



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Medicina Geral e Familiar

Nova Metodologia de Avaliação da Sensibilidade ao Sódio – Implicações Clínicas

Elsa Catarina Paiva Lourenço

Orientado por:

Professora Doutora Alda Pereira da Silva

Junho'2022

I. Resumo

A hipertensão arterial (HTA) constitui, mundialmente, o principal fator de risco modificável para doenças cardiovasculares, morbidade e mortalidade. Afeta 1,28 bilhões de pessoas.

Associa-se a inúmeras complicações, doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, demência e doença renal crônica. Em 2015 causou 10,7 milhões de mortes.

Estabeleceu-se causalidade entre o consumo de sal, a disrupção da homeostasia de sódio e HTA. A HTA sal sensível ($\approx 50\%$ dos doentes) caracteriza-se pela elevação concomitante do consumo de sal e valores tensionais, constituindo um fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular tão importante como os fatores de risco tradicionais. Polimorfismos dos genes envolvidos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, hiperativação do SNS e disfunção renal constituem fatores etiológicos importantes.

Segundo o modelo clássico de homeostasia, o sódio distribui-se equitativamente nos compartimentos intravascular e intersticial, existindo relação direta entre a composição do organismo em sódio, volume extracelular e pressão arterial. Foi criticado após constatação de dissociação entre o consumo e excreção diárias de sódio. Verificou-se acumulação de sódio em compartimentos, que o acumulam e libertam ciclicamente, sob regulação de eixos neuroendócrinos, incluindo endotélio, pele, cartilagem, músculo e osso.

A exposição endotelial a excesso de sal compromete a sua integridade estrutural e funcional. Observa-se disrupção do glicocálice e aumento da rigidez endotelial, desencadeando disfunção endotelial e vasoconstrição.

Na pele, a acumulação de sódio causa hiperplasia capilar linfática. A sua disrupção provoca aumento da resistência vascular epitelial.

Em indivíduos sal sensíveis, há alteração dos mecanismos centrais de regulação da pressão arterial, desencadeando hiperativação simpática, e consequente elevação tensional.

Tendo em conta a importância da avaliação da sensibilidade ao sódio, propõe-se um novo método, desenvolvido por Oberleithner *et al.*, através da avaliação do

glicocálice eritocitário. A sua aplicação permite a demarcação de um fenótipo distinto, do ponto de vista fisiopatológico e abordagem terapêutica, podendo requerer atualização das *guidelines*.

Palavras-chave

Hipertensão arterial, Sensibilidade ao Sódio, Endotélio vascular, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, Novo Método de Avaliação da Sensibilidade ao Sódio

Este Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

II. Abstract

Systemic arterial hypertension (SAT) is, worldwide, the main avoidable risk factor for the establishment of cardiovascular disease, as well as morbidity and mortality risk. It affects 1.28 billion people.

It is associated with serious long term health consequences, including ischemic heart disease, heart failure, stroke, dementia as well as chronic kidney disease. In 2015, SAT was directly responsible for 10.7 million deaths globally.

One can establish a causal direct association between increased salt intake, the disruption of sodium homeostasis and SAT. Salt sensitive SAT is characterized by paralleled salt intake and blood pressure elevation. It is thought that this form of SAT encompasses 30 to 50% of patients.

Regarding etiologic factors, genetic polymorphisms affecting genes that encode components of the renin-angiotensin-aldosterone system have been established as important contributors to salt sensitive SAT, as well as sympathetic nervous system hyperactivity and renal dysfunction.

Salt sensitivity constitutes a risk factor for increased morbidity and mortality, considered as relevant and important as the other traditional cardiovascular risk factors.

The traditional model of sodium balance considers the existence of two compartments, intravascular and interstitial, where sodium distributes equally. It postulates the existence of a linear association between total body sodium, extracellular volume and blood pressure. The model received criticism after it was recently detected that sodium intake doesn't match excretion in 24 hours. Moreover, sodium storage in body was detected in the endothelium, skin, cartilage muscle and bone. It is generally accepted that these compartments store and release sodium rhythmically, under the influence of neuroendocrine cyclic axis.

Salt loading compromises the structural and functional integrity of the endothelium. It triggers glycocalyx disruption, endothelial rigidity and, ultimately, endothelial dysfunction.

Sodium storage was observed in the skin interstitium. This event drives capillary hyperplasia. When this process fails, it can be noticed increased resistance of capillary arterioles.

In salt sensitive individuals, the central mechanisms that regulate blood pressure are abnormal, triggering sympathetic nervous system hyperactivation, leading to blood pressure elevation.

Considering the importance of sodium sensitivity evaluation, a new method, developed by Oberleithner *et al.*, that analyses changes in the glycocalyx of erythrocytes, is proposed. Its application allows the demarcation of a distinct phenotype, regarding physiopathologic mechanisms and therapeutic approach. Advances in the body of knowledge acquired through application of this new method might require adjustments in hypertension *guidelines*.

The application of this new method enables the definition of a distinct hypertensive phenotype, encompassing specific pathophysiological mechanisms and, therefore, the need for a tailored therapeutic approach. These specificities might require a review of current arterial hypertension *guidelines*.

Keywords

Systemic arterial hypertension, Sodium sensitivity, Vascular endothelium, Renin-Angiotensin-Aldosterone system, New method for the evaluation of sodium sensitivity

The author of this Master Thesis is solely responsible for its content. No responsibility can be attributed to FMUL.

Índice Geral

Índice

I.	Resumo.....	2
II.	Abstract	4
III.	Lista de Abreviaturas.....	9
1.	Introdução	12
1.1.	A Sensibilidade ao Sódio e a sua Importância.....	12
1.1.1.	O que é a Sensibilidade ao Sódio	16
1.1.2.	Perspetiva Histórica.....	17
1.2.	Método Tradicional de Avaliação da Sensibilidade ao Sódio.....	20
1.2.1.	Limitações da Metodologia Tradicional	21
2.	Objetivos	24
3.	Relevância do tema	25
4.	Metodologia	26
4.1.	Pesquisa Bibliográfica.....	26
4.2.	Sistema de Referenciação	27
5.	Resultados	28
5.1.	Aspetos Fisiopatológicos Associados à Sensibilidade ao Sódio	28
5.1.1.	Estrutura e Funções do Endotélio Vascular.....	28
5.1.2.	Interação do Sódio com o Endotélio	43
5.1.3.	Modelo de interação entre o Sódio e o Endotélio	50
5.1.4.	O Papel do Canal ENaC na Interação entre o Sódio e o Endotélio	52
5.1.5.	O papel do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona na Hipertensão Arterial Sal Sensível	59
5.1.6.	Impacto da Sensibilidade ao Sódio nos Mecanismos Centrais de Regulação da Pressão Arterial	70
5.1.7.	Sódio e Inflamação	74
5.1.8.	Armazenamento de Sódio na Pele	77
5.2.	Novo Método de Determinação da Sensibilidade ao Sódio	81
5.2.1.	Fundamentação da Técnica.....	81
5.2.2.	Protocolo do Novo Método de Determinação da Sensibilidade ao Sódio.....	83
5.3.	Vantagens da Técnica.....	87
5.4.	Limitações	87

6. Discussão	88
7. Conclusões.....	97
8. Perspetivas Futuras	98
9. Agradecimentos	99
10. Referências Bibliográficas	100

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura do Endotélio Vascular.....	29
Figura 2 – Condições associadas a disrupção do glicocálice endotelial.....	31
Figura 3 - Promoção da manutenção da integridade do glicocálice endotelial pela ação da tensão de cisalhamento.	37
Figura 4 – Funções desempenhadas pelo endotélio no estado quiescente.	39
Figura 5 – Disfunção endotelial desencadeada pela ação de citocinas inflamatórias.	42
Figura 6 - Papel do ENaC na determinação das propriedades mecânicas do córtex celular.	57
Figura 7 - Modelo dos mecanismos centrais envolvidos no estabelecimento de hipertensão arterial (Ang II: angiotensina II, Aldo: aldosterona, EO: ouabaína endógena, AVP: arginina-vasopressina, BDNF: fator neurotrófico cerebral, RVLM: medula ventrolateral rostral, SON: núcleo supra-otico, mPVN: divisão magnocelular do núcleo paraventricular).....	73
Figura 8 - Papel do inflamassoma NLRP3 na promoção da disfunção endotelial.	76
Figura 9 – Protocolo do novo método de determinação da sensibilidade ao sódio estabelecido por Oberleithner <i>et al.</i>	85
Figura 10 – Determinação da sensibilidade ao sódio eritrocitária (ESS) em duas amostras de sangue.	85

III. Lista de Abreviaturas

AT	Recetor de Angiotensina
AP 1	Proteína ativadora 1
AQP	Aquaporina
ASC	Proteína adaptadora do domínio CARD associada à apoptose
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
AVP	Arginina-vasopressina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
c- JNK	Cinase c-Jun N-terminal
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ENaC	Canal epitelial de sódio
eNOS	Sintase de óxido nítrico
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigénio
ET 1	Endotelina 1
GAG	Glicosaminoglicanos
GE	Glicocálice endotelial
HIF 1	Fator de transcrição induzido pela hipóxia 1
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IκB	Inibidor do fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
IP3	Inositol-1-4-5-trifosfato
KDa	Quilodalton
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénios
MCP 1	Proteína quimiotática de monócitos 1

mM	Milimoles
MMP	Metaloproteinases de matriz
NADPH	Fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina
Nedd4-2	Ubiquitina ligase 3
NET	Armadilha extracelulare de neutrófilos
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NHE3	Contratransportador de Na ⁺ /H ⁺ 3
NLRP3	Proteínas com domínio de ligação a nucleótidos, domínio de pirina e repetições ricas em Leucina
nM	Nanomoles
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
NPV	Núcleos paraventricular
NSO	Núcleo supra-óptico
PA	Pressão arterial
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PIP-2	Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
Po	Probabilidade de abertura
RM	Recetor mineralocorticóide
SG-k1	Cinase regulada por soro e glucocorticóide 1
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TC	Tensão de cisalhamento
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
Tiam 1	Proteína 1 de invasão e indução de metástases do linfoma de células T
TOPH	Ensaio de Prevenção da Hipertensão (Trials of Hypertension Prevention)
μm	Micrómetro
UTR	Região não traduzida
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VCAM 1	Molécula de adesão a células vasculares 1

VEGF Fator de crescimento das células endoteliais

VEGFR Recetor do fator de crescimento das células endoteliais

1. Introdução

1.1. A Sensibilidade ao Sódio e a sua Importância

A hipertensão arterial constitui uma síndrome clínica caracterizada pela elevação sustentada dos valores de pressão arterial (PA) (Brouwers et al., 2021; Organization World Health & World Health Organization, 2012; Unger et al., 2020; Williams et al., 2018). A Organização Mundial de Saúde preconiza, para o diagnóstico, valores de PA sistólica ≥ 140 mmHg ou de PA diastólica ≥ 90 mmHg (Organization World Health & World Health Organization, 2012; Unger et al., 2020; Williams et al., 2018). O diagnóstico requer o registo de um perfil tensional alterado em, pelo menos, duas ocasiões diferentes, espaçadas por um intervalo de uma semana (Unger et al., 2020). Apesar de a avaliação dos valores tensionais ser, habitualmente, efetuada em serviços de saúde, as *guidelines* atuais recomendam a confirmação do diagnóstico através da avaliação da pressão arterial em ambulatório, recorrendo a aparelhos automatizados ou a métodos de registo dos valores num período de vinte e quatro horas (Brouwers et al., 2021).

Esta síndrome tem etiologia multifatorial, decorrendo da interação complexa e dinâmica entre múltiplos fatores, genéticos, epigenéticos, biológicos, ambientais e socioeconómicos (Brouwers et al., 2021; Williams & Mancina, 2018). Na maioria dos casos, não se estabelece um fator ou fatores etiológicos bem definidos e correlacionados através de uma associação causal, designando-se a condição clínica de hipertensão arterial essencial (Brouwers et al., 2021; Williams & Mancina, 2018). Constitui cerca de 90% dos casos na espécie humana (Rassler, 2010). De qualquer modo, estima-se que a contribuição de fatores genéticos para a génese da doença seja de 30 a 50% (Kurtz et al., 2017). Múltiplos programas de sequenciação do genoma humano e meta-análises identificaram, pelo menos, 120 *loci* envolvidos na regulação da pressão arterial sistémica (Williams & Mancina, 2018). A doença decorre, geralmente, de polimorfismos em múltiplos alelos, cujos efeitos interagem entre si, modulando e potenciando a sua ação, para estabelecer as características diferenciais e únicas que definem a condição de cada doente (Elijovich et al., 2016; Williams &

Mancia, 2018). De fato, a doença hipertensiva tem, em múltiplos doentes, características heterogêneas (Williams & Mancia, 2018).

A hipertensão arterial constitui o principal fator de risco modificável para o estabelecimento de doenças cardiovasculares, bem como um dos principais fatores contributivos para a morbidade e mortalidade, a nível mundial (Brouwers et al., 2021; Unger et al., 2020; Williams & Mancia, 2018). De fato, uma meta-análise desenvolvida no âmbito do estudo da carga global de doença, de 2017, estabeleceu que a elevação da pressão arterial sistólica constitui o principal fator de risco independente para a mortalidade e anos de Vida vividos com incapacidade (Brouwers et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 1,28 bilhões de pessoas, a nível mundial, são hipertensas (World Health Organization, 2021). Contudo, apenas cerca de metade destes indivíduos o sabe (World Health Organization, 2021). Dois terços das pessoas hipertensas provêm de países com um nível socioeconómico baixo ou médio (World Health Organization, 2021). Adicionalmente, na maioria dos doentes, não foi alcançado o controlo adequado da doença (World Health Organization, 2021). Estima-se que, em 2025, 29% da população adulta do mundo, aproximadamente 1,56 bilhões de pessoas, terão hipertensão arterial estabelecida (Calzerra et al., 2018).

A hipertensão arterial mal controlada está associada a inúmeras complicações cardiovasculares e renais, entre outras (B. Zhou et al., 2021). É um dos principais fatores de risco modificáveis no que toca à doença cardíaca isquémica, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, demência e doença renal crónica (Felder et al., 2013; B. Zhou et al., 2021). Em 2015 causou, mundialmente, 10,7 milhões de mortes (Mills et al., 2016) e 212 milhões de anos de Vida ajustados à incapacidade (Forouzanfar et al., 2017). Desta forma, assume elevado custo social e económico (Mills et al., 2016). De fato, entre 2012 e 2013, nos Estados Unidos da América, a doença hipertensiva gerou custos de 109,1 bilhões de dólares (Mills et al., 2016).

Estabeleceu-se, na evidência científica gerada nas últimas décadas, uma associação causal relevante entre o consumo de sal, a disrupção da homeostasia de sódio no organismo e o desenvolvimento de hipertensão arterial (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Organization World Health & World Health Organization, 2012). Designa-se a condição clínica caracterizada pela existência de uma correlação causal entre o consumo de uma carga de sal e o incremento decorrente dos valores

tensionais de hipertensão sal sensível (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Felder et al., 2013). É citado, na literatura, como um fator etiopatogénico da hipertensão arterial em 30 a 50% dos casos (Balafa & Kalaitzidis, 2021).

A sensibilidade incrementada ao sódio revela-se um fator importante no que concerne à saúde global das populações, visto que, nas sociedades atuais, se preconizam estilos de Vida que incluem dietas com um teor de sal muito superior ao ideal (Balafa & Kalaitzidis, 2021).

O fenótipo sal sensível da hipertensão arterial associa-se a fatores etiológicos, mecanismos e processos fisiopatológicos diferentes relativamente ao subtipo sal resistente, o que se traduz numa resposta diferencial à terapêutica instituída (Elijovich et al., 2016; Mishra et al., 2018). Desta forma, revela-se fulcral o estudo aprofundado dos fatores causais geradores e potenciadores de sensibilidade ao sódio, e a descrição do modo como as alterações e decorrentes geram os mecanismos e processos patológicos que culminam na doença. Assume-se como determinante o estudo dos polimorfismos genéticos, fatores biológicos e ambientais que conferem sensibilidade aumentada ao sódio, bem como o modo como a sua interação desencadeia os mecanismos fisiopatológicos que disrompem os processos fisiológicos essenciais para a homeostasia do organismo, gerando doença (Ando & Fujita, 2012).

A sensibilidade ao sódio constitui um fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular, independente dos valores de pressão arterial e igualmente importante (Kurtz et al., 2017; Qi et al., 2018). De fato, considera-se que a sensibilidade ao sódio acarreta, a nível prognóstico, implicações tão importantes como os fatores de risco cardiovascular tradicionais (Kurtz et al., 2017). Predispõe, ainda, ao desenvolvimento de doença renal, carcinoma gástrico, osteoporose e asma (Felder et al., 2013).

Várias meta-análises estabeleceram um papel importante de fatores genéticos no aumento da sensibilidade ao sódio, na espécie humana (Rassler, 2010). Considera-se que polimorfismos em genes que codificam componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), como o angiotensinogénio (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Mishra et al., 2018; Rassler, 2010), a enzima conversora de angiotensina (ECA), a renina ou a sintase de aldosterona (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Rassler, 2010). Este sistema intervém na homeostasia do sódio e água do organismo e, logo, balanço do

fluido extracelular (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Ressler, 2010). Atribui-se, também, um papel importante à regulação central da pressão arterial, ativação do sistema nervoso simpático e rim (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Mishra et al., 2018; Ressler, 2010).

Nas sociedades ocidentais, o consumo diário de sal estimado é de 8 a 12 g (Organization World Health & World Health Organization, 2012). Esta quantidade excede as recomendações da Organização Mundial de Saúde, que estabelece uma dose diária de 5 g (Organization World Health & World Health Organization, 2012). Verificou-se uma associação consistente, em estudos de coorte (Oberleithner et al., 2011) e ensaios clínicos randomizados com controlo TOHP I e II (ensaios para a prevenção da hipertensão arterial) (Olde Engberink et al., 2017), entre o consumo de uma dose diária superior à dose recomendada e o desenvolvimento de hipertensão arterial, bem como aumento do risco cardiovascular (Oberleithner et al., 2011; Olde Engberink et al., 2017). No estudo INTERSALT, um estudo epidemiológico estandardizado, com uma amostra ampla, de 10 079 voluntários provenientes de 32 países, avaliou-se o efeito do consumo de sódio, estimado a partir da excreção urinária, nos valores de pressão arterial (Jeremiah Stamler, 1997). Verificou-se uma associação entre a redução da ingestão de sódio em 100mmol por dia e decréscimo da pressão arterial sistólica e diastólica médias de 7,1 e 3,8 mmHg, respetivamente (Jeremiah Stamler, 1997).

Uma meta-análise recente, de treze estudos de coorte com duração igual ou superior a quatro anos, estabeleceu uma relação direta entre o consumo aumentado de sódio e o risco de doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (AVC) (Organization World Health & World Health Organization, 2012). O incremento do consumo de sal está associado à elevação dos valores de pressão arterial (Tapia-Castillo et al., 2015), enquanto a restrição reduz os valores tensionais (Organization World Health & World Health Organization, 2012).

De igual modo, uma revisão recente da Cochrane demonstrou que a restrição de sal na dieta desencadeia a redução dos valores de pressão arterial, de 0,4 mmHg em indivíduos normotensos, e 4 mmHg em hipertensos (Ellison & Welling, 2021).

A relação entre o consumo de sódio e o risco cardiovascular é representada por uma curva que assume uma conformação em J; logo, não se estabelece uma relação linear entre as duas variáveis (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Felder et al., 2013).

Estima-se que a redução do consumo diário de sal para os valores recomendados possibilitaria a prevenção de 2,5 milhões de mortes anualmente (Organization World Health & World Health Organization, 2012). Nos Estados Unidos, a redução do consumo diário de sal da população em 3 g, reduziria os custos de saúde anuais em 10 a 24 bilhões de dólares (Olde Engberink et al., 2015). Deste modo, a redução do consumo de sal revela-se como uma meta de saúde pública essencial para a prevenção da doença e manutenção da saúde das populações (Olde Engberink et al., 2015).

Independentemente do grau de sensibilidade ao sal do doente hipertenso, a restrição de sal na dieta constitui um dos pilares do tratamento (Olde Engberink et al., 2015; Takahashi et al., 2011). Demonstrou, como efeitos, a redução da pressão arterial (Olde Engberink et al., 2015; Takahashi et al., 2011) e potenciação da acção de fármacos antihipertensores, como bloqueadores do sistema renina-angiotensina e diuréticos (Olde Engberink et al., 2015).

1.1.1. O que é a Sensibilidade ao Sódio

A variação dos valores de pressão arterial em diferentes indivíduos, normotensos e hipertensos, após a administração de uma dose de carga de sal, é extremamente variável (Ando & Fujita, 2012; Ellison & Welling, 2021; Olde Engberink et al., 2015; Tapia-Castillo et al., 2015). Atribui-se esta variabilidade a diferenças na sensibilidade ao sal entre pessoas, associada a efeito diferencial do sal no sistema cardiovascular (Ando & Fujita, 2012; Ellison & Welling, 2021; Olde Engberink et al., 2015; Tapia-Castillo et al., 2015). De acordo com a Sociedade Americana de Cardiologia, a hipertensão arterial sal sensível caracteriza-se pela alteração dos valores de pressão arterial concomitante à variação do consumo de sal (Kurtz et al., 2017). Atualmente, não existe consenso no que concerne aos critérios de diagnóstico de sensibilidade ao sódio (Kurtz et al., 2017). Contudo, estima-se que cerca de 30 a 50%

dos indivíduos hipertensos sejam sensíveis ao sódio, condição que engloba até 25% dos normotensos (Kurtz et al., 2017).

A sensibilidade ao sal é definida como a variação da pressão arterial igual ou superior a 10 mmHg quando é alterado o balanço de sal através de uma combinação de dieta e diuréticos de ansa (Ellison & Welling, 2021).

1.1.2. Perspetiva Histórica

O modelo clássico de homeostasia de sal, postulado por Guyton *et al.*, propõe a existência de dois compartimentos extracelulares para a distribuição de sódio, intravascular e intersticial (Wenstedt et al., 2018). Defende que o ião se distribui equitativamente em ambos os compartimentos (Wenstedt et al., 2018). Guyton *et al.* defendem a existência de uma relação direta entre a composição total do organismo em sódio, o volume extracelular total e a pressão arterial (Wiig et al., 2013). Consideram que os mecanismos renais que intervêm na regulação do fluxo-sanguíneo, da pressão hidrostática glomerular e natriurese de pressão asseguram o controlo da pressão arterial a longo prazo, e a manutenção da homeostasia (Wiig et al., 2013).

De acordo com o modelo, após sobrecarga aguda de sal, ocorre aumento da concentração plasmática de sódio (Hall & Hall, 2020). O aumento da osmolalidade é detetado por quimiorreceptores no hipotálamo anterior, desencadeando a sensação de sede e aumento da ingestão de água (Olde Engberink et al., 2020), bem como a secreção de hormona arginina-vasopressina (AVP) pelos núcleos paraventricular (NPV) e supra-óptico (NSO) do hipotálamo, e a sua secreção pela neurohipófise na circulação sistémica (Bankir et al., 2017; Hall & Hall, 2020; Ogawa et al., 2018). Ao atuar nos receptores V2 dos ductos coletores renais, a hormona desencadeia a translocação de transportadores aquaporina 2 (canais de água) para a membrana apical, aumentando a reabsorção renal de água, a favor do gradiente osmótico (Bankir et al., 2017; Hall & Hall, 2020). Subsequentemente, aumenta o volume plasmático e, logo, a pressão arterial sistémica (Hall & Hall, 2020). O incremento de volume plasmático associa-se a elevação do gradiente entre a pressão de enchimento sistémico e a pressão na aurícula direita, potenciando o efeito de sucção gerado pelas pressões diastólicas

negativas na aurícula direita (Berger & Takala, 2018; Hall & Hall, 2020; Henderson et al., 2010). Assim, aumenta o retorno venoso ao coração direito (Hall & Hall, 2020). Conseqüentemente, aquando do retorno do sangue ao coração esquerdo, o volume sistólico final no ventrículo esquerdo é superior, aumentando a distensão ventricular (Berger & Takala, 2018; Hall & Hall, 2020; Henderson et al., 2010). Proporciona-se, assim, um alinhamento mais favorável das miofibrilhas de actina e miosina miocárdicas para gerar força de contração máxima (Hall & Hall, 2020; Monge García et al., 2019). Este efeito inotrópico desencadeia aumento do débito cardíaco, incrementando o fluxo sanguíneo renal medular através da rede capilar formada pelos *vasa recta* (Ivy & Bailey, 2014; Moss & Layton, 2014). Ocorre elevação da pressão hidrostática do interstício renal, desencadeando ativação de vias parácrinas e processos biofísicos que culminam na inibição reabsorção tubular de sódio (Ivy & Bailey, 2014; Moss & Layton, 2014). É, assim, potenciada a natriurese e diurese, aumentando a excreção renal de sódio e água (Hall & Hall, 2020; Ivy & Bailey, 2014; Moss & Layton, 2014), retornando a valores fisiológicos (Olde Engberink et al., 2020). Deste modo, o organismo retorna à homeostasia prévia, alcançando valores de normotensão (Hall & Hall, 2020; Olde Engberink et al., 2020).

Os mecanismos que regulam a excreção renal, através do acoplamento entre a ingestão e excreção renal de sódio, possibilitam a manutenção da homeostasia (Hall & Hall, 2020). A falência destes processos está, de acordo com o modelo proposto por Guyton, na gênese do desenvolvimento de hipertensão arterial sistémica (Hall & Hall, 2020; Olde Engberink et al., 2020).

Ensaio posteriores aos desenvolvidos por Guyton *et al.* revelaram que o aumento do consumo de sódio não se associava a elevação do volume de água no organismo, nem a aumento da excreção urinária de sódio, contrariando os pressupostos defendidos pelo modelo clássico de balanço de sódio (Wenstedt et al., 2018).

De fato, em 2000, Heer *et al.* demonstraram que uma dieta rica em sal não se associava a incremento da composição total em água (Wenstedt et al., 2018). Em 2002, Tietze *et al.* analisaram o balanço eletrolítico de voluntários saudáveis sujeitos a condições de simulação de voo aerospacial, durante 135 dias (Wenstedt et al., 2018). Verificaram, no final do ensaio, que o ganho de sódio suplantava o de água (Wenstedt

et al., 2018). Considerou-se, então, a possibilidade de armazenamento não osmótico de sódio (Wenstedt et al., 2018).

Rakova *et al.* desenharam um estudo com o propósito de avaliar o balanço de sódio em indivíduos saudáveis, que participavam num programa de simulação de voo aerospacial a Marte, Mars 500 (Rakova et al., 2013). Os participantes mantiveram-se num ambiente confinado durante o período do ensaio (Titze, 2014). Estabeleceram-se dois braços do estudo, que seguiram os voluntários durante 105 e 520 dias, respetivamente (Titze, 2014). As suas dietas continham quantidades de sódio precisamente determinadas (Titze, 2014). Procedia-se à colheita da urina diária total produzida, avaliando-se o teor de sódio excretado (Titze, 2014). Estimou-se, durante este período, o consumo de 15 Kg de sal, sendo 90-95% eliminado através da urina (Titze, 2014). Contudo, contrariamente ao postulado pelo modelo clássico de homeostasia do sal, a excreção diária de sódio raramente se equiparava ao consumo nesse período (Lerchl et al., 2015; Titze, 2014). Verificaram-se flutuações regulares, substanciais, da composição em sódio do organismo, com periodicidade de, aproximadamente, um mês (Titze, 2014). Eram acompanhadas por flutuações, de periodicidade semanal, dos valores de Aldosterona, Cortisol e Cortisona (Titze, 2014). Os autores consideraram a existência de eixos neuroendócrinos, rítmicos, que regulam o armazenamento e excreção de sódio no organismo (Lerchl et al., 2015; Titze, 2014). As flutuações dos eixos hormonais introduziam uma variável de confundimento, gerando um erro de estimativa de consumo de sal de até 3g por dia (Lerchl et al., 2015; Polychronopoulou et al., 2019).

Assim, concluiu-se a ocorrência de armazenamento e excreção periódica de sódio, gerando variabilidade significativa (Rakova et al., 2013; Titze, 2014). Não se detetaram alterações mensuráveis no peso, evidenciando o desacoplamento entre o balanço de sódio e água (Rakova et al., 2013; Titze, 2014). Esta variabilidade também não se traduziu em alterações na pressão arterial sistémica (Rakova et al., 2013; Titze, 2014). Desta forma, estes resultados sugerem o armazenamento temporário de sódio em compartimentos do organismo, de forma osmoticamente inativa (Rakova et al., 2013; Titze, 2014).

Os resultados obtidos contrariam a noção da constância da composição do organismo em sódio (Titze, 2014). Assumem relevância clínica visto que, de momento,

a quantificação de sódio na urina de 24 horas é considerado o método *gold standard* para a estimativa do consumo de sal (Titze, 2014).

1.2. Método Tradicional de Avaliação da Sensibilidade ao Sódio

Desenvolveram-se alguns métodos de estudo da sensibilidade individual ao sódio, utilizados no âmbito de investigação clínica (Kurtz et al., 2017). Contudo, não se conhecem, ainda, métodos validados passíveis de serem utilizados na prática clínica (Kurtz et al., 2017).

A Sociedade Americana de Cardiologia recomenda um protocolo de curto prazo, que decorre num período de duas semanas, para estudo da sensibilidade ao sódio em contexto ambulatorio (Kurtz et al., 2017).

