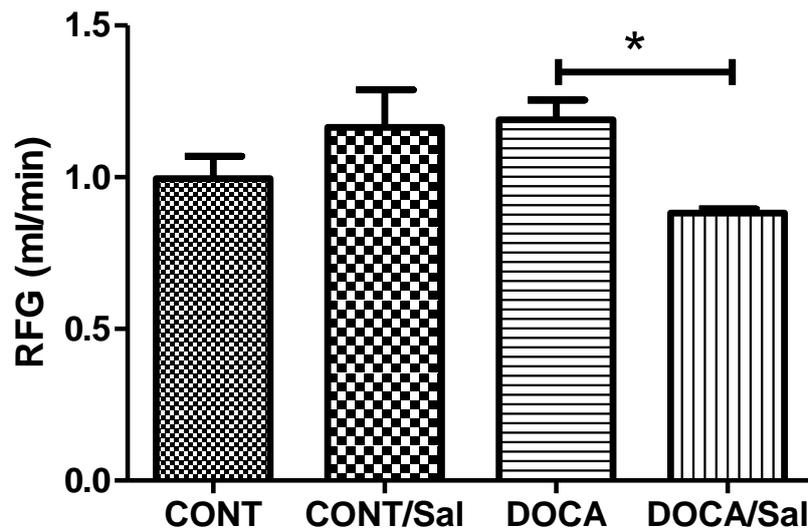


**Figura 19:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre creatinina plasmática. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média ± EPM. n=5,5,5,6.



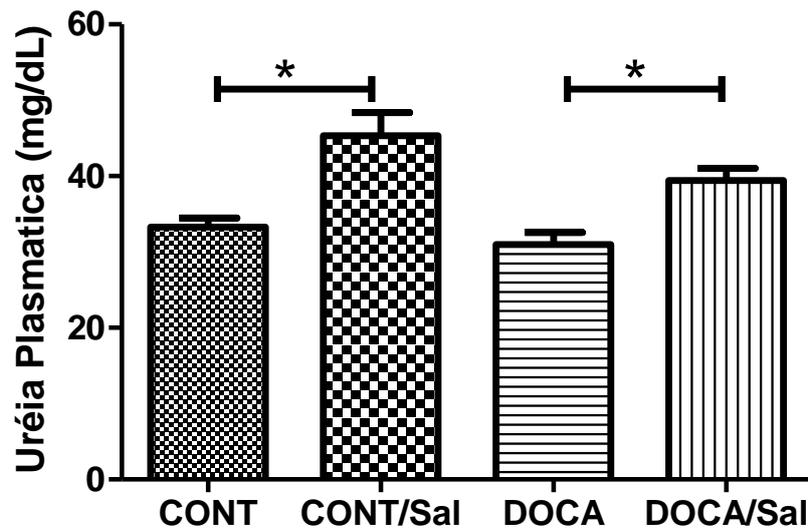
**Figura 20:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre creatinina urinária. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média ± EPM. n=5,5,6,6.

Embora os níveis de creatinina não se alterem, quando calculamos o RFG observamos que apenas o grupo DOCA/Sal apresenta uma redução quando comparado com o grupo DOCA ( $1,00 \pm 0,07$ ;  $1,16 \pm 0,12$ ;  $1,19 \pm 0,06$  e  $0,88 \pm 0,01$  mL/min CONT, CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal, respectivamente  $p < 0,05$ ) (Figura 21).



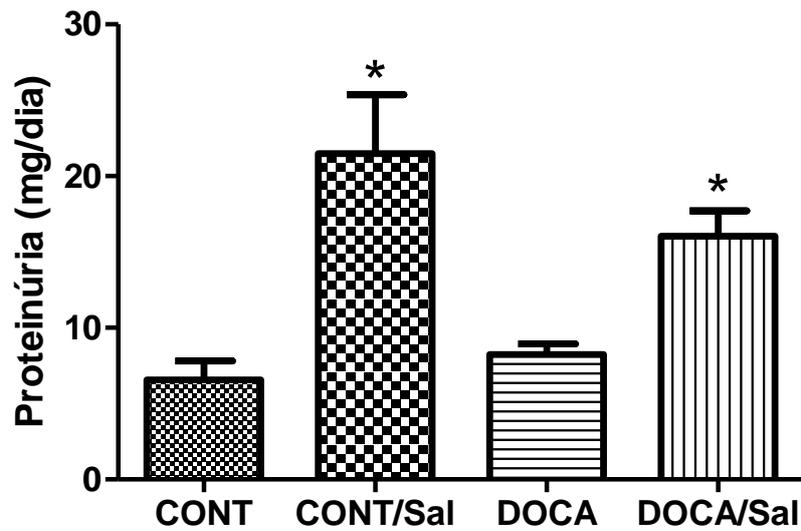
**Figura 21:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre o Ritmo de Filtração Glomerular. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n=4,4,5,4$ . \*, Indica valores estatisticamente diferentes (Teste *t* Student,  $p < 0,05$ ).

Como segunda forma de avaliar função renal fomos verificar os níveis de uréia plasmática. Foi observado que os grupos que receberam a dieta hipersódica apresentaram concentrações maiores de uréia plasmática independente da injeção com DOCA ( $33 \pm 1,2$ ,  $45 \pm 3$ ,  $31 \pm 1,6$  e  $39 \pm 1,6$  mg/dL, CONT, CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal, respectivamente  $p < 0,05$ ) (Figura 22).



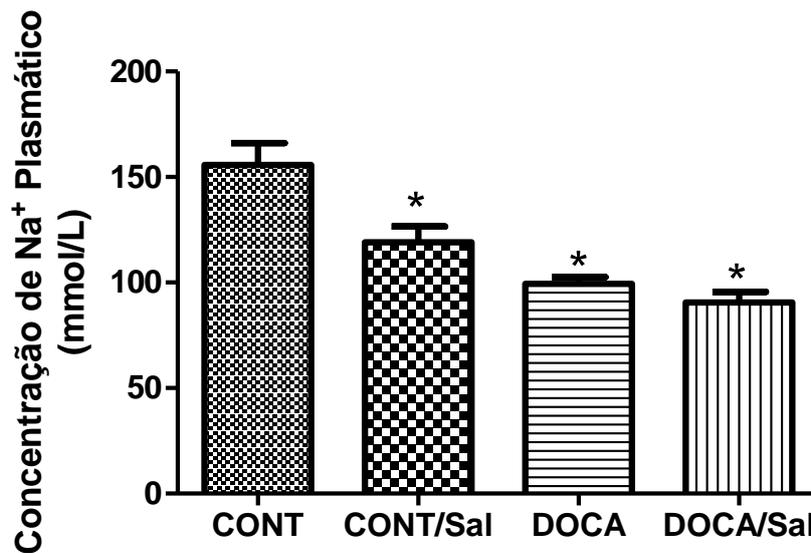
**Figura 22:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a concentração de uréia plasmática. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n=5$ . \*, Indica valores estatisticamente diferentes em relação ao seu par (Teste *t* Student,  $p<0,05$ ).

A análise de proteinúria está representada na Figura 23. Assim como no acúmulo de uréia no plasma, a proteinúria foi elevada apenas nos grupos que receberam dieta hipersódica, independente da administração de DOCA ( $6,6\pm 1,3$ ,  $21\pm 3,4$ ,  $8,2\pm 0,7$  e  $16,04\pm 1,67$ , respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal,  $p<0,05$ ).



**Figura 23:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre preteinúria. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n=5,5,6,6$ . \*, Indica valores estatisticamente diferentes (One-way ANOVA com Tukey pós-teste,  $p<0,05$ ).

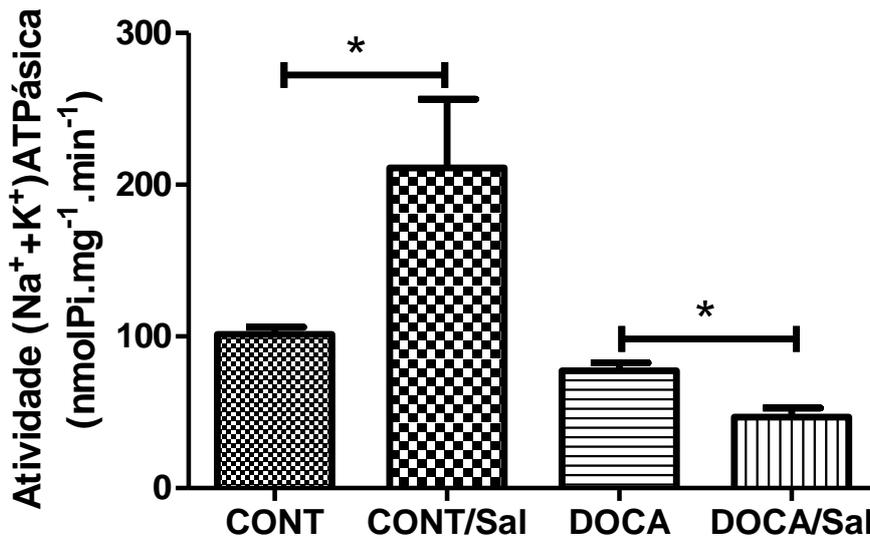
A Figura 24 mostra os valores de concentração plasmática de  $\text{Na}^+$  nos diferentes grupos experimentais. CONT/Sal, DOCA e DOCA/Sal apresentaram concentrações plasmáticas menores do que aquelas obtidas para o grupo CONT ( $156\pm 10$ ,  $119\pm 8$ ,  $99\pm 3$  e  $91\pm 5$  mmol/L, respectivamente para CONT, CONT/Sal, DOCA, DOCA/Sal,  $p<0,05$ ).



