

**Nathalia Juocys Dias Moreira**

**Efeitos da desnervação renal em ratos espontaneamente hipertensos e normotensos: repercussões nos vasos de resistência e no sistema nervoso autônomo**

**São Paulo**

**2023**

**Nathalia Juocys Dias Moreira**

**Efeitos da desnervação renal em ratos espontaneamente hipertensos e normotensos: repercussões nos vasos de resistência e no sistema nervoso autônomo**

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

Programa de Cardiologia

**Orientadora:**

Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Nathalia Juocys Dias  
Efeitos da desnervação renal em ratos  
espontaneamente hipertensos e normotensos :  
repercussões nos vasos de resistência e no sistema  
nervoso autônomo / Nathalia Juocys Dias Moreira. --  
São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientadora: Maria Cláudia Costa Irigoyen.

Descritores: 1.Simpatectomia 2.Hipertensão  
3.Sistema nervoso autônomo 4.Arterias mesentéricas  
5.Endotélio vascular 6.Ratos endogâmicos SHR

USP/FM/DBD-391/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Com carinho e profundo  
respeito ao meu avô Edson, que  
dedicou uma vida inteira à  
pesquisa científica, com amor e  
devoção. Que seu legado  
inspire e guie todos os  
pesquisadores que vierem  
depois dele.

## AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que me acompanharam durante o desenvolvimento do doutorado que se fosse nomeá-las escreveria páginas de agradecimento.

Entretanto, algumas pessoas não poderiam deixar de ser mencionadas.

Agradeço inicialmente a minha mãe, Ligia, que me apoia até nos meus sonhos mais malucos, e sem seu amor e suporte, eu não teria dado nem os primeiros passos.

Agradeço ao meu filho, Lucca, que me faz começar o dia com entusiasmo e alegria. Os dias seriam cinzentos e sem graça sem sua presença.

Agradeço ao meu padrasto Marcos, que me recebeu em sua casa na Califórnia de braços e peito abertos, para que eu pudesse realizar a etapa do doutorado no exterior, experiência essa que enriqueceu minha formação grandiosamente.

Estendo esse agradecimento a toda minha família, meu pai, Robinson, meus irmãos; Guilherme, Arthur, Pedro e Laura, minha sobrinha Beatriz, minha tia Rosana, tio Ary e meu primo Fábio. Tenho a sorte de fazer parte de uma família que se une e se apoia.

Agradeço a toda equipe do laboratório de hipertensão experimental do InCor e às inúmeras colaborações, sem as quais esse trabalho não seria possível.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha orientadora Maria Cláudia Irigoyen, que é uma das mulheres mais inspiradoras que conheço. Em todos os momentos em que eu precisei, sua firmeza e generosidade estavam presentes para me acolher.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autônomo
<b>PA</b>	Pressão Arterial
<b>FC</b>	Frequência Cardíaca
<b>AESR</b>	Ativação Eferente Simpática Renal
<b>SHR</b>	Spontaneous Hypertensive Rats
<b>NE</b>	Noradrenalina
<b>TFG</b>	Taxa de filtração Glomerular
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>DRB</b>	Desnervação Renal Bilateral
<b>PAS</b>	Pressão Arterial Sistólica
<b>PAD</b>	Pressão Arterial Diastólica
<b>PAM</b>	Pressão Arterial Média
<b>RMSSD</b>	Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos
<b>FFT</b>	Transformada Rápida de Fourier
<b>LF</b>	Low Frequency
<b>HF</b>	High Frequency
<b>ACH</b>	Acetilcolina

<b>NPS</b>	Nitroprussiato de Sódio
<b>NS</b>	Normotenso <i>Sham</i>
<b>ND</b>	Normotenso Desnervado
<b>HS</b>	SHR <i>sham</i>
<b>HD</b>	SHR desnervado
<b>VFC</b>	Variabilidade da frequência cardíaca
<b>VS</b>	Versus
<b>LF PAS</b>	Low Frequency da Pressão Arterial Sistólica

## Lista de Símbolos

<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Cálcio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnésio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potássio Monobásico
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Sódio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>Mmol</b>	Milimol
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>mL</b>	Mililitros
<b>log [M]</b>	Logaritmo Molar



## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Sistema Nervoso Autônomo .....	14
1.2 Anatomia e função dos nervos renais .....	14
1.3 Evidência da Ativação Simpática na Hipertensão Experimental .....	15
1.4 Evidência da Ativação Simpática na Hipertensão Humana .....	16
1.5 Estudos clínicos de Desnervação Renal .....	17
1.6 As artérias mesentéricas .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo Principal .....	21
2.2 Objetivos Secundários .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 Animais e grupos .....	22
3.2 Procedimentos cirúrgicos .....	22
3.2.1 Desnervação Renal Bilateral (DRB) .....	22
3.2.2 Canulação .....	23
3.3 Parâmetros Metabólicos .....	24
3.3.1 Gaiola Metabólica .....	24
3.3.2 Análises Urinárias .....	24
3.4 Avaliação hemodinâmica .....	25
3.4.1 Registro da Frequência Cardíaca, Pressão Arterial e avaliação da sensibilidade barorreflexa .....	25
3.5 Avaliação Autonômica .....	26
3.5.1 Variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial .....	26
3.6 Eutanásia e descarte dos animais .....	27
3.7 Perfusão e coleta de tecidos .....	27
3.8 Avaliação dos vasos de resistência .....	27
3.9 Comprovação da Desnervação Renal .....	28
3.10 Análises histológicas .....	28
3.11 Análise Estatística .....	29
3.12 Sequência Experimental .....	29
4. RESULTADOS .....	31
4.1. Efeitos da Desnervação Renal Bilateral nos animais normotensos .....	31

4.1.1 Resultados Hemodinâmicos.....	31
4.1.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS) .....	31
4.1.1.2 Pressão Arterial Diastólica (PAD) .....	31
4.1.1.3 Pressão Arterial Média (PAM) .....	32
4.1.1.4 Resposta Bradicárdica.....	33
4.1.1.5 Resposta Taquicárdica .....	33
4.1.1.6 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) .....	34
4.1.1.7 Variância Pressão Arterial Sistólica (VPAS) .....	34
4.1.1.8 Modulação de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (LF PAS).....	35
4.1.1.9 Alfa LF .....	35
4.1.2 Resultados Metabólicos.....	36
4.1.2.1 Gaiola Metabólica.....	36
4.1.2.2 Análises Urinárias .....	36
4.1.3 Resultados Reatividade Vascular .....	37
4.1.3.1 Relaxamento endotélio-independente.....	37
4.1.3.2 Relaxamento endotélio-dependente.....	37
4.1.3.3 Curva concentração-resposta Acetilcolina com L-NAME.....	38
4.1.3.4 Curva concentração-resposta Fenilefrina.....	39
4.1.4 Noradrenalina Renal .....	39
4.1.5 Resultados histologia .....	40
4.1.5.1 Camada média da aorta.....	40
4.1.5.2 Camada adventícia da aorta .....	41
4.2 Efeitos da Desnervação Renal Bilateral nos animais hipertensos .....	42
4.2.1 Resultados Hemodinâmicos.....	42
4.2.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS) .....	42
4.2.1.2 Pressão Arterial Diastólica (PAD) .....	43
4.2.1.3 Pressão Arterial Média (PAM) .....	44
4.2.1.4 Resposta Bradicárdica.....	44
4.2.1.5 Resposta Taquicárdica .....	45
4.2.1.6 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) .....	45
4.2.1.7 Variância Pressão Arterial Sistólica (VPAS) .....	46
4.2.1.8 Modulação de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (LF PAS).....	47
4.2.1.9 Alfa LF .....	47
4.2.2 Resultados Metabólicos.....	48

4.2.2.1 Gaiola Metabólica .....	48
4.2.2.2 Análises Urinárias .....	48
4.2.3 Resultados Reatividade Vascular .....	49
4.2.3.1 Relaxamento endotélio-indepentende.....	49
4.2.3.2 Relaxamento endotélio-depentente .....	49
4.2.3.3 Curva concentração-resposta Acetilcolina com L-NAME.....	50
4.2.3.4 Curva concentração-resposta Fenilefrina.....	51
4.2.4 Noradrenalina Renal .....	52
4.2.5 Resultados histologia .....	52
4.2.5.1 Camada média da aorta.....	52
4.2.5.2 Camada adventícia da aorta .....	53
4.3 Efeitos das desnervação renal em ratos normotensos e hipertensos .....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	64
7. BIBLIOGRAFIA .....	65