O protocolo para avaliação da sensibilidade ao sódio requer a alteração do teor de sal consumido durante duas semanas, e posterior colheita sequencial de urina de 24 h e avaliação do perfil tensional (Kurtz et al., 2017). Durante a primeira semana, preconiza-se o consumo de teor de sal elevado, estabelecendo uma meta diária de cerca de 250 milimoles (mM) de cloreto de sódio por dia (Kurtz et al., 2017). Na segunda semana, a quantidade de cloreto de sódio ingerida por dia é reduzida, para até 50 mM por dia (Kurtz et al., 2017). As dietas prescritas a cada indivíduo devem ser bem caracterizadas, devendo manter-se a monitorização da *compliance* durante o período de estudo (Kurtz et al., 2017). A Sociedade Americana de Cardiologia defende que a ordem de administração das dietas com diferente teor de cloreto de sódio pode variar, consoante os objetivos do estudo implementado (Kurtz et al., 2017). Preconizam-se, durante este período, múltiplas avaliações do sódio excretado na urina colhida durante 24 h, de modo a confirmar o consumo de cloreto de sódio (Kurtz et al., 2017). Adicionalmente, devem ser efetuadas várias medições dos valores de pressão arterial através de um método com elevada reprodutibilidade (Kurtz et al., 2017). Tendo em conta os resultados obtidos, consideram-se indivíduos normotensos como sal sensíveis quando se verifica, durante o período de estudo, uma elevação da pressão arterial média igual ou superior a 3 a 5 mmHg (Kurtz et al., 2017). Para os indivíduos

hipertensos, considera-se uma variação da pressão arterial média igual ou superior a 8 a 10 mmHg (Kurtz et al., 2017).

No que toca às técnicas para avaliação dos valores de pressão arterial, estão definidos métodos específicos (Kurtz et al., 2017). Propõe-se a utilização de um esfigmomanómetro digital (Kurtz et al., 2017). Para os indivíduos previamente normotensos, estabelece-se uma média de trinta avaliações num período de uma hora, na posição supina; considera-se existir sensibilidade ao sódio quando se verifica uma elevação da pressão arterial média igual ou superior a 3 mmHg (Kurtz et al., 2017). Por outro lado pode, nestes indivíduos, avaliar-se os valores tensionais na posição sentada, efetuando-se uma média de doze registos, num período de uma hora (Kurtz et al., 2017). Para os indivíduos previamente hipertensos, preconiza-se seis registos em meia hora, na posição supina; considera-se sensibilidade ao sódio para uma elevação da pressão igual ou superior a 8 mmHg (Kurtz et al., 2017). Adicionalmente, nestes doentes, pode recorrer-se a métodos de avaliação de pressão arterial num período de vinte e quatro horas, efetuando-se registos a cada vinte minutos, entre as 6.00 horas e as 21.59 horas, e a cada trinta minutos durante a noite (Kurtz et al., 2017). Neste caso, o *cutoff* para se considerar a existência de sensibilidade ao sódio é igual ou superior a 10 mmHg (Kurtz et al., 2017).

Vários estudos nos quais foi aplicado este método para a determinação da sensibilidade ao sódio constataram elevada reprodutibilidade dos resultados obtidos, superior a 90% (Kurtz et al., 2017).

1.2.1. Limitações da Metodologia Tradicional

O método *gold standard* para avaliação da sensibilidade ao sódio é amplamente criticado, pois baseia-se no modelo clássico de homeostasia do sal postulado por Guyton (Titze, 2014). A sua fundamentação científica baseia-se no pressuposto de que, para um consumo de sal fixo, num período de 24 horas, a ingestão e excreção de sódio são equitativas (Titze, 2014). Contudo, conforme explanado neste trabalho, o modelo clássico da homeostasia de sódio de Guyton, de dois compartimentos, foi refutado pela evidência científica obtida através de múltiplos

ensaios clínicos num período relativamente recente (Lerchl et al., 2015; Titze, 2014; Wenstedt et al., 2018). Adicionalmente, constatam-se, diretamente, discrepâncias consideráveis entre o consumo e a excreção diária de sódio (Lerchl et al., 2015; Santos et al., 2020; Titze, 2014; Wenstedt et al., 2018). De fato, estudos do balanço de sódio a longo prazo revelaram, para um consumo fixo de sal, variações entre a ingestão e excreção diárias de até 80 mmol (Olde Engberink et al., 2020). Estimou-se ser necessária a colheita de urina de 24 horas em 7 dias consecutivos para se conseguir estimar o *steady state* do consumo de sal num dia em 24h (Olde Engberink et al., 2020). Num estudo de coorte que seguiu 574 doentes em regime de ambulatório ao longo de 17 anos, a análise dos dados relativos a múltiplas colheitas de urina de 24 h revelou, em metade dos casos, uma discrepância superior a 34 mol entre os valores de base e seguimento (Olde Engberink et al., 2017). Atribui-se esta variabilidade a ciclos rítmicos infradianos da concentração sérica de sódio desencadeados por flutuações de Aldosterona e Cortisol (Lerchl et al., 2015; Olde Engberink et al., 2017). De modo expetável, esta variabilidade entre as estimativas de consumo de sódio com base em apenas uma colheita, ou estudo durante um período prolongado, associou-se a diferenças substanciais nos *outcomes* a longo prazo (Olde Engberink et al., 2017). Contudo, este método parece ser adequado e fiável para estimar o consumo médio de sódio numa amostra populacional (Olde Engberink et al., 2017).

A sensibilidade deste método é, ainda, adicionalmente comprometida pela constante variação no consumo diário de sal, medicação, como diuréticos, bem como erros de colheita (Olde Engberink et al., 2020).

O método envolve um protocolo complexo e laborioso, de difícil aplicabilidade pelos doentes na sua Vida diária (Santos et al., 2020). Por requerer, durante um período de tempo longo, de duas semanas, a disponibilidade para as múltiplas avaliações dos valores de pressão arterial, bem como a colheita de urina produzida num período de 24h (Kurtz et al., 2017), pode exigir absentismo laboral ou profissional, gerando, assim, custos profissionais, sociais e económicos (Santos et al., 2020). Estas características do método avaliativo associam-se a redução da *compliance* dos doentes, o que pode introduzindo erros no cumprimento do protocolo que comprometam a fiabilidade dos resultados obtidos (Santos et al., 2020). Deste modo, os clínicos não devem guiar a sua prática pelos resultados obtidos através deste método (Santos et

al., 2020). Adicionalmente, a técnica é dispendiosa, criando mais custos socioeconómicos (Santos et al., 2020).

2. Objetivos

- Revisão narrativa da literatura existente sobre os fatores etiológicos da sensibilidade ao sódio, bem como os mecanismos fisiopatológicos que estabelecem a doença hipertensiva sal sensível.
- Fundamentação e desenvolvimento de nova metodologia para avaliação da sensibilidade ao sódio.
- Análise comparativa das diversas metodologias de avaliação da sensibilidade ao sódio.

3. Relevância do tema

A área de investigação clínica da sensibilidade ao sódio e a sua relação com o desenvolvimento de hipertensão arterial constitui uma área de investigação relativamente recente tendo, por isso, grande potencial de exploração e desenvolvimento.

Tendo em conta o aumento do risco cardiovascular, bem como de morbilidade e mortalidade decorrentes de sensibilidade incrementada ao sódio, o desenvolvimento de novas metodologias de avaliação da sensibilidade ao sódio assume inúmeros potenciais benefícios e relevância clínica determinante. De fato, o estudo da sensibilidade ao sódio revela-se importante para estabelecer o risco de desenvolvimento de doenças crónicas, e aplicação de medidas preventivas, possibilitando, assim, a manutenção da saúde dos indivíduos e redução da carga de morbilidade associada às doenças crónicas, bem como da mortalidade. Adicionalmente, tendo em conta os elevados custos decorrentes da abordagem e tratamento de doenças crónicas, os métodos preventivos possibilitam a poupança de recursos, gerando um retorno positivo para a sociedade, tanto a nível individual como coletivo.

4. Metodologia

4.1. Pesquisa Bibliográfica

De modo a obter evidência científica para sustentar o meu Trabalho Final de Mestrado, recorri às bases de dados PubMed e SciELO.

Utilizei, para a pesquisa, termos MeSH, bem como pesquisa livre.

Termos MeSH pesquisados	Número de artigos encontrados
Salt and the Endothelium, Salt effect on the endothelial glycocalyx, Endothelial glycocalyx and salt excess, Endothelial cells function and salt	30 artigos
ENaC and salt sensitivity, Effect of sodium on endothelial actin filaments, Sodium and G-actin polimerization, Interaction between endothelial actin and nitric oxide synthase, ENaC effect on nitric oxide synthase, Nitric oxide synthase and salt	15 artigos
Sodium sensitivity and central hypertension, Sodium sensitivity and central sympathetic system activation	7 artigos
Angiotensin II and salt sensitivity	18 artigos
Vasopressin and salt sensitivity	12 artigos
Aldosterone and salt sensitivity	16 artigos
Salt storage on the skin and salt sensitivity, Salt and inflammation	14 artigos

Termos pesquisados por pesquisa livre	Número de artigos encontrados
Salt sensitive phenotype, Salt sensitive hypertension	24 artigos
Methods for salt sensitivity evaluation	6 artigos
Salt sensitivity targeted treatment	8 artigos

4.2. Sistema de Referência

Utilizei o programa Mendeley como sistema de referência.

5. Resultados

5.1. Aspetos Fisiopatológicos Associados à Sensibilidade ao Sódio

5.1.1. Estrutura e Funções do Endotélio Vascular

O endotélio vascular é o maior órgão do corpo humano, compondo a superfície interna de todos os vasos (Wenstedt et al., 2018). É composto por aproximadamente um trilião de células endoteliais, estendendo-se por uma área de cerca de 3000 m² (Krüger-Genge et al., 2019). A sua espessura varia entre 0,5 micrómetros (µm), nos capilares, e 4,5 µm, nas artérias de maior diâmetro (Wenstedt et al., 2018).

Constitui uma camada celular que cobre a superfície luminal de artérias, veias e capilares (Krüger-Genge et al., 2019; Lenasi, 2018; Olde Engberink et al., 2015). As células endoteliais são células polarizadas, escamosas; formadas por uma superfície apical, exposta ao plasma, e superfície basolateral, em contacto com a membrana basal glicoproteica, secretada pelas células, à qual estão ancoradas (Krüger-Genge et al., 2019). São finas, alongadas, com um comprimento de cerca de 30 a 50 µm, e uma largura aproximada de 10 a 30 µm (Krüger-Genge et al., 2019). Estão orientadas segundo o eixo do vaso, de forma a minimizar a tensão de cisalhamento (TC) exercida pelo fluxo sanguíneo (Krüger-Genge et al., 2019). A sua estrutura está representada na figura 1 (Gaudette et al., 2020).

Do ponto de vista embrionário, as células endoteliais têm origem a partir da mesoderme, através da diferenciação de hemangioblastos e angioblastos (Lenasi, 2018). Podem ainda formar-se a partir da desdiferenciação de células mesenquimatosas e adipócitos (Lenasi, 2018). Contudo, células endoteliais de diferentes tecidos podem ter diferentes características estruturais e fenotípicas, assumindo uma heterogeneidade considerável (Krüger-Genge et al., 2019; Lenasi, 2018).

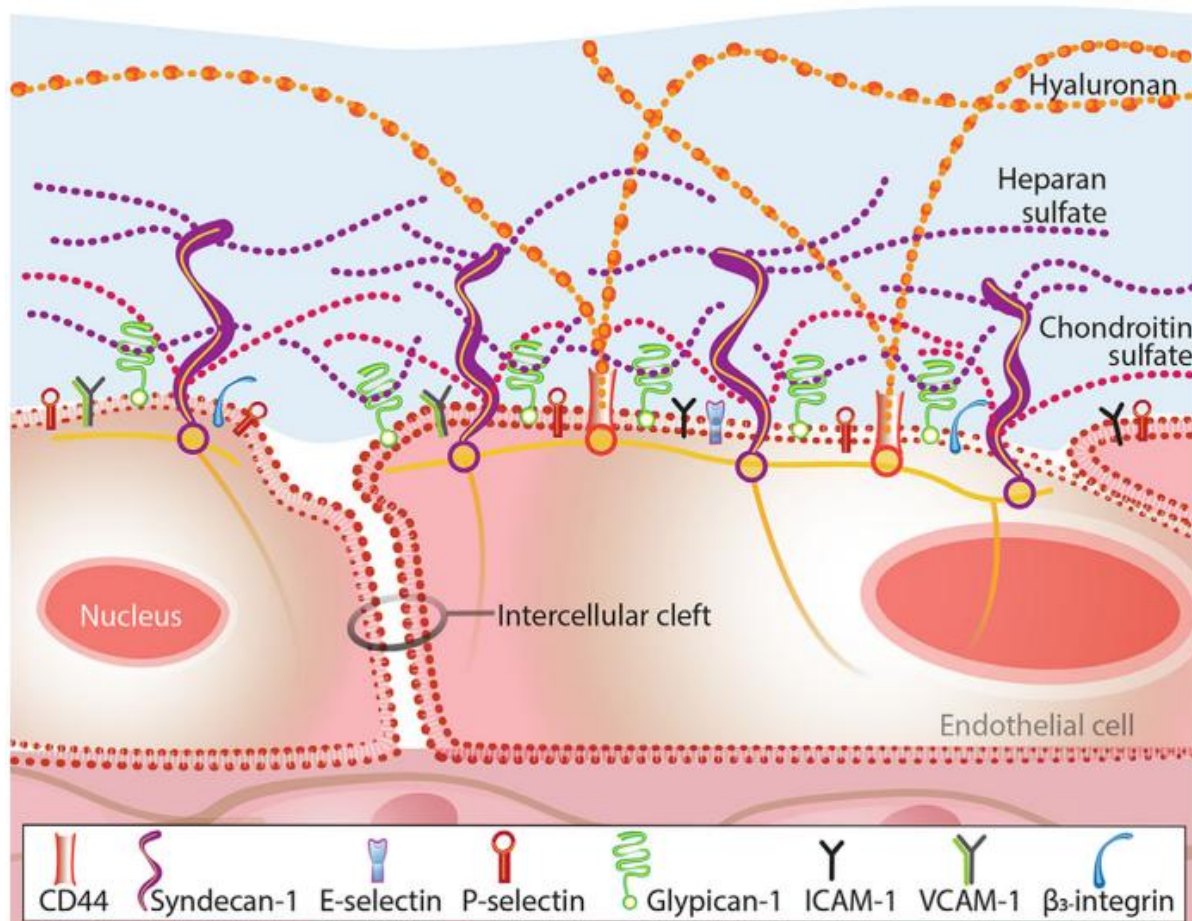


Figura 1 – Estrutura do Endotélio Vascular.

Os capilares, com uma espessura de aproximadamente 0,2 μm , são compostos apenas por uma camada de células endoteliais, ancoradas a uma membrana basal (80 nm) (Krüger-Genge et al., 2019; Lenasi, 2018). Os vasos de maiores dimensões têm uma parede vascular formada por uma camada de células endoteliais ancorada à membrana basal, constituindo a túnica íntima; células de músculo liso, que compõem a túnica média; células perivasculares, como células mesenquimatosas, compõem a camada adventícia (Krüger-Genge et al., 2019; Lenasi, 2018).

O endotélio que compõe os vasos pode ser contínuo, fenestrado ou, como nos capilares, descontínuo (Lenasi, 2018). Estas características afetam a permeabilidade endotelial (Lenasi, 2018). O endotélio contínuo não fenestrado cobre os vasos que irrigam a pele, cérebro, pulmões e coração. O endotélio contínuo fenestrado é observado nos vasos de glândulas endócrinas ou exócrinas, mucosa intestinal e rins. O

endotélio de tipo descontínuo compõe os sinusóides do fígado e medula óssea (Lenasi, 2018).

A maioria das células estão cobertas por uma camada protetora, uma rede de sacarídeos associados a proteínas, designada glicocálice (Lenasi, 2018). A sua estrutura é similar em diferentes tipos de células (Lenasi, 2018). A variabilidade intercelular, reduzida, verifica-se ao nível da sua composição (Lenasi, 2018). O glicocálice endotelial (GE) recobre as células endoteliais, constituindo uma estrutura vital para a sinalização celular e regulação da permeabilidade transvascular (Lenasi, 2018).

O glicocálice endotelial constitui uma rede densa, intrincada, com conformação em escova (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019) de proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos (GAG) (Olde Engberink et al., 2015; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019) e moléculas incorporadas a partir do plasma, como a albumina (Olde Engberink et al., 2015, 2020; Yilmaz et al., 2019). A sua composição é dependente das condições existentes no microambiente das células endoteliais que, por sua vez, a regulam e determinam ativamente (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). Estima-se que o glicocálice endotelial saudável tenha um volume de 1,5-1,7 L (Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019). O volume é reduzido em condições associadas a disrupção do glicocálice, como exposição crónica a sal (Olde Engberink et al., 2020; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019), hiperhomocisteinémia (Yilmaz et al., 2019), diabetes *mellitus* (Olde Engberink et al., 2020; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019), obesidade, hipertensão arterial (Patik et al., 2021) e doença renal crónica (Olde Engberink et al., 2020; Yilmaz et al., 2019). A figura seguinte esquematiza condições associadas a disrupção do glicocálice endotelial (figura 2) (Rabelink & De Zeeuw, 2015).

Assume um papel essencial no que toca à manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio (Olde Engberink et al., 2015; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019). Intervém na regulação da permeabilidade vascular (Oberleithner, 2012b; Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019), na manutenção da homeostasia e função endoteliais, como o fenótipo, conferindo ao endotélio propriedades antioxidantes, anti-aterogénicas e antitrombóticas (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019).

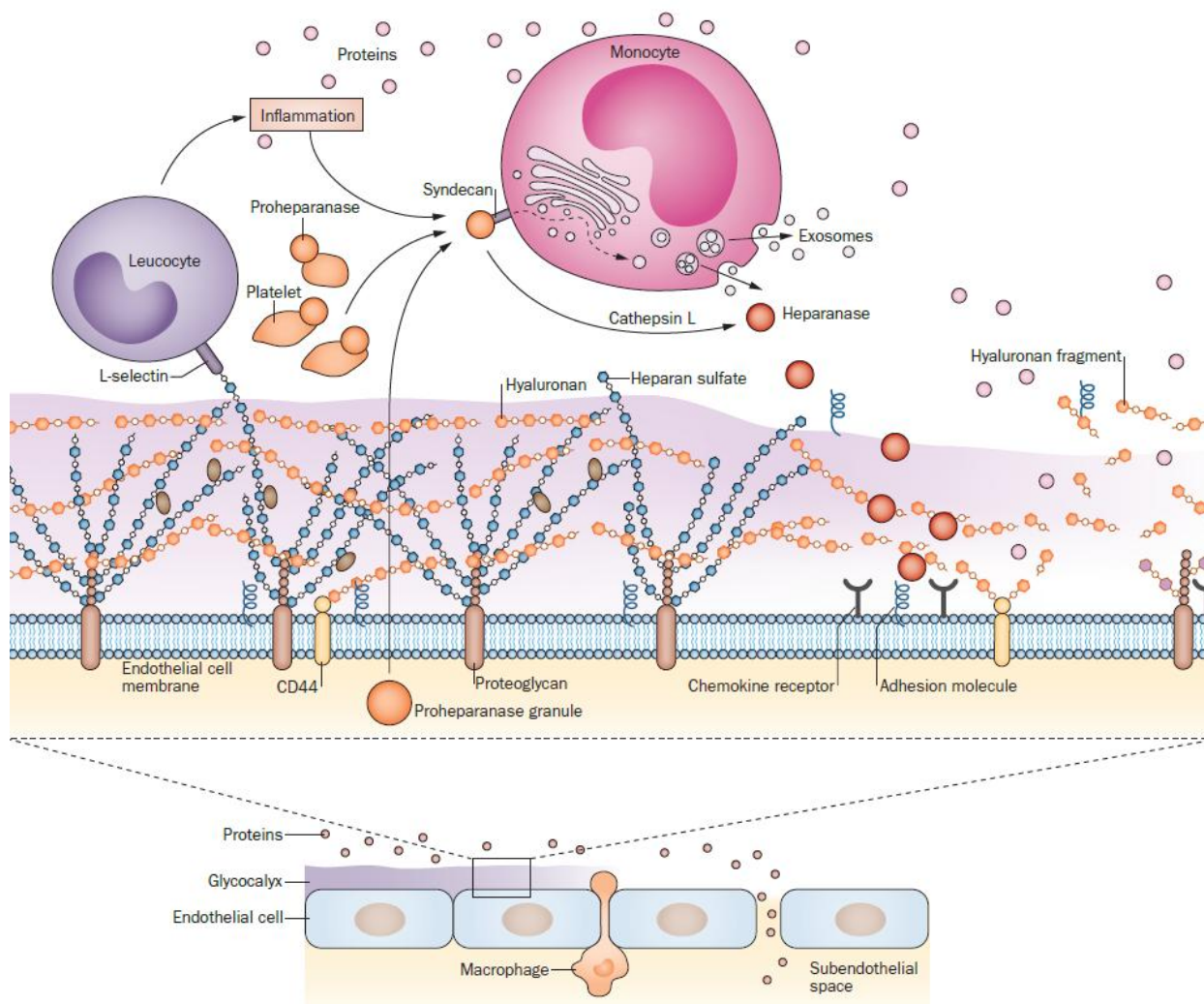


Figura 2 – Condições associadas a disrupção do glicocálice endotelial.

É crucial para a ativação de vias de mecanotransdução de sinal desencadeadas por forças mecânicas aplicadas sobre o endotélio (Oberleithner, 2012b; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019), que ativam vias de sinalização intracelular (Oberleithner, 2012b; Yilmaz et al., 2019). Desta forma, a integridade do glicocálice é importante para assegurar o adequado funcionamento endotelial, a manutenção das características do endotélio saudável e, logo, a manutenção da homeostasia do sistema vascular (Yilmaz et al., 2019). É, ainda, importante para prevenir a instalação de processos fisiopatológicos que conduzam a um estado de disfunção endotelial e condições patológicas decorrentes (Yilmaz et al., 2019).

Os proteoglicanos constituintes do glicocálice endotelial são formados por uma proteína, à qual se ligam covalentemente cadeias laterais de glicosaminoglicanos

ramificados (sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano) (Smart & Hughes, 2021; Yilmaz et al., 2019). Os mais abundantes na superfície endotelial são o glicopirano-1 e o sindecano, com diferente conformação estrutural (Smart & Hughes, 2021; Yilmaz et al., 2019). O sindecano inclui três domínios: citoplasmático, associado às proteínas do citoesqueleto intracelular; transmembranar, que mantém a ancoragem à célula endotelial; extracelular ou ectodomínio, que contém as cadeias laterais, ramificadas, de glicosaminoglicanos (Smart & Hughes, 2021; Yilmaz et al., 2019). O glicopirano-1 é ancorado à membrana celular das células endoteliais através de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (Smart & Hughes, 2021; Yilmaz et al., 2019). Por outro lado, outros proteoglicanos, como os perlecanos, decorinas, versicanos, mimecanos e biglicanos, são secretados pela célula endotelial, e ancorados através da ligação celular às suas cadeias laterais de GAG (Yilmaz et al., 2019).

Os glicosaminoglicanos, moléculas abundantes no glicocálice endotelial, constituem polímeros lineares de dissacarídeos (Selvarajah et al., 2018; Yilmaz et al., 2019) unidos por ligações covalentes, aos quais se ligam hexoxamina e ácido urónico ou galactose (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). A polimerização diferencial, traduzindo-se na associação e repetição variáveis de diferentes monómeros de dissacarídeos, bem como as modificações pós-tradução, através da sua sulfatação, acetilação ou desacetilação, conduz à formação de diferentes tipos de glicosaminoglicanos (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). Os principais GAG componentes do GE são o sulfato de heparano (50-90%), sulfato de condroitina (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019), sulfato de dermatano, sulfato de queratano e ácido hialurónico (Yilmaz et al., 2019). O ácido hialurónico, contrariamente aos restantes GAG, não se associa a proteínas na composição de proteoglicanos; é ancorado diretamente à membrana endotelial através do recetor membranar CD44, uma glicoproteína (Yilmaz et al., 2019). Pequenas alterações na composição do GE em GAG podem ter impacto significativo na função do glicocálice, pois estas moléculas têm diversos locais de ligação para proteínas plasmáticas (Yilmaz et al., 2019).

A estrutura, tamanho molecular e carga elétrica do glicocálice endotelial e os seus componentes condicionam a permeabilidade vascular (Yilmaz et al., 2019). Os GAG, de carga elétrica negativa, são importantes para a manutenção da função de

barreira do GE, repelindo proteínas de carga negativa, como a albumina, impedindo a sua translocação através da parede vascular (Yilmaz et al., 2019).

A composição do glicocálice endotelial está sujeita a regulação constante e dinâmica pelas células endoteliais, consoante as condições verificadas no seu microambiente (Cosgun et al., 2020; Olde Engberink et al., 2015; Villalba et al., 2021). Em condições fisiológicas, a estrutura do GE mantém-se estável, verificando-se, contudo, um balanço dinâmico constante entre a síntese de novo, rearranjo ou recrutamento de moléculas do plasma, e a degradação dos componentes (Cosgun et al., 2020; Villalba et al., 2021).

As glicoproteínas, outro constituinte do glicocálice endotelial, consistem em pequenas cadeias de sacarídeos (dois a cinco monossacarídeos), ligadas a ácido siálico (Cosgun et al., 2020; Villalba et al., 2021) ou fucose, constituem, principalmente, moléculas de adesão ou componentes do sistema de coagulação (Villalba et al., 2021). Incluem integrinas e seletinas, importantes para a adesão e transmigração leucocitárias estimuladas pela inflamação e, ainda, imunoglobulinas (Villalba et al., 2021). Muitas das suas funções apenas são desempenhadas quando o glicocálice endotelial é degradado (Cosgun et al., 2020; Villalba et al., 2021).

Os restantes componentes do glicocálice endotelial incluem proteínas plasmáticas como a albumina, bem como proteínas de ação anticoagulante e fibrinolítica, como a antitrombina III e o fator inibidor do plasminogénio tecidual, respetivamente (Villalba et al., 2021). São importantes para a manutenção da estrutura e permeabilidade endotelial, bem como assegurar uma superfície anticoagulante na interface com o sangue (Villalba et al., 2021).

Os constituintes do glicocálice endotelial estabelecem ligação com as proteínas do citoesqueleto das células endoteliais, possibilitando a existência de uma interconexão funcional e mecânica entre as duas estruturas (Cosgun et al., 2020). De fato, constatou-se que o glicocálice transmite sinais bioquímicos e biomecânicos provenientes do compartimento intravascular às células endoteliais, formando uma interface entre o sangue e a parede vascular (Cosgun et al., 2020; Schierke et al., 2017).

Assim, considera-se um modelo funcional do glicocálice endotelial, como uma estrutura envolvida na mecanotransdução de sinais mecânicos gerados pelo fluxo

laminar de sangue, a tensão de cisalhamento, às células endoteliais, através da ligação com a fina rede de actina do citoesqueleto endotelial (Oberleithner et al., 2011), 50 a 150 nanómetros abaixo da membrana apical (Cosgun et al., 2020).

O domínio citoplasmático dos sindecanos, por exemplo, associa-se ao citoesqueleto cortical endotelial através de moléculas de ezrina, tubulina, sintenina, sindesmos, dinamina e α -actinina, que possibilitam a distribuição das forças mecânicas pela célula (Cosgun et al., 2020).

A contração cardíaca gera forças hemodinâmicas aplicadas sobre a superfície endotelial (Oberleithner, 2012b). A força de atrito exercida, por unidade de área do endotélio, pelo fluxo laminar de sangue, consiste na tensão de cisalhamento (Potje et al., 2021). Atua sob a superfície endotelial, causando deformação pulsátil reversível do GE e superfície celular (Oberleithner, 2012b), conduzida ao meio intracelular endotelial através da ativação de vias de mecanotransdução de sinal (Oberleithner, 2012b; Potje et al., 2021).

O processo de mecanotransdução consiste na conversão de sinais mecânicos, induzidos pela tensão de cisalhamento, em sinais bioquímicos, que atuam nas células endoteliais (Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021). O glicocálice endotelial é considerado a principal estrutural do endotélio envolvida na deteção destes estímulos mecânicos (Potje et al., 2021). O glicocálice endotelial, em conjunto com outros mecanosensores endoteliais, nomeadamente, recetores acoplados a proteína G, recetores Piezo, canais recetores de potencial transitório, estruturas caveolares, integrinas e adesões focais, desencadeia a ativação de vias de mecanotransdução de sinal, gerando uma resposta imediata à tensão de cisalhamento, que se traduz na ativação da eNOS, produção de óxido nítrico e consequente modulação do tónus vascular (Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a reorganização do citoesqueleto endotelial de actina sob a ação da tensão de cisalhamento (Villalba et al., 2021). O proteoglicano sindecano-1 interage com o citoesqueleto através de resíduos de tirosina (Villalba et al., 2021). O sindecano-4, atuando sinergicamente com integrinas, orchestra a organização e rearranjo de fibras de actina, adesão celular e estabelecimento de pontos de contacto focais (Villalba et al., 2021). Por sua vez, o

proteoglicano glipicano-1, medeia a ativação da eNOS induzida pela tensão de cisalhamento (Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021).

A inativação do glipicano-1 bloqueia a ativação de eNOS em condições de exposição a tensão de cisalhamento pelas células endoteliais (Potje et al., 2021). Adicionalmente, ensaios realizados recorrendo a microscopia revelaram que a aplicação de tensão sobre o proteoglicano associa-se a aumento significativo da produção de óxido nítrico, o que não se verifica em caso de aplicação de tensão sobre sindecano-1, CD44 ou ácido hialurónico (Potje et al., 2021). Estes resultados demonstram que o Glipicano-1 é o principal mecanosensor para a ativação da síntese de óxido nítrico induzida pela tensão de cisalhamento, e que a via induzida pela sua ativação é essencial para a manutenção do tónus vascular (Potje et al., 2021).

A degradação de sulfato de heparano por hialuronidasas (Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021) ou de resíduos de ácido siálico de GAG, por neuraminidasas, (Villalba et al., 2021) altera a deteção da tensão de cisalhamento pelo GE, reduzindo a vasodilatação desencadeada pelo fluxo laminar (Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021). Estes resultados demonstram que a integridade dos componentes do glicocálice endotelial, principalmente das cadeias de sulfato de heparano, é importante para a indução da eNOS e produção de óxido nítrico (Potje et al., 2021).

Verificou-se, após exposição prolongada das células endoteliais a forças de tensão de cisalhamento, alterações no citoesqueleto de actina, que desencadearam redistribuição e restauração de sulfato de heparano, sindecano-1 e glipicano-1 na superfície apical das células endoteliais (Potje et al., 2021). Desta forma, pode concluir-se que alterações desencadeadas pela tensão de cisalhamento no citoesqueleto endotelial contribuem para a manutenção da integridade estrutural do GE (Potje et al., 2021), como pode ser observado na figura 3 (Wang et al., 2020).