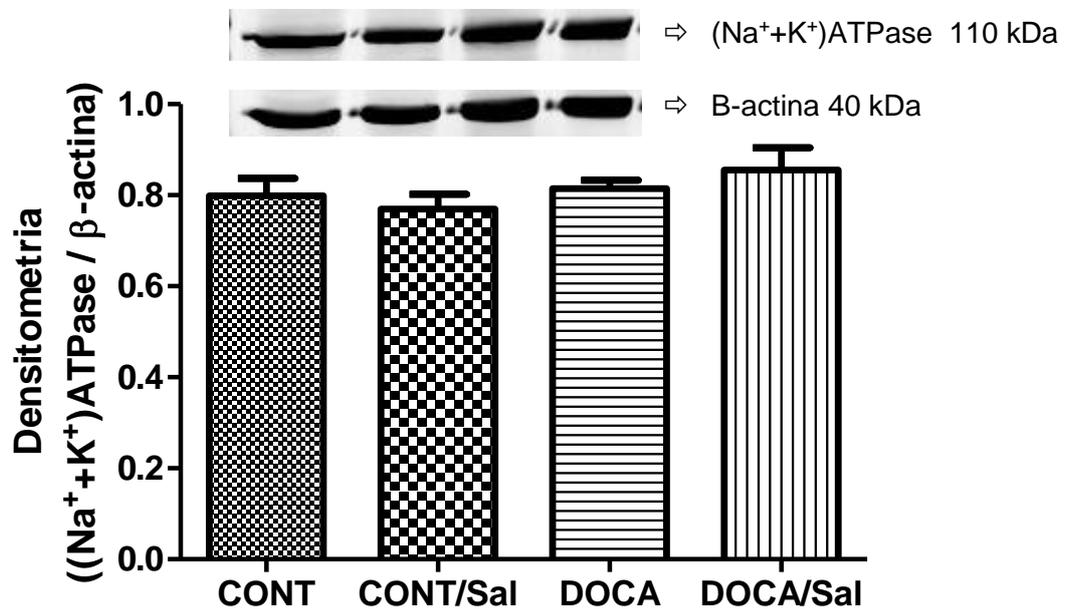
**Figura 24:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a concentração plasmática de Na<sup>+</sup>. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média ± EPM. n=3,4,6,5. \*, Indica valores estatisticamente diferentes (One-way ANOVA com Tukey pós-teste, p<0,05).

#### 4.2.2. Definição de quais ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> são moduladas pelo aumento crônico no consumo de sal:

A Figura 25 mostra que a administração de DOCA modifica a resposta da (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase à ingestão crônica de sal em homogeneizado de córtex renal. Nos grupos CONT, aos quais DOCA não foi administrado, a ingestão aumentada de sal acarretou no aumento da atividade (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPásica (em nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>: de 101±4,7 no CONT para 211±45,2 no CONT/Sal, p<0,05). Já nos grupos onde DOCA foi administrado, a atividade (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPásica se encontra diminuída (em nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>: de 77±5,2 no DOCA para 47±6,2 no DOCA/Sal p<0,05). Não foram observadas mudanças do conteúdo protéico da enzima em nenhum dos grupos experimentais (Figura 26).

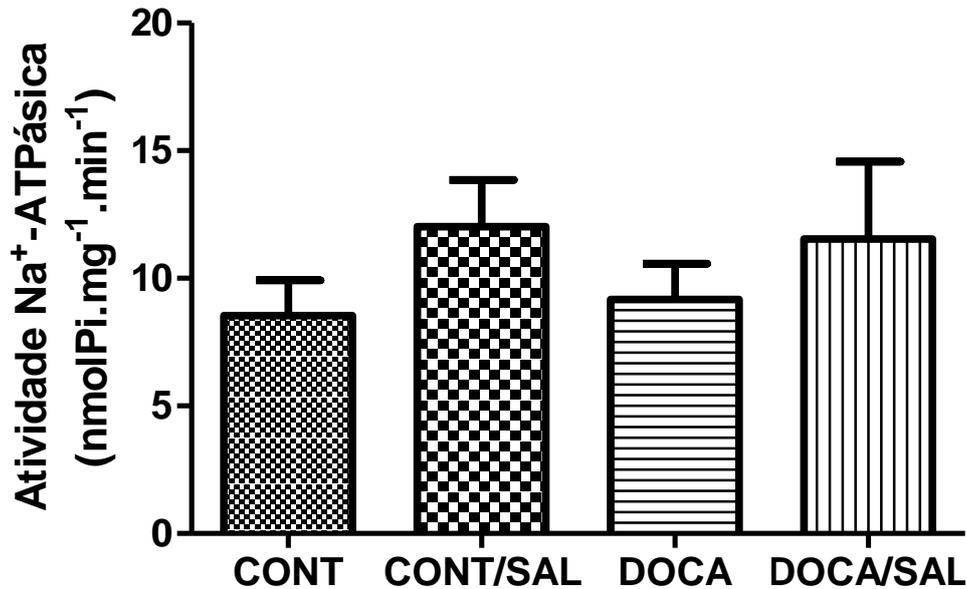


**Figura 25:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em homogeneizado de córtex renal. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média ± EPM. n=5,4,4,4 \*, Indica valores estatisticamente diferentes (Teste t Student, p<0,05).



**Figura 26:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a Expressão da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em homogeneizado de córtex renal. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os valores da expressão foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no scanner odssey. Os resultados representam a média da densitometria ± EPM, n=4

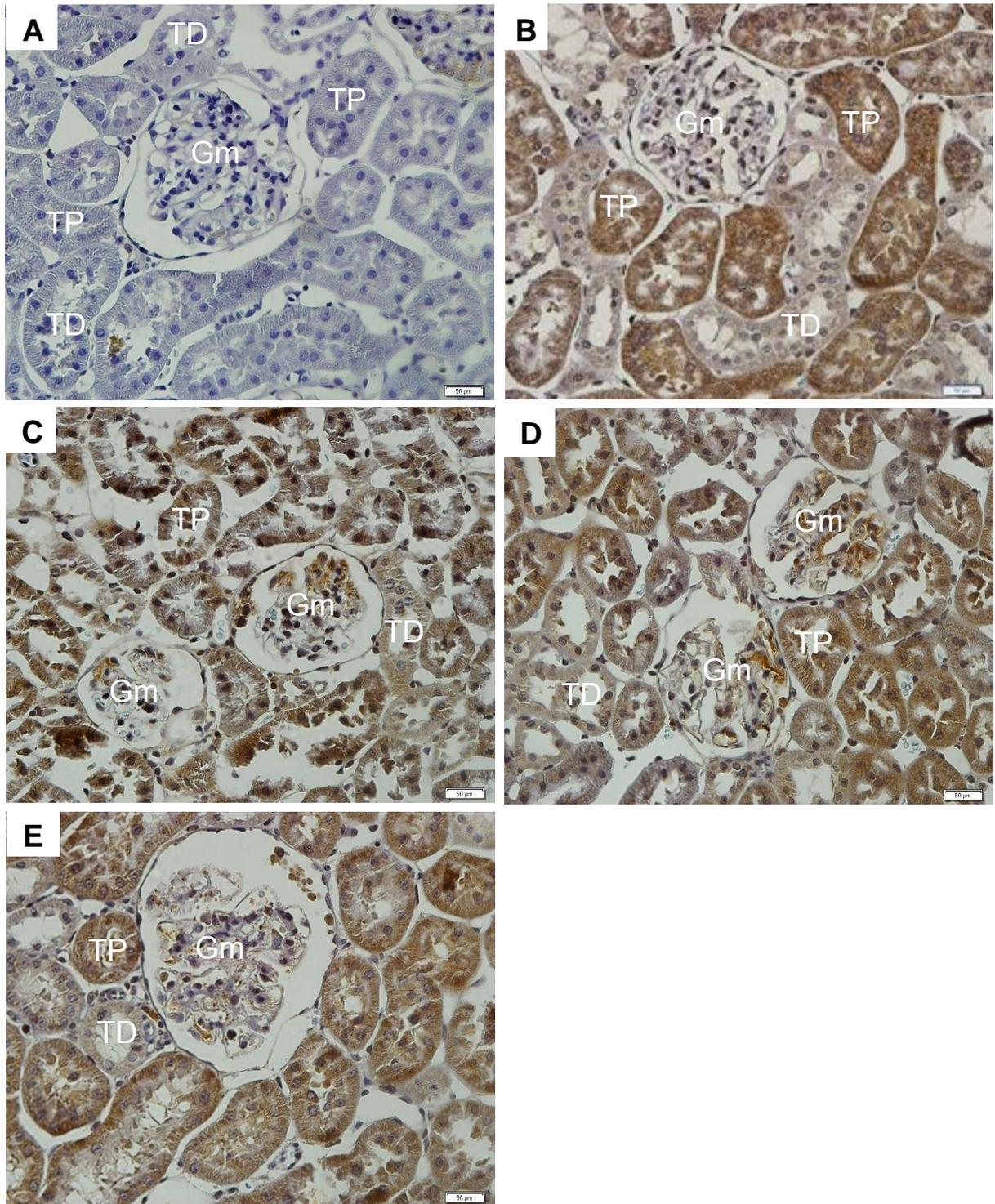
Ao contrário da  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$ , a atividade  $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$  não é modificada em nenhuma das condições experimentais ( $8,62\pm 1,44$ ,  $25,22\pm 10,74$ ,  $9,17\pm 1,40$  e  $11,53\pm 3,04$   $\text{nmolPi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente para CONT, CONT/SAL, DOCA, DOCA/SAL,  $p<0,05$ ) (Figura 27).