## RESUMO

Moreira NJD. Efeitos da desnervação renal em ratos espontaneamente hipertensos e normotensos: repercussões nos vasos de resistência e no sistema nervoso autônomo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O procedimento de desnervação renal bilateral (DRB) vem sendo proposto como um tratamento inovador em pacientes com hipertensão resistente, entretanto, não estão esclarecidos quais os mecanismos envolvidos nas alterações que levam à queda de pressão arterial nas respostas crônicas. Neste estudo avaliamos a modulação autonômica da circulação em animais normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR), trinta dias após a desnervação renal, assim como alterações na função contrátil e no relaxamento dos vasos de resistência. Foram utilizados ratos Wistar e SHR machos, divididos em 4 grupos experimentais (n=5); grupo normotenso desnervado (ND) e seu controle *sham* (NS); hipertenso desnervado (HD) e seu controle *sham* (HS). Os animais foram avaliados 30 dias após a cirurgia de retirada bilateral dos nervos renais. Os parâmetros hemodinâmicos foram medidos e os dados armazenados para posterior análise dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como variáveis autonômicas. Ao final do protocolo, a reatividade vascular das artérias mesentéricas de resistência foi avaliada utilizando um miógrafo de arame (DMT 620M). Tanto os animais hipertensos quanto normotensos submetidos a DRB apresentaram pressão arterial média (PAM) mais baixa em relação a seus controles (HS=  $171,5 \pm 4,07$ mmHg; HD=  $154,65 \pm 4,03$ mmHg;  $p=0,008$ . NS=  $119,14 \pm 2,39$ mmHg; ND=  $105,5 \pm 2,74$ mmHg;  $p=0,002$ ). Nos hipertensos, esta queda foi acompanhada de redução da modulação simpática para os vasos (LF PAS HS =  $19,42 \pm 2,13$ ; HD =  $11,87 \pm 1,35$ mmHg<sup>2</sup>;  $p=0,009$ ), melhor função barorreflexa, refletida através do índice alfa LF (HS =  $0,47 \pm 0,06$ ; HD =  $0,71 \pm 0,07$  ms/mmHg<sup>2</sup>;  $p=0,02$ ) e resposta taquicárdica (HS =  $1,18 \pm 0,17$ ; HD =  $2 \pm 0,17$  bpm/mmHg;  $p=0,004$ ) e resposta endotélio-dependente preservada. Em contrapartida, nos animais normotensos, a retirada dos nervos renais não alterou a resposta vascular ou autonômica, porém foi capaz de aumentar a resposta bradicárdica em relação ao seu controle (NS=  $1,21 \pm 0,1$ ; ND=  $2,2 \pm 0,3$  bpm/mmHg;  $p=0,003$ ). Adicionalmente, ao utilizarmos o inibidor de óxido nítrico L-NAME na avaliação endotélio-dependente das artérias mesentéricas, os animais normotensos ainda apresentaram ~40% de relaxamento, enquanto os animais hipertensos apresentaram resposta vasoconstrictora, independentemente da desnervação renal. Em conclusão, a desnervação renal bilateral (30 d) é capaz de reduzir a pressão arterial de ratos SHR e normotensos. Esse efeito hipotensor pode estar associado com a redução da modulação simpática para os vasos, com a melhora da resposta barorreflexa e com a preservação da função endotelial das artérias mesentéricas de animais espontaneamente hipertensos.

**Palavras-chave:** Simpatectomia. Hipertensão. Sistema nervoso autônomo. Artérias mesentéricas. Endotélio vascular. Ratos endogâmicos SHR.

## ABSTRACT

Moreira NJD. Effects of renal denervation in spontaneously hypertensive and normotensive rats: Implications for resistance vessels and the autonomic nervous system [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Bilateral renal denervation (RDN) procedure has been proposed as an innovative treatment for patients with resistant hypertension. However, the mechanisms underlying the blood pressure-lowering effects of chronic responses are not fully understood. In this study, we evaluated the autonomic modulation of circulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR) thirty days after renal denervation, as well as changes in contractile function and relaxation of resistance vessels. Male Wistar and SHR rats were used and divided into 4 experimental groups (n=5): normotensive denervated (ND) and its sham control (NS); hypertensive denervated (HD) and its sham control (HS). The animals were evaluated 30 days after bilateral renal nerve removal surgery. Hemodynamic parameters were measured, and the data were stored for subsequent analysis of blood pressure and heart rate values, as well as autonomic variables. At the end of the protocol, vascular reactivity of mesenteric resistance arteries was evaluated using a wire myograph (DMT 620M). Both hypertensive and normotensive animals subjected to RDN showed lower mean arterial pressure (MAP) compared to their respective controls (HS=171.5±4.07mmHg; HD=154.65±4.03mmHg; p=0.008. NS=119.14±2.39mmHg; ND=105.5±2.74mmHg; p=0.002). In hypertensive animals, this decrease was accompanied by reduced sympathetic modulation to the vessels (LF SBP HS=19.42±2.13; HD=11.87±1.35mmHg<sup>2</sup>; p=0.009), improved baroreflex function, as reflected by the LF alpha index (HS=0.47±0.06; HD=0.71±0.07 ms/mmHg<sup>2</sup>; p=0.02), and tachycardic response (HS=1.18±0.17; HD=2±0.17 bpm/mmHg; p=0.004), as well as preserved endothelium-dependent response. On the other hand, in normotensive animals, renal nerve removal did not alter the vascular or autonomic response, but it increased the bradycardic response compared to its control (NS=1.21±0.1; ND=2.2±0.3 bpm/mmHg; p=0.003). Additionally, when the nitric oxide inhibitor L-NAME was used in the endothelium-dependent evaluation of mesenteric arteries, normotensive animals still showed approximately 40% relaxation, while hypertensive animals exhibited vasoconstrictor response regardless of renal denervation. In conclusion, bilateral renal denervation (30 days) is capable of reducing blood pressure in SHR and normotensive rats. This hypotensive effect may be associated with the reduction of sympathetic modulation to the vessels, improvement of baroreflex response, and preservation of endothelial function in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive animals.

Keywords: Sympathectomy. Hypertension. Autonomic nervous system. Mesenteric arteries. Endothelium, vascular. Rats, inbred SHR.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Sistema Nervoso Autônomo**

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA), também conhecido como sistema nervoso vegetativo(1) ou sistema nervoso visceral é a parte do sistema nervoso que controla a vida vegetativa, através da regulação de funções como a respiração, circulação do sangue, pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), entre outras(2). O SNA possui duas grandes divisões: sistema nervoso simpático e sistema nervoso parassimpático, através dos quais os sinais autônomos eferentes são transmitidos aos diferentes órgãos do corpo. As fibras nervosas simpáticas secretam principalmente norepinefrina enquanto que as fibras parassimpáticas secretam principalmente acetilcolina (3).

O sistema nervoso simpático participa do controle a curto prazo da PA, o que ocorre em grande parte por meio de seus efeitos sobre a resistência e capacitância vascular periféricas totais e sobre a capacidade de bombeamento do coração (4), porém, a ativação simpática contínua pode promover retenção de água e sal pelos rins, elevando dessa forma a pressão a longo prazo (3). O equilíbrio entre a atividade simpática e parassimpática desempenha um papel fundamental nas funções fisiológicas e o desequilíbrio entre essas duas atividades (disautonomia) é caracterizado pela condição em que a função autonômica alterada afeta adversamente a saúde, particularmente nas funções cardiovasculares (5).

Embora a hipertensão seja uma doença multifatorial com várias origens, é amplamente reconhecido que fatores neuroadrenérgicos desempenham um papel significativo no desenvolvimento e progressão da doença. Em pacientes hipertensos o grau de ativação do sistema nervoso simpático apresenta uma amplitude diretamente relacionada à magnitude da elevação da pressão arterial (6); as fibras eferentes simpáticas encontram-se hiperativas e contribuem para o aumento da PA(7). Sendo assim, o sistema nervoso simpático está importantemente envolvido na fisiopatologia da hipertensão primária e em algumas formas secundárias da condição(8).

### **1.2 Anatomia e função dos nervos renais**

As fibras eferentes renais emergem do centro autonômico hipotalâmico e atingem os rins através das fibras pós-ganglionares que se originam no segmento T10-11 a L2-3 da medula espinhal (9). A partir daí, os nervos pós-ganglionares renais, acompanham o trajeto da artéria renal, atravessam o hilo renal e dividem-se em pequenas ramificações que inervam a vasculatura renal, túbulos e aparelho justaglomerular (10).

A estimulação da via eferente renal resulta em retenção de volume via reabsorção de sódio (11), redução no fluxo sanguíneo renal (12, 13) e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), através da estimulação do aparelho justaglomerular e subsequente liberação de renina (6, 14).

As fibras aferentes, por sua vez, estão localizadas principalmente na parede da pelve renal e conectam os rins com centros autonômicos no sistema nervoso central (15). Condições como isquemia, hipóxia ou estresse oxidativo podem promover a ativação dessas fibras (16, 17).

A estimulação dos nervos simpáticos renais leva a um aumento da produção de noradrenalina, que através de receptores  $\alpha$ -1 aumenta a reabsorção de sódio pelas células epiteliais tubulares renais – resultando em uma diminuição da excreção urinária de sódio e aumento da contração de células lisas musculares diminuindo o fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular. Os receptores  $\beta$ -1 por sua vez, aumentam a liberação de renina pelo aparelho justaglomerular(18).

A ablação dos nervos renais eferentes pode levar a queda da PA, pois reduz a atividade eferente simpática renal promovendo excreção urinária de sódio, enquanto que a ablação dos nervos simpáticos renais aferentes diminui a PA pela inibição do fluxo simpático central, o que influencia diretamente na atividade simpática nos rins e em outros órgãos altamente inervados que estão envolvidos no controle cardiovascular (19-21). Desta forma, os nervos renais são um importante alvo na terapia desta síndrome.

### **1.3 Evidência da Ativação Simpática na Hipertensão Experimental**

O aumento da atividade simpática renal é uma importante característica na hipertensão experimental, e isto foi evidenciado através da demonstração da medida

direta da atividade eferente renal (registros multifibras) ou de uma única fibra simpática renal em ratos espontaneamente hipertensos (22).

Cruz, *et al.*, 1992 demonstraram através de um registro direto, um aumento da atividade eferente simpática renal (AESR) em SHR e na hipertensão produzida por mineralocorticóides e excesso de sal (23). De fato, todos os efeitos da AESR podem contribuir para a iniciação, desenvolvimento e manutenção da hipertensão.

Estudos de nosso grupo demonstraram que a completa desnervação do rim isquêmico (em modelos experimentais de hipertensão através da ligadura da aorta) atenua a hipertensão observada 10 dias após a ligadura, normaliza a atividade plasmática de renina e o reflexo comandado pelos barorreceptores sobre a frequência cardíaca, evidenciando desta forma, o importante papel dos nervos renais na homeostasia cardiovascular (24). Além disso, em outro estudo, a desnervação renal foi capaz de normalizar a atividade de renina plasmática 10 dias após a ligadura da aorta, demonstrando o papel dos nervos renais na secreção de renina (25).

Sendo assim, evidências indicam a importância dos nervos renais na patogênese da hipertensão, uma vez que a desnervação renal demonstrou ser efetiva em modelos de várias etiologias, em múltiplas espécies, reduzindo tanto a pressão sanguínea quanto os danos em órgãos-alvos causados pela hiperatividade simpática crônica (26, 27). Embora não se tenha estudado claramente quais os mecanismos envolvidos nesse efeito hipotensor, é possível que o efeito benéfico desta técnica na hipertensão esteja associado, entre outros mecanismos, a uma progressiva queda na retenção do sódio renal (18).