O glicocálice endotelial compõe uma barreira determinante para a regulação da permeabilidade vascular (Finfer et al., 2018; Oberleithner, 2012b). A sua abundância em GAG sulfatados, ricos em aniões (de carga negativa), confere carga elétrica negativa à camada endotelial, importante para a manutenção da sua integridade e função de barreira (Finfer et al., 2018; Oberleithner, 2012b; Villalba et al., 2021). Confere, ao endotélio, propriedades eletrostáticas que modulam a sua permeabilidade, provocando a repulsão de moléculas de carga similar (Finfer et al.,

2018; Oberleithner, 2012b; Villalba et al., 2021). Deste modo, é condicionada a adesão de moléculas, bem como de elementos figurados do sangue, ao endotélio, com base na sua carga elétrica (Finfer et al., 2018; Oberleithner, 2012b; Villalba et al., 2021). Adicionalmente, as características eletroquímicas do glicocálice endotelial condicionam também a permeabilidade seletiva a moléculas consoante o seu peso molecular (Oberleithner, 2012b) (permeabilidade seletiva para peso molecular inferior a 70 kDa) (Villalba et al., 2021) e lipofilicidade (Oberleithner, 2012b).

A lesão do GE e perda da carga negativa da superfície endotelial decorrente, desencadeiam extravasamento de fluido (Finfer et al., 2018), albumina (Smart & Hughes, 2021), criando condições que potenciam o desenvolvimento de edema intersticial (Finfer et al., 2018).

A superfície endotelial é formada por uma camada mais interna, uma matriz densa de proteoglicanos, glicoproteínas e GAG com estrutura em escova, de 200 a 300 nm de espessura, que forma a primeira barreira seletiva a macromoléculas (Finfer et al., 2018). A camada externa, menos densa, estende-se alguns micrómetros no interior do lúmen vascular. Forma uma microestrutura que facilita o movimento dos eritrócitos no plasma (Finfer et al., 2018).

A superfície endotelial forma uma barreira à filtração de fluido plasmático, criando uma zona sub-glicocálice pobre em proteínas, mantendo-se gradientes de pressões colóide e osmótica que favorecem a retenção de fluido nos vasos (Smart & Hughes, 2021). A pressão oncótica colóide é a principal determinante do fluxo de fluido transcapilar (Finfer et al., 2018). Uma pequena porção de fluido intersticial retorna à circulação através de um pequeno número de poros de grande dimensão; contudo, a principal via constitui a circulação linfática (Finfer et al., 2018).

O Endotélio desempenha e intervém ativamente em inúmeros processos fisiológicos essenciais para a manutenção da homeostasia do sistema vascular, regulando ativamente as condições no microambiente vascular local, de forma a manter a homeostasia vascular (Lenasi, 2018; Patik et al., 2021).

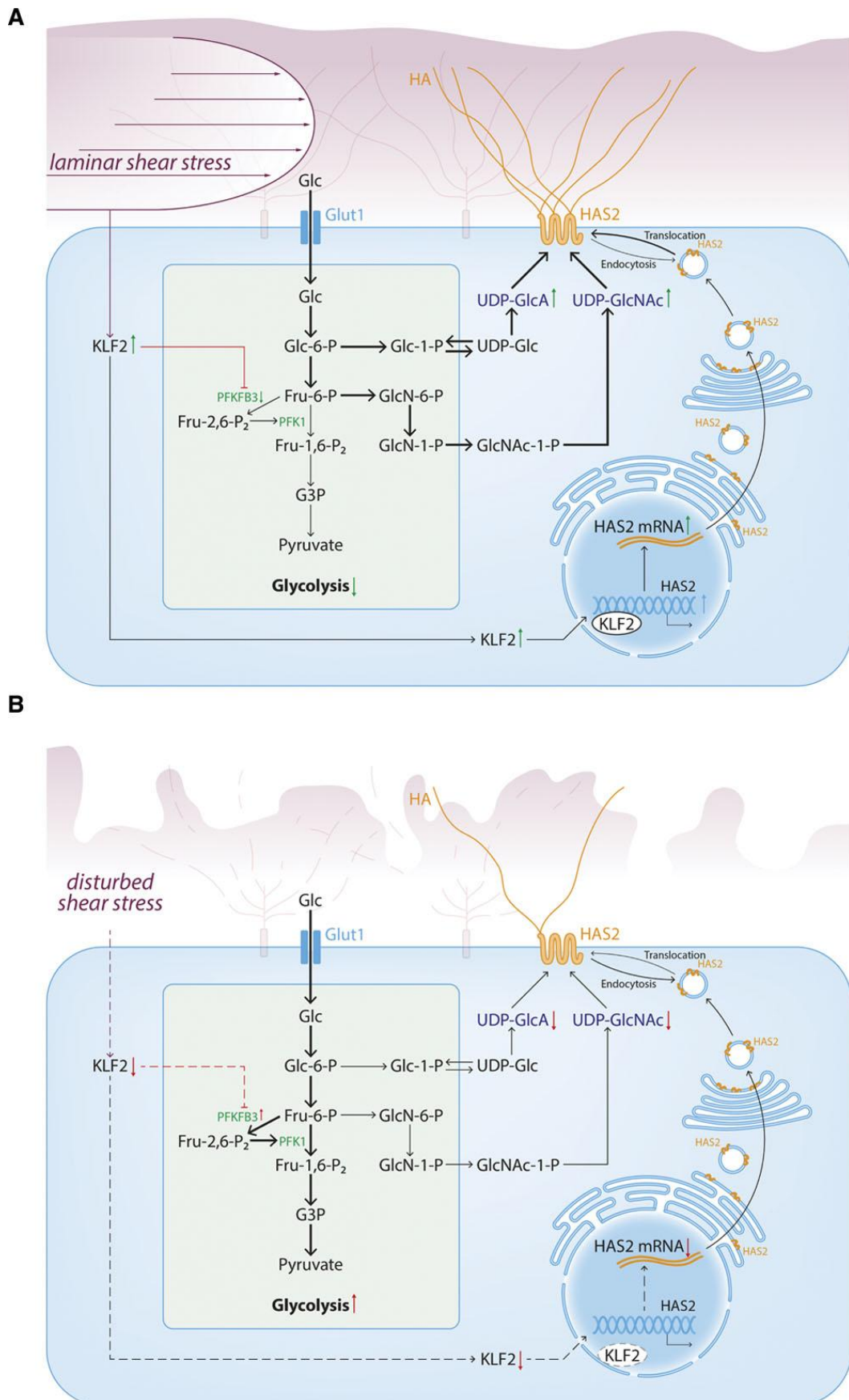


Figura 3 - Promoção da manutenção da integridade do glicocálice endotelial pela ação da tensão de cisalhamento.

Além de constituir uma barreira mecânica, entre o plasma e o espaço intersticial (Lenasi, 2018; Olde Engberink et al., 2020; Patik et al., 2021) cujas características e propriedades bioquímicas e eletrofisiológicas determinam a permeabilidade vascular (Lenasi, 2018), intervém na regulação do tónus e resistência vasculares (Lenasi, 2018; Patik et al., 2021), fluxo sanguíneo local, ativação e transmigração leucocitária, adesão e agregação plaquetária, angiogénese (Krüger-Genge et al., 2019), equilíbrio homeostático entre os processos de coagulação e fibrinólise (Krüger-Genge et al., 2019; Patik et al., 2021). Estabelece uma relação dinâmica com o compartimento vascular, de forma que a sua estrutura, composição e propriedades funcionais são influenciados pelas condições do microambiente (Lenasi, 2018). De facto, as características morfológicas e funcionais das células endoteliais alteram-se consoante sejam expostas a fluxo laminar ou turbulento (Lenasi, 2018). Uma representação das funções endoteliais está esquematizada na figura 4 (Pober & Sessa, 2007).

As condições que caracterizam o microambiente endotelial, como a tensão de cisalhamento, fatores de crescimento, citocinas, hormonas, hipóxia, influenciam continuamente o endotélio, que se adapta (Ricard et al., 2021), desencadeando alterações celulares a nível morfogenético e epigenético; conduzindo à assunção das características e propriedades mais adequadas, otimizadas para o ambiente (Campinho et al., 2020). Em células endoteliais em cultura, observou-se que a exposição à tensão de cisalhamento conduzia à alteração da sua forma, via reorganização do citoesqueleto, assumindo uma conformação alongada, orientada segundo o eixo do fluxo sanguíneo (Campinho et al., 2020).

A deteção de forças mecânicas pelas células endoteliais pode ocorrer ao nível do glicocálice, recetores membranares ou complexos juncionais (Campinho et al., 2020).

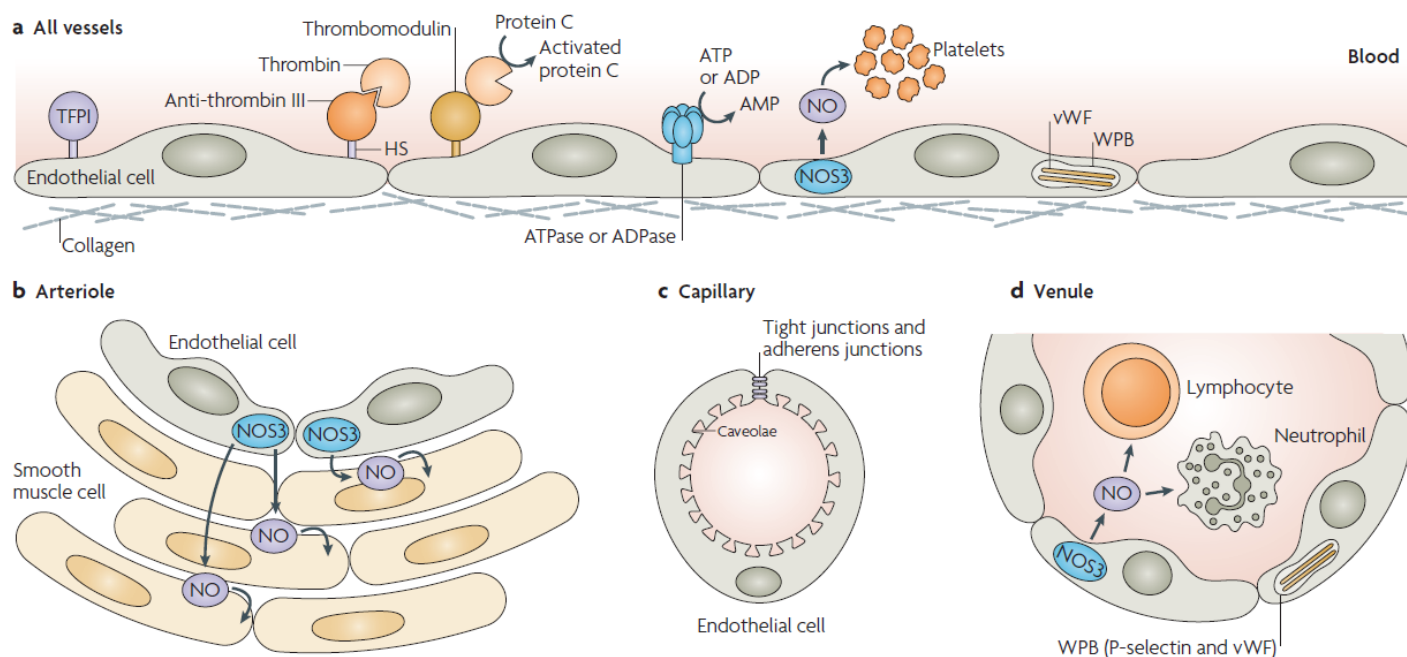


Figura 4 – Funções desempenhadas pelo endotélio no estado quiescente.

O endotélio responde a vários estímulos humorais, neurais e mecânicos (Deanfield et al., 2007a; Patik et al., 2021; Schwartz et al., 2010). Regula o tónus vascular através de vários mediadores vasoativos (Deanfield et al., 2007a; Patik et al., 2021; Schwartz et al., 2010). A libertação de NO, prostaciclina, bradicinina, serotonina (secretada por plaquetas ativadas), adenosina, VEGF (produzido em resposta à hipóxia) e fatores hiperpolarizadores derivados do endotélio medeiam a vasodilatação; enquanto a secreção de endotelina 1, angiotensina II e tromboxano desencadeia vasoconstrição (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010).

A exposição endotelial à tensão de cisalhamento, ou a acetilcolina (Patik et al., 2021; Schwartz et al., 2010) ativa a via de sinalização intracelular mediada pelo fosfoinositol, conduzindo ao aumento da concentração citoplasmática de iões Ca^{2+} , que se ligam à calmodulina (Schwartz et al., 2010). Esta enzima ativa a eNOS (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010), que catalisa a síntese de NO a partir do precursor L-arginina (Deanfield et al., 2007a; Patik et al., 2021; Schwartz et al., 2010). O composto vasodilatador difunde-se para as células de músculo liso adjacentes

(Deanfield et al., 2007a; Oberleithner, 2012b; Schwartz et al., 2010), onde atua a enzima guanilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010). A cGMP inibe a via do fosfoinositol (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010) e, logo, a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático induzindo, assim, relaxamento muscular (Deanfield et al., 2007a; Patik et al., 2021; Schwartz et al., 2010). A síntese e secreção endotelial de NO são continuamente reguladas de acordo com os estímulos ambientais, de forma a controlar o tônus vascular, adequando-o às condições verificadas no microambiente endotelial (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010).

Os fatores hiperpolarizadores derivados do endotélio (fatores derivados do citocromo, péptido natriurético do tipo C) difundem-se para o músculo liso vascular, atuando ao nível dos canais de potássio para induzir aumento da sua condutividade, mediando, assim, a hiperpolarização celular, e o relaxamento muscular decorrente (Deanfield et al., 2007a). Assumem particular importância em caso de diminuição da biodisponibilidade do NO, permitindo a manutenção do tônus vasodilatador na microcirculação (Deanfield et al., 2007a).

Através da determinação do tônus e diâmetro vascular, o endotélio regula o fluxo sanguíneo para os tecidos, adequando a entrega celular de oxigênio às necessidades metabólicas (Deanfield et al., 2007a).

No estado fisiológico, o óxido nítrico mantém as células endoteliais num estado quiescente (Deanfield et al., 2007a). Através da nitrosilação de resíduos de cisteína de proteínas como o fator de transcrição NF- κ B, reguladores do ciclo celular, e proteínas envolvidas na síntese de fator tecidual, reduz a sua atividade biológica, inibindo vias celulares que conduzem à inflamação, proliferação celular e trombose (Deanfield et al., 2007a). Este mediador vasodilatador limita, ainda, as reações mitocondriais de fosforilação oxidativa (Deanfield et al., 2007a).

Tendo em conta o papel do óxido nítrico na promoção do funcionamento endotelial fisiológico através da indução de um estado de quiescência celular, podem considerar-se estados de disfunção endotelial como estados de ativação endotelial (Deanfield et al., 2007a).

A disfunção endotelial consiste numa síndrome de desregulação endotelial caracterizada pela perda das suas propriedades e características funcionais fisiológicas (Lenasi, 2018). Neste contexto, o endotélio assume um fenótipo vasoconstritor, pró-oxidativo, pró-proliferativo, pró-inflamatório, pró-trombótico (Lenasi, 2018). A característica essencial que define o estado de disfunção endotelial consiste na diminuição da síntese ou resposta endotelial a mediadores vasodilatadores, e aumento da resposta a estímulos vasoconstritores, o que resulta num fenótipo vasoconstritor (Lenasi, 2018). Contudo, a síndrome engloba um espectro mais amplo de propriedades endoteliais anómalas, resultantes da disfunção de processos celulares, manifestando-se como um estado pró-oxidativo, pró-proliferativo, pró-inflamatório e pró-trombótico (Lenasi, 2018).

Entre a miríade de mecanismos e condições patológicas associados a disfunção endotelial, incluem-se alteração do perfil de secreção de citocinas, conforme representado na figura 5 (Poher & Sessa, 2007), *stress* oxidativo, hiperglicémia, dislipidémia, hiperhomocisteinémia, resistência à insulina, hipertensão arterial, doença renal crónica, obesidade, disautonomia (Lenasi, 2018).

Tendo em conta as funções desempenhadas pelo sistema vascular, vascularização de tecidos e órgãos, suprimento de oxigénio e nutrientes e remoção de produtos do metabolismo celular, essenciais para a homeostasia dos órgãos e organismo, pode considerar-se a disfunção endotelial como uma patologia sistémica, com potencial de envolvimento multisistémico (Lenasi, 2018). A disfunção do endotélio é considerada um mecanismo fulcral na sequência de alterações fisiopatológicas que conduzem à maioria das doenças cardiovasculares (D. Guo et al., 2016; Patik et al., 2021). Predispõe ao desenvolvimento de aterosclerose, hipertensão arterial, doença arterial periférica, enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, mas também um amplo espectro de outras doenças, incluindo metabólicas (diabetes *mellitus*, obesidade), inflamatórias, reumatológicas, oncológicas e degenerativas (D. Guo et al., 2016; Lenasi, 2018). A completa falência do sistema endotelial culmina em falência orgânica (D. Guo et al., 2016; Lenasi, 2018).

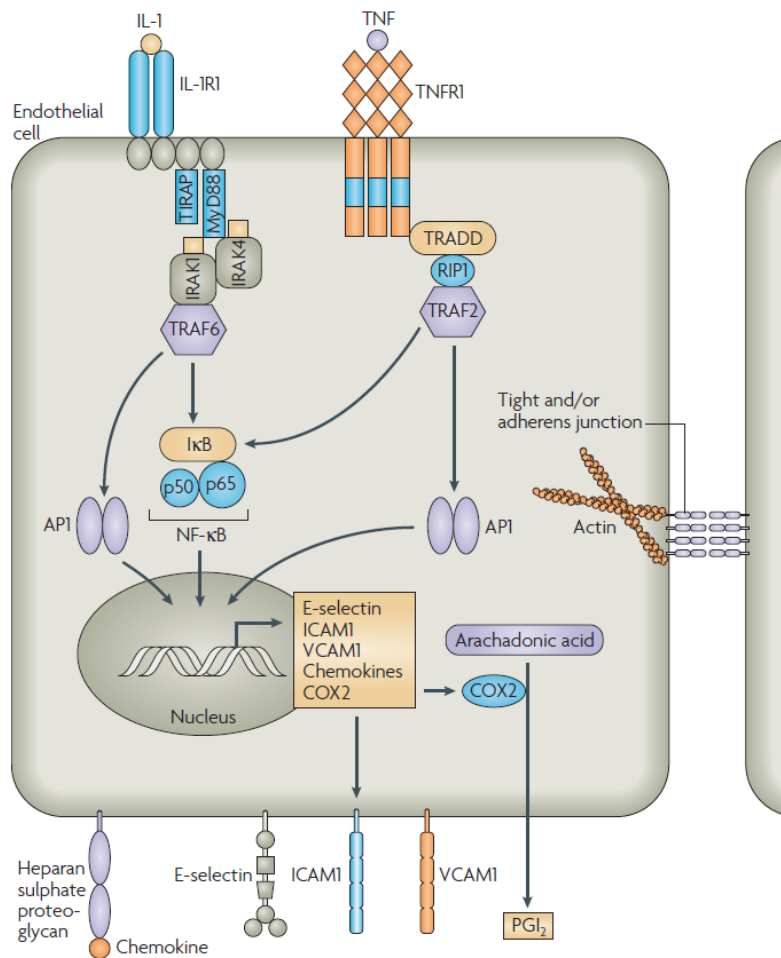


Figura 5 – Disfunção endotelial desencadeada pela ação de citocinas inflamatórias.

5.1.2. Interação do Sódio com o Endotélio

Já foi demonstrado o armazenamento não osmótico de sódio em diversos tecidos, designadamente o endotélio, pele, músculo, cartilagem e osso (Olde Engberink et al., 2015). A análise de tecidos através de ressonância magnética, utilizando ^{23}Na e ^1H , demonstrou, em indivíduos diagnosticados com hiperaldosteronismo e hipertensão arterial, que a acumulação incrementada de sódio na pele e músculo constatada não se associava a retenção comensurável de água (Olde Engberink et al., 2015).

Com base em resultados de estudos *in vitro* recentes, é possível considerar um modelo bicompartimental do endotélio, que funciona como uma dupla barreira ao sódio, impedindo o seu efluxo do espaço vascular para o intersticial (Oberleithner, 2012b).

A barreira luminal constitui o glicocálice endotelial, uma rede de proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e albumina (incorporada a partir do plasma), que recobre as células endoteliais, importante para a integridade estrutural e função endoteliais (Oberleithner, 2012b).

Quando o endotélio é exposto a uma carga de sal, ocorre ligação de iões de sódio (de carga positiva) às cargas negativas dos resíduos de proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (Oberleithner, 2012a). Deste modo, ocorre o armazenamento temporário de iões de sódio no GE (Oberleithner, 2012a). Esta capacidade de tamponamento depende da manutenção da integridade do glicocálice endotelial (Oberleithner, 2012a). Requer a existência de uma superfície endotelial desenvolvida, com uma rede ampla de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas (Oberleithner, 2012a).

Através da captação temporária de iões de sódio pelo glicocálice, é reduzido o acesso destas partículas às células endoteliais, que compõem a segunda barreira endotelial (Oberleithner, 2012a). A permeabilidade das células endoteliais ao sódio depende de canais ENaC, situados na superfície celular (Oberleithner, 2012a). A densidade destes canais na membrana apical é regulada pela concentração plasmática de sódio, aldosterona e o fator SG-k1 (cinase regulada por soro e glucocorticóide 1) (Jia

et al., 2018). De fato, em condições de exposição crónica a doses elevadas de sal, ou hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, há aumento da expressão endotelial de canais ENaC (Jia et al., 2018). Este aumento da quantidade de canais de sódio, associado à disrupção da matriz de proteoglicanos e glicosaminoglicanos do glicocálice, desencadeia influxo aumentado do catião nas células endoteliais (Oberleithner, 2012a).

A cultura de células endoteliais em meios de cultura com sódio e posterior quantificação do armazenamento do catião pelo endotélio permitiu estimar, em condições de cultura com reduzida concentração de sódio (135 milimoles/mM), um valor de cerca de 16 nanomoles (nM)/cm² (Oberleithner, 2012b). A extrapolação destes resultados permite estimar a capacidade de tamponamento de sódio pelo endotélio humano em cerca de 35 mM (Wenstedt et al., 2018). Este valor é, provavelmente, subestimado, visto que a superfície endotelial tem um volume sete a trinta vezes superior (Olde Engberink et al., 2015) *in vivo* comparativamente ao observado em condições *in vitro* (Olde Engberink et al., 2015; Wenstedt et al., 2018). A capacidade de armazenamento do ião pela superfície endotelial reduziu, em cerca de dois terços, após a exposição da estrutura, em condições *ex vivo*, a concentrações elevadas de sódio (150 mM), durante cinco dias (Oberleithner, 2012b).

O volume estimado da superfície endotelial, no endotélio saudável, é de cerca de 1,5 L (Olde Engberink et al., 2015). Volumes inferiores de GE foram detetados em indivíduos com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar, tratada (1,1 L) e não tratada (0,8 L); diabetes *mellitus* tipo 1 associada a normoalbuminúria (0,8 L) e microalbuminúria (0,2 L) (Olde Engberink et al., 2015). Em pacientes diabéticos de tipo 1, o volume do GE correlacionou-se inversamente ao valor de pressão arterial (Olde Engberink et al., 2015).

A integridade do glicocálice é comprometida em caso de exposição crónica a sal (Olde Engberink et al., 2015; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019), ressuscitação volémica com fluidos colóides, inflamação (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019), hiperglicémia, isquémia, *stress* oxidativo, toxinas bacterianas, heparanase, bem como a um conjunto amplo de doenças crónicas e críticas (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019), nomeadamente diabetes *mellitus*, doença renal crónica (Olde Engberink et al., 2015, 2020; Yilmaz et al., 2019), sépsis (Olde Engberink et al., 2015;

Yilmaz et al., 2019), trauma ou queimadura grave (Milford & Reade, 2019). Estes fatores desencadeiam a ativação de proteases, que clivam os constituintes endoteliais (Milford & Reade, 2019). A lesão endotelial está associada a agravamento do prognóstico sendo, assim, postulável que a reconstituição do glicocálice melhore o *outcome* (Milford & Reade, 2019).

A maioria das condições que desencadeiam a disrupção do glicocálice endotelial associa-se a aumento do volume extracelular, da pressão arterial, ou de ambos (Olde Engberink et al., 2015). Pode depreender-se que a variabilidade detetada entre indivíduos no que toca à homeostasia do sal, bem como a sensibilidade ao sal, podem decorrer e depender da qualidade do glicocálice endotelial (Olde Engberink et al., 2015).

A exposição crónica do endotélio a excesso de sal está associada à diminuição da espessura do GE, aumento da rigidez endotelial *in vitro* (Oberleithner, 2012b; Oberleithner et al., 2011), bem como a desenvolvimento de hipertensão arterial *in vivo* (Oberleithner et al., 2011). Esta exposição desencadeia alterações endoteliais consideradas como os eventos primordiais na fisiopatologia da hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares (Oberleithner et al., 2011).

A disrupção do GE compromete, não apenas a sua função de barreira entre o sangue e as células endoteliais e espaço subendotelial, mas também a sua capacidade de armazenamento temporário de sódio (Oberleithner, 2012b; Wenstedt et al., 2018).

Postulou-se que a disrupção do glicocálice endotelial é um evento importante na sequência de alterações fisiopatológicas que desencadeiam rigidez endotelial (Oberleithner et al., 2011). De forma a comprovar esta hipótese, Oberleithner *et al.* expuseram células endoteliais humanas de artérias umbilicais a uma concentração de sódio de 150 mM, durante cinco dias (Oberleithner et al., 2011). Analisaram a espessura e rigidez das células endoteliais através de um nanosensor mecânico, associado a um microscópio de força atómica (Oberleithner et al., 2011). Detetaram que, perante um aumento da concentração extracelular de sódio, de 135 para 150 mM, ocorria uma redução 50% na espessura do glicocálice endotelial, e um aumento de 130% da rigidez endotelial (Oberleithner et al., 2011). Adicionalmente, através da análise quantitativa da composição do glicocálice, constatou-se uma redução de 68% ao nível da concentração de resíduos de sulfato de heparano, o que conduziu à

disrupção, degradação e colapso do glicocálice (Oberleithner et al., 2011). Depreende-se, da análise dos resultados obtidos, que a sobrecarga de sódio causa degradação do GE (Oberleithner et al., 2011; Patik et al., 2021).

A rigidez endotelial e degradação do glicocálice endotelial induzidas por exposição celular a elevada concentração de sódio são inibidas por antagonistas da Aldosterona (Oberleithner, 2012b; Oberleithner et al., 2011).

A administração de heparanase ao meio de células endoteliais de artérias humanas *ex vivo*, durante 1 semana, causou perda de sulfato de heparano, e desintegração de GE (Oberleithner et al., 2011). Pode concluir-se que os glicosaminoglicanos de sulfato de heparano contribuem para a estabilidade estrutural do endotélio, que sofre colapso subsequentemente à degradação destes constituintes (Oberleithner et al., 2011).

De modo a analisar a capacidade de armazenamento de sódio pelo glicocálice endotelial, Oberleithner *et al.* desenvolveu-se outro ensaio. Colocaram-se células endoteliais humanas, durante uma semana, em três diferentes meios de cultura: reduzida concentração de sódio; concentração elevada de sódio; concentração elevada de sódio + Espironolactona (Oberleithner et al., 2011). Subsequentemente, as células endoteliais foram expostas a heparanase durante 60 minutos, tendo-se, posteriormente, medido a concentração de sódio no sobrenadante (Oberleithner et al., 2011). Registou-se um aumento da quantidade de sódio no meio sobrenadante das células endoteliais colocadas em condições de reduzida quantidade de sódio (Oberleithner et al., 2011). Contrariamente, para as células colocadas num meio rico em sódio, verificou-se não ocorrer libertação de sódio para o meio após exposição a heparanase; constatou-se um aumento da concentração intracelular do ião. Isto não se verifica quando em caso de adição de Espironolactona ao meio de cultura (Oberleithner et al., 2011).

A aldosterona aumenta a sensibilidade das células endoteliais a concentrações plasmáticas de sódio elevadas através da inserção de canais ENaC na membrana celular, o que aumenta o influxo celular de sódio, causando disrupção do funcionamento celular (Oberleithner et al., 2011).

Verificou-se que o influxo excessivo de sódio nas células endoteliais estabiliza as fibras de actina, do citoesqueleto intracelular, na conformação F-actina; causando a

remodelação do citoesqueleto associado a rigidez do córtex endotelial (Fels et al., 2012). Esta conformação inibe a ativação da sintase de óxido nítrico endotelial, diminuindo a síntese de óxido nítrico (NO) e, assim, a vasodilatação endotelial; desencadeia aumento da rigidez celular e, assim, endotelial (Fels et al., 2012).

Associa-se, assim, a um estado de disfunção endotelial, caracterizado por diminuição da síntese de substâncias vasodilatadores ou da resposta a estímulos promotores de vasodilatação, à aquisição de um fenótipo vasoconstritor (Deanfield et al., 2007b; Rassler, 2010), aumento da adesão leucocitária à parede vascular, e um fenótipo endotelial pró-trombótico, proliferativo e oxidante (Deanfield et al., 2007b).

O fluxo laminar de sangue, a tensão de cisalhamento, causa deformação do glicocálice e células endoteliais, e ativação de vias de mecanotransdução que culminam no aumento da síntese de óxido nítrico (Cosgun et al., 2020; Girão-Silva et al., 2021; Oberleithner, 2012b; Olde Engberink et al., 2015; Su et al., 2003) e substâncias antioxidantes, inibição da proliferação endotelial, da adesão e ativação plaquetárias, promovendo a manutenção da estrutura e funcionalidade do endotélio (Oberleithner, 2012b). Verifica-se um aumento e redistribuição de glicosaminoglicanos, proteoglicanos no glicocálice estimulado pelo fluxo laminar, contribuindo para a manutenção da integridade da barreira endotelial (Oberleithner, 2012b). A rigidez endotelial, pelo contrário, reduz a deformabilidade das células endoteliais, diminuindo a ativação das vias de sinalização intracelular referidas, promovendo um fenótipo de disfunção endotelial (Oberleithner, 2012b).