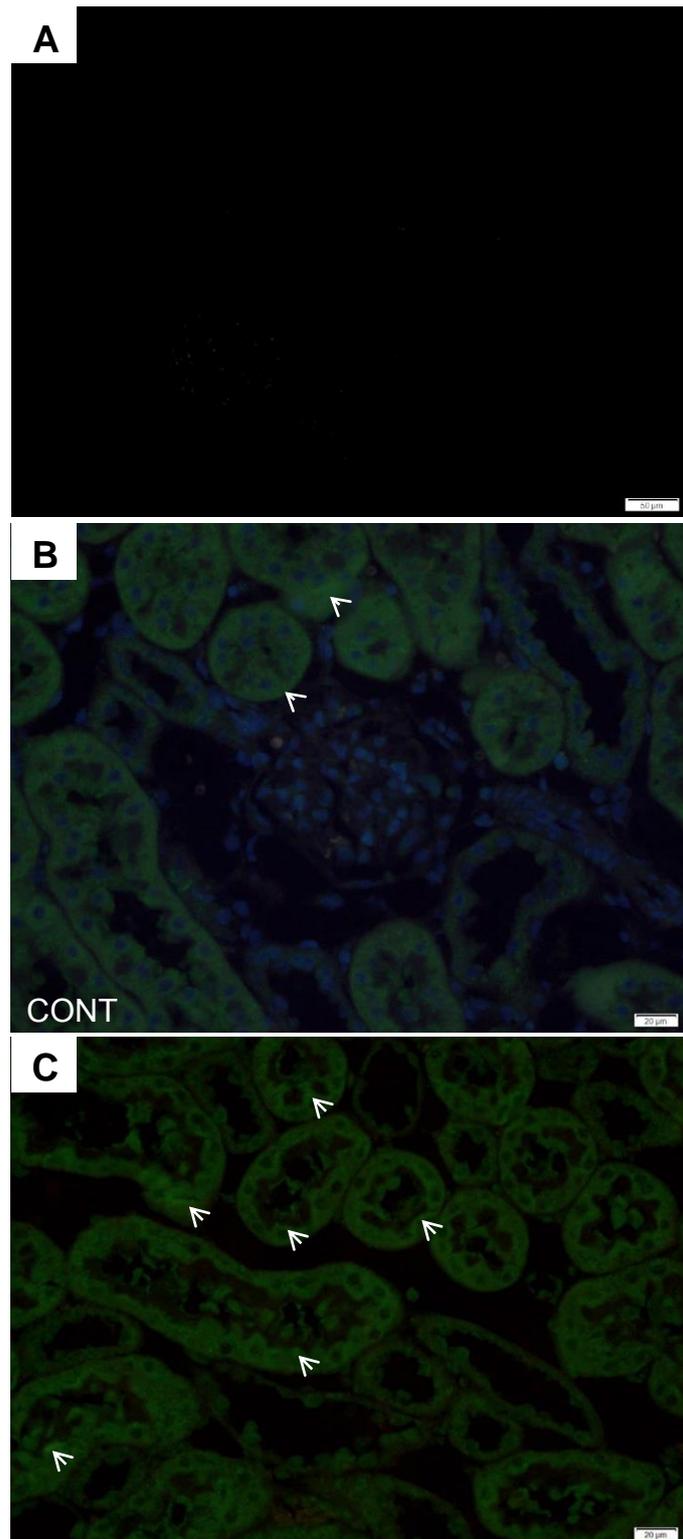
**Figura 27:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a atividade da  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  em homogeneizado de córtex renal. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM.  $n=5,5,8,9$

#### 4.2.3. Avaliação do envolvimento da proteína SIK:

Com o objetivo de avaliar se a ingestão aumentada de  $\text{Na}^+$  modifica o conteúdo protéico de SIK inicialmente utilizamos as técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica para detectar a presença desta enzima no córtex renal dos diferentes grupos experimentais (Figura 28 e Figura 29). Nas imagens da imunohistoquímica apresentadas na Figura 28 podemos observar a marcação da SIK em marrom em todos os grupos, principalmente nas regiões do túbulo proximal. Aparentemente os grupos CONT/Sal, DOCA e DOCA/SAL apresentam uma marcação intraglomerular que não é vista no CONT. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando a técnica de imunofluorescência (Figura 29).

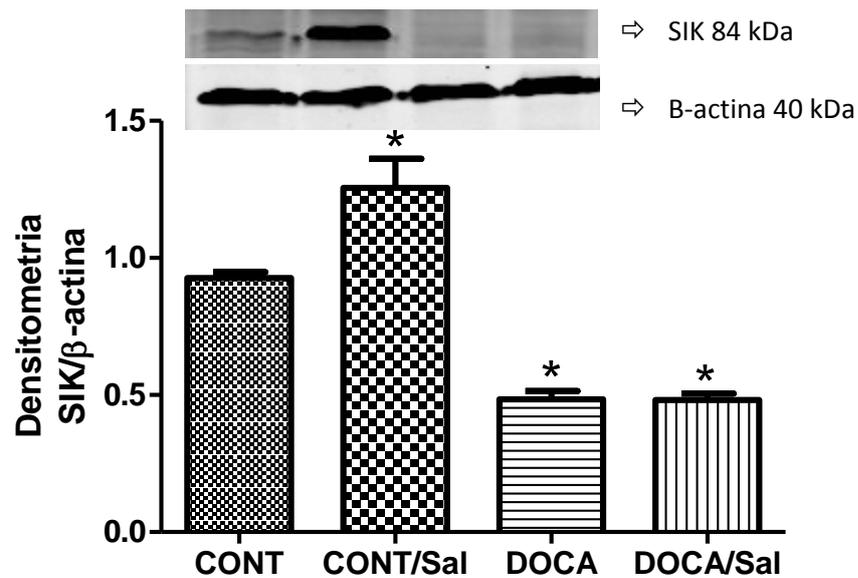


**Figura 28:** Imunohistoquímica demonstrando a presença da SIK em células do túbulo proximal. Em A o controle negativo (ausência do anticorpo primário). Em B grupo CONT (ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica). Em C grupo CONT/Sal (ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl). Em D grupo DOCA (ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA). Em E grupo DOCA/Sal (ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA). Sendo Gm: Glomérulo; TP: Túbulo Proximal; TD: Túbulo Distal. n=1



**Figura 29:** Imunofluorescência onde as setas brancas indicam a presença da SIK em células do túbulo proximal. Em A controle negativo (ausência de anticorpo primário). Em B grupo CONT (ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica). Em C grupo CONT/Sal (ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl). n=1

A análise do conteúdo protéico de SIK no córtex renal demonstrou que a administração do DOCA interfere na quantidade de SIK expressa no córtex renal. Nesta condição, o DOCA – independente da ingestão de sal diminui para metade o conteúdo protéico de SIK. Nos grupos CONT, que não foram submetidos à injeção com DOCA. A ingestão de sal aumenta em 36% o conteúdo protéico da enzima (Figura 30).



**Figura 30:** Efeito da dieta hipersódica e do tratamento com DOCA sobre a expressão da SIK em homogeneizado de córtex renal. CONT: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica; CONT/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl; DOCA: ratos uninefrectomizados que receberam dieta normosódica e injeção subcutânea de DOCA; DOCA/Sal: ratos uninefrectomizados que receberam dieta com 4% de NaCl e injeção subcutânea de DOCA. Os valores da expressão foram obtidos pela densitometria das bandas visualizadas no scanner odyssey. Os resultados representam a média da densitometria  $\pm$  EPM.  $n=4$ .\*, Indica valores estatisticamente diferentes (One-way ANOVA com Tukey pós-teste,  $p<0,05$ ).