Em SHR, o retardo no desenvolvimento da hipertensão está associado com o aumento na excreção urinária do sódio ingerido (natriurese por desnervação, balanço de sódio negativo), entretanto, a literatura sobre o assunto parece indicar que depois de algum tempo a PA volta a subir. Este subsequente desenvolvimento da hipertensão coincide com o retorno do conteúdo renal de noradrenalina ao valor normal, evidenciando reinervação(23).

#### **1.4 Evidência da Ativação Simpática na Hipertensão Humana**



Através da metodologia de diluição com radiotraçador para medir a saída de norepinefrina (NE) dos rins para o plasma, estudos em humanos revelaram aumento das taxas do spillover de NE renal em pacientes com hipertensão essencial (28, 29). Em outras palavras, estes estudos sugerem fortemente a ativação simpática renal na hipertensão humana, onde o perfil hemodinâmico comumente encontrado caracteriza-se pelo aumento da atividade nervosa simpática muscular, aumento da frequência cardíaca e do débito cardíaco e aumento da resistência periférica e renovascular (30).

As informações mais antigas sobre esse tipo de intervenção no controle da PA em pacientes com hipertensão, datam de 1920 e 1930, quando abordagens cirúrgicas como a esplenectomia e simpatectomia radical foram aplicadas em humanos (31). Embora essas abordagens não tenham sido diretamente direcionadas aos nervos renais e apresentem altas taxas de complicações periprocedural, foram demonstradas melhorias no controle da pressão arterial e da sobrevida em um número substancial de pacientes tratados. Mais recentemente e baseados nas informações obtidas em modelos experimentais, a desnervação renal cirúrgica demonstrou ser um meio eficaz de reduzir o fluxo simpático para os rins e aumentar a produção de urina (natriurese e diurese) e reduzir a liberação da renina, sem afetar adversamente as outras funções do rim, tais como a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo sanguíneo renal (32).

### **1.5 Estudos clínicos de Desnervação Renal**

Diversos estudos clínicos vêm sendo conduzidos desde que a desnervação renal bilateral (DRB) baseada em catéter se tornou disponível. O primeiro deles, Symplicity HTN-1, estudo aberto, não randomizado, demonstrou que a DRB por catéter de ablação é uma técnica segura e apresenta benefícios em longo prazo (três anos), com uma queda de 10 mmHg ou mais na pressão sistólica de consultório em 93% dos pacientes com hipertensão resistente (33). Pouco tempo depois, o Symplicity HTN-2, estudo randomizado, controlado não cego, também concluiu que a DRB era um procedimento livre de complicações que levava a uma queda sustentada da PA de consultório sistólica e diastólica durante os três anos de acompanhamento dos pacientes hipertensos resistentes (34).

Embora os resultados do Symplicity HTN-1 e HTN-2 tenham sido promissores, em 2014, o estudo Symplicity HNT-3, randomizado, controlado cego, porém pela primeira vez com procedimento simulado, demonstrou que nos pacientes com hipertensão resistente, os efeitos de queda da pressão após DRB eram comparáveis àqueles observados nos pacientes que realizaram a cirurgia de simulação *sham* (35). Este resultado negativo foi relacionado com a possível inexperiência do médico operante, número de pontos de ablação, variabilidade no uso de medicamentos anti-hipertensivo e escolha dos pacientes.

Posteriormente, novos ensaios clínicos foram desenvolvidos, dando origem a uma segunda geração de estudos da desnervação renal. Esses estudos utilizaram técnicas avançadas de ablação por radiofrequência realizadas por operadores experientes, incluindo novas técnicas de desnervação, como o ultrassom endovascular. Além disso, foram implementados regimes de tratamento médico modificados e os participantes com hipertensão sistólica isolada foram excluídos(36-40).

A despeito de todas as conjecturas sobre as razões do resultado negativo do Symplicity HNT-3, uma meta análise envolvendo os estudos mais atuais concluiu que a redução da pressão arterial entre os ensaios clínicos de primeira e segunda geração não era decorrente do uso de dispositivos diferentes ou da presença ou ausência de medicamentos anti-hipertensivos(41). Portanto, novas investigações têm como principal desafio identificar corretamente quem são os indivíduos respondedores que poderão se beneficiar da técnica, além da combinação de estudos adequadamente projetados com amostras maiores e acompanhamento de longo prazo, a fim de permitir recomendações clínicas baseadas em evidências. Entender quais os mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos benéficos da desnervação parece ser um caminho importante na definição futura do procedimento em pacientes.

Assim como certos indivíduos hipertensos podem não apresentar queda da pressão em resposta à DRB, diferentes modelos animais de hipertensão também demonstram respostas distintas. Por exemplo, quando submetidos à desnervação renal utilizando termorradiofrequência, ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidente vascular cerebral (SHRSP) exibiram redução na elevação da pressão arterial durante a fase de desenvolvimento da hipertensão. No entanto, quando a desnervação

renal foi realizada por meio de radiofrequência, a atenuação da PA não foi observada(42). Ainda mais, ambas as técnicas não levam a queda da PA em ratos hipertensos induzidos pela dieta rica em sal angiotensina e II e (ratos AngII-sal)(43), demonstrando que não há contribuição dos nervos renais no desenvolvimento da hipertensão nesse modelo.

No presente momento, devido à existência de múltiplos ensaios controlados por placebo, foi possível estabelecer a segurança e eficácia da desnervação renal utilizando tanto a técnica de radiofrequência quanto de ultrassom. Essas evidências respaldam a inclusão da desnervação renal como uma alternativa adicional de tratamento em pacientes adultos com hipertensão resistente criteriosamente selecionados(44).

## **1.6 As artérias mesentéricas**

As artérias de resistência são vasos que possuem um diâmetro de lúmen <400  $\mu$ m quando relaxados e constituem o principal local de geração de resistência vascular (45). Conforme descrito originalmente por Folkow em 1956, muitas das características hemodinâmicas associadas à hipertensão essencial podem ser explicadas por alterações na estrutura dos vasos de resistência (46).

A causa fundamental do aumento da resistência periférica é uma diminuição do diâmetro do lúmen desses vasos; de fato Mulvany e Halpern, em 1977, demonstraram através da técnica de miografia, que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam diminuição da relação parede-luz e enrijecimento arteriolar. Desta forma, o grau de remodelamento de artérias tem valor prognóstico em indivíduos hipertensos (47). Sendo assim, já é bem reconhecido que as pequenas artérias têm um papel significativo na patogênese da hipertensão e seus desfechos (48).

Existem poucos relatos sobre os efeitos da desnervação renal bilateral nos vasos de resistência, Wang *et al.* demonstrou uma melhora da função endotelial em modelo de diabetes tipo 2 após a retirada dos nervos renais (49). Outro estudo mostrou o impacto do transplante renal na reatividade de pequenos vasos – uma vez que o procedimento leva à ruptura dos nervos renais – concluindo que os vasos de resistência de ratos transplantados respondem de forma mais intensa a estímulos constritores, e a resposta a impulsos dilatadores é ligeiramente atenuada após o transplante (50).

Apesar do conhecimento gerado ao longo de todos esses anos, os mecanismos envolvidos na redução da PA após a retirada dos nervos renais não estão totalmente esclarecidos. A busca em entender os mesmos levando em conta o papel dos vasos de resistência e do sistema nervoso autonômico parece ter importância fundamental no caminho a ser percorrido em direção ao melhor manejo e uso desses procedimentos na hipertensão e em outros estados de retenção de líquidos como a insuficiência cardíaca.

Anteriormente demonstramos que a desnervação renal é capaz de melhorar a função vascular da aorta em ratos SHR sete dias após o procedimento(51). Até o presente momento, não existem estudos do nosso conhecimento que tenham avaliado a reatividade vascular das artérias mesentéricas em ratos SHR 30 dias após a denervação renal. Sendo assim, sabendo-se do importante papel dos pequenos vasos na hipertensão e levando em conta o papel destes na hemodinâmica circulatória, no presente estudo, investigamos se a desnervação renal bilateral altera funcionalmente estes vasos nos animais espontaneamente hipertensos. Adicionalmente e considerando a falta de informação sobre a regulação autonômica face à desnervação renal na hipertensão, nesse estudo avaliamos a variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial, bem como o controle reflexo da circulação sobre a FC como possíveis mecanismos envolvidos na queda da PA 30 dias após a desnervação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

Observar as alterações de pressão arterial frente a Desnervação Renal Bilateral (DRB) e sua associação com a reatividade das artérias mesentéricas de resistência e com a modulação autonômica da circulação em animais SHR.

### **2.2 Objetivos Secundários**

Estudar as alterações da espessura da camada média da aorta e dos vasos mesentéricos 30 dias após da desnervação renal;

Avaliar a ingestão de água e comida, bem como volume urinário e quantidade de fezes dos animais no mesmo período;

Quantificar sódio, creatinina, e proteínas totais presentes na urina destes animais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados mediante aprovação do Comitê de Ética do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP, registrada com o nº 057/17. Os animais submetidos a procedimentos cirúrgicos receberam tratamento pós-operatório com antibiótico (Benzetacil, 1000000U/Kg) e analgésico (Dipirona Sódica, 50mg/Kg e Tramadol 3mg/Kg) visando o menor sofrimento para o animal.