A enzima sintase de óxido nítrico endotelial está localizada na face interna da membrana plasmática endotelial, a uma distância nanométrica da rede de filamentos de actina do citoesqueleto (Fels et al., 2012). A associação da enzima à actina globular (G-actina) desencadeia um aumento da sua atividade; verifica-se o oposto quando ocorre associação à F-actina (Fels et al., 2012).

Diferentes estímulos ambientais podem desencadear polimerização ou despolimerização das fibras de actina cortical, o que permite a rápida modulação da atividade da eNOS (Fels et al., 2012). A conformação F-actina confere ao córtex celular uma consistência tipo gel, mais rígida (Fels et al., 2012). Uma conformação globular (G-actina), associada à despolimerização fibrilar, diminui a rigidez celular (Fels et al., 2012). A associação de G-actina à eNOS aumenta a sua atividade, causando síntese

aumentada de NO que, ao atuar sobre o músculo liso vascular, desencadeia vasodilatação (Fels et al., 2012).

Os autores propõem um modelo de regulação do diâmetro vascular determinado pela conformação do citoesqueleto de actina endotelial (Fels et al., 2012). A ação do *stress* de cisalhamento do fluxo laminar sobre as células endoteliais desencadearia, através de ativação de vias de sinalização intracelular, a despolimerização das fibras de actina, assumindo uma conformação globular (Fels et al., 2012). Ocorreria um aumento da síntese de NO e, logo, vasodilatação, associada a diminuição da pressão arterial (Fels et al., 2012). Contrariamente, a diminuição da pressão arterial reduziria a tensão de cisalhamento aplicada sobre as células endoteliais (Fels et al., 2012). Ocorreria, tendencialmente, a polimerização das fibras de actina corticais, assumindo uma conformação F-actina, inibindo a ativação da eNOS. A vasoconstrição decorrente permitiria restabelecer o valor de pressão arterial, aumentando a pressão de perfusão tecidual (Fels et al., 2012).

A regulação pós-transcricional da expressão endotelial da sintase de óxido nítrico é um mecanismo através do qual as células endoteliais respondem a vários estímulos fisiológicos e fisiopatológicos (Searles et al., 2004). Postula-se que o transporte de RNA mensageiro (mRNA) de eNOS mediado por actina, e a sua decorrente localização celular (ligado a actina ou livre no citoplasma), determine a estabilidade do produto de transcrição (Searles, 2006). C. Searles *et. al.* identificaram a actina monomérica (G-actina) como o principal constituinte de uma ribonucleoproteína de 51kDa, que se liga à região 3'UTR do mRNA da eNOS, alterando a estabilidade do mRNA (Searles et al., 2004). Estabelece-se, assim, uma relação entre a conformação do citoesqueleto e a regulação pós-transcricional da eNOS (Searles et al., 2004).

Desta forma, o papel do endotélio no que concerne à interação com o sódio e a regulação do efeito do ião na variação da pressão arterial parece incluir: 1) constituição de uma estrutura, diretamente em contacto com o sangue, que forme um reservatório de sódio, intervindo no tamponamento e armazenamento de sódio de forma osmoticamente inativa; 2) assegurar a síntese de óxido nítrico, mantendo o fenótipo endotelial vasodilatador; e 3) estabelecimento de uma barreira que impeça o

movimento de sódio e células inflamatórias para o espaço intersticial e pele (Wenstedt et al., 2018).

5.1.3. Modelo de interação entre o Sódio e o Endotélio

Pode postular-se um modelo de interação do sódio pelo organismo humano, com intervenção endotelial e renal, tendo em conta as características e propriedades do endotélio (Oberleithner, 2012b).

Num indivíduo com uma dieta pobre em sal, com um glicocálice endotelial bem desenvolvido, denso, rico em resíduos de proteoglicanos e glicosaminoglicanos com carga negativa, bem como com densidade reduzida de canais ENaC na superfície apical das células endoteliais, ocorre, após consumo de sal, elevação plasmática da concentração de sódio, alterando-se as condições às quais o endotélio é exposto (Oberleithner, 2012b). O glicocálice endotelial desenvolvido tem elevada capacidade de tamponamento do catião, através do seu armazenamento de forma osmoticamente inativa (Oberleithner, 2012b). Aliado à reduzida expressão endotelial de ENaC, estas condições do endotélio possibilitam a retenção temporária do ião nesta estrutura, impedindo o seu acesso às células endoteliais e espaço intersticial vascular (Oberleithner, 2012b). Subsequentemente, após libertação gradual do ião pelo endotélio, o excesso de sódio é eliminado pelos rins, alcançando-se a homeostasia (Oberleithner, 2012b).

Contrariamente, num indivíduo cuja dieta contenha elevado teor de sal, as condições do endotélio são marcadamente diferentes. Constata-se disrupção do glicocálice endotelial, com redução da sua espessura e composição em resíduos de sulfato de heparano, principal componente da estrutura, importante para assegurar a sua integridade estrutural (Oberleithner, 2012b). Por outro lado, a exposição crónica a sódio pelas células endoteliais causa aumento da expressão de canais ENaC na membrana apical (Oberleithner, 2012b). Deste modo, em caso de aumento da concentração de sódio no sangue, não se verifica capacidade de tamponamento do catião pela superfície endotelial que tem, assim, acesso aumentado às células endoteliais e espaço extracelular (Oberleithner, 2012b). Associa-se às moléculas de carga negativa da matriz extracelular, onde se acumula (Oberleithner, 2012b). Adicionalmente, a densidade elevada de ENaC causa influxo aumentado de ião nas células; aqui, desencadeia alterações no citoesqueleto celular, estabilizando as fibras de actina numa conformação que confere rigidez ao córtex celular (Oberleithner,

2012b). O aumento de rigidez endotelial, por sua vez, associa-se a menor síntese de óxido nítrico, promovendo um fenótipo endotelial vasoconstritor (Oberleithner, 2012b).

Independentemente do grau de sensibilidade ao sal do doente hipertenso, a restrição de sal na dieta constitui um dos pilares do tratamento (Olde Engberink et al., 2015). Demonstrou, como efeitos, a redução da pressão arterial e potenciação da ação de fármacos antihipertensores, como bloqueadores do sistema renina-angiotensina e diuréticos (Olde Engberink et al., 2015).

Um novo método de tratamento de doenças cardiovasculares, em fase experimental, pretende preservar e restaurar o glicocálice endotelial. Testou-se uma mistura altamente purificada de constituintes do glicocálice, Sulodexide, composto por 80% de glicosaminoglicanos de sulfato de heparano e 20% de sulfato de dermatano (Olde Engberink et al., 2015). O fármaco, de administração oral, tem um perfil farmacocinético favorável, caracterizado por elevada biodisponibilidade e longa semi-vida (Olde Engberink et al., 2015). Em estudos em doentes diabéticos de tipo 2, o composto Sulodexide desencadeou restauração da espessura do GE (Olde Engberink et al., 2020), bem como diminuição do grau de albuminúria (Olde Engberink et al., 2015).

Olde Engberinke *et al.* desenvolveram uma meta-análise de 8 estudos controlados com placebo, 7 dos quais duplamente cegos, que incluíram 3019 voluntários. Verificou-se uma redução significativa da pressão arterial sistémica decorrente de terapêutica com Sulodexide. Constatou-se este efeito mesmo nos pacientes com valores de pressão arterial controlados (PA <140/90 mmHg) por terapêutica com inibidores do sistema renina-angiotensina na dose máxima tolerada. Em pacientes hipertensos, com um perfil tensional mal controlado, observou-se redução dos valores tensionais, de 10 mmHg para a PA sistólica e 5 mmHg de PA diastólica, similar à gerada pelo tratamento farmacológico antihipertensor (Olde Engberink et al., 2020).

5.1.4. O Papel do Canal ENaC na Interação entre o Sódio e o Endotélio

O canal epitelial de sódio, ENaC, clonado por Canessa *et al.* em 1994 (Canessa *et al.*, 1994; Pitzer *et al.*, 2020), é um canal iônico transportador de sódio, constitutivamente ativo, independente da voltagem (Pitzer *et al.*, 2020; Schönberger *et al.*, 2014) pertencente à família ENaC/Degenerina (Baldin *et al.*, 2020; Knoepp *et al.*, 2020; Pitzer *et al.*, 2020; Schönberger *et al.*, 2014). Tem estrutura tridimensional homo ou hetero-trimérica (Baldin *et al.*, 2020; Kellenberger & Schild, 2002; Pitzer *et al.*, 2020; Schönberger *et al.*, 2014) sendo constituído pelas subunidades α , β , γ e/ou δ (Kellenberger & Schild, 2002; Pitzer *et al.*, 2020; Reading, 2009; Schönberger *et al.*, 2014). Contém dois domínios intracelulares, N e C-terminal, que estabelecem ligação ao citoesqueleto intracelular; duas regiões transmembranares; e um longo domínio extracelular, que inclui cinco regiões (“palm,” “ball,” “finger,” “thumb,” e “knuckle”), rico em resíduos de cisteína, ancorado à matriz extracelular (Baldin *et al.*, 2020; Bhalla & Hallows, 2008; Kellenberger & Schild, 2002; Kleyman *et al.*, 2009; Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Schönberger *et al.*, 2014). É composto por cerca de 550 a 950 aminoácidos, com um peso molecular de 80 a 95 kDa (Bhalla & Hallows, 2008).

Os canais iônicos da família ENaC/Degenerina são canais independentes da voltagem, de estrutura homo ou hetero-trimérica, inibidos pela Amilorida, Benzamil e Fenamil (Pitzer *et al.*, 2020). Compõem um recetor mecanosensível, envolvido na conversão de sinais mecânicos em sinais intracelulares (Baldin *et al.*, 2020; Kellenberger & Schild, 2002). São principalmente expressos no pulmão, rim e vasos (Pitzer *et al.*, 2020).

Nos Vertebrados, o canal ENaC é expresso em tecidos epiteliais do rim, pulmões e cólon e não epiteliais, como as células endoteliais e músculo liso vascular (Baldin *et al.*, 2020).

Através de ensaios de imunofluorescência, demonstrou-se a transcrição de mRNA, bem como a síntese proteica das quatro subunidades do canal ENaC, α , β , δ , e γ , nas células endoteliais de ratinhos (Pitzer *et al.*, 2020).

O canal ENaC canónico é heterotrimérico, constituído por três subunidades homólogas: $\alpha\beta\gamma$ ou $\delta\beta\gamma$ (Pitzer *et al.*, 2020; Wichmann *et al.*, 2018).

Canessa *et al.* demonstraram, em oócitos de *Xenopus laevis*, ser necessária a co-expressão das subunidades α , β e γ para se formar um canal com atividade máxima (Canessa *et al.*, 1994; Kellenberger & Schild, 2002; Pitzer *et al.*, 2020; Staruschenko *et al.*, 2005). A expressão de uma única subunidade, formando um canal homotrimérico; ou a co-expressão de duas subunidades, compondo um canal heterotrimérico, associou-se à formação de um canal com atividade reduzida (Pitzer *et al.*, 2020).

A sua atividade é regulada através de dois mecanismos principais: a regulação do número de canais na membrana celular (síntese ou translocação do canal para a membrana); modulação do P_o (probabilidade de abertura) do canal e, logo, da sua condutividade ao sódio (Kleyman *et al.*, 2009) complexo de Golgi ou membrana celular (Bhalla & Hallows, 2008; Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014).

A modulação do tempo de abertura ou condutividade do canal ENaC ao sódio constitui um mecanismo mais rápido de modulação celular da sua atividade (Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014; Wichmann *et al.*, 2018). Decorre da clivagem proteolítica das porções extracelulares das subunidades α ou γ no complexo de Golgi ou membrana celular (Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014; Wichmann *et al.*, 2018). Através da clivagem de resíduos dos domínios extracelulares das subunidades α ou γ por furina (Bhalla & Hallows, 2008), prostasina, CAP2, plasmina, matriptase, calicreína e elastase (Kleyman *et al.*, 2009) ocorre a excisão de péptidos inibitórios, conduzindo ao aumento do P_o do canal (Bhalla & Hallows, 2008; Kleyman *et al.*, 2009).

A alteração do número de canais na membrana decorre de forma mais lenta. Ocorre em resposta a hormonas ou péptidos, como a aldosterona (Bhalla & Hallows, 2008; Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014; Pitzer *et al.*, 2020), SG-k1 (Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014; Pitzer *et al.*, 2020), angiotensina II (Pitzer *et al.*, 2020), vasopressina e insulina (Bhalla & Hallows, 2008; Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Pitzer *et al.*, 2020). Estes fatores reguladores causam alteração da expressão génica ou translocação de proteínas ENaC do citosol para a membrana, e, logo, da densidade do canal na membrana celular apical (Bhalla & Hallows, 2008; Kusche-Vihrog *et al.*, 2008; Pitzer *et al.*, 2020).

A quantidade de canais ENaC na membrana depende do balanço entre a sua inserção e remoção (Kellenberger & Schild, 2002; Kusche-Vihrog, Jeggle, *et al.*, 2014).

Os domínios C-terminal das três subunidades do canal contêm motivos ricos em prolina (Kellenberger & Schild, 2002; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014), que interagem com a Ubiquitina ligase 3 (Nedd4-2) (Bhalla & Hallows, 2008; Kellenberger & Schild, 2002; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Esta enzima catalisa a ubiquitinação do canal, desencadeando a sua endocitose e degradação em proteossomas citosólicos (Bhalla & Hallows, 2008; Kellenberger & Schild, 2002; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014).

O incremento de sódio plasmático ou aldosterona estimulam a expressão de SG-k1 (Jia et al., 2016; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014; Pitzer et al., 2020). A enzima fosforila a ubiquitina ligase 3 (Nedd4-2), inativando-a (através de ligação a proteína 14-3-3, que inibe a interação entre a enzima Nedd4-2 e o canal ENaC) (Jia et al., 2016; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014; Pitzer et al., 2020). Consequentemente, diminui a ubiquitinação de canais ENaC e, logo, a sua remoção da membrana celular. Deste modo, a hiperativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona está associada a um aumento da densidade de ENaC membranar nas células endoteliais (Jia et al., 2016; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014; Pitzer et al., 2020).

Considera-se que os canais da família ENaC/Degenerina formam um complexo mecanoreceptor (Knoepp et al., 2020). O princípio “force from filaments” postula um mecanismo de mecanotransdução decorrente da ativação de canais iónicos mecanosensíveis (Knoepp et al., 2020). A aplicação de forças mecânicas causa deformação de filamentos intracelulares, como a espectrina ou anquirina, ou extracelulares, que ancoram o canal ao citoesqueleto ou matriz extracelular, respetivamente (Knoepp et al., 2020). A deformação é transmitida, sob a forma de força mecânica, ao canal, causando a sua alteração conformacional e, logo, modulação da sua atividade (Knoepp et al., 2020).

O canal ENaC, através do domínio extracelular, ancorado à matriz, deteta forças mecânicas exercidas no meio extracelular, que, transmitidas através de moléculas de adesão, que fixam o canal à matriz extracelular, conduzem à alteração conformacional do canal, e ativação de vias de sinalização intracelular (Bhalla & Hallows, 2008; Knoepp et al., 2020). Assim, o canal converte estímulos mecânicos, que atuam no meio ambiente, num sinal intracelular, culminando na alteração da atividade celular (Bhalla & Hallows, 2008; Knoepp et al., 2020).

A atividade do canal ENaC endotelial é modulada pela tensão de cisalhamento exercida pelo fluxo laminar de sangue (Baldin et al., 2020; D. Guo et al., 2016; Olde Engberink et al., 2015), que conduz ao aumento do Po do canal (Bhalla & Hallows, 2008).

O fluxo laminar, ao atuar sobre as células endoteliais, exerce uma tensão de cisalhamento, que deforma ritmicamente componentes do glicocálice e endotélio (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Esta deformação, detetada pelo canal ENaC, ativa vias de mecanotransdução de sinal, culminando aumento da atividade da enzima eNOS, e, logo, da síntese endotelial de óxido nítrico (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Desta forma, há um acoplamento entre a tensão de cisalhamento exercida pelo fluxo laminar e a vasodilatação desencadeada (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014).

As subunidades β e γ do canal ENaC parecem desempenhar um efeito modulador da ativação do canal pela tensão de cisalhamento (Pitzer et al., 2020). A co-expressão da subunidade β com as subunidades α , δ ou γ associou-se, consistentemente, a redução da ativação do canal pela tensão de cisalhamento (Pitzer et al., 2020). Contrariamente, a subunidade γ , quando co-expressa com as subunidades α ou δ , exerce um efeito modulador positivo, aumentando a ativação do canal (Pitzer et al., 2020).

Ensaio de Mazzochi *et al.* revelaram que a remoção do domínio C-terminal do ENaC, com locais de ligação para a F-actina, comprometeu a ativação do canal em resposta à tensão de cisalhamento (Pitzer et al., 2020). O mesmo foi observado em ensaios em que foram introduzidas mutações no domínio extracelular do canal, depreendendo-se que a ligação à matriz extracelular é essencial para o processo de mecanotransdução (Pitzer et al., 2020).

Considera-se que moléculas N-glicanos, ligadas aos resíduos de asparagina glicosilada dos domínios extracelulares do recetor, estabelecendo a sua ancoragem à matriz extracelular, são fundamentais para a deteção das forças mecânicas exercidas no meio extracelular (Knoepp et al., 2020). De modo a avaliar a sua relevância para a ativação do canal pela tensão de cisalhamento, Knoepp *et al.* substituíram, no domínio extracelular da subunidade α , resíduos de asparagina por alanina, que não se ligam a N-glicanos (Knoepp et al., 2020). A remoção dos resíduos de asparagina nos domínios “palm” ou “knuckle” do canal causou redução de 40% nas correntes desencadeadas

pela tensão de cisalhamento (Knoepp et al., 2020). A eliminação simultânea dos resíduos em ambos os domínios revelou efeitos aditivos na disrupção da resposta à tensão de cisalhamento (Knoepp et al., 2020). Adicionalmente, a remoção exclusiva de moléculas de N-glicanos associou-se a redução da resposta avaliada (Knoepp et al., 2020). Estes resultados evidenciam o papel do glicocálice endotelial na ativação do canal ENaC induzida pela tensão de cisalhamento (Knoepp et al., 2020).

O aumento do número de ENaC na membrana apical de células endoteliais causa aumento da permeabilidade endotelial ao sódio (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014; Olde Engberink et al., 2015). O excesso de sódio intracelular gera alterações no citoesqueleto cortical, uma rede de fibras de actina no citoplasma, a 50-100 nm abaixo da membrana plasmática apical (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014; Olde Engberink et al., 2015). Desencadeia a polimerização das fibras de actina, e subsequente alteração da sua conformação da forma G-actina para F-actina, que confere maior rigidez ao córtex celular (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014), conforme representado na figura 6 (Kusche-Vihrog, Tarjus, et al., 2014).

A deleção da subunidade α do ENaC conduz à redução da rigidez do córtex celular endotelial. Constata-se o mesmo efeito após bloqueio do canal ENaC por Amilorida (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014).

Verifica-se um acoplamento estreito entre a rigidez do córtex endotelial e a síntese de óxido nítrico (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). De fato, um córtex com reduzida rigidez é facilmente deformável pela coluna de sangue, logo, a aplicação da tensão de cisalhamento sob o endotélio, pelo fluxo laminar, causa o incremento da produção de óxido nítrico (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Contrariamente, o aumento da rigidez endotelial reduz a deformabilidade celular, diminuindo a ativação das vias de mecanotransdução normalmente ativadas pela ação do fluxo laminar sobre o endotélio (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Assim, há uma redução da indução da eNOS e da produção endotelial de óxido nítrico (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Desta forma, o aumento do influxo endotelial de sódio culmina no aumento da rigidez celular, conduzindo a uma alteração no tónus vascular (Olde Engberink et al., 2015).

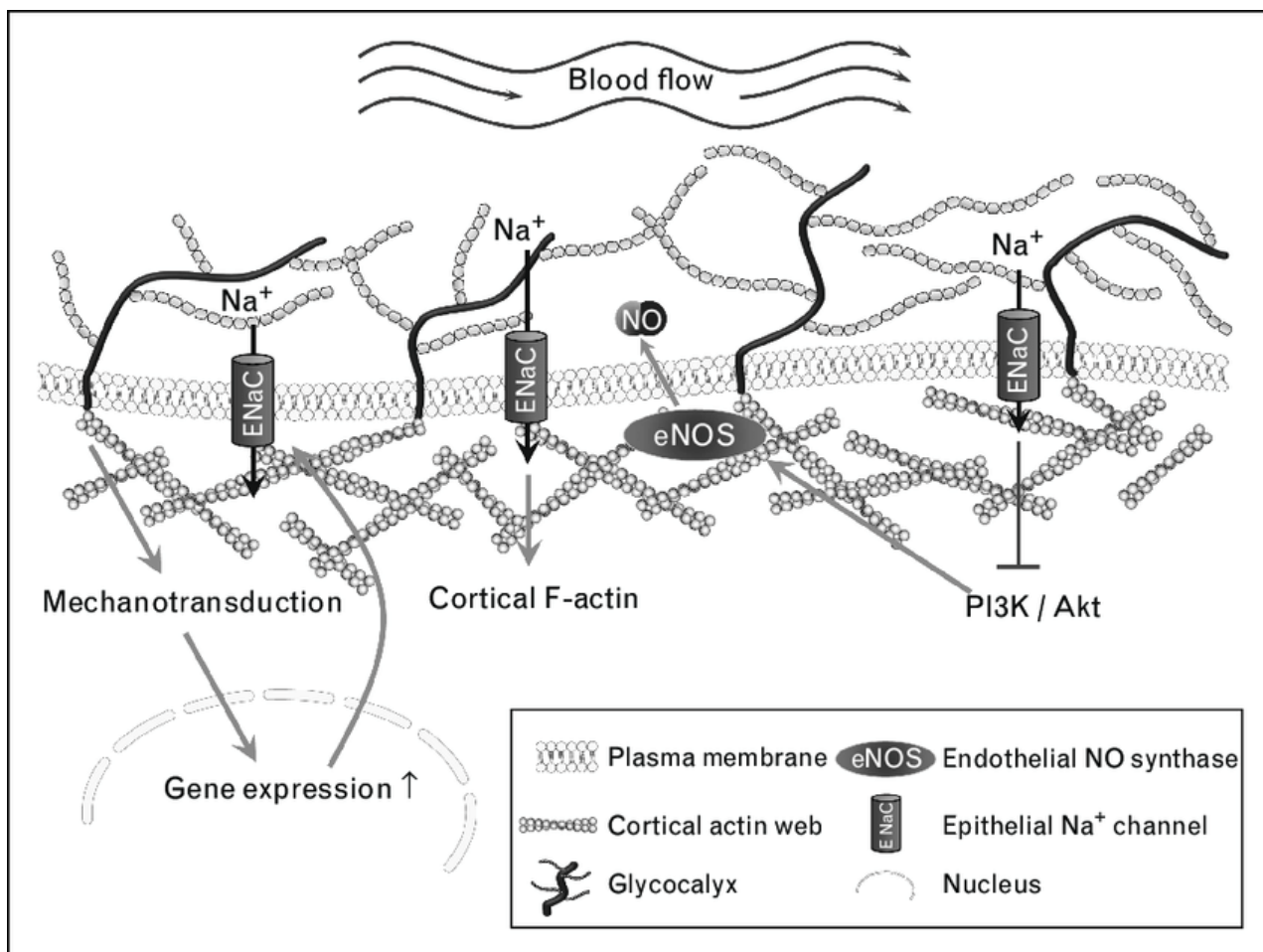


Figura 6 - Papel do ENaC na determinação das propriedades mecânicas do córtex celular.

Estudos em humanos revelaram que a restrição de sal na dieta se associava a aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico e melhoria da função endotelial a nível micro e macrovascular (Olde Engberink et al., 2015).

Através da regulação da densidade apical de ENaC, o endotélio modula a ativação da enzima eNOS, possibilitando um ajuste flexível a alterações da concentração plasmática de sódio (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Os autores postulam que o ajuste da permeabilidade da superfície endotelial ao sódio assegura a manutenção do tónus vascular (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Em caso de hipovolémia por perda de fluido, ocorre hemoconcentração, elevando a concentração plasmática de sódio (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Logo, aumenta a expressão de ENaC na superfície apical das células endoteliais, aumentando a permeabilidade celular ao sódio, e o seu influxo celular (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). O

incremento da quantidade de sódio no citosol causa polimerização das fibras de actina do córtex celular, alterando a sua conformação, de G-actina para F-actina (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Esta conformação confere rigidez ao córtex celular e reduz a ativação da eNOS e, logo, a síntese de NO (Kusche-Vihrog et al., 2015; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Ocorre vasoconstrição, aumento da resistência vascular e, assim, da pressão arterial (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Este mecanismo permitiria restabelecer a normotensão em caso de hipovolémia, perda de volume circulante, revelando-se como um processo adaptativo neste contexto, preservador da homeostasia (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014).

Contrariamente, a exposição do endotélio a concentrações elevadas de sódio ou hiperaldosteronismo crónicos associam-se a sobreexpressão mantida do canal ENaC (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). A decorrente permeabilidade endotelial aumentada ao catião desencadeia alterações fisiopatológicas caracterizadas por rigidez endotelial e vasoconstrição crónicas (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Ocorre lesão vascular, conduzindo a alteração das características e propriedades do endotélio, que assume um fenótipo disfuncional, caracterizado por vasoconstrição, produção de compostos oxidantes, promoção da proliferação celular, adesão e transmigração de células inflamatórias (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). O endotélio adquire propriedades patológicas, culminando no estabelecimento de doença hipertensiva arterial crónica (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Perante este cenário, os fármacos antagonistas da aldosterona e bloqueadores do canal ENaC assumem relevância clínica no tratamento e controlo da hipertensão arterial (Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014).

5.1.5. O papel do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona na Hipertensão Arterial Sal Sensível

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) constitui um regulador essencial da homeostasia de sódio no organismo, volume de fluido extracelular, resistência vascular e, conseqüentemente, de pressão arterial (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Ressler, 2010). A sua indução desencadeia mecanismos que culminam na retenção e conservação de sódio e água (Sparks et al., 2014). A sua ativação anómala, contudo, contribui para o estabelecimento de doenças como hipertensão arterial, hipertrofia ventricular, insuficiência cardíaca (Sparks et al., 2014) e doença renal crónica.

5.1.5.1. Angiotensina II

A Angiotensina II é formada a partir da clivagem de angiotensinogénio (Sparks et al., 2014; Yang & Xu, 2017), uma α_2 -globulina sintetizada maioritariamente no fígado, e, em menor quantidade, no rim (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). O composto é clivado pela enzima renina, produzida pelas células renais do complexo justaglomerular, formando-se, assim, angiotensina I (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014; Yang & Xu, 2017). Nos pulmões, a angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Yang & Xu, 2017) (Hall & Hall, 2020) (Sparks et al., 2014). Esta hormona exerce os seus efeitos através da ligação a recetores acoplados a proteína G, os recetores de tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). A sua ação renal é mediada pelo recetor AT1 (Hall & Hall, 2020).

A reação catalisada pela enzima renina constitui a etapa limitante da produção de angiotensina II (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). A secreção da enzima pelas células do complexo justaglomerular da arteríola renal aferente é desencadeada pelo aumento da concentração intracelular de cAMP; contrariamente, é inibida pela elevação das concentrações intracelulares e extracelulares de cálcio (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). Os três principais mecanismos que induzem a secreção renal de

renina são a ativação dos baroreceptores da arteríola renal aferente, ativação do reflexo túbuloglomerular e aumento do tónus simpático dos nervos que inervam as arteríolas peri-complexo justaglomerular (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). Assim, a redução do fluxo sanguíneo renal, provocada por múltiplos eventos e estados patológicos, como hemorragia, choque cardiogénico, dissecção da aorta, displasia fibromuscular, aterosclerose ou trombose da artéria renal, causa diminuição da pressão arterial na arteríola aferente (Hall & Hall, 2020). A redução da distensão arteriolar decorrente é detetada pelos baroreceptores da arteríola aferente, cuja ativação induz a secreção de renina (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). O aumento de tónus simpático renal estimula o eixo RAAS através da ativação dos recetores β adrenérgicos (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). Adicionalmente, o reflexo tubuloglomerular constitui um mecanismo regulador da secreção de renina (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). Em caso de aumento da concentração de cloreto de sódio que alcança a mácula densa, ocorre maior influxo celular de sódio através de ATPases de Na^+/K^+ (Hall & Hall, 2020; Ren et al., 2004). Assim, é consumido ATP, formando-se adenosina (Ren et al., 2004), que se liga ao seu recetor A_1 nas células do complexo justaglomerular, desencadeando aumento da concentração intracelular de cálcio e, logo, inibição de libertação de renina. No músculo liso da arteríola aferente, a ligação ao recetor A_1 provoca vasoconstrição (Cecilia Ortiz-Capisano et al., 2013; Soo et al., 2006). Contrariamente, em caso de redução da quantidade de cloreto de sódio detetada pela mácula densa, ocorre ativação de vias induzidas pela p38-MAPK, indução da ciclooxygenase tipo 2 (COX-2), que catalisa a produção de prostaglandina E_2 que, ao atuar no complexo justaglomerular, desencadeia a secreção de renina (Rashighi & Harris, 2017a).