# 5. Discussão

Na presente dissertação de mestrado foram utilizados dois modelos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) com a finalidade de dissociar o efeito exclusivo do  $\text{Na}^+$  do componente pressórico conforme descrito por GUYTON *et al* (1972) em suas clássicas curvas de natriurese pressórica. Em ambos os modelos estudados foi possível identificar respostas inerentes ao aumento localizado de  $\text{Na}^+$ . Dentre eles, destacam-se no modelo *in vitro* o aumento das atividades da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e SERCA e, no modelo *in vivo*, o aumento da frequência cardíaca sem o correspondente aumento de pressão sistólica, o acúmulo de uréia, elevada proteinúria, o aumento da atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$  e do conteúdo proteico de SIK. Além disso, a presença de um componente pressórico como ocorre nos ratos DOCA, aumenta a sensibilidade da pressão sistólica ao sal, diminuindo o processo de filtração renal, a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e o conteúdo proteico de SIK.

Uma vez que a região do córtex renal – com destaque para o túbulo proximal – é a responsável pela maior manipulação de  $\text{Na}^+$  contribuindo diretamente para o acúmulo de  $\text{Na}^+$  no meio extracelular, foi escolhida a cultura imortalizada de células de túbulo proximal de rim de porco LLC-PK1 para a realização do estudo. A exposição aguda de  $\text{Na}^+$  na face luminal destas células mimetiza a fase inicial do aumento da excreção renal deste íon em decorrência do aumento da ingestão de sal na tentativa de reequilibrar a homeostasia de  $\text{Na}^+$ , conforme exposto na Figura 7. Vale a pena ressaltar que utilizamos a cultura quando as células alcançam em torno de 90% de confluência. Nesta condição, as células mantêm a sua polaridade de forma que a membrana luminal fica exposta ao meio de cultura e a membrana basolateral aderida ao plástico (Ferrão *et al.*, 2012).

Neste contexto, pudemos demonstrar que o aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  no ambiente luminal aumenta a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ , mas não a da  $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ . Desta forma, propomos que o aumento agudo da concentração luminal de  $\text{Na}^+$  ativa imediatamente o transporte em massa de  $\text{Na}^+$  por meio da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ . De fato, quanto maior é o aporte de  $\text{Na}^+$  advindo do processo da filtração, maior será o processo de reabsorção, sendo esse processo denominado de regulação glomerulotubular (GUYTON AC & HALL JE, 2006). Diversos estudos vem demonstrando a ativação inapropriada da  $\text{Na}^+-\text{ATPase}$  como um dos possíveis mecanismos renais associados a hipertensão arterial (SILVA *et al*, 2014; QUEIROZ-MADEIRA *et al*, 2010). Neste contexto, o aumento da reabsorção inapropriada de  $\text{Na}^+$  estaria contribuindo diretamente para o aumento localizado da concentração de  $\text{Na}^+$ ,

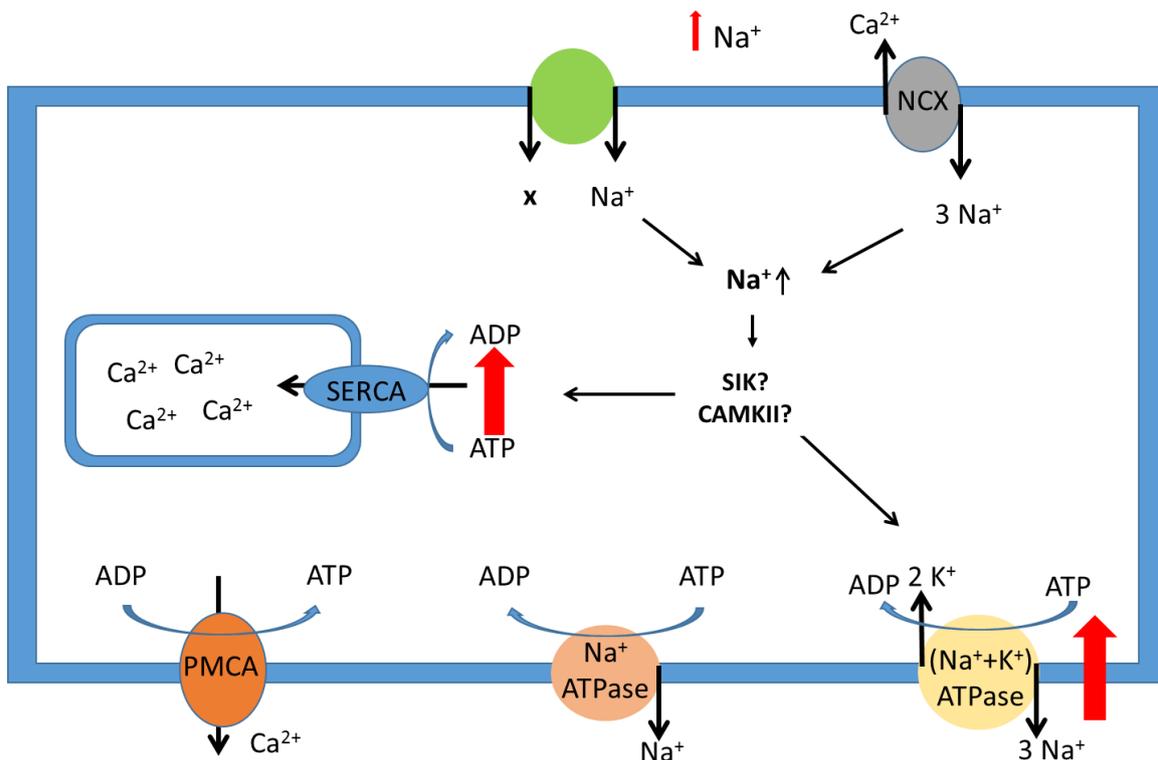
sem grandes modificações sobre a concentração plasmática do íon e do volume extracelular. O aumento da concentração tecidual de  $\text{Na}^+$  poderia ser um mecanismo associado à sensibilidade ao sal demonstrada no modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (KOPP *et al*, 2013; HOFMEISTER *et al*, 2015). Comparando com o modelo SHR, a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  se encontra aumentada em fases iniciais da vida (6 semanas) e retorna ao controle no rato adulto (13 semanas). O contrário acontece com a  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  que não se altera nas 6 semanas de vida, mas está aumentada no rato adulto (QUEIROZ-MADEIRA *et al*, 2010). Estes dados, em conjunto com os obtidos em relação à cultura de células indicam que em fases iniciais da exposição ao  $\text{Na}^+$  é a  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  a principal enzima reguladora do transporte renal deste íon e, possivelmente, a envolvida na gênese de processos hipertensivos. A exposição crônica ao  $\text{Na}^+$  poderia levar ao retorno da atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  a níveis basais – talvez por um mecanismo de dessensibilização – cabendo à  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  a responsabilidade desse transporte no rato adulto. Nessa dissertação tivemos como limitação o tempo máximo de exposição das células ao  $\text{Na}^+$ . Acima de 1 h de incubação observamos o desprendimento e a morte das células. No modelo *in vivo*, observamos um aumento da atividade da  $\text{Na}^+\text{-ATPase}$  em termos de valores brutos, mas devido ao pequeno n experimental não alcançamos significância. Será necessário aumentar a amostragem dos grupos experimentais estudados.

O principal mecanismo associado ao aumento do transporte renal de  $\text{Na}^+$  é aquele que envolve o  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensageiro (DU *et al*, 2015). No rim, a principal via de reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  é a via paracelular (ALEXANDER *et al*, 2014). Pela via transcelular, com destaque para o túbulo proximal, a PMCA é a principal enzima responsável pelo gradiente intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que favorece a sua entrada luminal por meio de canais específicos. Uma vez no citoplasma, este íon é rapidamente capturado para o retículo endoplasmático pela ação da SERCA (CARAFOLI & BRINI, 2000). O transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  modulado por hormônios e autacóides, promove a ativação de vias de sinalização dependentes deste íon que acarretam na modulação do transporte renal de  $\text{Na}^+$ . O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , presente na membrana luminal, participa do processo de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas ao contrário do que acontece nas células excitáveis, como no coração, tem uma relevância secundária a da PMCA (BRINI & CARAFOLI, 2011). No nosso modelo, observamos que o aumento luminal da concentração de  $\text{Na}^+$  acarreta no aumento da atividade da SERCA, sem alteração do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Podemos propor que o aumento da

atividade da enzima contribui para o armazenamento do íon no retículo endoplasmático, deixando a célula mais sensível a um disparo promovido por um hormônio ou autacóides, como a Ang II. FERRÃO e colaboradores (2012) demonstraram, utilizando as mesmas células deste estudo, que a ação luminal da Ang II estimula a atividade da SERCA, tornando a eficiência da célula em mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular maior durante uma segunda exposição. Este mecanismo poderia explicar porque a hipertensão dependente de Ang II é sensível à elevada ingestão de sal (Lara *et al*, 2011).