#### 3.1 Animais e grupos

Foram utilizados ratos Wistar e SHR machos, de 250 e 300g, com 12 semanas de idade, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em caixas individuais, alocados no Biotério do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração (Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina/USP), em ambiente com temperatura (22<sup>o</sup> - 24<sup>o</sup>C) e luz controladas, em ciclo de 12 horas (claro-escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, dieta normoprotéica (12% de proteínas). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais a seguir relacionados:

GRUPO I - Grupo Normotenso *Sham* (NS) – 2 a 9 ratos Wistar submetidos à cirurgia de simulação de retirada nos nervos renais(*sham*);

GRUPO II - Grupo Normotenso Desnervado (ND) – 2 a 9 Wistar submetidos à Desnervação Renal Bilateral (DRB)

GRUPO III - Grupo Hipertenso SHR *Sham* (HS) – 2 a 11 ratos SHR submetidos à cirurgia de simulação de retirada nos nervos renais (*sham*);

GRUPO IV – Grupo Hipertenso SHR Desnervado (HD) – 2 a 10 ratos SHR submetidos à Desnervação Renal Bilateral (DRB).

O número de animais varia conforme o experimento, sendo especificado na legenda de cada figura correspondente.

#### 3.2 Procedimentos cirúrgicos

##### 3.2.1 Desnervação Renal Bilateral (DRB)

O procedimento cirúrgico de DRB foi adaptado e validado por Oliveira e cols., (1992) (25). Todo o procedimento foi realizado com o uso de Lupa e aumento de campo de 16 x (M900, DF Vasconcellos).

Os animais foram submetidos ao jejum de oito horas antes do procedimento cirúrgico e anestesiados com isoflurano 2,5%. Foi realizada então a tricotomia no flanco direito, esquerdo e limpeza do local com álcool etílico 70%. O método consistiu em colocar o animal em decúbito lateral e, após uma incisão no flanco esquerdo e identificação do rim, este foi rebatido de forma a expor a região da aorta e veia renal. Feito isto, foi realizada a secção dos nervos renais e a retirada da adventícia ao redor dos vasos utilizando-se a pinça de íris e tesoura oftálmica, com posterior limpeza geral da extensão – da aorta ao rim. Adicionalmente, fenol 10% foi utilizado para assegurar que não houvesse inervação remanescente. O mesmo procedimento foi realizado no lado direito. Os animais que realizaram a cirurgia *sham* tiveram a região da artéria e veia renal exposta seguida de leve manipulação com haste com ponta de algodão. A sutura da incisão foi realizada em duas etapas; sutura da camada muscular, e sutura da pele, ambas utilizando-se fio nylon 4.0. O mesmo procedimento foi realizado no lado direito (52). Visto que existem evidências que a reinervação pode se iniciar 15 dias após o procedimento (53), e uma vez que o experimento em questão visa avaliar as respostas frente à desnervação renal após 30 dias, os animais foram submetidos ao ato cirúrgico em 2 tempos diferentes. No dia 1 e no dia 15, como demonstrado a seguir no desenho experimental.

### **3.2.2 Canulação**

A canulação de artéria e veia femoral, para obtenção da pressão arterial (PA) e administração de drogas, respectivamente, foi realizada com animal anestesiado com isoflurano. As cânulas foram confeccionadas com cateter de polietileno em três diâmetros (PE10 diâmetro interno de 0,28 mm, PE 50 com 0,5 mm e Tygon diâmetro interno de 0,8 mm) soldados uns aos outros e preenchidos com solução fisiológica de NaCl 0,9% e heparina sódica (Liquemine-Roche, 5000ui) na proporção de 0,5 ml para 0,02 ml, respectivamente.

A parte mais fina (PE10 e/ou PE50) foi introduzida na luz dos vasos femorais sendo artéria e veia respectivamente, e a parte mais grossa (Tygon), passada pelo subcutâneo de pele até o dorso na região cervical do animal aonde foi exteriorizada, e fixada através de pontos cirúrgicos na pele(54).

### **3.3 Parâmetros Metabólicos**

#### **3.3.1 Gaiola Metabólica**

Trinta dias após a desnervação renal os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, alocadas em uma sala com ambiente controlado para temperaturas com intervalos entre 20 e 24°C, umidade relativa do ar de 50% e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O experimento levou 48 horas, destas, as primeiras 24 horas corresponderam ao período de adaptação, assim, os dados levados em consideração foram aqueles obtidos nas últimas 24 horas do experimento.

#### **3.3.2 Análises Urinárias**

Foram coletadas amostras de urina para a quantificação de sódio, creatinina, e proteínas totais e as quantificações foram realizadas conforme descrito a seguir.

A quantificação da concentração de sódio nas amostras de urina foi realizada utilizando o Kit ICT Diluent. Esse kit utiliza eletrodos íon-seletivos (EIS) para sódio, os quais possuem membranas seletivas específicas para esse íon. Essas membranas permitem a passagem seletiva dos íons alvo e geram um potencial elétrico entre os eletrodos de referência e medição, de acordo com a equação de Nernst. A voltagem obtida foi comparada com voltagens previamente determinadas a partir de calibradores, e a concentração iônica correspondente foi determinada.

Para quantificação da concentração de creatinina, foi utilizando o ensaio automatizado de bioquímica Creatinine2. Nesse ensaio, a creatinina presente na amostra reage com o ácido picrico em um pH alcalino, formando um complexo conhecido como creatinina-picrato. Esse complexo absorve luz na faixa de comprimento de onda de 500 nm. A taxa de aumento na absorbância é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra, permitindo a determinação quantitativa da creatinina.



Por fim, a quantificação da concentração de proteínas totais na urina foi realizada utilizando o ensaio Alinity c Urine/CSF Protein. Esse ensaio é baseado no método turbidimétrico e utiliza o cloreto de benzetônio como agente desnaturante de proteínas. Esse agente desnatura as proteínas presentes na urina, resultando na formação de uma fina suspensão. A turbidez dessa suspensão foi quantificada a 404 nm, permitindo a determinação da concentração de proteínas totais na amostra.

Antes da análise, todas as amostras de urina foram diluídas de acordo com as instruções do fabricante para os respectivos ensaios. A diluição das amostras foi necessária para a realização dos ensaios de sódio, creatinina e proteínas totais, seguindo a metodologia dos eletrodos íon-seletivos diluídos.

### **3.4 Avaliação hemodinâmica**

#### **3.4.1 Registro da Frequência Cardíaca, Pressão Arterial e avaliação da sensibilidade barorreflexa**

A medição direta da PA foi realizada 33 dias após a DRB. Durante o registro, o animal permaneceu acordado e com livre movimentação na própria gaiola. A cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm, permitindo livre movimentação do animal pela caixa durante todo o período do experimento. Para registrar as modificações na pressão arterial, a extensão foi conectada a um transdutor de sinais (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Hewlet-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2KHz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 4000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para administração de drogas vasoativas para avaliação da sensibilidade barorreflexa. Para tal, utilizamos

fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), para provocar aumento da pressão arterial, aumento este, que é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores. Em seguida nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, UA), foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores.

Para avaliação do índice de sensibilidade dos barorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAS foi comparado aos valores do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. Os índices de bradicardia e taquicardia reflexas foram obtidos pela razão entre o delta de variação da FC pelo delta de variação da PA.

### **3.5 Avaliação Autônômica**

#### **3.5.1 Variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial**

Os parâmetros para análise das variabilidades da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios do intervalo de pulso e PAS. As variabilidades destas mesmas variáveis foram quantificadas pelos desvios padrões, variâncias e pela raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos (RMSSD).

Para a análise no domínio da frequência, realizamos a análise espectral dos registros basais utilizando o método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A potência foi obtida usando-se séries temporais derivadas de intervalo de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (CardioSeries v2.4). As potências para as bandas de baixa frequência (LF, 0,20-0.75 Hz; modulação simpática) e alta frequência (HF, 0.75-3.0 Hz; modulação parassimpática) foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos, percentuais e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de LF e HF foram divididas pela variância subtraída da potência na banda de muito baixa frequência (Soares et al., 2006). O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foi estimado pela função de coerência. Foram considerados coerentes os valores de K maiores que 0.5 (55).

### 3.6 Eutanásia e descarte dos animais

Os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico (Tiopental Sódico/80mg/kg) aplicado pela via endovenosa, e posteriormente descartados em sacolas plásticas brancas devidamente fechadas, com identificação da espécie e quantidade e então armazenados em câmara fria até recolhimento e incineração dos mesmos pela prefeitura.

### 3.7 Perfusão e coleta de tecidos

Ao término do protocolo, os animais foram sacrificados por sobrecarga de anestésico (tiopental sódico/80mg/kg) e então os vasos mesentéricos retirados para posterior análise de reatividade vascular. Cinco animais de cada grupo foram perfundidos com solução fisiológica e Cloreto de Potássio (14 mmol/L) após o sacrifício e seus tecidos perfundidos com formol (10%). Destes animais foram coletados rins, aorta torácica e vasos mesentéricos para posteriores análises.

### 3.8 Avaliação dos vasos de resistência

Após a devida dissecação das artérias de resistência de segundo ramo (diâmetro interno  $\sim 180 \mu\text{m}$ ), e com o vaso livre de tecido adiposo, o mesmo foi cortado em segmentos de aproximadamente 2 mm de comprimento. O vaso foi cuidadosamente transferido para um miógrafo de arame (DMT 620M), conforme descrito por Mulvany e Halpern (1977) preservando sua integridade endotelial e elástica(47).

Foram introduzidos dois segmentos de tungstênio (40  $\mu\text{m}$  de diâmetro) no lúmen do vaso e o mesmo devidamente montado em um miógrafo de 2 câmaras (5 ml cada) e tensão isométrica para seu estudo de maneira isolada (DanishMyo Technology A/S, Aarhus, Denmark). Após 30 minutos de equilíbrio basal em solução de Krebs contendo 118,6 mmol L<sup>-1</sup>NaCl; 4,7 mmol L<sup>-1</sup>KCl; 2,5 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mmol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25,1 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> e 11,1 mmol L<sup>-1</sup> glicose; a 37°, mistura gasosa de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> e pH= 7,4, o segmento do vaso em estudo foi estirado até atingir diâmetro e tensão ótimos, mimetizando uma pressão transmural de 100 mmHg(47). Em

seguida, os segmentos de artéria foram lavados com a solução de Krebs e deixados por 30 minutos para novo período basal.