Nos túbulos renais, através da ligação ao recetor AT1, a angiotensina II promove o aumento de ATPases de Na^+/K^+ na membrana basolateral tubular (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). No túbulo contornado proximal, desencadeia aumento da atividade do contra-transportador apical de Na^+/H^+ ou NHE3 (Sparks et al., 2014), bem como do co-transportador basolateral de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Hall & Hall, 2020). Ao nível do ramo ascendente espesso da ansa de Henle, é potenciada a atividade do co-transportador apical de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). No tubo contornado distal, a hormona potencia a ação do co-transportador apical de Na^+/Cl^- (Hall & Hall, 2020). Adicionalmente, a nível do segmento distal do tubo contornado

distal e nos ductos coletores, é estimulada a atividade, nas células principais, do canal ENaC; nas células intercaladas α , é aumentada a atividade de ATPases de Na^+/H^+ ; nas células intercaladas β , é incrementado o número de canais de pendrina, transportador de Cl^- (Hall & Hall, 2020; Sparks et al., 2014). Deste modo, a ação da angiotensina II estimula diretamente a reabsorção renal de Na^+ nos túbulos proximais, distais e ductos coletores, contribuindo para a criação de um gradiente osmótico que conduz à reabsorção de água (Hall & Hall, 2020).

Nas arteríolas da vasculatura sistêmica, a angiotensina II exerce os seus efeitos, maioritariamente, através dos seus recetores de tipo 1 (Kawai, 2016). A ligação da hormona ao recetor AT1 induz a ativação da proteína Gq acoplada (D. F. Guo et al., 2001; Peng Zhao et al., 2016; Sparks et al., 2014). É ativada a fosfolipase C (Sparks et al., 2014), que hidrolisa o fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP2) em inositol-1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (D. F. Guo et al., 2001; Hall & Hall, 2020; Peng Zhao et al., 2016). O IP3 desencadeia a libertação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático (Peng Zhao et al., 2016), e potencia a ativação dos canais membranares de cálcio dependentes ou independentes da voltagem (Hall & Hall, 2020). A associação de cálcio à calmodulina ativa a cinase de cadeias leves de miosina (Hall & Hall, 2020; Kawai, 2016). Os filamentos de miosina fosforilados estabelecem ligações cruzadas com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso e, logo, a vasoconstrição (Hall & Hall, 2020; Kawai, 2016). Aumenta, assim, a resistência vascular, elevando-se a pressão arterial (Hall & Hall, 2020).

Ao nível da arteríola renal eferente, a hormona provoca vasoconstrição, causando redução do fluxo sanguíneo medular, desencadeando ativação de vias parácrinas e processos biofísicos que culminam na inibição reabsorção tubular de sódio (Ivy & Bailey, 2014; Moss & Layton, 2014). A vasoconstrição arteriolar causa, ainda, aumento da pressão hidrostática glomerular e, logo, da taxa de filtração glomerular (TFG) (Hall & Hall, 2020).

Adicionalmente, nas células vasculares, a angiotensina II promove a fosforilação de proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK), p38MAPK, cinase c-Jun N-terminal (JNK), cinases de tirosina, mobilização de cálcio intracelular e geração de espécies reativas de oxigénio (Savoia et al., 2011; Yaghooti et al., 2011); induzindo cascatas de sinalização intracelular que estimulam a proliferação celular, inflamação, fibrose e

vasoconstrição, desencadeando remodelação vascular (Savoia et al., 2011). Desencadeia, ainda, a síntese de hormonas vasoativas e fatores de crescimento como endotelina 1 (ET-1), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), mediadores promotores de hiperplasia celular e fibrose (Savoia et al., 2011).

De fato, em ratinhos, a administração de angiotensina II associou-se a aumento significativo da atividade da via p38 MAPK (Potthoff et al., 2016; Zhang et al., 2017). Por sua vez, a indução desta via desencadeou alteração da expressão génica, detetando-se aumento da síntese de mRNA das proteases MMP-1 e MMP-9, envolvidas na remodelação da parede vascular (Potthoff et al., 2016; Rashighi & Harris, 2017b; Zhang et al., 2017). A ativação destes mediadores culminou na hipertrofia do músculo liso vascular, bem como fibrose intersticial (Rashighi & Harris, 2017b). Consequentemente, constatou-se, tanto na aorta como nos vasos de resistência renais, aumento da vasoreatividade, traduzido pelo aumento do tónus vasoconstritor subsequentemente à administração de angiotensina II, redução da resposta vasodilatadora ao óxido nítrico e, ainda, diminuição da capacitância e aumento da resistência vasculares (Potthoff et al., 2016).

SA Potthoff et al administram, em ratinhos, um inibidor da p38-MAPK, BIRB796. Constataram, em ratinhos tratados com angiotensina II, um aumento significativo da ativação da via p38 MAPK, revertido aquando da administração do inibidor BIRB796 (Potthoff et al., 2016). Verificaram alteração da expressão génica, traduzida pela diminuição significativa da expressão de MMP-1 e MMP-9 (Potthoff et al., 2016). Concomitantemente, observou-se uma redução do rácio entre a área das camadas intermédia e luminal da parede vascular (Potthoff et al., 2016). Adicionalmente, a resposta vasoconstritora à administração de angiotensina II nestes ratinhos revelou-se significativamente inferior à observada nos ratinhos aos quais não foi administrado o inibidor, evidenciando redução da vasoreatividade (Potthoff et al., 2016). A terapêutica em estudo associou-se a redução da pressão arterial sistólica; contudo, não foram alcançados valores de normotensão (Potthoff et al., 2016). Os autores postulam que a via p38 MAPK constitui uma de várias vias através das quais a angiotensina II gera o seu efeito hipertensor (Potthoff et al., 2016).

Constata-se, assim, que a desregulação do sistema SRAA desencadeia remodelação vascular anómala, evento determinante no estabelecimento de doença cardiovascular e renal (Potthoff et al., 2016). Nos vasos centrais, como a aorta, o aumento da rigidez e espessamento da íntima decorrente reduzem a capacitância dos vasos, causando elevação da pressão arterial sistólica, um forte fator preditivo de morbidade e morte cardiovascular aumentada (Potthoff et al., 2016)

No sistema cardiovascular, a ligação de angiotensina ao recetor AT1 desencadeia proliferação celular, inflamação e vasoconstrição enquanto que a ativação de AT2 induz apoptose, vasodilatação e, em condições patológicas, hipertrofia celular e inflamação (Savoia et al., 2011). Estes recetores medeiam, através da indução de cascatas de sinalização, os efeitos pró-inflamatórios, proliferativos e pró-fibróticos da angiotensina II (Savoia et al., 2011; Yaghooti et al., 2011).

A angiotensina II é um mediador pró-inflamatório (Calzerra et al., 2018; Xu et al., 2017; Yaghooti et al., 2011), induz a geração de espécies reativas de oxigénio (Calzerra et al., 2018; Eberhardt & Pfeilschifter, 2007; Savoia et al., 2011) mitocondriais e produzidas pela NADPH oxidase (Eberhardt & Pfeilschifter, 2007; Savoia et al., 2011), ciclooxigenase, lipoxigenase, hemeoxigenase, xantina oxidase e pelo citocromo P450 (Savoia et al., 2011). O anião superóxido e peróxido de hidrogénio gerados ativam múltiplas moléculas sinalizadoras (Eberhardt & Pfeilschifter, 2007; Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011), incluindo MAPK, cinases de tirosina, fosfatases de tirosina (PTPs), fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína ativadora 1 (AP-1) e fator de transcrição induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), que regulam o crescimento celular, proliferação, migração, inflamação, fibrose e contração vascular (Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011). De igual modo, a ativação destas vias induz remodelação vascular (Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011). Considera-se a inibição da NADPH oxidase como um potencial alvo terapêutico no tratamento da hipertensão arterial (Savoia et al., 2011). Desta forma, na parede vascular, a angiotensina II desencadeia hipertrofia de células de músculo liso (Calzerra et al., 2018; Eberhardt & Pfeilschifter, 2007; Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011), proliferação de fibroblastos, indução da síntese e inibição da degradação de matriz extracelular (aumento da produção de fibras de colagénio de tipos I e III, elastina, fibronectina)

(Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011) e fibrose intersticial (Eberhardt & Pfeilschifter, 2007; Potthoff et al., 2016; Savoia et al., 2011).

5.1.5.2. Arginina-Vasopressina

A hormona arginina-vasopressina participa também, para além do SRAA, na regulação do balanço hídrico corporal e da pressão arterial (Demiselle et al., 2020; Hall & Hall, 2020; Kortenoeven et al., 2015). É sintetizada nos núcleos supra-ótico e paraventricular do hipotálamo, sendo armazenada na neurohipófise (Hall & Hall, 2020; Holmes et al., 2003; Kim, Madara, et al., 2021; Kortenoeven et al., 2015). A sua secreção é estimulada pelo aumento da osmolalidade (Bankir et al., 2017; Bichet, 2019; Demiselle et al., 2020; Hall & Hall, 2020) (principalmente decorrente de hipernatrémia, comparativamente a hiperglicémia) (Bankir et al., 2017; Hall & Hall, 2020), detetada pelo órgão subfornical, núcleo pré-ótico mediano e *organum vasculosum* da *lamina terminalis*, a redução do volume de fluido extracelular (Abbott et al., 2016; Bichet, 2019; Holmes et al., 2003; Kim, Madara, et al., 2021), aumento da atividade do sistema RAS (Abbott et al., 2016), bem como do tónus simpático (Hall & Hall, 2020; Kortenoeven et al., 2015), a hipoglicémia (Kim, Knudsen, et al., 2021), nicotina (Budisavljevic & Ploth, 2012; Kapoor & Jones, 2005). A hormona liga-se a recetores de arginina-vasopressina de tipo 2 (V2) (Demiselle et al., 2020; Juul et al., 2014; Tingskov et al., 2019), localizados na membrana basolateral das células tubulares do ramo ascendente espesso da ansa de Henle, e células principais do segmento terminal do ducto contornado distal e ductos coletores da medula renal (Bankir et al., 2017; Juul et al., 2014), segmentos do nefrónio praticamente impermeáveis à água (Kortenoeven et al., 2015). A ligação ao recetor desencadeia elevação da concentração intracelular de cAMP, ativação da enzima proteína cinase A (PKA), que fosforila vesículas intracelulares de armazenamento de aquaporina 2 (AQP2, proteína transportadora de água) promovendo a sua translocação do citosol para a membrana apical, e a inserção dos transportadores na membrana celular (Juul et al., 2014; Kortenoeven et al., 2015; Tingskov et al., 2019). Através da aquaporina 2 ocorre transporte passivo de moléculas de água, a favor do gradiente osmótico criado pela

reabsorção tubular de sódio e ureia, possibilitando a reabsorção de água e formação de urina concentrada, hiperosmótica (Bankir et al., 2017; Hall & Hall, 2020).

A hormona arginina-vasopressina constitui um dos mediadores vasoconstritores mais potentes do organismo humano (Demiselle et al., 2020; Hall & Hall, 2020; Stegemann, 2007). No músculo liso vascular, através da ligação a recetores V1a (Bankir et al., 2013; Demiselle et al., 2020; Juul et al., 2014; Tingskov et al., 2019), ativa uma cascata de sinalização intracelular ativada pela fosfolipase C, que culmina na ativação da cinase de cadeias leves da miosina, que, através da fosforilação das cadeias leves de miosina, possibilita a formação de pontes cruzadas com os filamentos de actina e, logo, a contração do músculo liso vascular (Grzešek et al., 2015; Holmes et al., 2003; Stegemann, 2007).

5.1.5.3. Aldosterona

A hormona angiotensina II, produzida nos pulmões, liga-se a recetores AT1 na zona glomerulosa do córtex da supra-renal, desencadeando a libertação de Aldosterona (Briet & Schiffrin, 2010; Connell et al., 2008; Tsilosani et al., 2022). A sua secreção é ainda regulada pela concentração plasmática de K^+ e pela hormona hipofisária ACTH (Briet & Schiffrin, 2010; Connell et al., 2008; Shimosawa, 2013).

A hormona atua nas células principais e α -intercaladas do segmento terminal dos ductos contornados distais, e ductos coletores do córtex e medula renais (Shimosawa, 2013; Tsilosani et al., 2022). Aí, liga-se ao recetor mineralocorticoide (RM) citosólico, formando um complexo que se associa à região promotora de genes que codificam o canal ENaC (Briet & Schiffrin, 2010; Shimosawa, 2013; Tsilosani et al., 2022), a ATPase de Na^+/K^+ (Remuzzi et al., 2008), a ATPase de H^+ (Briet & Schiffrin, 2010) e a proteína pendrina, contra-transportador de Cl^-/HCO_3^- , promovendo a sua expressão génica (Kai et al., 2016). Deste modo, é aumentada, nos ductos coletores, a reabsorção de Na^+ , a excreção de K^+ e H^+ (Connell et al., 2008; Shimosawa, 2013). Desta forma, a Aldosterona promove a reabsorção renal de Na^+ e, logo, de água, contribuindo para a manutenção do volume de fluido extracelular (Remuzzi et al., 2008).

Constatou-se, em ratinhos Dahl S hipertensos, a redução dos valores séricos de aldosterona após administração de dose de carga de sal. Contudo, os investigadores continuavam a constatar a sobreativação do recetor mineralocorticóide renal (Ando & Fujita, 2012; Kawarazaki et al., 2012). Considerou-se, então, a existência de outro agonista do recetor mineralocorticóide (Ando & Fujita, 2012).

Shibata *et al.* postularam a ativação do recetor pela proteína rac 1, da família de GTPases Rho (Ando & Fujita, 2012). A família de GTPases Rho inclui, na espécie humana, vinte elementos, incluindo o RhoA, rac1 e Cdc42. Intervêm na regulação da formação do citoesqueleto de actina, e, portanto, processos de divisão, adesão e migração celular (André et al., 2014). De fato, demonstrou-se, em células HEK293, associação causal entre a ativação constitutiva de rac1 e aumento da atividade do recetor mineralocorticóide, bem como a sua translocação nuclear (Ando & Fujita, 2012).

A formação de rac1 é promovida pela angiotensina II, aldosterona e aumento da concentração plasmática de sódio (Kawarazaki et al., 2012; Shibata et al., 2011; Shimosawa, 2013). A angiotensina II ativa a cinase Src, que, fosforila e induz a proteína 1 de invasão e indução de metástases do linfoma de células T (Tiam 1). Este fator desencadeia a ativação de rac1, que promove a síntese de vários fatores de transcrição. (Shimosawa, 2013).

Shibata *et al.* verificaram, em amostras renais de ratinhos Dahl S expostos a uma dieta rica em sal, um aumento da expressão da GTPase rac 1 (Fujita, 2014). Em ratinhos Dahl R sob as mesmas condições, constatou-se o oposto (Fujita, 2014; Shibata et al., 2011). Nos ratinhos sal sensíveis, apesar da redução plasmática da aldosterona provocada pela carga de sal, detetou-se aumento da atividade do recetor mineralocorticóide, constatado pela acumulação de recetores no núcleo celular (Fujita, 2014; Shibata et al., 2011). Este aumento foi bloqueado pela inibição de rac 1 (Fujita, 2014; Shibata et al., 2011). Em ratinhos sal sensíveis, mesmo valores reduzidos de aldosterona parecem ter um efeito regulador positivo sob a atividade da GTPase (Fujita, 2014; Shibata et al., 2011). De fato, a atividade de rac 1 diminuiu em ratinhos Dahl S adrenalectomizados, tendo este efeito sido revertido pela administração de aldosterona (Fujita, 2014; Shibata et al., 2011).

Kawarazaki *et al.* obtiveram resultados similares em ratinhos transgênicos Tsukuba, hipertensos, nos quais foi induzida a sobreexpressão de angiotensina II (Kawarazaki *et al.*, 2012). Estes ratinhos foram divididos em dois braços do estudo, um dos quais recebeu uma dieta rica em sal durante 6 semanas; ao outro foi concedida dieta pobre em sal (Kawarazaki *et al.*, 2012). Selecionaram-se em ambos os braços do estudo, ratinhos, cujo plano de intervenção incluiu adrenalectomia, administração de Eplerenona, o inibidor de rac 1 EHT1864 ou hidralazina (Kawarazaki *et al.*, 2012). Os ratinhos com dieta rica em sal desenvolveram hipertensão arterial e lesão renal (Kawarazaki *et al.*, 2012). Constatou-se que a adrenalectomia preveniu o estabelecimento de doença renal (Kawarazaki *et al.*, 2012). A terapêutica com Eplerenona ou EHT1864 reprimiu a hiperativação do recetor mineralocorticóide, tendo causado regressão parcial da de doença renal, bem como redução dos valores tensionais (Kawarazaki *et al.*, 2012). O tratamento com Hidralazina associou-se, apenas, a normalização do perfil tensional (Kawarazaki *et al.*, 2012). Desta forma, os resultados obtidos por Kawarazaki *et al.* confirmam os constatados por Shibata *et al.*

Verificou-se, ainda, um efeito aditivo do sal e aldosterona na potenciação e indução da hiperativação do recetor mineralocorticóide, e estabelecimento de hipertensão arterial e lesão renal decorrentes (Kawarazaki *et al.*, 2012; Shibata *et al.*, 2011). A inibição de rac 1 preveniu estes efeitos (Shibata *et al.*, 2011). Deste modo, pode assumir-se um papel importante do mediador rac 1 na etiopatogénese da hipertensão arterial sal sensível (Shibata *et al.*, 2011).

Tendo em conta que a atividade de rac 1 evidenciou resultados opostos em ratinhos Dahl S e Dahl R expostos a condições ambientais idênticas, pode assumir-se que a variabilidade da resposta se deve a variações genéticas (Shibata *et al.*, 2011). Consideraram-se polimorfismos nos genes CAMGAP1, do cromossoma 10, Arhgap1, no cromossoma 3, como potenciais fatores causais (Shibata *et al.*, 2011). Os mecanismos através dos quais a exposição a uma carga de sal desencadeia efeitos diferenciais sob a atividade da GTPase rac 1 mantêm-se elusivos (Shibata *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de investigação nesta área revela-se determinante para o esclarecimento do papel deste mediador na fisiopatologia da hipertensão sal sensível (Shibata *et al.*, 2011).

A aldosterona desencadeia múltiplos efeitos deletérios nos vasos, coração e rins, constituindo um fator etiopatogénico importante nos modelos de estabelecimento de disfunção endotelial (Remuzzi et al., 2008), hipertrofia ventricular, hipertensão arterial (Briet & Schiffrin, 2010) e doença renal crónica (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). A hormona tem efeitos pró-oxidantes, pró-inflamatórios e pró-fibróticos (Bernardi et al., 2015; Remuzzi et al., 2008).

A infusão de Aldosterona em ratinhos normotensos associa-se a expansão de tufo glomerulares, alterações escleróticas, lesão de podócitos, hialinose arteriolar (Briet & Schiffrin, 2010), inflamação intersticial e fibrose (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008).

A hormona induz a ativação de cascatas sinalizadores que culminam em inflamação (Bernardi et al., 2015; Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). Através da ativação do recetor mineralocorticóide, ativa a enzima SG-k1 que, através da fosforilação do composto inibidor do fator nuclear kappa B (IκB), inibe-o, desencadeando a ativação do fator de transcrição NFκB (Briet & Schiffrin, 2010). Este fator promove a expressão de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios, como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (Briet & Schiffrin, 2010), citocinas inflamatórias como interleucina 1β (IL-1β) e interleucina 6 (IL-6), quimiocinas como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e osteopontina (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). Adicionalmente, a aldosterona induz a enzima NADPH (fosfato de dinucleótico de nicotinamida e adenina) oxidase, que catalisa a produção de espécies reativas de oxigénio, gerando *stress* oxidativo (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). Constatou-se, em ratinhos Dahl S com dieta rica em sal, uma redução sinérgica decorrente da administração de um inibidor da enzima conversora de angiotensina e do antagonista mineralocorticóide Eplerenona (Briet & Schiffrin, 2010).

Através da administração de aldosterona em células epiteliais humanas dos túbulos proximais, Zhang *et al.* detetaram a geração de espécies reativas de oxigénio mitocondriais. Os mediadores gerados induziam a via de cinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK1/2), culminando na transformação mesenquimatosa das células em miofibroblastos (Briet & Schiffrin, 2010). Os efeitos pró-fibróticos da hormona esteróide são, em parte, mediados por indução de vias ativadas pela GTPase

Rho cinase (Briet & Schiffrin, 2010), que induz a expressão dos fatores de crescimento pró-fibróticos TGF- β e CTGF (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). A sua atividade induz proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de colagénio, redução da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e, conseqüentemente, fibrose tubulointersticial (Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008). De modo concordante com o observado, a administração de Fasudil, um inibidor da cinase Rho, causou redução da expressão dos fatores TGF- β e CTGF, bem como da fibrose e inflamação túbulointersticiais (Briet & Schiffrin, 2010).

Adicionalmente, o stress oxidativo desencadeado pela aldosterona é, em parte responsável pela lesão de podócitos, em modelos de ratinhos. A sua ligação ao recetor mineralocorticóide nos podócitos provoca disrupção dos seus pedicelos e alterações na sua arquitetura, ocorrendo desnudação da membrana basal, conduzindo a esclerose segmentar. Há diminuição da expressão de nefrina e podocina e aumento de desmina e b7-1, marcadores de lesão podocitária. A terapêutica com Eplerenona evitou as alterações histológicas referidas (Briet & Schiffrin, 2010).

Nas células mesangiais, a hormona esteróide promove a fosforilação do recetor do fator de crescimento epitelial, EGFR, ativando as vias PI3K-AKT e RAS-MAPK (Briet & Schiffrin, 2010), induzindo proliferação celular (Bernardi et al., 2015; Briet & Schiffrin, 2010; Remuzzi et al., 2008).

Os ensaios clínicos randomizados RALES e EPHESUS, nos quais foi testado o efeito de um antagonista mineralocorticóide em doentes com disfunção ventricular esquerda demonstrou uma melhoria significativa na sobrevivência e na redução dos eventos cardiovasculares, independente dos valores tensionais (Briet & Schiffrin, 2010).

5.1.6. Impacto da Sensibilidade ao Sódio nos Mecanismos Centrais de Regulação da Pressão Arterial

O sistema nervoso central regula o sistema cardiovascular ao milissegundo, de modo a manter a homeostasia (Leenen, 2014). Este controlo é essencial para a sobrevivência dos organismos (Leenen, 2014). Os neurónios que formam as vias neuronais envolvidas na regulação das funções cardiovasculares têm corpos celulares no núcleo paraventricular do hipotálamo; daí, projetam axónios até à medula ventrolateral rostral, no tronco cerebral ou, diretamente, na coluna intermediolateral da medula espinhal (Leenen, 2014). A ativação destas vias desencadeia libertação de Glutamato ou GABA na fenda sináptica, que se ligam a recetores ionotrópicos, desencadeando abertura de canais iónicos (Leenen, 2014), gerando potenciais de ação transmitidos através de neurónios do sistema nervoso autónomo (Leenen et al., 2017).

A modulação da atividade das vias simpática e parassimpática, ou da libertação de vasopressina, constituem os principais mecanismos através dos quais o sistema nervoso central regula a pressão arterial (Takahashi et al., 2011).

Os neurónios dos órgãos circumventriculares, expostos ao sangue e líquido cefalorraquidiano, como a área postrema, órgão subfornical e o *organum vasculosum* da lâmina terminal, bem como neurónios dos núcleos pré-ótico mediano e paraventricular são sensíveis ao sódio (Leenen, 2010). A infusão de líquido cefalorraquidiano rico em sódio no sistema ventricular cerebral desencadeia, em ratinhos, aumento do tónus simpático e vasopressor (Leenen, 2010; Rassler, 2010). Estas respostas são induzidas pelo aumento da concentração em sódio do líquido cefalorraquidiano (Leenen, 2010; Rassler, 2010), e não da osmolaridade (Leenen, 2010), visto que não se verificam em caso de infusão de manitol.

Em ratinhos normotensos, o aumento da concentração de sódio no líquido cefalorraquidiano em 4 a 6 mM causa elevação da pressão arterial em 15 a 25 mmHg (Leenen, 2010). Constata-se uma resposta aumentada ao incremento do sódio cefalorraquidiano em ratinhos Dahl S e SHR, sal-sensíveis (Leenen, 2010).

Em estirpes de ratinhos sal-sensíveis Dahl S e SHR, observa-se uma correlação entre o aumento do consumo de sal e a elevação plasmática de sódio decorrente, e o aumento da concentração de sódio do líquido cefalorraquidiano (Leenen, 2010;

Rassler, 2010). Contrariamente, em estirpes sal-resistentes, como Wistar, WKY e Dahl R, não se estabelece esta associação (entre elevação da concentração de sódio no plasma e líquido cefaloespinal) (Leenen, 2010). A administração intravenosa de solução de cloreto de sódio causa, em ratinhos Dahl S, aumento significativamente superior no sódio cefalorraquidiano e do parênquima cerebral, comparativamente a estirpes Dahl R, demonstrando maior transporte através da barreira hematoencefálica nas estirpes sal-sensíveis (Leenen, 2010).

Em ratinhos geneticamente suscetíveis, após consumo excessivo de sal, a concentração plasmática de sódio eleva-se (Amin, 2011; Takahashi et al., 2011). O transporte de sódio, através da barreira hematoencefálica, aumenta a sua concentração no fluido cefalorraquidiano, bem como no espaço intersticial cerebral (Amin, 2011; Leenen, 2010; Rassler, 2010; Takahashi et al., 2011).

Ocorre aumento da síntese local de aldosterona, que, ligando-se a recetores mineralocorticóides, estimula a atividade da ATPase de Na^+/K^+ e canal ENaC nas células endoteliais do plexo coróide; e do canal ENaC nos neurónios dos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo, promovendo influxo celular aumentado de sódio (Leenen, 2010). Ocorre aumento da concentração citoplasmática de Na^+ e Ca^{2+} neuronal, incrementando a excitabilidade (Leenen, 2010).

A ativação do ENaC ou incremento de aldosterona estimula o aumento da secreção do composto de ouabaína endógena pelo hipotálamo (núcleos supra-óptico e paraventricular) (Leenen, 2010; Rassler, 2010; Shimosawa, 2013; Takahashi et al., 2011), que inibe a ATPase de Na^+/K^+ no plexo coróide, reduzindo o transporte de sódio para o líquido cefalorraquidiano (Amin, 2011; Leenen, 2010; Rassler, 2010; Takahashi et al., 2011); e ativa o sistema renina-angiotensina (Leenen, 2010; Padilha et al., 2011; Rassler, 2010; Takahashi et al., 2011). No córtex adrenal, a angiotensina II desencadeia a secreção de marinofubagenina, que induz inibição sustida da isoforma $\alpha 1$ da ATPase de Na^+/K^+ (Rassler, 2010). Nos neurónios do hipotálamo posterior, a ligação de angiotensina II ao recetor de angiotensina tipo 1 (AT1) desencadeia a indução de NADPH oxidases, decorrente síntese de superóxido (Calzerra et al., 2018; Leenen, 2010; Leenen et al., 2017), e aumento de cálcio intracelular (Leenen et al., 2017). Ocorre aumento da excitabilidade neuronal, da secreção de norepinefrina (Leenen et al., 2017; Rassler, 2010) e, conseqüentemente, hiperativação do sistema nervoso

simpático (Calzerra et al., 2018; Leenen et al., 2017; Ressler, 2010), cujo tónus é regulado pelo hipotálamo posterior (Amin, 2011; Leenen, 2010; Takahashi et al., 2011). O aumento do tónus simpático desencadeia estimulação da vasoconstrição arterial, aumento da frequência cardíaca e inotropismo, desencadeando elevação da pressão arterial sistémica (Amin, 2011; Leenen, 2010; Takahashi et al., 2011).

Nas últimas décadas, tornou-se aparente o papel crucial do sistema renina-angiotensina cerebral para a regulação da pressão arterial a longo prazo (Leenen, 2014). Não intervém na regulação aguda, ao segundo, mas na determinação crónica do *setpoint* para o tónus simpático e pressão arterial (Leenen, 2014). As vias neuromoduladoras de regulação a longo prazo envolvem aldosterona, recetores mineralocorticóides e de angiotensina de tipo 1, canais ENaC e ouabaína endógena (Leenen, 2014). A disrupção da sinalização cerebral ativada por qualquer dos fatores compromete os mecanismos centrais de elevação da pressão arterial (Leenen, 2014). Estes mecanismos estão sinalizados na figura 7 (Leenen, 2017). De modo concordante, o tratamento de ratinhos com Espironolactona, antagonista da aldosterona, ou Amilorida, antagonista do canal ENaC, bloqueou a hipertensão induzida pela infusão central de sódio.

Adicionalmente, em ratinhos Dahl S e SHR, a injeção de Losartan, antagonista do recetor de angiotensina de tipo 1, no núcleo pré-ótico mediano do hipotálamo inibiu a resposta hipertensiva desencadeada pelo incremento de sódio no líquido cefalorraquidiano. Estes resultados evidenciam a relevância da angiotensina II no mecanismo de hipertensão sal-sensível de causa central (Ressler, 2010).