Este estudo em cultura de células se diferencia do trabalho de SJÖSTRÖM e colaboradores (2007) que utilizaram células de túbulo proximal de gambá (OK) promovendo o aumento intracelular da concentração de  $\text{Na}^+$  artificialmente pelo uso de um ionóforo, a monensina. Neste contexto, foi visto que o aumento da permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  está associado com o aumento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (IWAMOTO *et al*, 2004). Sem o uso do ionóforo a entrada luminal de  $\text{Na}^+$  é dependente do simporte  $\text{Na}^+$ /glicose ou aminoácidos e do contra-transportador  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  ativados pelo gradiente intracelular de  $\text{Na}^+$  gerado pela  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). Nossa hipótese é de que a entrada luminal de  $\text{Na}^+$  na ausência do ionóforo não gera transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas prepara a célula para uma resposta eficiente a um agonista, como por exemplo a Ang II.

Ainda, o envolvimento da  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina kinase II (CAMKII) e de SIK, principal via descrita por SJÖSTRÖM e colaboradores (2007), precisa ser investigada. A enzima CAMKII pode ser a ligação entre o aumento do  $\text{Na}^+$  na face luminal e a ativação da SERCA, uma vez que a CAMKII estimula a SERCA via fosfolambam (GRIMM & BROWN, 2010) (Figura 31).



**Figura 31:** O aumento agudo de  $\text{Na}^+$  intracelular leva, por um mecanismo ainda não totalmente definido envolvendo a SIK e a CAMKII, a ativação da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e da SERCA, promovendo um aumento da reabsorção do sódio e a regulação da homeostasia do cálcio. Onde: NCX: Trocaador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; SIK: Salt Inducible-Kinase; CAMKII:  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina kinase II; PMCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de Membrana Plasmática; SERCA:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de Retículo Sarco(Endo)plasmático; ATP: Adenosina Trifosfato; ADP: Adenosina Difosfato.

No modelo *in vivo*, foi comparado o efeito da alta ingestão de  $\text{Na}^+$  no rato Wistar uninefrectomizado (CONT) com o rato Wistar uninefrectomizado submetido à injeção subcutânea com DOCA. No grupo CTRL, apesar da uninefrectomia, a elevada ingestão de  $\text{Na}^+$  não promoveu o aumento da pressão sistólica. Isso indica que neste grupo as alterações de função renal e de mecanismos moleculares são devidas exclusivamente ao  $\text{Na}^+$ . A administração do DOCA promove no rato a hipertensão induzida por mineralocorticoide – observamos o aumento de pressão sistólica – cuja gênese pode envolver a retenção de  $\text{Na}^+$  e a subsequente expansão de volume dando origem ao conceito de “hipertensão molhada” (tradução do inglês *wet hypertension*) (PINTO *et al*, 1998). Esse modelo tradicionalmente utiliza o sal na água de beber dos ratos (FAZAN *et al*, 2001), mas em nosso trabalho optamos por utilizar uma ração hipersódica adquirida comercialmente a fim de se evitar a aversão à água. Vale a pena ressaltar que este modelo de hipertensão é independente do sistema renina angiotensina sistêmico, devido à observação de baixos níveis de renina no plasma desses animais (ZICHA & KUNES, 1999). No nosso caso, este modelo é interessante

porque, quando comparado ao grupo CONT, demonstra como o efeito do  $\text{Na}^+$  é influenciado pelo o aumento de volume extracelular e de pressão sistólica.

Além da expansão de volume extracelular, a ingestão elevada de sal parece modificar a resposta reflexa humoral dos barorreceptores exacerbando o aumento da pressão sistólica (CHOE *et al*, 2015), conforme foi observado no nosso modelo. Observamos que os ratos DOCA já apresentam aumento de frequência cardíaca e de pressão sistólica, esta última exacerbada pela alta ingestão de sal, podendo esse fenômeno estar associado à alteração da atividade dos barorreceptores. Estes dados também indicam que a razão hipersódica é tão eficaz quanto a adição de sal na água de beber para promover a hipertensão. Nos ratos CONT, apesar do aumento da ingestão de sal promover o aumento da frequência cardíaca, não foi observada alteração de pressão sistólica, indicando que o sistema barorreceptor não foi afetado. Independente da injeção com DOCA, todos os grupos submetidos à alta ingestão de sal aumentaram a ingestão de água e, por consequência o volume da urina como era de se esperar.

A hipótese de trabalho é que no rato CONT a ingestão aumentada e crônica de sal ativa no rim mecanismos natriuréticos de forma que a concentração luminal de  $\text{Na}^+$  aumente. O transporte vetorial de  $\text{Na}^+$  no epitélio renal promove a entrada do  $\text{Na}^+$  pela via luminal. O aumento sustentado da concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  poderia ativar vias específicas de sinalização celular envolvidas na lesão renal. Já no modelo DOCA, a ação intracelular do  $\text{Na}^+$  passa a ser modulada por mecanismos pressóricos que poderiam contribuir para o agravamento da lesão e a perda do rim.

O principal parâmetro de análise da função renal é o RFG (NUNES *et al*, 2007). Na presença de uma aumentada pressão sistólica, a ingestão de sal diminui o RFG e, portanto, a função renal. Nos grupos CONT, CONT/Sal e DOCA não foram detectadas alterações do RFG, indicando que o  $\text{Na}^+$  exacerba os efeitos da hipertensão. A medida dos níveis de uréia no plasma também pode ser considerada como um parâmetro da avaliação da função renal, porém esse índice é influenciado por diversos fatores, como a ingesta proteica e sangramentos, entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011). Apenas os grupos que receberam a dieta hipersódica apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de uréia. Esse dado pode indicar que o  $\text{Na}^+$  causa uma perda inicial de função renal, porém não suficiente para alterar o RFG. Da mesma forma, os ratos submetidos à dieta hipersódica apresentaram elevada proteinúria, indicando que este efeito é exclusivo do  $\text{Na}^+$ . A observação do

rato CONT submetido a alta ingestão de sal leva à proteinúria e pode estar associada à sobrecarga do rim remanescente e a duração de 4 semanas de ingestão de sal. LARA e colaboradores (2012) não detectaram proteinúria em ratos Sprague-Dawley submetidos apenas à dieta contendo 8% NaCl durante 2 semanas.

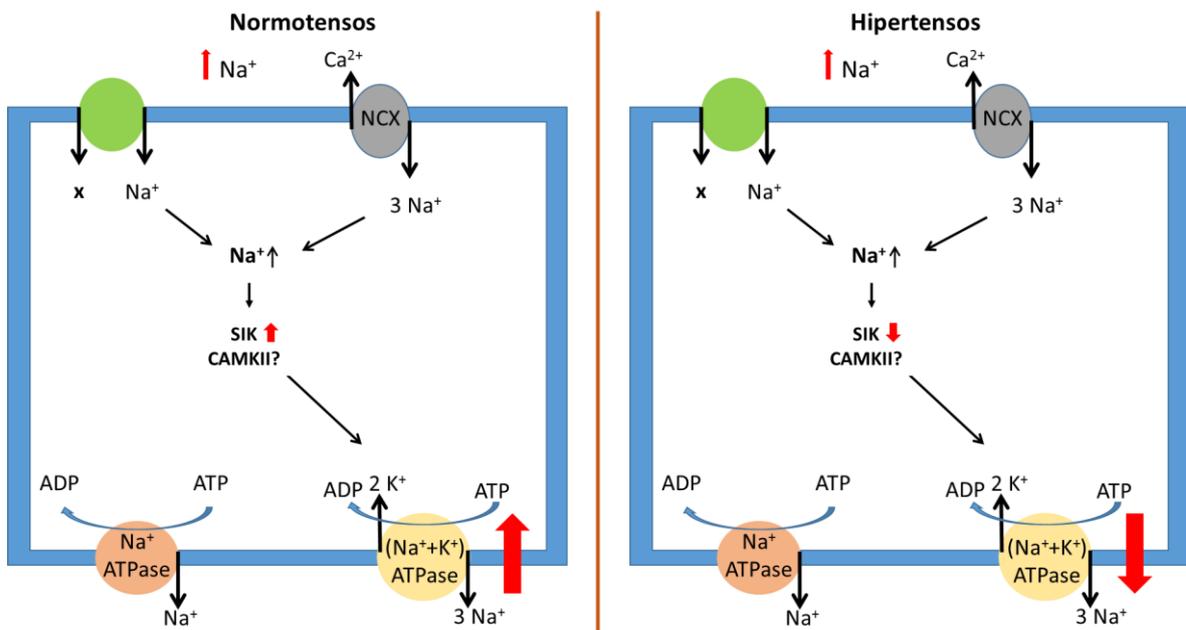
Apesar de ambos os grupos que receberam dieta hipersódica apresentarem elevada proteinúria, o mecanismo parece ser diferente. No grupo CONT/Sal a proteinúria pode ser decorrente de algum mecanismo secretor danificado ou alguma lesão tubular, uma vez que o RFG está preservado. Já no grupo DOCA/Sal, a proteinúria pode ser devido à lesão glomerular (pois o RFG está diminuído), associado ou não à lesão tubular. Para verificar essa hipótese é necessário a realização de análises histológicas para avaliar a presença de lesões renais e alterações nos glomérulos.