Após este procedimento, a capacidade máxima de contração do vaso foi testada expondo o mesmo a uma solução de alta concentração de  $K^+$  (100 mM). As capacidades de contração e vasodilatação estão expressas como porcentagem da contração máxima à solução de KCl. Os dados foram registrados pelo sistema de aquisição Powerlab e o software Chart 4.0 (AD instruments).

Para comprovação da integridade do endotélio nos segmentos em estudo, após estabilização do vaso, foi realizada uma pré-contração com fenilefrina ( $3 \times 10^{-6} M$ ) e realizada uma curva concentração-resposta frente à Acetilcolina ( $10^{-10}$  a  $10^{-5} M$  ACH). Apenas os vasos que apresentaram relaxamento  $\geq 80\%$  em relação à pré-contração foram utilizados para estudo. Em seguida, os anéis de aorta foram submetidos a uma curva concentração-resposta à fenilefrina administrada de forma cumulativa no banho em que se encontravam. As concentrações de fenilefrina utilizadas foram de  $10^{-10}$  a  $10^{-5} M$ .

N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu M$ ), um inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico (NO), foi utilizado a fim de avaliar o efeito do NO sobre o relaxamento endotélio-dependente. Após 30 minutos do inibidor no banho, nova curva concentração-resposta à acetilcolina foi realizada ( $10^{-10}$  a  $10^{-5} M$  ACH).

### **3.9 Comprovação da Desnervação Renal**

A completude da desnervação foi determinada pela medida do conteúdo renal de noradrenalina nos rins que foram congelados rapidamente e armazenado a  $-80^\circ C$  após a eutanásia dos animais. Estes foram então homogeneizados em ácido perclórico 0,1 N refrigerado. A noradrenalina foi extraída usando alumina e medida por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa, utilizando uma coluna analítica (ESA HR-80) otimizada para detecção eletroquímica (ESA Coulochem III) (56).

### **3.10 Análises histológicas**

Aortas de rato dos diferentes grupos citados acima foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^\circ C$ . Após descongelamento, seguiram rotina

histológica clássica para inclusão em parafina. Cortes de 5 $\mu$ m de espessura foram distendidos em lâminas de vidro e submetidos à técnica histoquímica do Picrossírius (57).

As lâminas foram escaneadas com auxílio do aparelho Scanscope CS System (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), utilizando a objetiva de 20x.

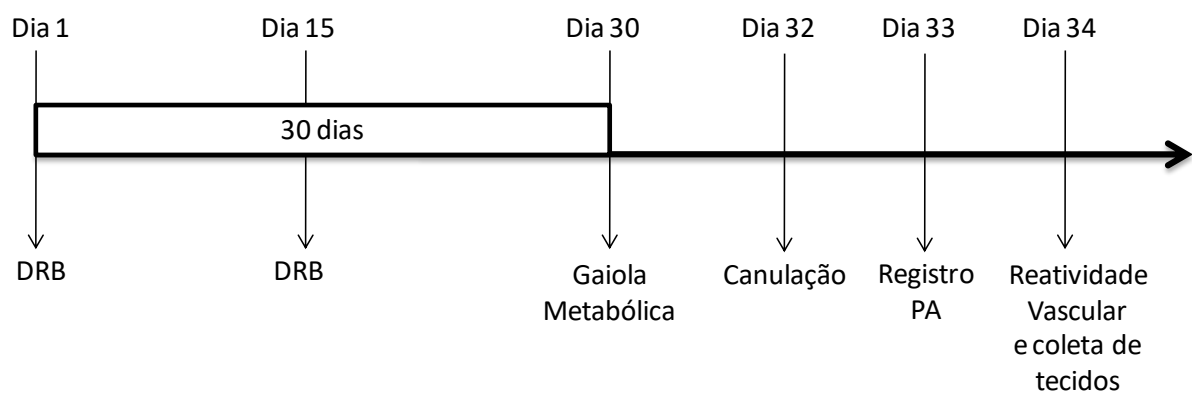
As imagens capturadas (registradas em extensão svx) foram analisadas através do Software Image Scope<sup>®</sup>, indicando a fração de área tecidual ocupada pelas fibras de colágeno (identificadas na cor vermelha).

### **3.11 Análise Estatística**

O tamanho da amostra do presente estudo foi determinado de acordo com experiências prévias de nosso grupo e com a literatura (58-60), sendo estipulado um número mínimo de 5 animais para os principais experimentos. As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Uma vez definidos os padrões de distribuição amostral, a comparação entre dois grupos foi calculada utilizando o teste t. Quando apropriado, foi utilizado ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido de teste complementar de Sidak. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os resultados que apresentaram um valor de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### **3.12 Sequência Experimental**

Sabendo-se que em ratos espontaneamente hipertensos a reinervação renal pode se iniciar 15 dias após a DRB (61), realizamos nova intervenção cirúrgica no décimo quinto dia, garantindo assim, que os animais permanecessem desnervados.



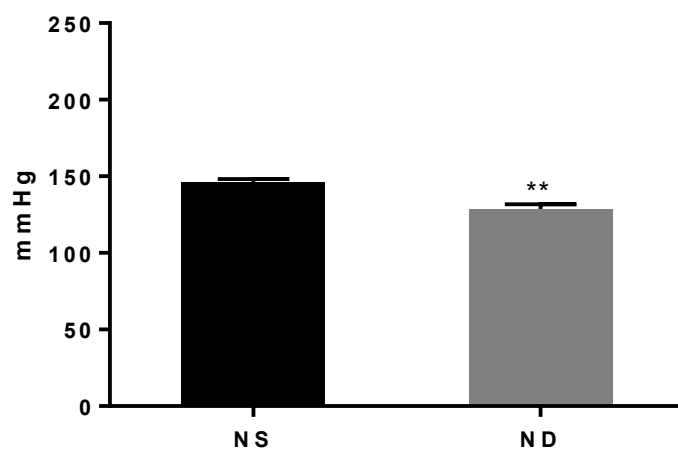
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos da Desnervação Renal Bilateral nos animais normotensos

#### 4.1.1 Resultados Hemodinâmicos

##### 4.1.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

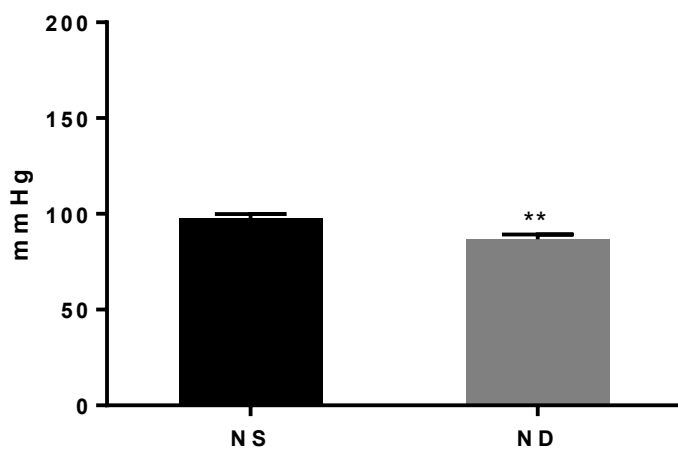
A PAS apresentou-se mais baixa nos animais normotensos desnervados (NS=  $145,64 \pm 2,56$  mmHg e ND=  $128,7 \pm 3,06$ mmHg).



**Figura 1:** Pressão Arterial Sistólica. NS: Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6). \*\* p=0,001 vs. NS.

##### 4.1.1.2 Pressão Arterial Diastólica (PAD)

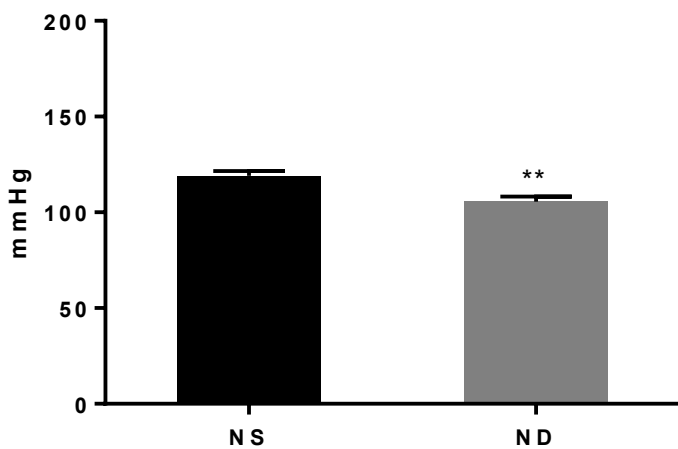
A pressão arterial diastólica apresentou o mesmo comportamento da pressão sistólica, com queda significativa nos animais desnervados em relação ao seu controle (NS=  $97,61 \pm 2,22$ mmHg e ND =  $86,75 \pm 2,54$ mmHg).



**Figura 2:** Pressão Arterial Diastólica. NS: Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6). \*\* p=0,007 vs. NS. Teste t-Student

#### 4.1.1.3 Pressão Arterial Média (PAM)

Acompanhando a PAS e a PAD, os valores de pressão arterial média também apresentaram-se significativamente mais baixa nos animais desnervados em relação a seus controles (NS=119,14 ± 2,39mmHg e ND= 105,5 ± 2,74mmHg), demonstrando que a DRB leva a diminuição da pressão em animais normotensos.