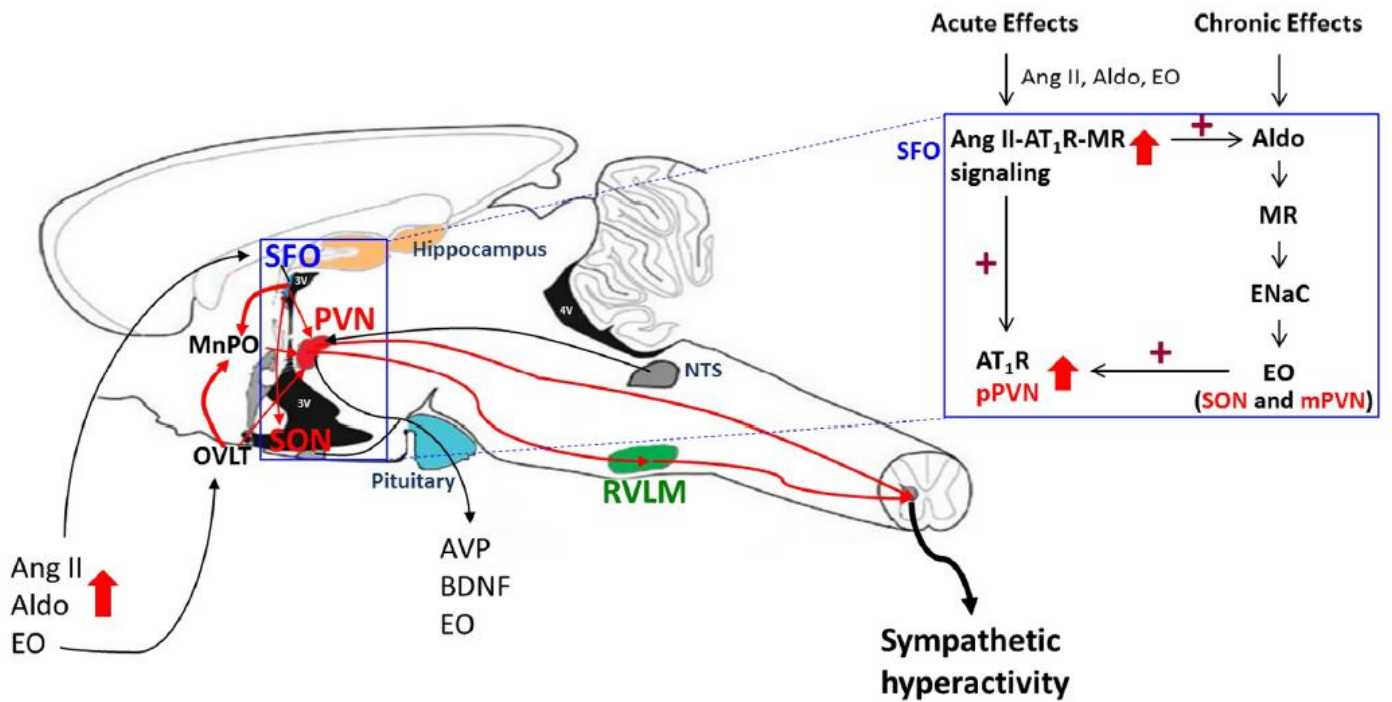


Figura 7 - Modelo dos mecanismos centrais envolvidos no estabelecimento de hipertensão arterial (Ang II: angiotensina II, Aldo: aldosterona, EO: ouabaína endógena, AVP: arginina-vasopressina, BDNF: fator neurotrófico cerebral, RVLM: medula ventrolateral rostral, SON: núcleo supra-otico, mPVN: divisão magnocelular do núcleo paraventricular)

5.1.7. Sódio e Inflamação

A disrupção da superfície endotelial compromete não só a sua função como barreira, mas também como estrutura com papel anti-inflamatório, que inibe a adesão leucocitária ao endotélio (Wenstedt et al., 2018). De fato, estudos *in vitro* e *in vivo*, em animais, revelaram uma associação entre o consumo excessivo de sal, a exposição endotelial crónica a concentrações elevadas de sódio decorrente, e o aumento da expressão endotelial das glicoproteínas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (Wenstedt et al., 2018). Desta forma, é potenciada a adesão dos leucócitos circulantes no sangue à superfície endotelial e, conseqüentemente, a sua ativação e migração para o espaço intersticial (Wenstedt et al., 2018).

A exposição crónica do endotélio a concentrações plasmáticas de sódio elevadas associa-se a desintegração da matriz do glicocálice endotelial, culminando no compromisso da função de barreira e aquisição de características pró-inflamatórias (Targoński et al., 2020). Conduz ainda a aumento da expressão endotelial de canais ENaC (Targoński et al., 2020). Desta forma, aquando da exposição da superfície endotelial a excesso de sódio, ocorre influxo aumentado de sódio nas células endoteliais e espaço intersticial (Targoński et al., 2020). A acumulação de sódio no espaço intersticial vascular associa-se a ativação de células dendríticas e macrófagos residentes, e alteração do perfil de expressão de citocinas, caracterizado por aumento da secreção de IL-17, gerando um microambiente pró-inflamatório (Targoński et al., 2020). Concomitantemente com o aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) desencadeados por *overload* de sal, o aumento de citocinas inflamatórias conduz à migração e acumulação de leucócitos no espaço perivascular (Targoński et al., 2020). A secreção de citocinas pelas células imunes ativadas, por sua vez, conduz a disfunção endotelial e promove retenção de sódio nos espaços celular e intersticial (Targoński et al., 2020). Os neutrófilos ativados, recrutados para o espaço perivascular formam espécies reativas de oxigénio (ERO) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, compostas por cromatina, histonas, elastase, mieloperoxidase, lactoferrina, gelatinase e proteínas plasmáticas), importantes para a contenção de microrganismos patogénicos em caso de infeção e aumento da eficiência dos processos de fagocitose e destruição microbiana (Targoński et al., 2020). Secretam,

ainda fator XII, ativado em contato com as redes de NETs (Targoński et al., 2020). A ativação do fator desencadeia a ativação da via extrínseca da coagulação, culminando na formação de redes de fibrina na microvasculatura, que desempenham funções similares às NETs em caso de infecção (Targoński et al., 2020). Adicionalmente, o fator XII ativado promove a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (Targoński et al., 2020). Deste modo, a ativação de células de imunidade inata desencadeada pelo sódio revela-se como uma resposta maladaptativa, contribuindo para inflamação e desregulação da coagulação crónicas, e decorrente disfunção da microvasculatura (Targoński et al., 2020).

Por sua vez, o stress oxidativo decorrente da ativação de neutrófilos induz o inflamassoma NALP3 ou NLRP3, formado por NALP3, ASC e a enzima caspase-1 (Fu et al., 2018). A indução do inflamassoma conduz à síntese da citocina inflamatória IL-1 β , que causa ativação e disfunção endoteliais, recrutamento e ativação de leucócitos. Conduz, assim, à manutenção de um estado pró-inflamatório crónico (Fu et al., 2018). O seu efeito nas células endoteliais está esquematizado na figura 8 (Bai et al., 2020).

Em ratinhos diabéticos, a administração de Anacinra, antagonista da IL-1, associou-se a melhoria da função endotelial (Fu et al., 2018).

Em estudos *in vitro* em células endoteliais da aorta de ratinhos desenvolvidas num meio de cultura rico em sal revelaram um aumento da produção de ERO e da expressão de NALP3, e redução da atividade da enzima eNOS (Fu et al., 2018). A disfunção endotelial decorrente e o incremento da expressão de NALP3 foram parcialmente abolidos pela administração de catalase ao meio (Fu et al., 2018). Adicionalmente, a aplicação das condições e método do ensaio em células NALP3-*knockout* associou-se a menor disfunção endotelial (Fu et al., 2018). A adição, ao meio de cultura, de Gliburida, antagonista NALP3, associou-se a maior expressão de eNOS (Fu et al., 2018). Estes resultados permitem avançar um modelo de ativação do inflamassoma NALP3 por ERO (Fu et al., 2018). O incremento da expressão de IL-1 e diminuição da expressão de eNOS estabelecem a ligação com os mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam disfunção endotelial (Fu et al., 2018).

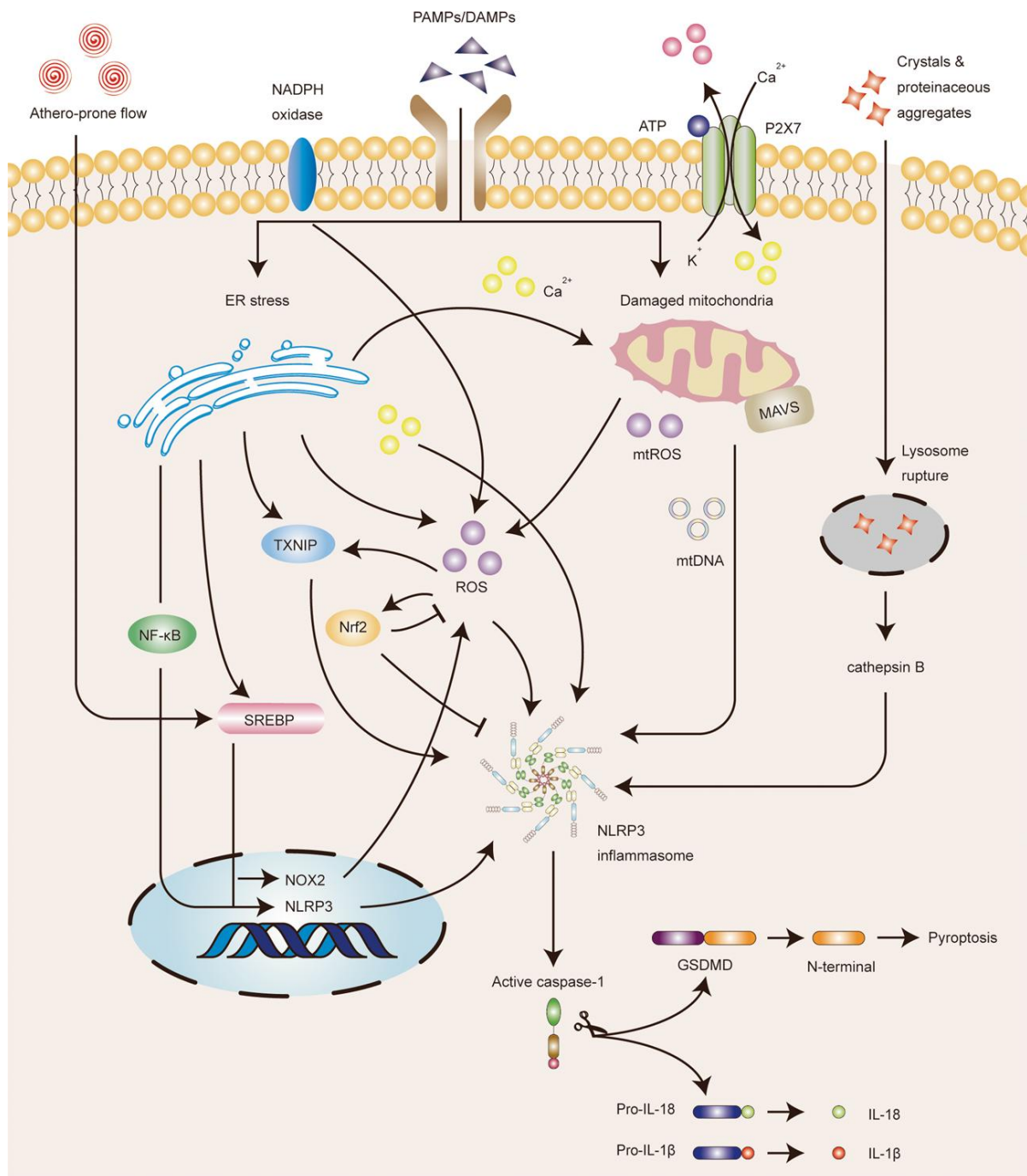


Figura 8 - Papel do inflamassoma NLRP3 na promoção da disfunção endotelial.

Adicionalmente, em estudos animais, verificou-se que o aumento de citocinas inflamatórias causa ativação de células dendríticas produtoras de angiotensina II, aumentando a sua concentração (Targoński et al., 2020). Este mediador promove vasoconstrição e aumento da retenção renal de sódio, contribuindo para a hipertensão arterial (Targoński et al., 2020).

5.1.8. Armazenamento de Sódio na Pele

A pele é o órgão com maior área de superfície de espaço extracelular (Olde Engberink et al., 2015).

Em ratinhos sujeitos a uma dieta rica em sal, verifica-se acumulação de sódio no espaço extracelular epitelial, não associado a acumulação concomitante de água (Hijmans et al., 2019; Olde Engberink et al., 2015, 2020; Polychronopoulou et al., 2019). O catião liga-se aos glicosaminoglicanos que compõem o espaço intersticial da pele (Hijmans et al., 2019; Olde Engberink et al., 2020; Polychronopoulou et al., 2019; Titze, 2014). De fato, o armazenamento de sódio no espaço intersticial epitelial induz a polimerização (Olde Engberink et al., 2015, 2020; Polychronopoulou et al., 2019; Titze, 2014) e sulfatação mais extensa destes compostos, conferindo-lhes carga mais negativa e, logo, maior capacidade de associação ao catião de sódio (Olde Engberink et al., 2015, 2020; Titze, 2014). Pelo contrário, a redução da polimerização e sulfatação destes GAG associa-se a libertação de sódio armazenado na pele (Polychronopoulou et al., 2019; Titze, 2014). O sódio é armazenado imediatamente abaixo da camada formada pelos queratinócitos, formando um microambiente hipertónico relativamente ao plasma, estabelecendo-se um gradiente de sódio através de um sistema de contracorrente, similar ao renal (Polychronopoulou et al., 2019). Desta forma, a pele parece constituir um microambiente altamente dinâmico, cujas características eletrolíticas do seu espaço intersticial são ativamente reguladas e adaptadas consoante os níveis séricos de sódio (Titze, 2014).

A concentração fisiológica de sódio no espaço intersticial de tecidos e órgãos alcança valores muito superiores aos plasmáticos (Olde Engberink et al., 2015, 2020; Titze, 2014), entre 160 e 250 mmol/L (Titze, 2014).

Em caso de elevação da concentração plasmática de sódio, a hipertonicidade intersticial decorrente é detetada por células inatas do sistema fagocítico mononuclear, que são ativadas e infiltram o espaço intersticial. Face ao *stress* osmótico, expressam o fator de transcrição TONEBP (Ellison & Welling, 2021; MacHnik et al., 2009; Polychronopoulou et al., 2019; Rossitto et al., 2020; Schatz et al., 2017; Selvarajah et al., 2018; Titze, 2014; Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013), que promove a expressão de VEGFC nos monócitos (MacHnik et al., 2009; Olde

Engberink et al., 2020; Polychronopoulou et al., 2019; Schatz et al., 2017; Selvarajah et al., 2018; Titze, 2014; Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013; M. S. Zhou et al., 2014). O fator de crescimento VEGFC, através da ligação ao recetor VEGFR3, nas células endoteliais do sistema linfático, desencadeia a expansão e reestruturação da rede de capilares linfáticos intersticiais (MacHnik et al., 2009; Rossitto et al., 2020; Schatz et al., 2017; Selvarajah et al., 2018; Titze, 2014; Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013; M. S. Zhou et al., 2014). Adicionalmente, o fator de crescimento estimula a ativação da enzima eNOS, promovendo-se a vasodilatação arterial (Polychronopoulou et al., 2019).

Em ratinhos com uma dieta rica em sal, ocorre aumento da composição cutânea em sódio, cloro e água (Wiig et al., 2013). A quantidade de sódio mensurada é superior ao dobro da de cloro, revelando a importância de aniões não mensurados para a manutenção da eletroneutralidade do fluido intersticial (Wiig et al., 2013). Esta alteração da composição eletrolítica do espaço extracelular associa-se a elevação da pressão arterial (Wiig et al., 2013).

Wiig *et al.* desenvolveram um conjunto de ensaios em que analisaram alterações decorrentes da deleção do gene TONEBP em macrófagos de ratinhos TONEBP-*wild type* e TONEBP-*knockout* (Wiig et al., 2013).

A deleção do gene TONEBP nos macrófagos de ratinhos bloqueou a expansão dos capilares linfáticos desencadeada pela hipertonicidade (decorrente da acumulação de sódio no espaço extracelular) na pele (Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013). Depreendeu-se que o fator TONEBP é essencial para o processo de expansão da rede capilar linfática (Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013). Consequentemente, acumulou-se cloro na matriz do espaço extracelular (Wiig et al., 2013).

De modo similar, o bloqueio do recetor VEGFR3 de macrófagos dos ratinhos, através de um anticorpo específico, causou inibição da hiperplasia de capilares linfáticos cutâneos, e acumulação seletiva de cloro no espaço intersticial cutâneo (Wiig et al., 2013). Estes ensaios revelaram que, nestas condições, a quantidade de cloro acumulada na pele aumenta comparativamente ao controlo, não se verificando aumento do conteúdo em sódio ou água (Wiig et al., 2013).

Estabelece-se, em ratinhos sujeitos a uma dieta rica em sal, uma correlação inversa entre a densidade da rede de capilares linfáticos e a variação do valor de pressão arterial média (Titze, 2014; Wiig et al., 2013). Estes resultados apontam uma relação entre a eliminação de íões de cloro acumulados na pele, ao invés de íões de sódio, através dos capilares linfáticos, e a pressão arterial sistémica (Titze, 2014; Wiig et al., 2013). A manutenção da homeostasia eletrolítica no espaço intersticial cutâneo revela-se determinante para a regulação da pressão arterial (Schatz et al., 2017; Wiig, H., Luft, F. and Titze, 2017; Wiig et al., 2013).

Hijmans et al verificaram, em doentes com doença renal crónica terminal (estadio > 5), bem como em voluntários saudáveis, uma relação direta entre o consumo de sal e a densidade de capilares linfáticos na pele (Hijmans et al., 2019).

Propõe-se, assim, um terceiro compartimento, o fluido intersticial da pele, que, para além do GE e células endoteliais, que intervém na homeostasia eletrolítica, sendo relevante para a regulação da pressão arterial (MacHnik et al., 2009; Selvarajah et al., 2018; Wiig et al., 2013).

Os autores especulam que a acumulação de cloro, ou a secreção de compostos pelos capilares linfáticos no espaço extracelular cutâneo, poderá alterar a resistência da microvasculatura da pele e, assim, contribuir para a variação da pressão arterial sistémica (Wiig et al., 2013).

Contrariamente, Rositto *et. al* postulam que a acumulação de sódio verificada em caso de consumo excessivo é um fenómeno sistémico, ocorrendo em vários tecidos e órgãos, constituindo a pele um dos reservatórios (Rossitto et al., 2020). Mais ainda, rejeitam o pressuposto de armazenamento do catião de forma osmoticamente inativa, desacoplada à acumulação de água (Rossitto et al., 2020). Defendem que o aumento do teor em sódio dos tecidos causa deslocamento de água do espaço intracelular, ou a sua acumulação no espaço extracelular, gerando edema subclínico (Rossitto et al., 2020). Reflete, assim, uma alteração da composição dos compartimentos intracelular e extracelular (Rossitto et al., 2020). Seria o edema extracelular subclínico resultante que, causando *stress* biomecânico, geraria ativação do fator de transcrição TONEBP, induzindo as vias de sinalização celular e mediadores que culminam em hiperplasia da rede capilar linfática (Rossitto et al., 2020).

Os vários compartimentos do organismo que funcionam como reservatórios de sódio desempenham um papel importantes no que concerne à homeostasia de sódio (Olde Engberink et al., 2020). De fato, possibilitam a adaptação do organismo a situações extremas de exposição a sal, e decorrente variação das concentrações séricas do catião para valores não fisiológicos, retendo o catião em situações de excesso de consumo, e libertando-o para o sangue quando o aporte é diminuído (Olde Engberink et al., 2020). Estes reservatórios representam, assim, um mecanismo extra-renal para regulação de sódio e água no organismo, constituindo um terceiro compartimento envolvido na homeostasia do sódio (Olde Engberink et al., 2020).

5.2. Novo Método de Determinação da Sensibilidade ao Sódio

5.2.1. Fundamentação da Técnica

Após a exposição a uma carga de sódio, o endotélio sofre alterações estruturais e funcionais patológicas (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). De fato, constata-se a disrupção do glicocálice endotelial, decorrente da degradação dos seus componentes, os proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos que recobrem a superfície das células endoteliais (Milford & Reade, 2019; Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). Constata-se, conseqüentemente, a redução da espessura desta estrutura (Oberleithner, 2012b; Oberleithner et al., 2011). Estabelece-se uma relação inversamente proporcional entre a capacidade de tamponamento de sódio pelo glicocálice endotelial e a sensibilidade ao sódio (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Adicionalmente, o compromisso do glicocálice endotelial, compromete a sua capacidade de tamponamento dos íons de sódio que, assim, têm acesso mais direto e incrementado às células endoteliais (Oberleithner, 2012a; Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Ocorre influxo aumentado de sódio nas células endoteliais, através de canais ENaC (Oberleithner, 2012a), culminando na alteração conformacional da actina intracelular, para a forma F-actina, que confere maior rigidez celular (Fels et al., 2012; Kusche-Vihrog, Jeggle, et al., 2014). Esta conformação dos filamentos de actina, associada a maior rigidez endotelial, causa inibição da sintase de óxido nítrico, culminando em potenciação do tónus vasoconstritor e disfunção endotelial (Fels et al., 2012).

Tendo em conta a existência de uma relação inversamente proporcional entre a capacidade de tamponamento de sódio pelo glicocálice endotelial e a sensibilidade ao sódio, podem definir-se métodos de avaliação da sensibilidade ao sódio através da análise do glicocálice endotelial (McNally et al., 2022; Oberleithner & Wilhelmi, 2013). De fato, em condições *in vivo*, a exposição crónica a excesso de sal causa degradação dos constituintes aniônicos do glicocálice eritrócitário, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, provocando redução das cargas negativas, como sulfato de heparano e ácido siálico. Logo, é afetado o potencial zeta, que representa a

intensidade de forças negativas estabelecidas entre eritrócitos (McNally et al., 2022). Consequentemente, é afetada a velocidade de sedimentação do eritrócito, avaliada nesta técnica (McNally et al., 2022). Em caso de extensa disrupção do glicocálice eritrocitário, após adição, no protocolo, de dextrano, o composto não é tamponado pelo glicocálice, causando agregação eritrocitária, através da formação de pontes de ligação, o que se traduz por superior velocidade de sedimentação (McNally et al., 2022). Contrariamente, se existir um glicocálice extenso e robusto, o dextrano é tamponado pelo glicocálice, não estabelecendo pontes de ligação e, assim, agregação eritrocitária. Neste caso, o valor da velocidade de sedimentação é inferior (McNally et al., 2022).

Adicionalmente, perante exposição crónica a sal, a disrupção do glicocálice endotelial conduz à perda de cargas aniónicas na superfície endotelial, reduzindo as forças repulsivas estabelecidas entre eritrócitos e células endoteliais (Oberleithner, 2013). Consequentemente, é aumentando o contato entre as células (Oberleithner, 2013). Nestas condições, o movimento dos eritrócitos gera forças de arrasto aplicadas sobre as células endoteliais (Oberleithner, 2013). Consequentemente, o glicocálice eritrocitário adquire características similares ao endotelial (Oberleithner, 2013). Desta forma, através do seu estudo é possível depreender as condições existentes no glicocálice endotelial (Oberleithner, 2013).

Recentemente, Oberleithner *et al.* demonstraram que, quando se promovia, através da aplicação de forças de arrasto, a interação entre os eritrócitos e a superfície de células endoteliais, observava-se que o glicocálice eritrocitário adquiria as características do glicocálice endotelial (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). De fato, Oberleithner *et al.* verificaram, em condições *in vitro*, que, após administração de heparinase ao meio de cultura de células endoteliais, ocorria degradação dos resíduos de sulfato de heparina do glicocálice endotelial, e perda de cargas negativas (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Quando, posteriormente, se estabelecia a interação entre eritrócitos e a superfície endotelial, por forças de dragagem, constata-se, igualmente, degradação do glicocálice das células endoteliais (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Esta observação conduziu à conclusão de que a sensibilidade ao sódio poderia ser determinada, indiretamente, através da avaliação da sensibilidade ao

sódio do eritrócito (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Oberleithner *et al.* estabeleceram, assim, o método de determinação da sensibilidade ao sódio designado *Salt blood test*.

5.2.2. Protocolo do Novo Método de Determinação da Sensibilidade ao Sódio

5.2.2.1. Teste de Sensibilidade ao Sódio (*Salt Blood Test*)

Recolhem-se, através de punção venosa, 2 mL de sangue, utilizando-se tubos de recolha (“monovettes”) com adição de heparina (Sarstedt Company, Sarstedt, Germany) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Posteriormente, o sangue é transferido, em frascos de plástico com 2 mL de capacidade (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), e centrifugado em 1800 x g, durante 5 minutos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). São removidos, da solução de centrifugação, o plasma e o sobrenadante (“buffy coat”) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Os eritrócitos são sujeitos a duas lavagens sequenciais, com 30 mL de solução de cloreto de sódio (solução de NaCl de concentração de 150 mM), à qual foi adicionada solução de tamponamento HEPES (10 mM HEPES = 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-ácido etanosulfónico) e albumina sérica bovina, a 1% (PAA Clone, Coelbe, Germany) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). É necessária esta quantidade de solução de lavagem para garantir a adequada remoção do glicocálice endotelial (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Em cada medição, 80 µl de eritrócitos sujeitos a lavagem prévia (como descrito acima) são suspensos em 120 µl de solução de NaCl (solução de NaCl de concentração entre 50 e 150 mM) (com hematócrito fixo a 0,4), contendo 3% de dextrano (Sigma 4486, MW 70,000 D) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). O dextrano é absorvido pela superfície dos eritrócitos, desencadeando a agregação dos eritrócitos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Este fenómeno (*macromolecular bridging*) indica que as forças de adesão entre os eritrócitos ultrapassam, ou seja, têm intensidade superior, às forças eletrostáticas repulsivas (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Adicionou-se sucrose à solução, em vários momentos, de modo a manter a osmolalidade (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Assim, preparam-se soluções com concentrações de NaCl variadas, entre 50 e 150 mM; concentrações de sucrose variáveis; e concentrações fixas de dextrano a 3% (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Posteriormente, preenchem-se, através de forças de capilaridade, tubos capilares para hematócrito (Safecap P75-2000, comprimento 75 mm, Scholz Company - Neubiberg, Germany) com as suspensões de eritrócitos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Estes tubos, encerrados na extremidade inferior, são colocados, num suporte, na posição vertical (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). O protocolo descrito está esquematizado na figura 9 (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Mede-se a velocidade de sedimentação dos eritrócitos em intervalos de tempo apropriados (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Calcula-se, para amostras de sangue individuais, a sensibilidade do eritrócito ao sódio, através do rácio entre a velocidade de sedimentação dos respetivos eritrócitos em soluções de NaCl de 150 e 125 mM de concentração, respetivamente (sensibilidade do eritrócito ao sódio = L_{150}/L_{125}) (figura 10) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Na população normal, verificam-se índices de sensibilidade ao sódio do eitrócito entre 2 a 8 (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Denota-se que a avaliação da sensibilidade ao sódio dos eritrócitos de uma amostra requer um volume de sangue de 200 μ l, que pode ser obtido através da punção de um dedo (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

O teste de sensibilidade ao sódio descrito foi realizado em temperatura ambiente; as soluções de NaCl tinham valores de pH de $\approx 7,4$ (devido à capacidade de tamponamento endógena da hemoglobina para um hematócrito fixo de 0,4) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

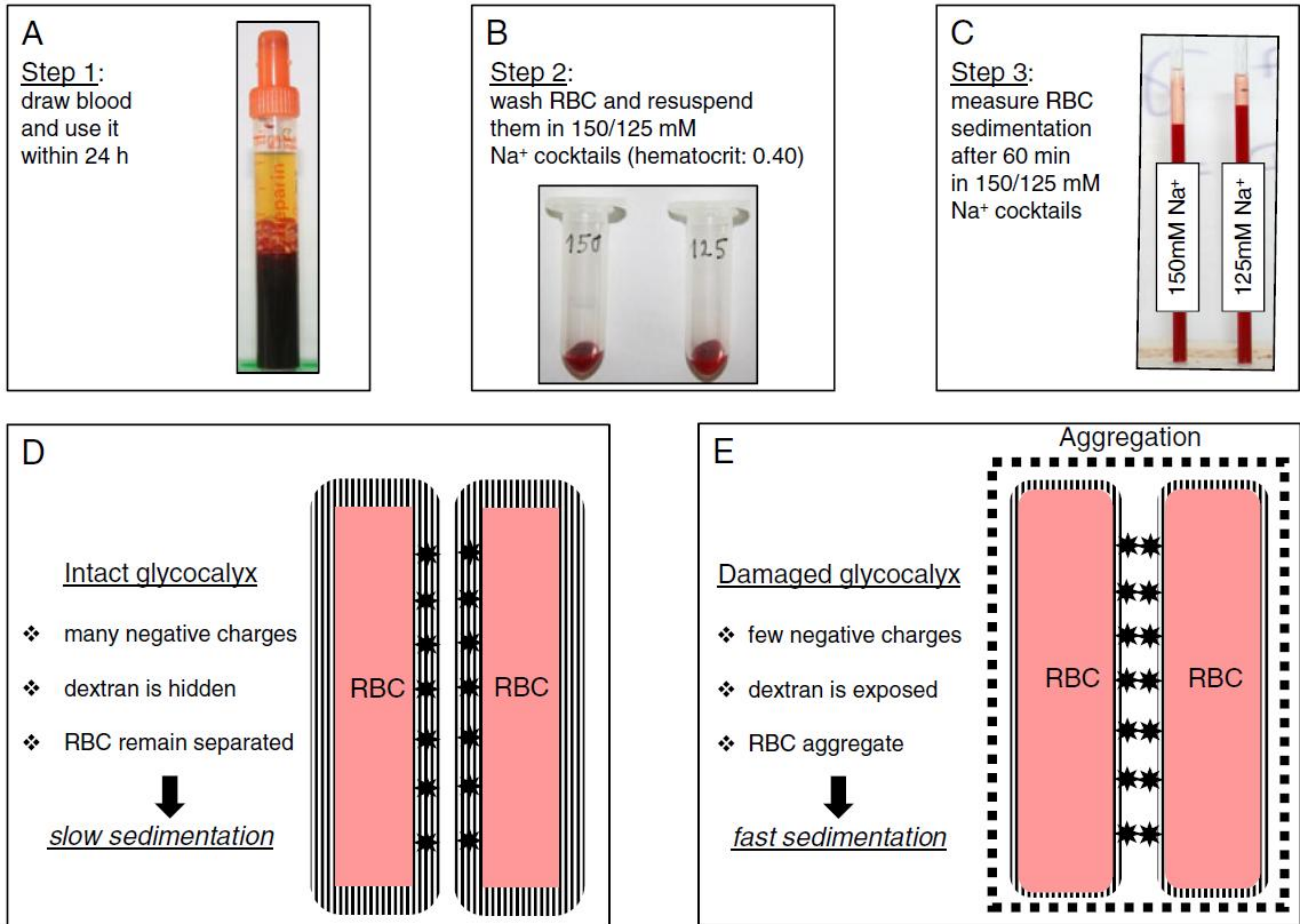


Figura 9 – Protocolo do novo método de determinação da sensibilidade ao sódio estabelecido por Oberleithner *et al.*

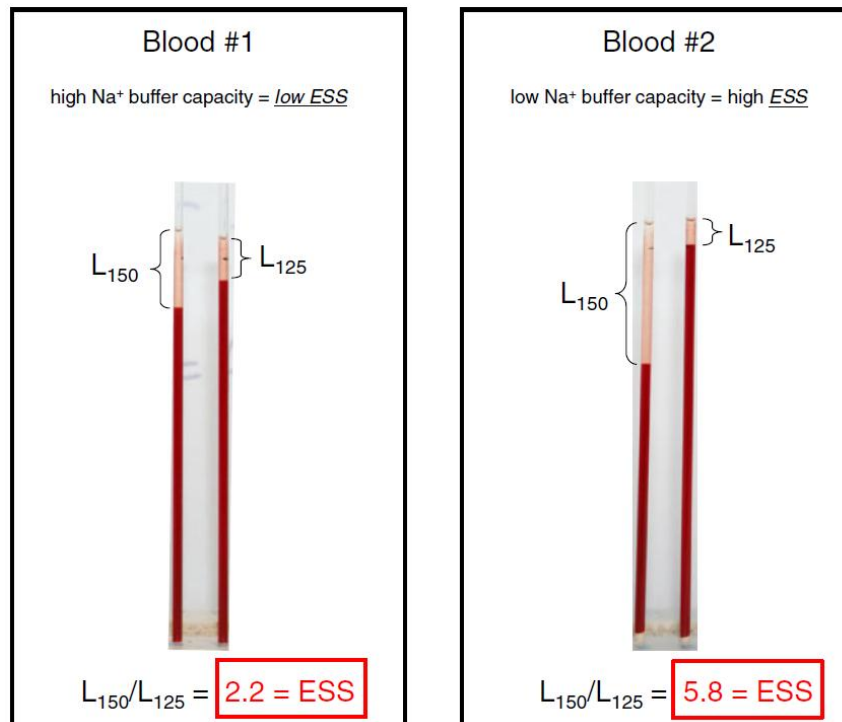


Figura 10 – Determinação da sensibilidade ao sódio eritrocitária (ESS) em duas amostras de sangue.