Avaliando os valores séricos de  $\text{Na}^+$  observamos que tanto o grupo CONT/Sal, quanto o DOCA e o DOCA/Sal apresentaram concentrações reduzidas de  $\text{Na}^+$  plasmático. Essa redução pode ser devida a um aumento da excreção sódica na urina ou ele pode estar se acumulando na forma osmoticamente inativa na pele e músculos, como sugerido por TITZE e colaboradores (2010). Para avaliar essas hipóteses é necessário realizar a medida do  $\text{Na}^+$  urinário.

Em relação aos transportadores renais de  $\text{Na}^+$ , a presença do componente pressórico é determinante para a atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$ . Nos ratos CONT, o aumento da ingestão de sal promove o aumento da atividade da enzima em homogeneizado de córtex renal, semelhante ao observado na cultura de células de túbulo proximal. Por outro lado, quando o componente pressórico está presente a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  é inibida, como um possível mecanismo de proteção uma vez que já está instalado um quadro de hipertensão e o aumento da reabsorção do íon agravaria esse quadro. Não podemos descartar que a inibição da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  seja também um mecanismo de dessensibilização promovido pela administração crônica de DOCA. A  $\text{Na}^+-\text{ATPase}$  é insensível nestas condições assim como ocorreu no modelo *in vitro*.

A análise do córtex renal demonstrou que a SIK está presente principalmente em células do túbulo proximal nos ratos CONT. Além disso, os grupos Sal, associados ou não à injeção de DOCA apresentam marcação para SIK no glomérulo. O conteúdo protéico de SIK é aumentado no CONT/Sal, o que vai de encontro com o dado da atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  uma vez que, de acordo com a via descrita por

SJÖSTRÖM e colaboradores (2007), a ativação da SIK termina na ativação da  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$ . Já nos grupo DOCA e DOCA/Sal, o conteúdo proteico de SIK está diminuída podendo ser mais uma vez um mecanismo de defesa na tentativa de evitar a exacerbação da associação entre o  $\text{Na}^+$  e o componente pressor. Esses dados sugerem que a hipertensão promovida por mineralocorticoides inibe a via de sinalização ativada pelo sal. Estes mecanismos estão apresentados na Figura 32.



**Figura 32:** O aumento crônico da ingestão de sal promove um aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular que em animais normotensos leva a um aumento da expressão SIK e ativação da  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  promovendo um aumento da reabsorção do sódio. Já em animais hipertensos ocorre uma redução da expressão da SIK que leva a uma redução da atividade da  $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$  diminuindo a reabsorção de sódio. Onde: NCX:Trocador  $\text{Na}^+\text{+Ca}^{2+}$ ; SIK:Salt Inducible-Kinase; CAMKII:Ca<sup>2+</sup>-calmodulina kinase II; ATP: Adenosina Trifosfato; ADP: Adenosina Difosfato.

## **6. Conclusão**

Por todo o exposto podemos concluir que o aumento localizado do  $\text{Na}^+$  aumenta exclusivamente a atividade da  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  ativando uma via de sinalização específica que envolve a SERCA e a SIK. A ativação da SERCA pode ser associada ao maior armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático de forma que o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  seja mais eficiente frente a um agonista.

Entretanto, a ingestão elevada de  $\text{Na}^+$  não modifica a função renal, apesar do aumento da atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPásica}$  e do conteúdo de SIK, implementando de maneira silenciosa a lesão renal. Quando o componente pressórico é inserido, como na hipertensão dependente de volume, a função renal é diminuída o que pode ser atribuído, em parte, à diminuição da atividade  $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$  e da SIK.

# **7. Referências bibliográficas:**

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias Da Alimentação (2013), Cenário do consumo de sódio no Brasil: Estudo elaborado com base em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Junho.

ALEXANDER RT, RIEVAJ J, DIMKE H (2014) Paracellular calcium transport across renal and intestinal epithelia. *Biochem Cell Biol.* Dec;92(6):467-80.

ANDERSON JM (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.* v. 16, p.p. 126-130.

ASARIA P, CHISHOLM D, MATHERS C, EZZATI M, BEAGLEHOLE R (2007) Chronic disease prevention: health effects and financial costs of strategies to reduce salt intake and control tobacco use. *Lancet.* Dec 15;370(9604):2044-53

BASTOS MG, CARMO WB, ABRITA RR, ALMEIDA EC, MAFRA D, CASTRO DMN, OLIVEIRA LA, SANTOS FR, GONÇALVES JA, PAULA RB (2004) Doença renal crônica: problemas e soluções. *J. Bras. Nefrol.* 26:202-215.

BASTOS MG & KIRSZTAJN GM (2011) Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. *J. Bras. Nefrol.* vol.33. n.1. pp. 93-108.

BATUMAN V (2011) Salt and hypertension: why is there still a debate? *Kidney Int Suppl.* 2013 Dec;3(4):316-320.

BEEVERS DG, LIP GY, BLANN AD. (2004) Salt intake and Helicobacter pylori infection. *J Hypertens.* Aug;22(8):1475-7.

BIGAZZI R, BIANCHI S, BALDARI D, SGHERRI G, BALDARI G, CAMPESE VM. (1994) Microalbuminuria in salt-sensitive patients. *Hypertension.*;23:195-199.

BOMBIG MTN, FRANCISCO YA, MACHADO CA (2014) A importância do sal na origem da hipertensão. *Rev Bras Hipertens* vol. 21(2):63-67.

BRENNER BM & ANDERSON S (1992) The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. *J Cardiovasc Pharmacol.*;19(suppl 6):S1-S7.

BRINI M & CARAFOLI E (2011) Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Feb 1;3(2). pii: a004168. The plasma membrane

BURNEY P (1987) A diet rich in sodium may potentiate asthma. Epidemiologic evidence for a new hypothesis. *Chest.* Jun;91(6 Suppl):143S-148S.

CAMPAGNOLE-SANTOS MJ & HAIBARA AS (2001) Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens* 8 (1): 30-40

CAMPESE VM, PARISE M, KARUBIAN F, BIGAZZI R (1991) Abnormal renal hemodynamics in black salt-sensitive patients with hypertension. *Hypertension.*;18:805-812.

CAPPUCCIO FP, KALAITZIDIS R, DUNECLIFT S, EASTWOOD JB (2000) Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. . *J Nephrol.* May-Jun;13(3):169-77.

CARAFOLI E & BRINI M (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 4, p. 152-161.

CARRETERO AO & ROMERO JC (1977) Production and characteristics of experimental hypertension in animals. In: Genest G, Koiw E, Kuchel O (eds.). *Hypertension.*;New York. McGraw. 485-507.

CARRETERO OA & OPARIL S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* Jan 25;101(3):329-35

CARUSO-NEVES C, FRANCISCO-PEDRO LG, PANTOZZI LP, CHAGAS C, LOPES AG (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity from basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1329: 336-344.

CARUSO-NEVES C, LARA LS, RANGEL LB, GROSSI AL, LOPES AG (2000) Angiotensin (1-7) modulates the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1467: 189-197.

CARUSO-NEVES C, COELHO-SOUZA SA, VIVES D, GOES G, LARA LS, LOPES AG (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na<sup>(+)</sup>-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg<sup>(2+)</sup>, MgATP and furosemide. *Int J Biochem Cell Biol.* Dec;34(12):1586-93.

CARUSO-NEVES C, LARA LS, RANGEL LBA, GROSSI AL, LOPES AG (2004) Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase of proximal tubule is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1660: 93-98.

CHOE KY, HAN SY, GAUB P, SHELL B, VOISIN DL, KNAPP BA, BARKER PA, BROWN CH, CUNNINGHAM JT, BOURQUE CW (2015) High Salt Intake Increases Blood Pressure via BDNF-Mediated Downregulation of KCC2 and Impaired Baroreflex Inhibition of Vasopressin Neurons. *Neuron.* Feb 4;85(3):549-60.

CONNELL JM & DAVIES E (2005) The new biology of aldosterone. *J Endocrinol.* Jul;186(1):1-20.

DAVIES A, BLAKELEY GHA, KIDD C (2001) *Human Physiology.* Churchill Livingstone, pp. 713-802.

DENTON D (1982) *The Hunger for Salt: An Anthropological, Physiological and Medical Analysis.* Berlin: Springer.

DEVINE A, CRIDDLE RA, DICK IM, KERR DA, PRINCE RL (1995) A longitudinal study of the effect of sodium and calcium intakes on regional bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* Oct;62(4):740-5.

DU CAILAR G, RIBSTEIN J, DAURES JP, MIMRAN A (1992) Sodium and left ventricular mass in untreated hypertensive and normotensive subjects. *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 2):H177-81.

DU Z, WEINBAUM S, WEINSTEIN AM, WANG T (2015) Regulation of Glomerulotubular Balance III: Implication of Cytosolic Calcium in Flow-dependent Proximal Tubule Transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jan 28:ajprenal.00601.2014.

ENELING K, CHEN J, WELCH LC, TAKEMORI H, SZNAJDER JI, BERTORELLO AM (2011) Salt-inducible kinase 1 is present in lung alveolar epithelial cells and regulates active sodium transport. *Biochem Biophys Res Commun.* May 27;409(1):28-33.