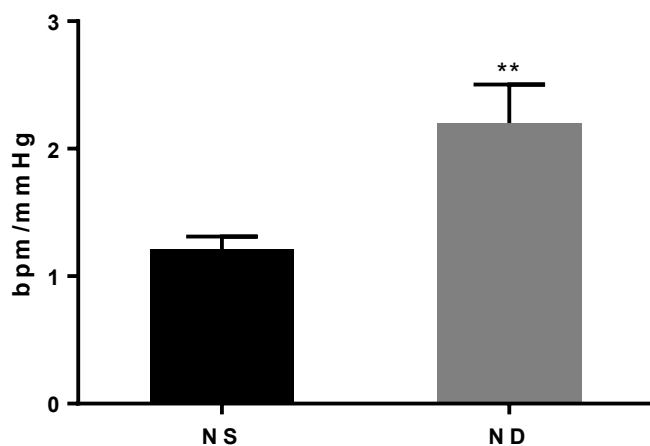


**Figura 3:** Pressão Arterial Média. NS: Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6) \*\*p=0,002 vs. NS. Teste t-Student



#### 4.1.1.4 Resposta Bradicárdica

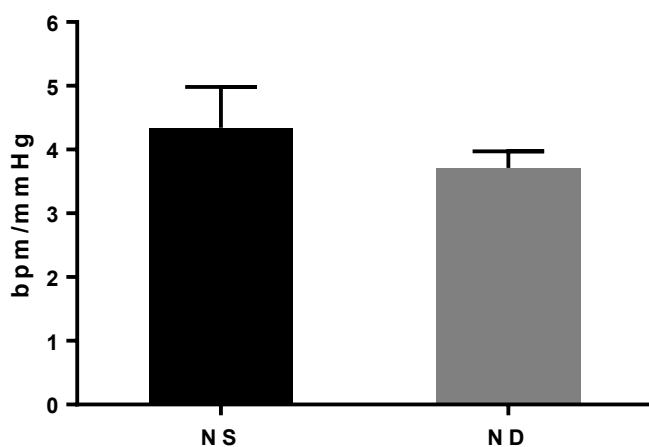
Pode-se observar uma maior resposta bradicárdica nos animais normotensos com a retirada dos nervos renais em relação a seu controle (NS=  $1,21 \pm 0,1$  e ND=  $2,2 \pm 0,3$  bpm/mmHg).



**Figura 4:** Resposta Bradicárdica. NS: Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6) \*\*p=0,003 vs. NS. Teste t-Student.

#### 4.1.1.5 Resposta Taquicárdica

A resposta taquicardia não se alterou entre os animais normotensos com a desnervação renal (NS =  $4,34 \pm 0,64$ ; ND =  $3,71 \pm 0,26$  bpm/mmHg)



**Figura 5:** Resposta taquicárdica. NS: normotenso *sham* (n=9); ND: normotenso desnervado (n=7). Teste t-student.

#### 4.1.1.6 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

A variabilidade da FC entre os grupos estudados não apresentou diferença 33 dias após a retirada dos nervos renais nos animais normotensos.

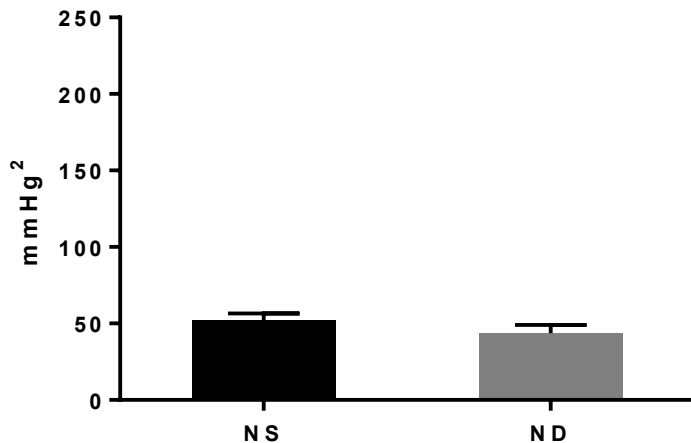
Tabela 1: Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais normotensos.

	NS	ND
<b>FC (bpm)</b>	376,42 ± 10,44	377,32 ± 11,06
<b>IP (ms)</b>	162,79 ± 4,61	161,98 ± 4,79
<b>DP IP (ms)</b>	13,21 ± 1,16	11,54 ± 0,92
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	185,32 ± 32,13	137,4 ± 22,22
<b>RMSSD (ms)</b>	7,31 ± 0,67	6,67 ± 0,6
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	8,8 ± 1,77	8,01 ± 0,79
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	16,95 ± 3,68	13,64 ± 2,2
<b>LF %</b>	16,22 ± 1,2	16,33 ± 1,15
<b>HF %</b>	32,66 ± 3,35	29,66 ± 2,85
<b>LF (nu)</b>	34,77 ± 2,61	37 ± 2,83
<b>HF (nu)</b>	65,22 ± 2,61	63 ± 2,83
<b>LF/HF</b>	0,62 ± 0,08	0,66 ± 0,08

Tabela representativa das médias dos parâmetros de variabilidade da Frequência Cardíaca. NS=normotenso *sham*; ND=normotenso desnervado. FC (bpm): Frequência cardíaca; IP (ms): Intervalo de pulso; DP IP (ms): Desvio Padrão do Intervalo de pulso; Var IP (ms<sup>2</sup>): Variância do Intervalo de Pulso; RMSSD (ms): Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos; LF IP: Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>), percentual (%) e normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência absoluto (ms<sup>2</sup>), percentual (%) e normalizado (un); LF/HF IP: Balanço simpato-vagal. Teste t-Student.

#### 4.1.1.7 Variância Pressão Arterial Sistólica (VPAS)

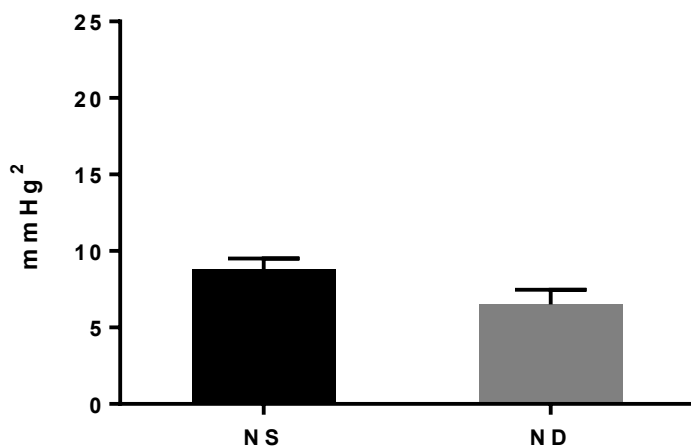
A VPAS não se alterou com a desnervação renal entre os normotensos (NS = 51,76 ± 4,8 N=9; ND = 43,71 ± 5,37 mmHg<sup>2</sup>).



**Figura 6:** Variância da Pressão Arterial Sistólica. NS: Normotense *sham* (n=9); ND: Normotense desnervado (n=6). Teste t-Student.

#### 4.1.1.8 Modulação de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (LF PAS)

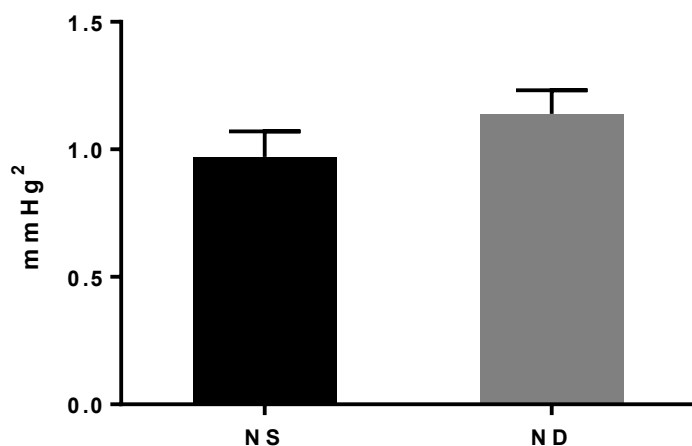
A LF PAS, que representa a ativação nervosa simpática sobre a pressão sistólica não foi diferente nos animais desnervados em relação a seu controle *sham* (NS =  $8,81 \pm 0,7$ ; ND =  $6,51 \pm 0,95\text{mmHg}^2$ ).



**Figura 7:** Modulação de baixa frequência da Pressão Arterial Sistólica. NS: Normotense *sham* (n=9); ND: Normotense desnervado (n=6). Teste t-Student.

#### 4.1.1.9 Alfa LF

Alfa LF, que reflete a função barorreflexa, não é diferente entre os grupos normotensos (NS =  $0.97 \pm 0,1$ ; ND =  $1,140 \pm 0,092$  ms/mmHg) 0 -1



**Figura 8:** Alfa LF. NS: Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6). Teste t-Student.

## 4.1.2 Resultados Metabólicos

### 4.1.2.1 Gaiola Metabólica

Os parâmetros metabólicos estudados não se alteraram entre os animais normotensos com a retirada dos nervos renais.

**Tabela 2:** Ingestão de água, volume urinário, ingestão de ração e volume de fezes dos animais normotensos.

	NS	ND
Água (mL)	34,77±2,97	34,63±2,58
Urina (mL)	13,18±0,86	13±1
Ração (g)	23,27±0,79	24,91±1,16
Fezes (g)	14,3±0,93	12,93±1,35
Balanco hídrico (%)	37,65±6,68	38,36±3,5

Tabela representativa das médias dos parâmetros metabólicos. NS=normotenso *sham* (n=9); ND=normotenso desnervado (n=6). T-student.

### 4.1.2.2 Análises Urinárias

A retirada dos nervos renais não alterou a quantidade de creatinina, sódio ou proteína urinários 30 dias após a intervenção.