5.2.2.1.1. Prova de Conceito

Tratamento dos Eritrócitos por Forças de Arrasto

De modo a comprovar a fiabilidade da técnica, Oberleithner *et al.* desenvolveram um protocolo que permitisse testar a sua aplicabilidade, de modo a constituir uma prova de conceito. Assim, cultivam-se, durante 4 dias, monocamadas (com espessura de 1 célula endotelial) de células endoteliais (linhagem de células humanas Eahy629), na base (com 75 cm² de área) de frascos, em meio de cultura, sem (controlo) e com extrato vasoprotetor *Crataegus* WS 1442 (10 µg/ml) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Foi demonstrado, *in vitro*, que o extrato vasoprotetor melhora a função do glicocálice (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Após o período de 4 dias, o meio de cultura é substituído por sangue (2,5 mL por frasco), colhido em voluntários (tubos de recolha heparinizados, Sarstedt Company - Sarstedt, Germany) (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Os frascos, colocados num agitador (4 turnos por minuto, a um ângulo de 7°), são colocados numa incubadora de culturas celulares (meio a temperatura de 37 °C e 5 % CO₂), e agitados durante 3 horas, de modo a que haja interação mecânica entre os eritrócitos e a superfície da camada de células endoteliais (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Mantendo estes parâmetros, pode estimar-se uma velocidade média dos eritrócitos de cerca de 30 metros por hora, e uma distância total percorrida de 90 metros (durante 3 horas) (Oberleithner, 2013; Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Este procedimento designa-se tratamento por força de dragagem (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Posteriormente, analisa-se o sangue na superfície das monocamadas de células endoteliais, aplicando-se o teste de determinação da sensibilidade ao sódio, *Salt blood test*, acima descrito (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

5.3. Vantagens da Técnica

Este novo método de determinação da sensibilidade ao sódio, comparativamente ao método tradicional, é mais simples, menos laborioso, requerendo para o doente apenas a colheita de uma pequena amostra de sangue através da punção venosa, um método praticamente indolor. Adicionalmente, o método estabelece um conjunto de etapas rigorosamente definidas e caracterizadas, possibilitando minimizar a margem de erro associada à técnica, conferindo maior fiabilidade aos resultados obtidos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). É, ainda, mais rápido, sendo um método relevante, prático e acessível, podendo ser extremamente uma ferramenta benéfica para a decisão terapêutica para os médicos da especialidade de Medicina Geral e Familiar.

5.4. Limitações

Dado ser um método inovador, a técnica deve ser implementada, testada e validada na população.

A implementação da técnica requer aparelhos e reagentes que envolvem algum custo financeiro. Contudo, uma vez montada, trata-se de uma técnica acessível.

6. Discussão

A hipertensão arterial sistêmica constitui uma síndrome clínica caracterizada pela elevação sustida dos valores de pressão arterial (Brouwers et al., 2021; Organization World Health & World Health Organization, 2012; Unger et al., 2020; Williams et al., 2018). Tem etiologia multifatorial, decorrendo da interação complexa e dinâmica entre fatores, genéticos, epigenéticos, biológicos, ambientais e socioeconômicos (Brouwers et al., 2021; Williams & Mancina, 2018). Na maioria dos casos, cerca de 90% (Rassler, 2010), não se estabelece um fator ou fatores etiológicos, designando-se a condição de hipertensão arterial essencial (Brouwers et al., 2021; Williams & Mancina, 2018).

A síndrome hipertensiva constitui o principal fator de risco modificável para o estabelecimento de doenças cardiovasculares, bem como um dos principais fatores contributivos para a morbidade e mortalidade, a nível mundial (Brouwers et al., 2021; Unger et al., 2020; Williams & Mancina, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 1,28 bilhões de pessoas, a nível mundial, são hipertensas (World Health Organization, 2021).

Associa-se a inúmeras complicações cardiovasculares e renais (B. Zhou et al., 2021), constituindo um dos principais fatores de risco modificáveis no que toca à doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, demência e doença renal crônica (Felder et al., 2013; B. Zhou et al., 2021). Em 2015 causou, mundialmente, 10,7 milhões de mortes (Mills et al., 2016) e 212 milhões de anos de Vida ajustados à incapacidade (Forouzanfar et al., 2017). Desta forma, assume elevado custo social e económico (Mills et al., 2016). Estima-se que, em 2025, 29% da população adulta do mundo, aproximadamente 1,56 bilhões de pessoas, terão hipertensão arterial estabelecida (Calzerra et al., 2018).

Estabeleceu-se, na evidência científica gerada nas últimas décadas, uma associação causal relevante entre o consumo de sal, a disrupção da homeostasia de sódio no organismo e o desenvolvimento de hipertensão arterial (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Organization World Health & World Health Organization, 2012). De acordo com a Sociedade Americana de Cardiologia, a hipertensão arterial sal

sensível caracteriza-se pela alteração dos valores de pressão arterial concomitante à variação do consumo de sal (Kurtz et al., 2017). A sensibilidade ao sal é definida como a variação da pressão arterial igual ou superior a 10 mmHg quando é alterado o balanço de sal através de uma combinação de dieta e diuréticos de ansa (Ellison & Welling, 2021). Estima-se que a sensibilidade ao sódio constitua um fator etiopatogénico da hipertensão arterial em 30 a 50% dos casos (Balafa & Kalaitzidis, 2021). Este fenótipo associa-se a fatores etiológicos, mecanismos e processos fisiopatológicos diferentes relativamente ao subtipo sal resistente, o que se traduz numa resposta diferencial à terapêutica instituída (Elijovich et al., 2016; Mishra et al., 2018).

Várias meta-análises estabeleceram um papel importante de fatores genéticos no aumento da sensibilidade ao sódio, na espécie humana (Rassler, 2010). Consideram-se relevantes polimorfismos em genes que codificam componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), como o angiotensinogénio (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Mishra et al., 2018; Rassler, 2010), a enzima conversora de angiotensina (ECA), a renina ou a sintase de aldosterona (Balafa & Kalaitzidis, 2021; Rassler, 2010). Este sistema intervém na homeostasia do sódio e água do organismo e, logo, balanço do fluido extracelular (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Rassler, 2010). Atribui-se, também, um papel importante à regulação central da pressão arterial, ativação do sistema nervoso simpático e rim (Ando & Fujita, 2012; Balafa & Kalaitzidis, 2021; Mishra et al., 2018; Rassler, 2010).

A sensibilidade ao sódio constitui um fator de risco independente para o estabelecimento de doenças cardiovasculares e morbidade e mortalidade decorrentes (Felder et al., 2013; Kurtz et al., 2017). De fato, considera-se que acarreta, a nível prognóstico, implicações tão importantes como os fatores de risco cardiovascular tradicionais, como a hipertensão arterial (Kurtz et al., 2017). Mais ainda, tem sido associada a resistência à insulina, dislipidémia e microalbuminúria, conferindo, assim, maior predisposição para a aterogénese e instalação de mecanismos fisiopatológicos conducentes à doença hipertensiva (Keane, 2001; M. S. Zhou et al., 2014). Predispõe, ainda, ao desenvolvimento de doença renal crónica, carcinoma gástrico, osteoporose e asma (Felder et al., 2013). De fato, estima-se que a redução do consumo diário de sal para os valores recomendados possibilitaria a

prevenção de 2,5 milhões de mortes anualmente (Organization World Health & World Health Organization, 2012). Dado o impacto determinante da sensibilidade ao sódio no que concerne ao risco futuro de desenvolver doença, o desenvolvimento de métodos de avaliação e determinação da sensibilidade ao sódio assumem relevância clínica fulcral.

Múltiplos métodos de avaliação da sensibilidade ao sódio foram desenvolvidos. O método tradicional, atualmente a técnica *gold standard*, baseia-se nos pressupostos defendidos por Guyton *et al.*, postulados no seu modelo de homeostasia de sal no organismo. O modelo de Guyton *et al.* propõe a existência de dois compartimentos, intravascular e intersticial, nos quais o sódio se distribui equitativamente (Hall & Hall, 2020; Wenstedt et al., 2018). Estabelece uma relação direta entre a composição do organismo em sódio, o volume extracelular e a pressão arterial (Wiig et al., 2013). Defende que os mecanismos renais que intervêm na regulação do fluxo-sanguíneo, da pressão hidrostática glomerular e natriurese de pressão asseguram o controlo da pressão arterial a longo prazo, e a manutenção da homeostasia (Wiig et al., 2013), estando a sua falência na génese do desenvolvimento de hipertensão arterial sistémica (Hall & Hall, 2020; Olde Engberink et al., 2020).

O método *gold standard* para determinação da sensibilidade ao sódio pressupõe o cumprimento de um plano dietético restrito, durante cerca de 2 semanas (Kurtz et al., 2017). Nesse intervalo ocorre variação drástica no consumo de sal, estabelecendo-se ingestão elevada de sal numa semana e reduzida na seguinte, de modo a avaliar a influência desta variação na pressão arterial (Kurtz et al., 2017). Proceder-se à colheita de urina de 24h, de modo a estimar a quantidade de sal ingerida e eliminada, bem como a múltiplas avaliações dos valores de pressão arterial, como forma de avaliação a resposta da PA à variação do consumo de sal (Kurtz et al., 2017).

O método tem inúmeras desvantagens associadas (Santos et al., 2020). Por estabelecer uma dieta restritiva, é de difícil cumprimento pelos doentes, estando associado a reduzida compliance, o que compromete a validade dos resultados obtidos (Santos et al., 2020). Mais ainda, o protocolo é laborioso, complexo e dispendioso (Santos et al., 2020), requerendo absentismo profissional ou laboral, gerando, assim, custos socioeconómicos importantes.

Adicionalmente, a evidência recente refutou a validade científica deste método (Santos et al., 2020). De fato, constatou-se, em ensaios clínicos desenvolvidos sob condições controladas, a dissociação entre a ingestão e excreção de sódio na urina, num período de 24 horas (Lerchl et al., 2015; Santos et al., 2020; Titze, 2014; Wenstedt et al., 2018). Na verdade, os investigadores constataram variações cíclicas na excreção renal de sódio, de periodicidade de cerca de um mês, que consideraram serem influenciados pela variação rítmica de eixos neuroendócrinos reguladores, de periodicidade semanal, das hormonas de Aldosterona, Cortisol e Cortisona (Titze, 2014)(Rakova et al., 2013; Titze, 2014). Constataram, sob influência das alterações hormonais, a ocorrência de armazenamento e excreção cíclicas de sódio em compartimentos reservatórios do organismo, nomeadamente o endotélio, a pele, o músculo, a cartilagem e o osso (Lerchl et al., 2015; Titze, 2014). De fato, as flutuações dos eixos hormonais introduziam uma variável de confundimento, gerando um erro de estimativa de consumo de sal de até 3g por dia (Lerchl et al., 2015; Polychronopoulou et al., 2019).

Assim, tendo em conta a variabilidade mensal cíclica da excreção urinária de sódio detetada, e o desacoplamento entre o consumo e excreção de sódio subjacentes (Lerchl et al., 2015; Santos et al., 2020; Titze, 2014; Wenstedt et al., 2018), não se torna possível estimar o consumo de sódio para um intervalo temporal de 24 horas com base na excreção urinária nesse período (Santos et al., 2020). Assim, é refutada a validade científica do método tradicional, *gold standard*, para a determinação da sensibilidade ao sódio (Santos et al., 2020).

O novo método proposto por Oberleithner et al., é sustentado por evidência científica recente, obtida em ensaios desenvolvidos em ratinhos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Os autores fundamentam a técnica com base no princípio da disrupção do endotélio após exposição a uma carga de sal (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Estes resultados foram, adicionalmente, constatados em inúmeros outros estudos (Olde Engberink et al., 2020; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019).

O endotélio vascular constitui a superfície luminal de todos os vasos do organismo (Krüger-Genge et al., 2019; Lenasi, 2018; Olde Engberink et al., 2015). É composto por células endoteliais, recobertas por uma estrutura em escova de proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos, que compõe o glicocálice

endotelial (Lenasi, 2018; Olde Engberink et al., 2015; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019). Esta estrutura tem inúmeras funções, tais como a composição de uma barreira entre o sangue e as células endoteliais, com carga negativa, exercendo forças de repulsão sob os compostos aniônicos do plasma, como a albumina; deste modo, é também importante para a regulação da permeabilidade endotelial (Finfer et al., 2018; Oberleithner, 2012b; Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). Adicionalmente, constituiu uma estrutura essencial para a transmissão de sinais mecânicos gerados pela corrente sanguínea às células endoteliais (Oberleithner, 2012b; Patik et al., 2021; Yilmaz et al., 2019). De fato, através da sua ligação ao citoesqueleto citoplasmático, os componentes do glicocálice transmitem a sua deformação ao meio intracelular, desencadeando ativação de vias de sinalização intracelular (Cosgun et al., 2020; Schierke et al., 2017). Uma via de mecanotransdução essencial para o tópicio da hipertensão arterial constitui a que transmite sinais desencadeados pela tensão de cisalhamento, culminando na ativação da sintase de óxido (Oberleithner et al., 2011; Potje et al., 2021; Villalba et al., 2021). Assim, estabelece-se acoplamento entre a tensão de cisalhamento aplicada pela coluna de sangue sobre o endotélio e a vasodilatação (Oberleithner et al., 2011). Esta via de mecanotransdução é ainda importante para assegurar a adequada produção de compostos como a prostaciclina, bem como a inibição da síntese de endotelina 1, tromboxano A₂ e espécies reativas de oxigénio, assegurando-se a manutenção de um fenótipo endotelial vasodilatador (Deanfield et al., 2007a; Schwartz et al., 2010), antiproliferativo, antioxidante e antitrombótico (Lenasi, 2018). Pelo contrário, a síntese aumentada dos compostos vasoconstritores e pró-trombóticos referidos gera disfunção endotelial, associada a manutenção de um tónus vasoconstritor aumentado e inibição da vasodilatação (Lenasi, 2018). Por último, uma função do glicocálice essencial para a sustentação da validade científica da técnica descrita é a de tamponamento das cargas de sódio perante exposição a sal (Oberleithner, 2012a). Neste caso, através da ligação dos catiões às cargas aniónicas dos proteoglicanos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos endoteliais, ocorre tamponamento e armazenamento temporário destas cargas no endotélio (Oberleithner, 2012a). Adicionalmente, a retenção de sódio no glicocálice reduz o seu acesso às células endoteliais (Oberleithner, 2012a). O influxo endotelial excessivo de sódio, através dos canais ENaC, associa-se a alteração da conformação

dos filamentos de actina, da forma globular (G-actina), que confere maleabilidade ao córtex celular, para a forma F-actina. A conformação F-actina, alcançada através da polimerização da actina monomérica, G-actina, confere rigidez à célula endotelial e, logo, menor deformabilidade das células endoteliais pela coluna de sangue e ativação da via de mecanotransdução previamente descrita. Adicionalmente, a F-actina inibe, diretamente, a ativação da sintase de óxido nítrico. Desta forma, há menor produção do composto vasodilatador, e conseqüente promoção de um estado vasoconstritor, associado a maior resistência vascular e, assim, valores de pressão arterial superiores.

A exposição crónica do endotélio a excesso de sal (Oberleithner et al., 2011; Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019), bem como a hiperhomocisteinémia, doenças críticas como sépsis, trauma grave ou doenças crónicas como a diabetes *mellitus* e a doença renal crónica causam alterações que comprometem a estrutura e função do endotélio (Olde Engberink et al., 2015; Yilmaz et al., 2019). Verifica-se, nestas condições, ativação de proteases e conseqüente disrupção do glicocálice endotelial (Oberleithner et al., 2011). De fato, constatou-se, em ensaios, a redução da espessura desta estrutura (Oberleithner et al., 2011). Estabeleceu-se uma relação inversamente proporcional entre a capacidade de tamponamento de sódio pelo glicocálice endotelial e a sua espessura (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Assim, conclui-se que a desintegração do GE confere sensibilidade aumentada ao sódio (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Adicionalmente, a partir de resultados obtidos em ensaios pioneiros, observou-se que, através da promoção de contato entre células endoteliais e eritrócitos através da aplicação de forças de arrasto, o glicocálice eritrocitário assumia características idênticas às do glicocálice endotelial (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Assim, assume-se que o estudo do glicocálice eritrocitário fornece informações relativas ao glicocálice das células endoteliais (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Deste modo, através da aplicação de técnicas sobre eritrócitos, é possível estimar a sensibilidade ao sódio do indivíduo (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Com base nestes resultados, Oberleithner et al. desenvolveram a nova técnica descrita neste trabalho (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Este novo método de determinação da sensibilidade ao sódio tem inúmeras vantagens em relação ao tradicional (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). Para o doente, implica apenas a recolha de sangue através de punção venosa (Oberleithner &

Wilhelmi, 2013). Adicionalmente, o autor assume a possibilidade de alteração de protocolo para incluir a recolha de sangue por punção de um dedo (Oberleithner & Wilhelmi, 2013). É uma técnica muito mais vantajosa para o doente, praticamente indolor, menos dispendiosa e sem os problemas de *compliance*, absentismo laboral e profissional decorrentes do método tradicional (Santos et al., 2020). Implica o investimento em aparelhos de laboratório dispendiosos; contudo, uma vez obtidos e montada a técnica, gera menos custos financeiros.

Posteriormente ao estabelecimento da técnica *Salt Blood Test*, Oberleithner *et al.* desenharam uma versão encurtada, designada *Salt Blood Test Mini*, com um protocolo mais simples (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Requer recolha de apenas 50 µL de sangue por punção de um dedo, adição de uma solução cocktail de NaCl prevista, e agitação da solução (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Depois, a amostra é transferida para um tubo, colocado, na posição vertical, durante 60 minutos (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Subsequentemente, mede-se a dimensão do sobrenadante. Pode, depois, determinar-se a sensibilidade ao sódio através da aplicação de uma fórmula (sensibilidade ao sódio = sobrenadante/valor *standard* * 100 * sobrenadante; o valor *standard*, determinado a partir de dois estudos de coorte, é de 21,4 mm para o sexo masculino e 26,1 mm para o sexo feminino) (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Contudo, constataram-se, após análise dos resultados obtidos através do método, ligeiras discrepâncias, decorrentes da incapacidade de manter o hematócrito fixo a 0,4, como pressuposto na técnica original. No entanto, quando este fator era corrigido, os resultados obtidos através dos dois métodos eram similares (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). O novo método é mais simples, requerendo uma amostra de sangue menor, por uma técnica simples (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Para além disso, não são necessários aparelhos de laboratório dispendiosos (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Por ser simples e requerer equipamento de fácil utilização e pouco dispendioso, este método é ainda mais acessível do que o original, podendo o protocolo ser cumprido pelo próprio indivíduo (Oberleithner & Wilhelmi, 2016). Contudo, ainda é necessário desenvolver mais ensaios para comprovar a fiabilidade da técnica (Oberleithner & Wilhelmi, 2016).

A sensibilidade ao sódio decorre de fatores etiológicos específicos, que geram alterações e disfunção da homeostasia, gerando um quadro fisiopatológico singular,

que, atuando no organismo, estabelece a doença (Elijovich et al., 2016; Mishra et al., 2018). De modo a restabelecer o normal funcionamento fisiológico e a homeostasia, é necessário conhecer e intervir ao nível dos mecanismos e eixos patológicos estabelecidos. Assim, a abordagem do doente requer o reconhecimento destas características, contemplando um plano terapêutico farmacológico e não farmacológico adaptado a este subtipo de hipertensão arterial (Elijovich et al., 2016; Mishra et al., 2018).

Constatou-se, em ensaios, que os doentes sal sensíveis registam uma maior redução da pressão arterial através da redução do consumo de sal (Mishra et al., 2018). Desta forma, a avaliação da sensibilidade ao sódio de um doente hipertenso assume importância no que concerne à abordagem não farmacológica da pressão arterial (Mishra et al., 2018). De fato, constata-se, em caso de redução do consumo de sal em 100 mmol por dia, que se alcança uma diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica médias de 7,1 e 3,8 mmHg, respetivamente (Jeremiah Stambler, 1997). Pressupõe-se, tendo em conta os mecanismos fisiopatológicos estabelecidos, que uma dieta DASH (Intervenções na Dieta para Abolir a Hipertensão) (Mishra et al., 2018; Pilic et al., 2016), aumento do consumo de potássio, cálcio, vitamina D, vitaminas antioxidantes e proteínas ricas em L-arginina possa associar-se a um efeito benéfico em indivíduos sal sensíveis (Pilic et al., 2016). Contrariamente, uma dieta tipicamente ocidental, rica em gorduras saturadas, sucrose, frutose, que inclui consumo excessivo de álcool, pode exacerbar alterações da pressão arterial associadas ao fenótipo sal sensível (Pilic et al., 2016). A identificação de potenciais mecanismos conferentes de sensibilidade ao sódio em populações suscetíveis possibilita a definição de alterações na dieta e estilos de Vida protetoras e preventivas ou, por oposição, nefastas (Pilic et al., 2016). Esta evidência é essencial para a estabelecimento de *guidelines* para a abordagem e tratamento da hipertensão arterial sistémica, bem como prevenção de doença cardiovascular, em conformidade e sob medida para esta população específica (Pilic et al., 2016).

Constata-se também a necessidade de desenvolvimento de um plano terapêutico farmacológico à população sal sensível (Mishra et al., 2018). Mishra et al. sugeriram que a administração de Azilsartan, um antagonista dos recetores de angiotensina desenvolvido recentemente, que inibe o contratransportador de Na^+/K^+

no tubo contornado proximal, pode beneficiar estes doentes (Mishra et al., 2018). Assumem que podem advir benefícios para o tratamento deste subtipo de hipertensão arterial de futura investigação nesta área (Mishra et al., 2018).

Han Qi *et al.* desenvolveram uma meta-análise, em que avaliaram os resultados obtidos em 25 ensaios (com uma amostra total de 1935 voluntários) comparativos da eficácia entre 2 antihipertensores no tratamento da hipertensão arterial sal-sensível (Qi et al., 2018). Os *outcomes* incluídos englobavam variações na pressão arterial média, bem como pressão arterial sistólica e diastólica (Qi et al., 2018). Concluíram que, para os doentes hipertensos sensíveis ao sal e sem comorbilidades, a terapêutica mais eficaz consistia na combinação de um antagonistas dos canais de cálcio e hidroclorotiazida, associado a consumo moderado de sal (Qi et al., 2018). Para os doentes hipertensos sensíveis ao sal obesos, a combinação terapêutica mais adequada revelou ser a associação de um fármaco antagonista de canais de cálcio e metformina, mantendo-se, igualmente, a promoção de ingestão moderada de cálcio (Qi et al., 2018).

Atualmente, *as guidelines* para o tratamento da hipertensão arterial sistémica, tanto da Sociedade Europeia de Cardiologia, como da Sociedade Europeia de Hipertensão Arterial, não preveem ou definem uma abordagem diferencial dos doentes hipertensos consoante o seu fenótipo caracterizador, sal sensível ou sal resistente. Contudo, conforme abordado ao longo deste Trabalho Final de Mestrado, foi comprovado, na literatura, a existência de mecanismos fisiopatológicos específicos a este fenótipo, bem como demonstrados os benefícios decorrentes de uma abordagem diferencial, ajustada (Elijovich et al., 2016; Mishra et al., 2018). Assim, revela-se essencial o aprofundamento da investigação básica e clínica nesta área, de modo a amplificar a literatura existente sobre este tópico. É fulcral a análise da literatura através de meta-análises, gerando evidência de elevada qualidade, que possa ser integrada e utilizada para fundamentar princípios de abordagem ajustados ao fenótipo sal sensível da hipertensão arterial, constituindo novas *guidelines* adaptadas.

7. Conclusões

Este novo método de determinação da sensibilidade ao sódio tem inúmeras vantagens comparativamente ao método tradicional, considerado como *gold standard*. De fato, o método tradicional é laborioso, complexo e dispendioso. Inclui um protocolo de difícil cumprimento pelos doentes, por requerer uma dieta restritiva durante um período de duas semanas, bem como disponibilidade para se efetuarem múltiplas avaliações dos valores tensionais e para a colheita da urina produzida em vinte e quatro horas, exigindo absentismo profissional ou laboral, gerando custos socioeconómicos. Contrariamente, o novo método proposto por Oberleithner *et al.*, *Salt Blood Test*, é mais simples, menos laborioso, requerendo para o doente apenas a colheita de uma pequena amostra de sangue através da punção venosa, um método praticamente indolor. Adicionalmente, o método estabelece um conjunto de etapas rigorosamente definidas e caracterizadas, possibilitando minimizar a margem de erro associada à técnica e, assim, aumentar a fiabilidade dos resultados obtidos (Oberleithner & Wilhelmi, 2013).

Deste modo, a nova metodologia de determinação da sensibilidade ao sódio descrita neste trabalho final de mestrado, pode revelar benefícios determinantes para a abordagem do doente sal sensível. De fato, possibilita a avaliação do risco de desenvolvimento de doenças a médio e longo prazo e, conseqüentemente, a aplicação de planos e medidas preventivas, visando a preservação da saúde e prevenção de doença. Constitui, deste modo, uma ferramenta de extrema importância em contexto dos cuidados de saúde primários, que asseguram o seguimento das populações ao longo da sua vida. De fato, possibilitando ao médico especialista em Medicina Geral e Familiar a estratificação do risco de doença e morbimortalidade dos seus doentes, revela-se determinante para a definição de estratégias preventivas ajustadas ao risco individual, na perspetiva de prevenção primordial e primária.

8. Perspetivas Futuras

Como perspetiva futura, pretende-se obter a validação da técnica, possibilitando a sua implantação na população portuguesa, e utilização na prática clínica, nas populações alvo.

9. Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a professora doutora Alda Pereira da Silva, pelo apoio, orientação e sugestões concedidos.

À professora Ana Carolina Santos, pela ajuda disponibilizada no período inicial deste trabalho, possibilitando guiar a seleção da minha pesquisa bibliográfica.

À minha família, pelo apoio, disponibilidade, encorajamento e por me proporcionarem condições que possibilitam completar este trabalho.

Ao Tommy, por todas as interrupções.

Aos meus amigos, pelas conversas, motivação e encorajamento.