ENELING K, BRION L, PINTO V, PINHO MJ, SZNAJDER JI, MOCHIZUKI N, EMOTO K, SOARES-DA-SILVA P, BERTORELLO AM (2012) Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. *FASEB J.* Aug;26(8):3230-9.

FAZAN JR R, SILVA VJD, SALGADO HC Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.*, 2001, 8: 19-29

FENG FJ & MACGREGOR GA (2002) Effect of modest salt reductions on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens.*16:761-770.

FENG FJ & MACGREGOR GA (2004) Effect of long-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*;1:

FÉRAILLE E & DOUCET A (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.*, 81: 345-418.

FERRÃO FM, LARA LS, AXELBAND F, DIAS J, CARMONA AK, REIS RI, COSTA-NETO CM, VIEYRA A, LOWE J (2012) Exposure of luminal membranes of LLC-PK1 cells to ANG II induces dimerization of AT1/AT2 receptors to activate SERCA and to promote Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 1;302(7):F875-83.

FRANCO M, MARTINEZ F, QUIROZ Y, GALICIA O, BAUTISTA R, JOHNSON RJ, RODRIGUEZ-ITURBE B (2007) Renal angiotensin II concentration and interstitial infiltration of immune cells are correlated with blood pressure levels in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R251–R256

FRINDT G & PALMER LG (2009) Surface expression of sodium channels and transporters in rat kidney: effects of dietary sodium. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov;297(5):F1249-55.

FRISOLI TM, SCHMIEDER RE, GRODZICKI T, MESSERLI (2012) Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort? *FH. Am J Med*. May;125(5):433-9.

FUNDAÇÃO PRÓ-RENAL BRASIL (2010), InfoRenal, ano 01, Edição 05.

GERDTS E, MYKING OL, OMVIK P (1994) Salt sensitive essential hypertension evaluated by 24 hour ambulatory blood pressure. *Blood Pressure*.;3:375-380

GILL JR JR, GROSSMAN E, GOLDSTEIN DS (1991) High urinary dopa and low urinary dopamine-to-dopa ratio in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*.;18:614-621

GRIMM M & BROWN JH (2010)  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in heart: Role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*, 48(2): 322-330.

GUYTON AC (1992) Kidneys and fluids in pressure regulation. Small volume but large pressure changes *Hypertension*. Jan;19(1 Suppl):I2-8.

GUYTON AC, COLEMAN TG, COWLEY AV JR, SCHEEL KW, MANNING RD JR, NORMAN RA JR (1972) Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med.* May;52(5):584-94.

GUYTON AC & HALL JE (2006) *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed.

GUYTON AC & HALL JE (2011) *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed.

HAIBARA AS & SANTOS RAS (2000) Descobrimto e importância dos barorreceptores. *Rev Bras Hipertens*; 7(2): 113-115.

HE FJ & MACGREGOR GA (2009) A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens.* Jun;23(6):363-84

HE FJ & MACGREGOR GA (2014) Salt and sugar: their effects on blood pressure. *Pflugers Arch.* Dec 30

HEIMANN JC (2000) Sal e hipertensão: aspectos históricos e práticos. *Revista Brasileira de Hipertensão*; 7(1):11-3.

HOFMEISTER LH, PERISIC S, TITZE J (2015) Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arch.* Mar;467(3):551-8.

IBARRA FR, CHENG SX, AGRÉN M, SVENSSON LB, AIZMAN O, APERIA A (2002) Intracellular sodium modulates the state of protein kinase C phosphorylation of rat proximal tubule Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* v. 175, p. 165-71

INGELFINGER JR, PRATT RE, ELLISON K, DZAU VJ (1986) Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest.* Nov;78(5):1311–1315.

IWAMOTO T, KITA S, ZHANG J, BLAUSTEIN MP, ARAI Y, YOSHIDA S, WAKIMOTO K, KOMURO I, KATSURAGI T (2004) Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca<sup>2+</sup> entry via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 10:1193–1199.

JOFFRES MR, CAMPBELL NR, MANNS B, TU K (2007) Estimate of the benefits of a population-based reduction in dietary sodium additives on hypertension and its related health care costs in Canada. *Can J Cardiol.* May 1;23(6):437-43.

JOOSSENS JV, HILL MJ, ELLIOTT P, STAMLER R, LESAFFRE E, DYER A, NICHOLS R, KESTELOOT H (1996) Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol.* Jun;25(3):494-504.

JULA AM & KARANKO HM (1994) Effects on left ventricular hypertrophy of long-term nonpharmacological treatment with sodium restriction in mild-to-moderate essential hypertension. *Circulation.* Mar;89(3):1023-31

JUNIOR JER (2004) Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J. Bras. Nefrol.*;26 (3 Suppl 1)(3):1-3

KEARNEY PM, WHELTON M, REYNOLDS K, MUNTNER P, WHELTON PK, HE J (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* Jan 15-21;365(9455):217-23.

KIRSZTAJN GM (2009) Avaliação de Função Renal. *J Bras Nefrol*;31 (Supl 1):14-20.

KOPP C, LINZ P, DAHLMANN A, HAMMON M, JANTSCH J, MÜLLER DN, SCHMIEDER RE, CAVALLARO A, ECKARDT KU, UDER M, LUFT FC, TITZE J (2013) <sup>23</sup>Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension.* Mar;61(3):635-40.

KOTANKO P, HOGLINGER O, SKRABAL F (1992) Beta 2-adrenoceptor density in fibroblast culture correlates with human NaCl sensitivity. *Am J Physiol.*;263(part 1):C623-C627.

LARA LS, MCCORMACK M, SEMPRUM-PRIETO LC, SHENOUDA S, MAJID DS, KOBORI H, NAVAR LG, PRIETO MC (2012) AT1 receptor-mediated augmentation of angiotensinogen, oxidative stress, and inflammation in ANG II-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F85–F94,

LESSA I (2006) Impacto social da não-adesão ao tratamento da hipertensão arterial *Rev Bras Hipertens* vol.13(1): 39-46.

LEVEY AS, CORESH J, BALK E, KAUSZ AT, LEVIN A, STEFFES MW, HOGG RJ, PERRONE RD, LAU J, EKNOYAN G (2003) National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* Jul 15;139(2):137-47.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov;193(1):265-75.

MACHNIK A, NEUHOFER W, JANTSCH J, DAHLMANN A, TAMMELA T, MACHURA K, PARK JK, BECK FX, MÜLLER DN, DERER W, GOSS J, ZIOMBER A, DIETSCH P, WAGNER H, VAN ROOIJEN N, KURTZ A, HILGERS KF, ALITALO K, ECKARDT KU, LUFT FC, KERJASCHKI D, TITZE J (2009) Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* May;15(5):545-52

MAHAN LK & ARLIN M (1995) Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 7a ed. São Paulo: Roca

MAITLAND K, BRIDGES L, DAVIS WP, LOSCALZO J, POINTER MA (2006) Different effects of angiotensin receptor blockade on end-organ damage in salt-dependent and salt-independent hypertension. *Circulation* 114: 905–910.

MATAVELLI LC, ZHOU X, VARAGIC J, SUSIC D, FROHLICH ED (2007) Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H814–H819,

MELLO-AIRES M (2008) *Fisiologia* (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, pp. 679-767

MENDOZA A & LAZARTIGUES E (2015) The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. Mar 23. pii

MENETON P, JEUNEMAITRE X, DE WARDENER HE, MACGREGOR GA (2005) Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev*. Apr;85(2):679-715.

MICKLEBOROUGH TD, FOGARTY A (2006) Dietary sodium intake and asthma: an epidemiological and clinical review. *Int J Clin Pract*. Dec;60(12):1616-24.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011) Plano de Redução do Sódio em Alimentos Processados. Disponível em: <http://www.abia.org.br/anexos/criteriosparamonitoramentoeavaliacaodoplano27jan.pdf> Acessado em: 19/01/15

MORIMOTO A, UZU T, FUJII T, NISHIMURA M, KURODA S, NAKAMURA S, INENAGA T, KIMURA G (1997) Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *Lancet*. Dec 13;350(9093):1734-7.

NAGATA C, TAKATSUKA N, SHIMIZU N, SHIMIZU H (2004) Sodium intake and risk of death from stroke in Japanese men and women. *Stroke*. Jul;35(7):1543-7. Epub 2004 May 13.

NAKASATO M (2004) Sal e Hipertensão. *Rev Bras Hipertens*. 11: 95–97.

NAKHOUL N & BATUMAN V (2011) Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease. *Contrib Nephrol.*;169:37-50.

NIELSEN S, FRØKIAER J, MARPLES D, KWON TH, AGRE P, KNEPPER MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* Jan;82(1):205-44.

NUNES GLS (2007) Avaliação da função renal em pacientes hipertensos. *Rev Bras Hipertens*, vol.14(3): 162-166.

OKAMOTO M, TAKEMORI H, KATOH Y (2004) Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* Jan-Feb;15(1):21-6.  
108

OMS (2002) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, 28 January -- 1 February.