**Tabela 3:** Creatinina, sódio e proteína urinários dos animais normotensos.

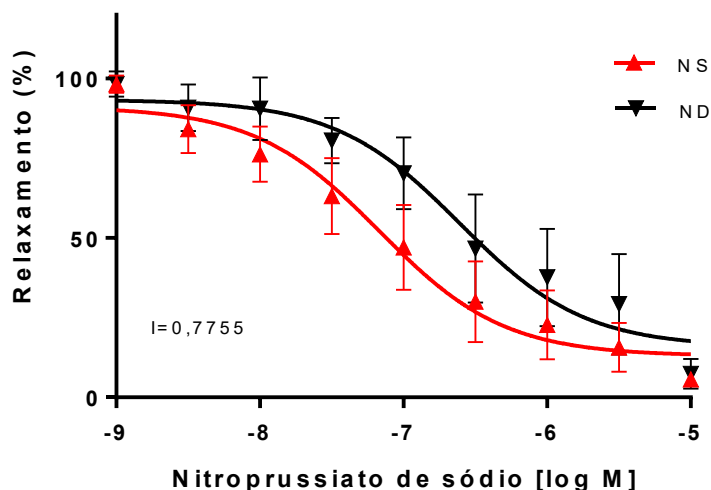
	NS	ND
Creatinina g/L	1±0,09	1,18±0,07
Sódio mEq/L	88,5±3,83	91,5±5
Proteína g/L	1,49±0,1	1,4±0,05

Tabela representativa das médias das análises urinárias. NS=normotenso *sham*; ND=normotenso desnervado; Teste t-Student

### 4.1.3 Resultados Reatividade Vascular

#### 4.1.3.1 Relaxamento endotélio-independente

A fim de avaliar o relaxamento independente do endotélio, curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio foram realizadas. Nos animais normotensos, a desnervação renal não alterou o relaxamento endotélio-independente das artérias mesentéricas de resistência

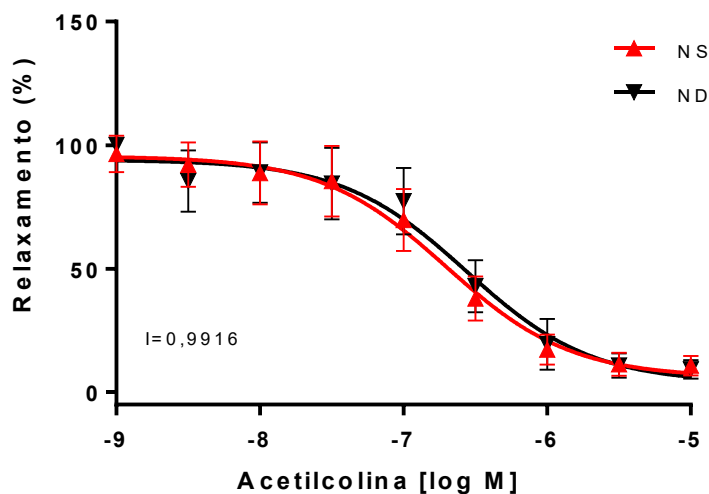


**Figura 9:** Curva concentração-resposta Nitroprussiato de sódio. NS: Normotenso *sham* (n=6); ND: Normotenso desnervado (n=5). ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.1.3.2 Relaxamento endotélio-dependente

Com o objetivo de caracterizar uma possível disfunção endotelial, foram conduzidas curvas concentração-resposta com acetilcolina, que provoca um relaxamento

endotélio-dependente. Em animais normotensos, a remoção dos nervos renais não resultou em alterações no relaxamento dependente do endotélio.

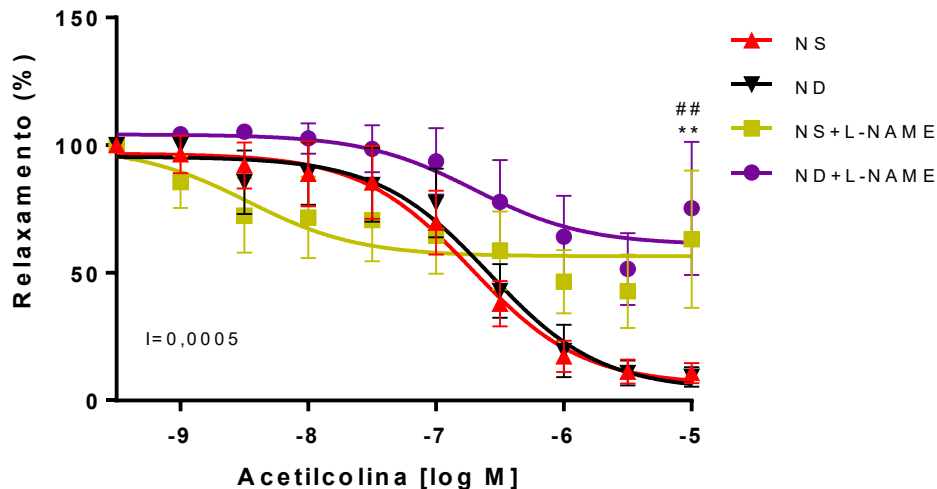


**Figura 10:** Curva concentração-resposta Acetilcolina. Normotenso *sham* (n=9); ND: Normotenso desnervado (n=6). ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.1.3.3 Curva concentração-resposta Acetilcolina com L-NAME

N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico (NO), foi utilizado previamente a curva concentração-resposta à acetilcolina, dessa forma foi possível avaliar outras vias de vasodilatação, que não a do NO.

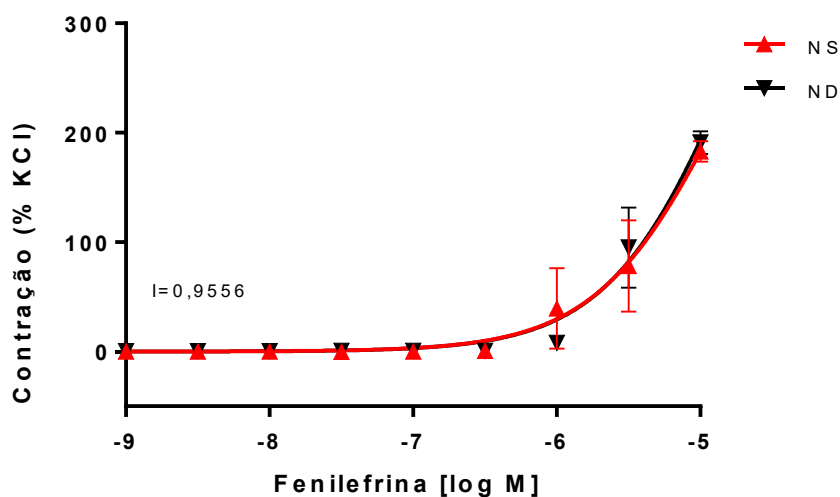
Na curva com L-NAME dos ratos normotensos, podemos observar que mesmo com a inibição de óxido nítrico, as artérias destes animais não perdem completamente o relaxamento, evidenciando que existe outra via de vasodilatação nas artérias mesentéricas de resistência de animais normotensos.



**Figura 11:** Curva concentração-resposta Acetilcolina e Curva concentração-resposta Acetilcolina + L-NAME. L-NAME: N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster. NS: Normotenso *sham* (n=6); ND: Normotenso Desnervado (n=5); NS+L-NAME: (n=6); ND+L-NAME: (n=5). \*\*p<0,01 NS vs. NS+L-NAME; ##p<0,01 ND vs. ND+L-NAME. ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak

#### 4.1.3.4 Curva concentração-resposta Fenilefrina

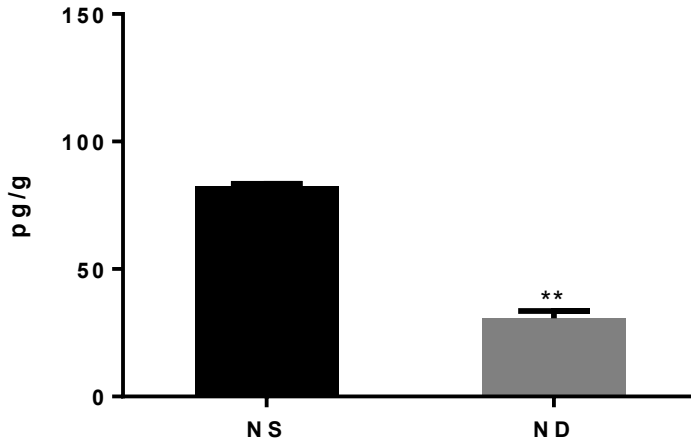
A resposta vasoconstrictora avaliada através da curva concentração-resposta à fenilefrina (agonista  $\alpha$ -1) não se alterou alterada com a retirada dos nervos renais nos ratos normotensos.



**Figura 12:** Curva concentração-resposta Fenilefrina. Normotenso *sham* (n=6); ND: Normotenso desnervado (n=5). ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.1.4 Noradrenalina Renal

Os animais desnervados apresentaram uma menor quantidade de noradrenalina nos rins, demonstrando a efetividade da técnica utilizada para retirada dos nervos renais (NS =  $82,5 \pm 0,92\text{pg}$ ; ND =  $30,74 \pm 2,88\text{pg}$ ).