10. Referências Bibliográficas

- Abbott, S. B. G., Machado, N. L. S., Geerling, J. C., & Saper, C. B. (2016). Reciprocal control of drinking behavior by median preoptic neurons in mice. *Journal of Neuroscience*, *36*(31), 8228–8237. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1244-16.2016>
- Amin, S. (2011). *EPITHELIAL SODIUM CHANNELS IN THE BRAIN: EFFECTS OF HIGH SALT INTAKE ON THEIR EXPRESSION* [University of Ottawa]. <http://dx.doi.org/10.20381/ruor-4655>
- Ando, K., & Fujita, T. (2012). Pathophysiology of salt sensitivity hypertension. *Annals of Medicine*, *44*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.3109/07853890.2012.671538>
- André, G., Sandoval, J. E., Retailleau, K., Loufrani, L., Toumaniantz, G., Offermanns, S., Rolli-Derkinderen, M., Loirand, G., & Sauzeau, V. (2014). Smooth muscle specific rac1 deficiency induces hypertension by preventing p116RIP3-dependent RhoA Inhibition. *Journal of the American Heart Association*, *3*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000852>
- Balafa, O., & Kalaitzidis, R. G. (2021). Salt sensitivity and hypertension. *Journal of Human Hypertension*, *35*(3), 184–192. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-00407-1>
- Baldin, J. P., Barth, D., & Fronius, M. (2020). Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) Formed by One or Two Subunits Forms Functional Channels That Respond to Shear Force. *Frontiers in Physiology*, *11*(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00141>
- Bankir, L., Bichet, D. G., & Morgenthaler, N. G. (2017). Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *Journal of Internal Medicine*, *282*(4), 284–297. <https://doi.org/10.1111/joim.12645>
- Bankir, L., Bouby, N., & Ritz, E. (2013). Vasopressin: A novel target for the prevention and retardation of kidney disease? *Nature Reviews Nephrology*, *9*(4), 223–239. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.22>
- Berger, D., & Takala, J. (2018). Determinants of systemic venous return and the impact of positive pressure ventilation. *Annals of Translational Medicine*, *6*(18), 350–350. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.27>

- Bernardi, S., Toffoli, B., Zennaro, C., Bossi, F., Losurdo, P., Michelli, A., Carretta, R., Mulatero, P., Fallo, F., Veglio, F., & Fabris, B. (2015). Aldosterone effects on glomerular structure and function. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, *16*(4), 730–738. <https://doi.org/10.1177/1470320315595568>
- Bhalla, V., & Hallows, K. R. (2008). Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19*(10), 1845–1854. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008020225>
- Bichet, D. G. (2019). Regulation of Thirst and Vasopressin Release. *Annual Review of Physiology*, *81*, 359–373. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114556>
- Briet, M., & Schiffrin, E. L. (2010). Aldosterone: Effects on the kidney and cardiovascular system. *Nature Reviews Nephrology*, *6*(5), 261–273. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.30>
- Brouwers, S., Sudano, I., Kokubo, Y., & Sulaica, E. M. (2021). Arterial hypertension. *The Lancet*, *398*(10296), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00221-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00221-X)
- Budisavljevic, M. N., & Ploth, D. W. (2012). Nicotine and the kidney: Mr. Hyde, and perhaps some Dr. Jekyll. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *302*(9), 1082–1083. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00067.2012>
- Calzerra, N. T. M., Gomes, C. F., & De Queiroz, T. M. (2018). Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. *Acta Brasiliensis*, *2*(2), 69. <https://doi.org/10.22571/2526-433876>
- Campinho, P., Vilfan, A., & Vermot, J. (2020). Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior. *Frontiers in Physiology*, *11*(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00552>
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, *367*(6462), 463–467. <https://doi.org/10.1038/367463a0>
- Cecilia Ortiz-Capisano, M., Atchison, D. K., Harding, P., Lasley, R. D., & Beierwaltes, W. H. (2013). Adenosine inhibits renin release from juxtaglomerular cells via an A1 receptor-TRPC-mediated pathway. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *305*(8), 1209–1219. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00710.2012>

- Connell, J. M. C., MacKenzie, S. M., Freel, E. M., Fraser, R., & Davies, E. (2008). A lifetime of aldosterone excess: Long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. *Endocrine Reviews*, *29*(2), 133–154. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0030>
- Cosgun, Z. C., Fels, B., & Kusche-Vihrog, K. (2020). Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function. In *American Journal of Pathology* (Vol. 190, Issue 4, pp. 732–741). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.021>
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007a). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*, *115*(10), 1285–1295. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007b). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. In *Circulation* (Vol. 115, Issue 10, pp. 1285–1295). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
- Demiselle, J., Fage, N., Radermacher, P., & Asfar, P. (2020). Vasopressin and its analogues in shock states: a review. *Annals of Intensive Care*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-020-0628-2>
- Eberhardt, W., & Pfeilschifter, J. (2007). Nitric oxide and vascular remodeling: Spotlight on the kidney. *Kidney International*, *72*(SUPPL. 106), S9. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002381>
- Elijovich, F., Weinberger, M. H., Anderson, C. A. M., Appel, L. J., Burszty, M., Cook, N. R., Dart, R. A., Newton-Cheh, C. H., Sacks, F. M., & Laffer, C. L. (2016). Salt sensitivity of blood pressure : A scientific statement from the American Heart Association. In *Hypertension* (Vol. 68, Issue 3). <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000047>
- Ellison, D. H., & Welling, P. (2021). Insights into Salt Handling and Blood Pressure. *New England Journal of Medicine*, *385*(21), 1981–1993. <https://doi.org/10.1056/nejmra2030212>
- Felder, R. A., White, M. J., Williams, S. M., & Jose, P. A. (2013). Diagnostic tools for hypertension and salt sensitivity testing. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *22*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32835b3693>
- Fels, J., Jeggle, P., Kusche-Vihrog, K., & Oberleithner, H. (2012). Cortical actin

- nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041520>
- Finfer, S., Myburgh, J., & Bellomo, R. (2018). Intravenous fluid therapy in critically ill adults. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 541–557). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0044-0>
- Forouzanfar, M. H., Liu, P., Roth, G. A., Ng, M., Biryukov, S., Marczak, L., Alexander, L., Estep, K., Abate, K. H., Akinyemiju, T. F., Ali, R., Alvis-Guzman, N., Azzopardi, P., Banerjee, A., Bärnighausen, T., Basu, A., Bekele, T., Bennett, D. A., Biadgilign, S., ... Murray, C. J. L. (2017). Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(2), 165–182. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.19043>
- Fu, H., Chen, J. K., Lu, W. J., Jiang, Y. J., Wang, Y. Y., Li, D. J., & Shen, F. M. (2018). Inflammasome-independent NALP3 contributes to high-salt induced endothelial dysfunction. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00968>
- Fujita, T. (2014). Mechanism of salt-sensitive hypertension: Focus on adrenal and sympathetic nervous systems. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(6), 1148–1155. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121258>
- Gaudette, S., Hughes, D., & Boller, M. (2020). The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 30(2), 117–134. <https://doi.org/10.1111/vec.12925>
- Girão-Silva, T., Fonseca-Alaniz, M. H., Ribeiro-Silva, J. C., Lee, J., Patil, N. P., Dallan, L. A., Baker, A. B., Harmsen, M. C., Krieger, J. E., & Miyakawa, A. A. (2021). High stretch induces endothelial dysfunction accompanied by oxidative stress and actin remodeling in human saphenous vein endothelial cells. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93081-3>
- Grześk, E., Malinowski, B., Tejza, B., Wiciński, M., Kołtan, S., Szadujkis-Szadurska, K., Kulczyńska, M., Kołtan, A., & Grześk, G. (2015). Effect of phospholipase C inhibition on vascular smooth muscle contraction. *Medical and Biological Sciences*, 29(1), 33. <https://doi.org/10.12775/mbs.2015.005>
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P., & Inagami, T. (2001). The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research*, 11(3), 165–180.

<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290083>

Guo, D., Liang, S., Wang, S., Tang, C., Yao, B., Wan, W., Zhang, H., Jiang, H., Ahmed, A., Zhang, Z., & Gu, Y. (2016). Role of epithelial Na⁺ channels in endothelial function. *Journal of Cell Science*, *129*(2), 290–297. <https://doi.org/10.1242/jcs.168831>

Hall, J. E., & Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th ed.). Elsevier.

Henderson, W. R., Griesdale, D. E. G., Walley, K. R., & Sheel, A. W. (2010). Clinical review: Guyton - the role of mean circulatory filling pressure and right atrial pressure in controlling cardiac output. *Critical Care*, *14*(6).

<https://doi.org/10.1186/cc9247>

Hijmans, R. S., Van Londen, M., Sarpong, K. A., Bakker, S. J. L., Navis, G. J., Storteboom, T. T. R., De Jong, W. H. A., Pol, R. A., & Van Den Born, J. (2019). Dermal tissue remodeling and non-osmotic sodium storage in kidney patients. *Journal of Translational Medicine*, *17*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1815-5>

Holmes, C. L., Landry, D. W., & Granton, J. T. (2003). Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1 - Receptor physiology. *Critical Care*, *7*(6), 427–434. <https://doi.org/10.1186/cc2337>

Ivy, J. R., & Bailey, M. A. (2014). Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *Journal of Physiology*, *592*(18), 3955–3967.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271676>

Jeremiah Stambler. (1997). The INTERSALT and implications Study : background , methods , findings , and implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(2), 626S-642S.

Jia, G., Habibi, J., Aroor, A. R., Hill, M. A., Yang, Y., Whaley-Connell, A., Jaisser, F., & Sowers, J. R. (2018). Epithelial sodium channel in aldosterone-induced endothelium stiffness and aortic dysfunction. *Hypertension*, *72*(3), 731–738.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11339>

Jia, G., Habibi, J., Aroor, A. R., Martinez-Lemus, L. A., De Marco, V. G., Ramirez-Perez, F. I., Sun, Z., Hayden, M. R., Meininger, G. A., Mueller, K. B., Jaffe, I. Z., & Sowers, J. R. (2016). Endothelial mineralocorticoid receptor mediates diet-induced aortic stiffness in females. *Circulation Research*, *118*(6), 935–943.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308269>

- Juul, K. V., Bichet, D. G., Nielsen, S., & Nørgaard, J. P. (2014). The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306(9).
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00604.2013>
- Kai, K., Tominaga, N., Uchida, D., Fukai, N., Matsuura, Y., Uda, S., & Yokochi, A. (2016). Aldosterone Response in Severe Hypokalemia and Volume Depletion: A Case Report and Review of the Recent Research. *Case Reports in Nephrology*, 2016, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/2036503>
- Kapoor, D., & Jones, T. H. (2005). Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, 152(4), 491–499.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.01867>
- Kawai, T. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008.AT1>
- Kawarazaki, W., Nagase, M., Yoshida, S., Takeuchi, M., Ishizawa, K., Ayuzawa, N., Ueda, K., & Fujita, T. (2012). Angiotensin II- and salt-induced kidney injury through Rac1-mediated mineralocorticoid receptor activation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6), 997–1007. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011070734>
- Keane, W. F. (2001). Metabolic pathogenesis of cardiorenal disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 38(6), 1372–1375. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.29260>
- Kellenberger, S., & Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: A variety of functions for a shared structure. *Physiological Reviews*, 82(3), 735–767. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2002>
- Kim, A., Knudsen, J. G., Madara, J. C., Benrick, A., Hill, T., Kadir, L. A., Kellard, J. A., Mellander, L., Miranda, C., Lin, H., James, T., Suba, K., Spigelman, A. F., Wu, Y., Macdonald, P. E., Asterholm, I. W., Magnussen, T., Christensen, M., Visboll, T., ... Briant, L. J. B. (2021). Arginine-vasopressin mediates counter-regulatory glucagon release and is diminished in type 1 diabetes. *ELife*, 10, 1–29.
<https://doi.org/10.7554/eLife.72919>
- Kim, A., Madara, J. C., Wu, C., Andermann, M. L., & Lowell, B. B. (2021). Neural basis for regulation of vasopressin secretion by anticipated disturbances in Osmolality. *ELife*, 10, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.66609>
- Kleyman, T. R., Carattino, M. D., & Hughey, R. P. (2009). ENaC at the cutting edge:

- Regulation of epithelial sodium channels by proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20447–20451. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800083200>
- Knoepp, F., Ashley, Z., Barth, D., Baldin, J. P., Jennings, M., Kazantseva, M., Saw, E. L., Katare, R., de la Rosa, D. A., Weissmann, N., & Fronius, M. (2020). Shear force sensing of epithelial Na⁺ channel (ENaC) relies on N-glycosylated asparagines in the palm and knuckle domains of α ENaC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(1), 717–726. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911243117>
- Kortenoeven, M. L., Pedersen, N. B., Rosenbaek, L. L., & Fenton, R. A. (2015). Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 309(4), F280–F299. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00093.2015>
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular endothelial cell biology: An update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Kurtz, T. W., DiCarlo, S. E., Pravenec, M., & Morris, R. C. (2017). An appraisal of methods recently recommended for testing salt sensitivity of blood pressure. *Journal of the American Heart Association*, 6(4). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005653>
- Kusche-Vihrog, K., Jeggle, P., & Oberleithner, H. (2014). The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(5), 851–859. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1356-3>
- Kusche-Vihrog, K., Schmitz, B., & Brand, E. (2015). Salt controls endothelial and vascular phenotype. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(3), 499–512. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1657-1>
- Kusche-Vihrog, K., Sobczak, K., Bangel, N., Wilhelmi, M., Nechyporuk-Zloy, V., Schwab, A., Schillers, H., & Oberleithner, H. (2008). Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 455(5), 849–857. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0341-0>
- Kusche-Vihrog, K., Tarjus, A., Fels, J., & Jaisser, F. (2014). The epithelial Na⁺ channel: A new player in the vasculature. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 143–148. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000441054.88962.2c>

- Leenen, F. H. H. (2010). The central role of the brain aldosterone-"ouabain" pathway in salt-sensitive hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(12), 1132–1139. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.03.004>
- Leenen, F. H. H. (2014). Actions of circulating angiotensin II and aldosterone in the brain contributing to hypertension. *American Journal of Hypertension*, 27(8), 1024–1032. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu066>
- Leenen, F. H. H., Blaustein, M. P., & Hamlyn, J. M. (2017). Update on angiotensin II: New endocrine connections between the brain, adrenal glands and the cardiovascular system. *Endocrine Connections*, 6(7), R131–R145. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0161>
- Lenasi, H. (2018). *Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68656>
- Lerchl, K., Rakova, N., Dahlmann, A., Rauh, M., Goller, U., Basner, M., Dinges, D. F., Beck, L., Agureev, A., Larina, I., Baranov, V., Morukov, B., Eckardt, K. U., Vassilieva, G., Wabel, P., Vienken, J., Kirsch, K., Johannes, B., Krannich, A., ... Titze, J. (2015). Agreement between 24-hour salt ingestion and sodium excretion in a controlled environment. *Hypertension*, 66(4), 850–857. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05851>
- MacHnik, A., Neuhofer, W., Jantsch, J., Dahlmann, A., Tammela, T., MacHura, K., Park, J. K., Beck, F. X., Müller, D. N., Derer, W., Goss, J., Ziomber, A., Dietsch, P., Wagner, H., Van Rooijen, N., Kurtz, A., Hilgers, K. F., Alitalo, K., Eckardt, K. U., ... Titze, J. (2009). Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nature Medicine*, 15(5), 545–552. <https://doi.org/10.1038/nm.1960>
- McNally, R. J., Morselli, F., Farukh, B., Chowienczyk, P. J., & Faconti, L. (2022). A pilot study to evaluate the erythrocyte glycocalyx sensitivity to sodium as a marker for cellular salt sensitivity in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, March, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41371-022-00683-z>
- Milford, E. M., & Reade, M. C. (2019). *Fluidos y conservación del glicocalix*. 1–11.
- Mills, K. T., Stefanescu, A., & He, J. (2016). The global epidemiology of hypertension Katherine. *Physiol. Behav.*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>.The

- Mishra, S., Ingole, S., & Jain, R. (2018). Salt sensitivity and its implication in clinical practice. *Indian Heart Journal*, *70*(4), 556–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.10.006>
- Monge García, M. I., Jian, Z., Settels, J. J., Hunley, C., Cecconi, M., Hatib, F., & Pinsky, M. R. (2019). Determinants of left ventricular ejection fraction and a novel method to improve its assessment of myocardial contractility. *Annals of Intensive Care*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0526-7>
- Moss, R., & Layton, A. T. (2014). Dominant factors that govern pressure natriuresis in diuresis and antidiuresis: A mathematical model. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *306*(9), 952–969. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00500.2013>
- Oberleithner, H. (2012a). A physiological concept unmasking vascular salt sensitivity in man. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *464*(3), 287–293.
<https://doi.org/10.1007/s00424-012-1128-5>
- Oberleithner, H. (2012b). Two barriers for sodium in vascular endothelium? *Annals of Medicine*, *44*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.653397>
- Oberleithner, H. (2013). Vascular endothelium leaves fingerprints on the surface of erythrocytes. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *465*(10), 1451–1458.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1288-y>
- Oberleithner, H., Peters, W., Kusche-Vihrog, K., Korte, S., Schillers, H., Kliche, K., & Oberleithner, K. (2011). Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *462*(4), 519–528. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0999-1>
- Oberleithner, H., & Wilhelmi, M. (2013). Determination of erythrocyte sodium sensitivity in man. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *465*(10), 1459–1466. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1289-x>
- Oberleithner, H., & Wilhelmi, M. (2016). Salt sensitivity determined from capillary blood. *Kidney and Blood Pressure Research*, *41*(4), 355–364.
<https://doi.org/10.1159/000443438>
- Ogawa, K., Suga, H., Ozone, C., Sakakibara, M., Yamada, T., Kano, M., Mitsumoto, K., Kasai, T., Kodani, Y., Nagasaki, H., Yamamoto, N., Hagiwara, D., Goto, M., Banno, R., Sugimura, Y., & Arima, H. (2018). Vasopressin-secreting neurons derived from human embryonic stem cells through specific induction of dorsal hypothalamic

- progenitors. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22053-x>
- Olde Engberink, R. H. G., Rorije, N. M. G., Van Der Heide, J. J. H., Van Den Born, B. J. H., & Vogt, L. (2015). Role of the vascular wall in sodium homeostasis and salt sensitivity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(4), 777–783. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014050430>
- Olde Engberink, R. H. G., Selvarajah, V., & Vogt, L. (2020). Clinical impact of tissue sodium storage. *Pediatric Nephrology*, 35(8), 1373–1380. <https://doi.org/10.1007/s00467-019-04305-8>
- Olde Engberink, R. H. G., Van Den Hoek, T. C., Van Noordenne, N. D., Van Den Born, B. J. H., Peters-Sengers, H., & Vogt, L. (2017). Use of a single baseline versus multiyear 24-hour urine collection for estimation of long-term sodium intake and associated cardiovascular and renal risk. *Circulation*, 136(10), 917–926. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029028>
- Organization World Health, & World Health Organization. (2012). Guideline: Sodium intake for adults and children. *World Health Organization*, 1–56. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/77985> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sodium%5BTitle%5D AND intake%5BTitle%5D AND adults%5BTitle%5D AND children%5BTitle%5D AND WHO%5BTitle%5D%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sodium%255BTitle%255](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sodium%5BTitle%5D%20AND%20intake%5BTitle%5D%20AND%20adults%5BTitle%5D%20AND%20children%5BTitle%5D%20AND%20WHO%5BTitle%5D%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sodium%255BTitle%255)
- Padilha, A. S., Salaices, M., Vassallo, D. V., Batista, P. R., & Siman, F. D. M. (2011). Hypertensive effects of the iv administration of picomoles of ouabain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(9), 933–938. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500103>
- Patik, J. C., Lennon, S. L., Farquhar, W. B., & Edwards, D. G. (2021). Mechanisms of dietary sodium-induced impairments in endothelial function and potential countermeasures. *Nutrients*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu13010270>
- Peng Zhao, Su, X., Ge, T., & Fan, J. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00006-7>. Constitutive
- Pilic, L., Pedlar, C. R., & Mavrommatis, Y. (2016). Salt-sensitive hypertension:

- Mechanisms and effects of dietary and other lifestyle factors. *Nutrition Reviews*, 74(10), 645–658. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw028>
- Pitzer, A. L., Van Beusecum, J. P., Kleyman, T. R., & Kirabo, A. (2020). ENaC in Salt-Sensitive Hypertension: Kidney and Beyond. *Current Hypertension Reports*, 22(9). <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01067-9>
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Polychronopoulou, E., Braconnier, P., & Burnier, M. (2019). New Insights on the Role of Sodium in the Physiological Regulation of Blood Pressure and Development of Hypertension. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00136>
- Potje, S. R., Paula, T. D. C., Paulo, M., & Bendhack, L. M. (2021). The Role of Glycocalyx and Caveolae in Vascular Homeostasis and Diseases. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.620840>
- Potthoff, S. A., Stamer, S., Grave, K., Königshausen, E., Sivritas, S. H., Thieme, M., Mori, Y., Woznowski, M., Rump, L. C., & Stegbauer, J. (2016). Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 17(3). <https://doi.org/10.1177/1470320316653284>
- Qi, H., Liu, Z., Cao, H., Sun, W. P., Peng, W. J., Liu, B., Dong, S. J., Xiang, Y. T., & Zhang, L. (2018). Comparative Efficacy of Antihypertensive Agents in Salt-Sensitive Hypertensive Patients: A Network Meta-Analysis. *American Journal of Hypertension*, 31(7), 835–846. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy027>
- Rabelink, T. J., & De Zeeuw, D. (2015). The glycocalyx - Linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nature Reviews Nephrology*, 11(11), 667–676. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.162>
- Rakova, N., Jüttner, K., Dahlmann, A., Schröder, A., Linz, P., Kopp, C., Rauh, M., Goller, U., Beck, L., Agureev, A., Vassilieva, G., Lenkova, L., Johannes, B., Wabel, P., Moissl, U., Vienken, J., Gerzer, R., Eckardt, K. U., Müller, D. N., ... Titze, J. (2013). Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na⁺ balance. *Cell Metabolism*, 17(1), 125–131.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.013>

Rashighi, M., & Harris, J. E. (2017a). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009070759>. Macula

Rashighi, M., & Harris, J. E. (2017b). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03618>. Matrix

Rassler, B. (2010). The renin-angiotensin system in the development of salt-sensitive hypertension in animal models and humans. *Pharmaceuticals*, *3*(4), 940–960.

<https://doi.org/10.3390/ph3040940>

Reading, F. (2009). Epithelial sodium channels (ENaC). *British Journal of Pharmacology*, *158*(SUPPL. 1), 2008–2009. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00503_9.x

Remuzzi, G., Cattaneo, D., & Perico, N. (2008). The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19*(8), 1459–1462. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007101079>

Ren, Y. L., Garvin, J. L., Liu, R., & Carretero, O. A. (2004). Role of macula densa adenosine triphosphate (ATP) in tubuloglomerular feedback. *Kidney International*, *66*(4), 1479–1485. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00911.x>

Ricard, N., Bailly, S., Guignabert, C., & Simons, M. (2021). The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 565–580). Nature Research.

<https://doi.org/10.1038/s41569-021-00517-4>

Rossitto, G., Mary, S., Chen, J. Y., Boder, P., Chew, K. S., Neves, K. B., Alves, R. L., Montezano, A. C., Welsh, P., Petrie, M. C., Graham, D., Touyz, R. M., & Delles, C. (2020). Tissue sodium excess is not hypertonic and reflects extracellular volume expansion. *Nature Communications*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17820-2>

Santos, J. A., Li, K. C., Huang, L., Mclean, R., Petersen, K., Di Tanna, G. L., & Webster, J. (2020). Change in mean salt intake over time using 24-h urine versus overnight and spot urine samples: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Journal*, *19*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12937-020-00651-8>

Savoia, C., Burger, D., Nishigaki, N., Montezano, A., & Touyz, R. M. (2011). Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Reviews in Molecular*

- Medicine*, 13(March), 1–25. <https://doi.org/10.1017/S1462399411001815>
- Schatz, V., Neubert, P., Schröder, A., Binger, K., Gebhard, M., Müller, D. N., Luft, F. C., Titze, J., & Jantsch, J. (2017). Elementary immunology: Na⁺ as a regulator of immunity. *Pediatric Nephrology*, 32(2), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3349-x>
- Schierke, F., Wyrwoll, M. J., Wisdorf, M., Niedzielski, L., Maase, M., Ruck, T., Meuth, S. G., & Kusche-Vihrog, K. (2017). Nanomechanics of the endothelial glycocalyx contribute to Na⁺ - Induced vascular inflammation. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46476>
- Schönberger, M., Althaus, M., Fronius, M., Clauss, W., & Trauner, D. (2014). Controlling epithelial sodium channels with light using photoswitchable amilorides. *Nature Chemistry*, 6(8), 712–719. <https://doi.org/10.1038/nchem.2004>
- Schwartz, B. G., Economides, C., Mayeda, G. S., Burstein, S., & Kloner, R. A. (2010). The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy. In *International Journal of Impotence Research* (Vol. 22, Issue 2, pp. 77–90). <https://doi.org/10.1038/ijir.2009.59>
- Searles, C. D. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00457.2005>
- Searles, C. D., Ide, L., Davis, M. E., Cai, H., & Weber, M. (2004). Actin cytoskeleton organization and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circulation Research*, 95(5), 488–495. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000138953.21377.80>
- Selvarajah, V., Connolly, K., McEniery, C., & Wilkinson, I. (2018). Skin Sodium and Hypertension: a Paradigm Shift? *Current Hypertension Reports*, 20(11). <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0892-9>
- Shibata, S., Mu, S. Y., Kawarazaki, H., Muraoka, K., Ishizawa, K. I., Yoshida, S., Kawarazaki, W., Takeuchi, M., Ayuzawa, N., Miyoshi, J., Takai, Y., Ishikawa, A., Shimosawa, T., Ando, K., Nagase, M., & Fujita, T. (2011). Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8), 3233–3243. <https://doi.org/10.1172/JCI43124>

- Shimosawa, T. (2013). Salt, the renin-angiotensin-aldosterone system and resistant hypertension. *Hypertension Research*, *36*(8), 657–660.
<https://doi.org/10.1038/hr.2013.69>
- Smart, L., & Hughes, D. (2021). The Effects of Resuscitative Fluid Therapy on the Endothelial Surface Layer. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*(May), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.661660>
- Soo, M. K., Mizel, D., Huang, Y. G., Briggs, J. P., & Schnermann, J. (2006). Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *290*(5), 1016–1023.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00367.2005>
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsov, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, *4*(3), 1201–1228. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130040>
- Staruschenko, A., Adams, E., Booth, R. E., & Stockand, J. D. (2005). Epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry. *Biophysical Journal*, *88*(6), 3966–3975.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056804>
- Stegemann, J. P. (2007). 基因的改变 NIH Public Access. *Tissue Engineering*, *23*(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00825.2006>. Vasopressin-induced
- Su, Y., Edwards-Bennett, S., Bubb, M. R., & Block, E. R. (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *284*(6 53-6), 1542–1549.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2002>
- Takahashi, H., Yoshika, M., Komiyama, Y., & Nishimura, M. (2011). The central mechanism underlying hypertension: A review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertension Research*, *34*(11), 1147–1160. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.105>
- Tapia-Castillo, A., Carvajal, C. A., Campino, C., Hill, C., Allende, F., Vecchiola, A., Carrasco, C., Bancalari, R., Valdivia, C., Lagos, C., Martinez-Aguayo, A., Garcia, H., Aglony, M., Baudrand, R. F., Kalergis, A. M., Michea, L. F., Riedel, C. A., & Fardella, C. E. (2015). The expression of RAC1 and mineralocorticoid pathway-dependent genes are associated with different responses to salt intake. *American Journal of*

- Hypertension*, 28(6), 722–728. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu224>
- Targoński, R., Sadowski, J., Price, S., & Targoński, R. (2020). Sodium-induced inflammation—an invisible player in resistant hypertension. *Hypertension Research*, 43(7), 629–633. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-0428-y>
- Tingskov, S. J., Choi, H. J., Holst, M. R., Hu, S., Li, C., Wang, W., Frøkiær, J., Nejsum, L. N., Kwon, T. H., & Nørregaard, R. (2019). Vasopressin-independent regulation of aquaporin-2 by tamoxifen in kidney collecting ducts. *Frontiers in Physiology*, 10(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00948>
- Titze, J. (2014). Sodium balance is not just a renal affair. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 101–105. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000441151.55320.c3>
- Tsilosani, A., Gao, C., & Zhang, W. (2022). Aldosterone-Regulated Sodium Transport and Blood Pressure. *Frontiers in Physiology*, 13(February). <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.770375>
- Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., Khan, N. A., Poulter, N. R., Prabhakaran, D., Ramirez, A., Schlaich, M., Stergiou, G. S., Tomaszewski, M., Wainford, R. D., Williams, B., & Schutte, A. E. (2020). 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*, 75(6), 1334–1357. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>
- Villalba, N., Baby, S., & Yuan, S. Y. (2021). The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711003>
- Wang, G., Kostidis, S., Tiemeier, G. L., Sol, W. M. P. J., De Vries, M. R., Giera, M., Carmeliet, P., Van Den Berg, B. M., & Rabelink, T. J. (2020). Shear stress regulation of endothelial glycocalyx structure is determined by glucobiosynthesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, February, 350–364. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313399>
- Wenstedt, E. F. E., Engberink, R. H. G. O., & Vogt, L. (2018). Sodium handling by the blood vessel wall critical for hypertension development. *Hypertension*, 71(6), 990–996. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10211>
- Wichmann, L., Vowinkel, K. S., Perniss, A., Manzini, I., & Althaus, M. (2018).

- Incorporation of the β -subunit into the epithelial sodium channel (ENaC) generates protease-resistant ENaCs in *Xenopus laevis*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(18), 6647–6658. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002543>
- Wiig, H., Luft, F. and Titze, J. (2017). The interstitium conducts extrarenal storage of sodium and represents a third compartment essential for extracellular volume and blood pressure homeostasis. *Acta Physiologica*, 222(3), 13006.
- Wiig, H., Schröder, A., Neuhofer, W., Jantsch, J., Kopp, C., Karlsen, T. V., Boschmann, M., Goss, J., Bry, M., Rakova, N., Dahlmann, A., Brenner, S., Tenstad, O., Nurmi, H., Mervaala, E., Wagner, H., Beck, F. X., Müller, D. N., Kerjaschki, D., ... Titze, J. (2013). Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2803–2815. <https://doi.org/10.1172/JCI60113>
- Williams, B., & Mancia, G. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal*, 39(33), 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D., Coca, A., De Simone, G., Dominicczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S., Kreutz, R., Laurent, S., ... Desormais, I. (2018). 2018 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC). *Blood Pressure*, 27(6), 314–340. <https://doi.org/10.1080/08037051.2018.1527177>
- World Health Organization. (2021). *Hypertension*.
- Xu, Z., Li, W., Han, J., Zou, C., Huang, W., Yu, W., Shan, X., Lum, H., Li, X., & Liang, G. (2017). Angiotensin II induces kidney inflammatory injury and fibrosis through binding to myeloid differentiation protein-2 (MD2). *Scientific Reports*, 7(November 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44911>
- Yaghooti, H., Firoozrai, M., Fallah, S., & Khorramzadeh, M. R. (2011). Angiotensin II induces NF- κ B, JNK and p38 MAPK activation in monocytic cells and increases matrix metalloproteinase-9 expression in a PKC- and Rho kinase-dependent

- manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(3), 193–199.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500008>
- Yang, T., & Xu, C. (2017). Physiology and pathophysiology of the intrarenal renin-angiotensin system: An update. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(4), 1040–1049. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016070734>
- Yilmaz, O., Afsar, B., Ortiz, A., & Kanbay, M. (2019). The role of endothelial glycocalyx in health and disease. *Clinical Kidney Journal*, 12(5), 611–619.
<https://doi.org/10.1093/ckj/sfz042>
- Zhang, F., Li, S., Song, J., Liu, J., Cui, Y., & Chen, H. (2017). Angiotensin-(1-7) regulates angiotensin II-induced matrix metalloproteinase-8 in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 261, 90–98.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.02.012>
- Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., & Ezzati, M. (2021). Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 18(11), 785–802. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00559-8>
- Zhou, M. S., Wang, A., & Yu, H. (2014). Link between insulin resistance and hypertension: What is the evidence from evolutionary biology? *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-12>