OMS (2011) World Health Organization and World Economic Forum. From burden to “best buys”:reducing the economic impact of non-communicable diseases in low- and middle-income countries. World Economic Forum, [http://www.who.int/nmh/publications/best\\_buys\\_summary/en/](http://www.who.int/nmh/publications/best_buys_summary/en/)

OMS (2013) A global brief on Hypertension Silent killer, global public health crisis Geneva, Abril.

PAHO (2013) World Health Day: In the Americas, one in three adults has hypertension, the leading risk factor for death from cardiovascular disease. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=8466&Itemid=1926&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8466&Itemid=1926&lang=en), acessado em 21/01/15. Acessado em: 19/01/2015

PARMER RJ, STONE RA, CERVENKA JH (1994) Renal hemodynamics in essential hypertension: racial differences in response to changes in dietary sodium. *Hypertension.*;24:752-757.

PERRY IJ & BEEVERS DG (1992) Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens.* Feb;6(1):23-5.

PINTO YM, PAUL M, GANTEN D (1998) Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* Jul;39(1):77-88.

POCHYNYUK O, RIEG T, BUGAJ V, SCHROTH J, FRIDMAN A, BOSS GR, INSEL PA, STOCKAND JD, VALLON V (2010) Dietary Na<sup>+</sup> inhibits the open probability of the epithelial sodium channel in the kidney by enhancing apical P2Y<sub>2</sub>-receptor tone. *FASEB J.* Jun;24(6):2056-65.

POGSON ZEK, ANTONIAK MD, PACEY SJ, LEWIS SA, BRITTON JR, FOGARTY AW (2008) Does a low sodium diet improve asthma control? A randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* Jul 15;178(2):132-8.

POPOV S, VENETSANO K, CHEDRESE PJ, PINTO V, TAKEMORI H, FRANCO-CERECEDA A, ERIKSSON P, MOCHIZUKI N, SOARES-DA-SILVA P, BERTORELLO AM (2012) Increases in intracellular sodium activate transcription and gene expression via the salt-inducible kinase 1 network in an atrial myocyte cell line. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jul;303(1):H57-65.

POPOV S, TAKEMORI H, TOKUDOME T, MAO Y, OTANI K, MOCHIZUKI N, PIRES N, PINHO MJ, FRANCO-CERECEDA A, TORIELLI L, FERRANDI M, HAMSTEN A, SOARES-DA-SILVA P, ERIKSSON P, BERTORELLO AM, BRION L (2014) Lack of salt-inducible kinase 2 (SIK2) prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake. *PLoS One.* Apr 21;9(4):e95771.

POWLES J, FAHIMI S, MICHA R, KHATIBZADEH S, SHI P, EZZATI M, ENGELL RE, LIM SS, DANAEI G, MOZAFFARIAN D (2013) Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ Open.* Dec 23;3(12):e003733.

PRIETO-CARRASQUERO MC, BOTROS FT, KOBORI H, NAVAR LG (2009) Collecting Duct Renin: A major player in Angiotensin II-dependent Hypertension. *J Am Soc Hypertens.* Mar-Apr;3(2):96-104.

PROVERBIO F, MARÍN R, PROVERBIO T (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta.*, 99: 279-283.

QUEIROZ-MADEIRA EP, LARA LS, WENGERT M, LANDGRAF SS, LÍBANO-SOARES JD, ZAPATA-SUDO G, SUDO RT, TAKIYA CM, GOMES-QUINTANA E, LOPES AG, CARUSO-NEVES C (2010) Na(+)-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1798: 360-366.

ROCAFULL MA, ROMERO FJ, THOMAS LE, DEL CASTILLO JR (2011) Isolation and cloning of the K(+) independent, ouabain-insensitive Na(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1808: 1684-700.

RODRIGUEZ-ITURBE B & VAZIRI ND (2007) Salt-sensitive hypertension--update on novel findings. *Nephrol Dial Transplant.* Apr;22(4):992-5.

RODRÍGUEZ-ITURBE B, FERREBUZ A, VANEGAS V, QUIROZ Y, MEZZANO S, VAZIRI ND (2005) Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct;315(1):51-7.

ROMITO A, LONARDO E, ROMA G, MINCHIOTTI G, BALLABIO A, COBELLIS G (2010) Lack of sik1 in mouse embryonic stem cells impairs cardiomyogenesis by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2. *PLoS One.* Feb 3;5(2):e9029.

RUAN X, WAGNER C, CHATZIANTONIOU C, KURTZ A, ARENDSHORST WJ (1997) Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest.* Mar 1;99(5):1072-81.

SELDIN D & GIEBISCH G (2008) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Burlington, San Diego, & London: Academic Press, pp 169-183.

SELYE H, HALL CE, ROWLEY EM (1943) Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. *Can Med Assoc J*. Aug; 49(2): 88–92.

SHAO W, SETH DM, PRIETO MC, KOBORI H, NAVAR LG (2013) Activation of the renin-angiotensin system by a low-salt diet does not augment intratubular angiotensinogen and angiotensin II in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. Mar 1;304(5):F505-14.

SILVA PA, MUZI-FILHO H, PEREIRA-ACÁCIO A, DIAS J, MARTINS JF, LANDIM-VIEIRA M, VERDOORN KS, LARA LS, VIEIRA-FILHO LD, CABRAL EV, PAIXÃO AD, VIEYRA A (2014) Altered signaling pathways linked to angiotensin II underpin the upregulation of renal Na(+)-ATPase in chronically undernourished rats. *Biochim Biophys Acta*. Dec;1842(12 Pt A):2357-66.

SILVERTHORN DU (2010) *Fisiologia Humana – Uma abordagem integrada*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed.

SJÖSTRÖM M, STENSTRÖM K, ENELING K, ZWILLER J, KATZ AI, TAKEMORI H, BERTORELLO AM (2007) SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium transport through a calcium-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 23;104(43):16922-7

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. (2006) V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* Fev: 1–48.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. (2010). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*; 95(1 supl.1): 1-51

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (2011) Biomarcadores na Nefrologia. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>

SOUZA MHL & ELIAS DO (2006) Fundamentos da Circulação Extracorpórea Segunda Edição Rio de Janeiro, Centro Editorial Alfa Rio. pp 90-101.

STAMLER J (1993). Dietary salt and blood pressure. *Ann N Y Acad Sci*, 676:122–156.

SUSIC D, FROHLICH ED, KOBORI H, SHAO W, SETH DM, NAVAR LG (2011) Salt-induced renal injury in SHR is mediated by AT1 receptor activation. *J Hypertens* 29: 716–723.

SWIFT PA, MARKANDU ND, SAGNELLA GA, HE FJ, MACGREGOR GA (2005) Modest salt reduction reduces blood pressure and urine protein excretion in black hypertensives: a randomized control trial. *Hypertension*. Aug;46(2):308-12. Epub 2005 Jun 27.

TAUSSKY HH & SHORR E (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*. Jun;202(2):675-85.

THERIEN AG & BLOSTEIN R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep;279(3):C541-66.

TITZE J & MACHNIK A (2010) Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jul;19(4):385-92.

VARAGIC J, FROHLICH ED, SUSIC D, AHN J, MATAVELLI L, LÓPEZ B, DÍEZ J (2008) AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHR without affecting pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb;294(2):H853-8.

VERDOORN KS, LINDOSO RS, LOWE J, LARA LS, VIEYRA A, EINICKER-LAMAS M (2010) Bone marrow mononuclear cells shift bioactive lipid pattern in injured kidney towards tissue repair in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 25: 3867-74.

VERHAVE JC, HILLEGE HL, BURGERHOF JG, JANSSEN WM, GANSEVOORT RT, NAVIS GJ, DE ZEEUW D, DE JONG PE (2004) PREVEND Study Group. Sodium intake affects urinary albumin excretion especially in overweight subjects. *J Intern Med.* Oct;256(4):324-30.

WALSH SB & UNWIN RJ (2012) Renal tubular disorders. *Clin Med.* Oct;12(5):476-9.

WEDLER B, BRIER ME, WIERSBITZKY M, GRUSKA S, WOLF E, KALLWELLIS R, ARONOFF GR, LUFT FC (1992) Sodium kinetics in salt-sensitive and salt-resistant normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens.*;10:663-669. Medline

WEINBERGER MH (1996a) Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* May;5(3):205-8.

WEINBERGER MH (1996b) Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension.* Mar;27(3 Pt 2):481-90.

WEINBERGER MH, FINEBERG NS, FINEBERG SE, WEINBERGER M (2001) Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension.* Feb;37(2 Pt 2):429-32.

WHELTON PK, HE J, APPEL LJ, CUTLER JA, HAVAS S, KOTCHEN TA, ROCCELLA EJ, STOUT R, VALLBONA C, WINSTON MC, KARIMBAKAS J (2002) National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *JAMA.* Oct 16;288(15):1882-8.

WHITTEMBURY G & PROVERBIO F (1970) Two modes of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney slices. *Pflugers Arch.*, 316:1-25.

ZHUO JL & LI XC (2013) Proximal nephron. *Compr Physiol.* Jul;3(3):1079-123.

ZICHA J & KUNES J (1999) Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* Oct;79(4):1227-82.