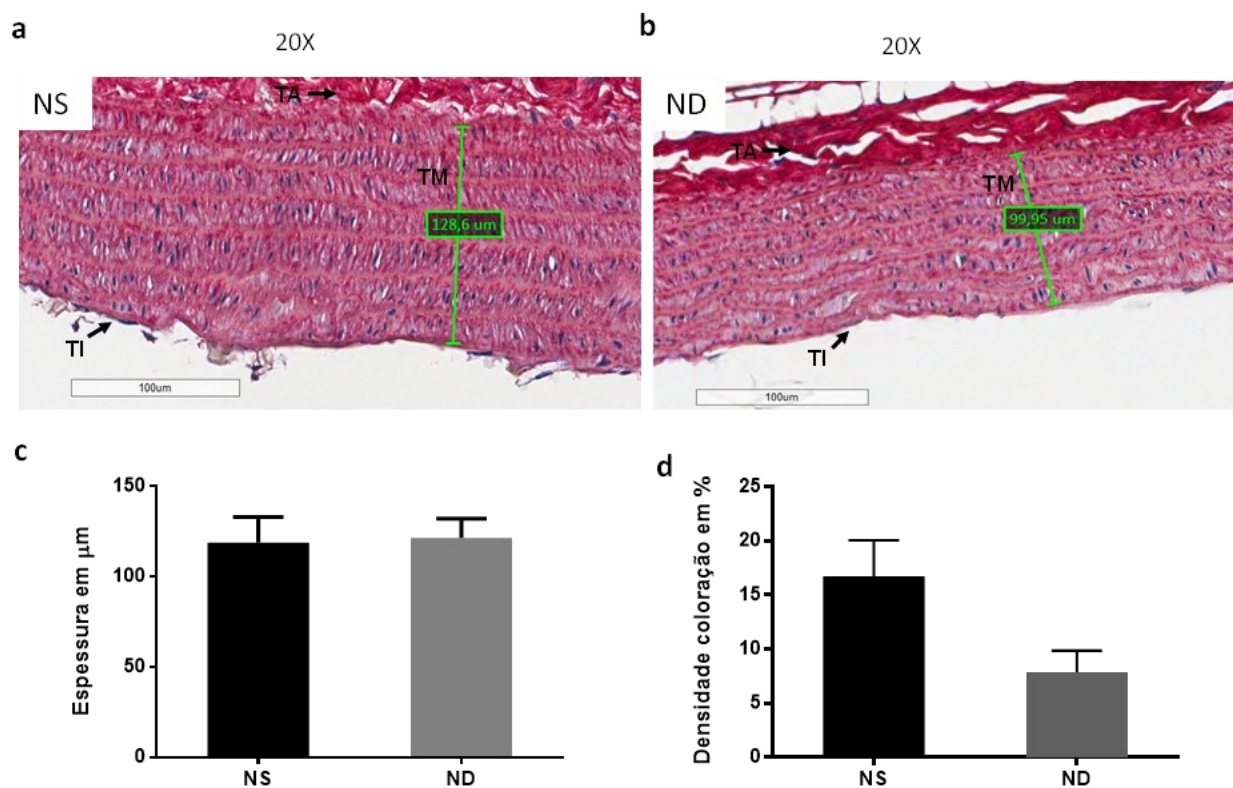
**Figura 13:** Noradrenalina renal. NS: Normotense *sham*; ND: Normotense desnervado (n=2). \*\*p=0,003 vs. NS. Teste t-Student.

#### 4.1.5 Resultados histologia

##### 4.1.5.1 Camada média da aorta

A desnervação renal não demonstrou influenciar significativamente a espessura média da parede da aorta em animais normotensos (NS =  $119,0 \pm 14,09\mu\text{m}$  e ND =  $121,4 \pm 10,68\mu\text{m}$ ). No entanto, se observou uma tendência à diminuição na fração de área ocupada pelas fibras de colágeno no grupo normotense desnervado ( $16,73 \pm 3,33\%$  e ND =  $7,88 \pm 1,97\%$ ; p=0,06).

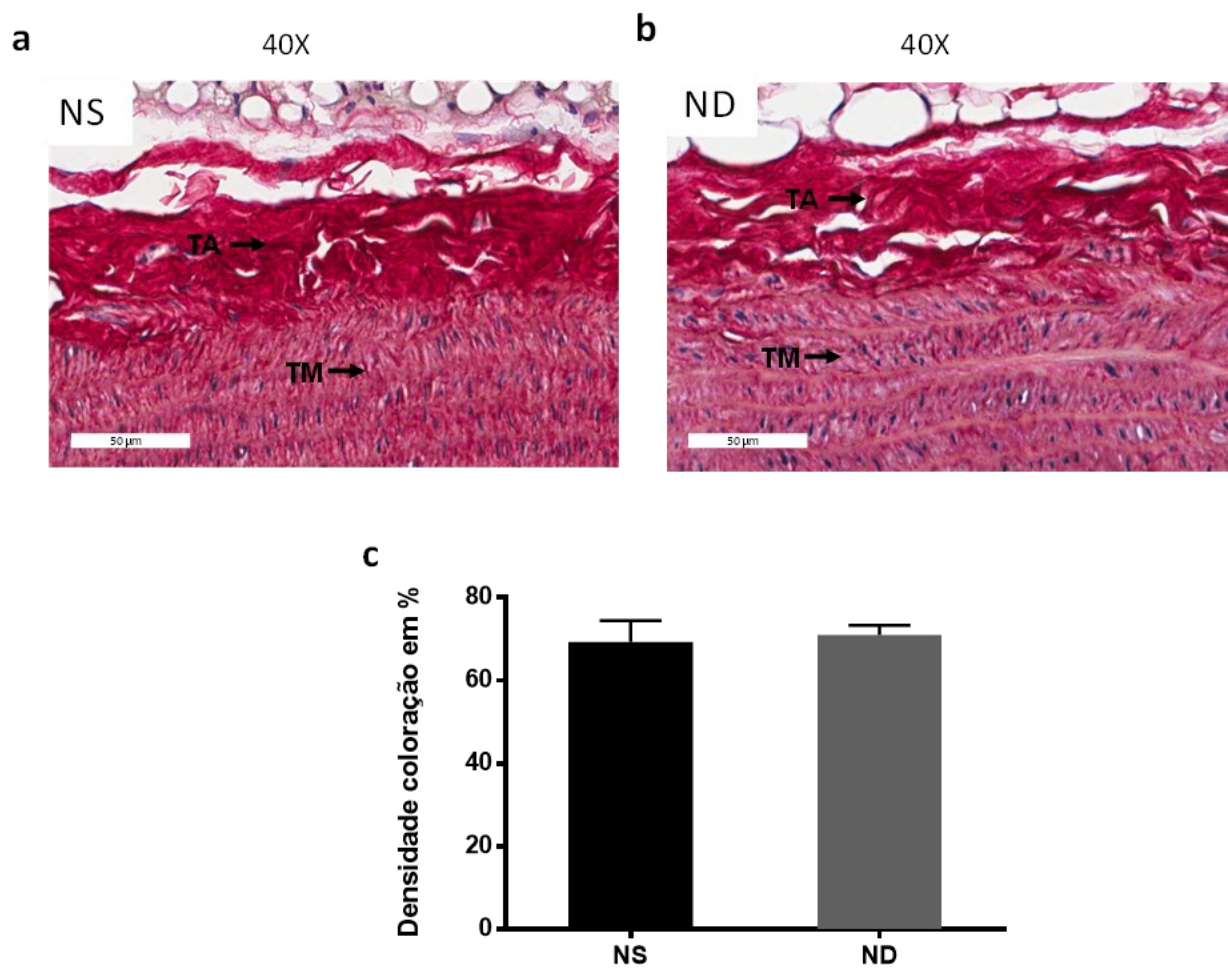




**Figura 14:** Cortes transversais de aorta de ratos normotensos submetidos à cirurgia *sham* (a) ou à desnervação renal (b), corados pelo Picrosirius e analisados sob a incidência de luz normal policromática. Medida da espessura da camada média da aorta expressa em  $\mu\text{m}$ , representada pela linha verde. Gráfico representativo da espessura da camada média da aorta (c). Fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada média da aorta (d). TA: Túnica Adventícia; TM: Túnica Média; TI: Túnica Íntima NS: Normotenso *sham*; ND: Normotenso desnervado (n=4). Teste t-Student.

#### 4.1.5.2 Camada adventícia da aorta

A intervenção não provocou alterações na fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada adventícia da aorta dos animais normotensos (NS=  $69,31 \pm 5,09\%$  e ND=  $71,01 \pm 2,31\%$ ).



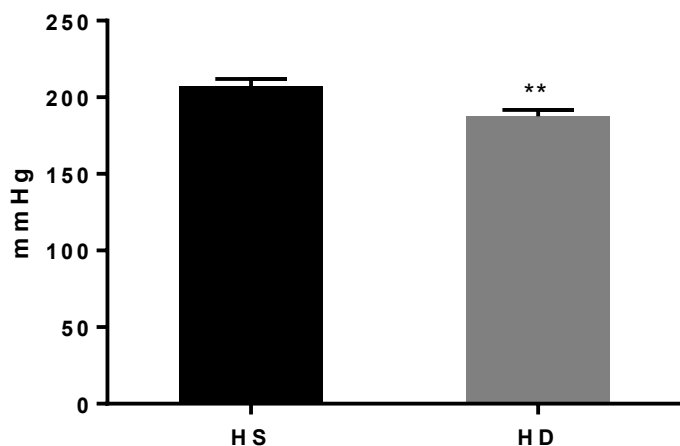
**Figura 15:** Cortes transversais de aorta de ratos normotensos submetidos à cirurgia *sham* (a) ou à desnervação renal (b), corados pelo Picrosirius e analisados sob a incidência de luz normal policromática. Fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada adventícia da aorta (c). TA: Túnica Adventícia; TM: Túnica Média. NS: Normotenso *sham*; ND: Normotenso desnervado (n=4). Teste t-Student.

## 4.2 Efeitos da Desnervação Renal Bilateral nos animais hipertensos

### 4.2.1 Resultados Hemodinâmicos

#### 4.2.1.1 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

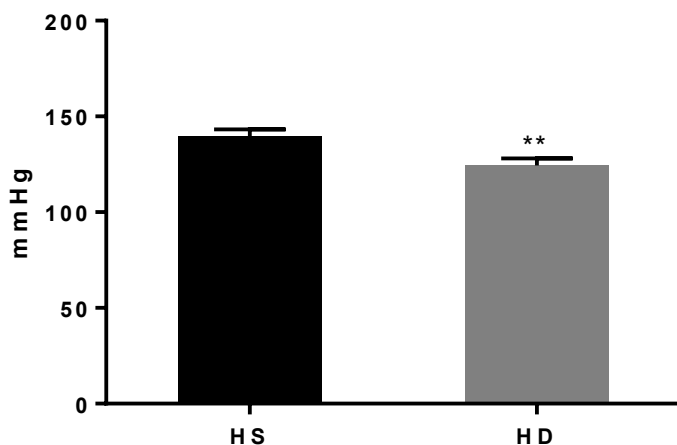
Os animais hipertensos desnervados exibiram valores de PAS mais baixos em relação aos hipertensos *sham* (HS= 207,15 ± 4,75mmHg e HD= 187,58 ± 4,26mmHg).



**Figura 16:** Pressão Arterial Sistólica. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). \*\*p=0,006 vs. HS. Teste t-Student.

#### 4.2.1.2 Pressão Arterial Diastólica (PAD)

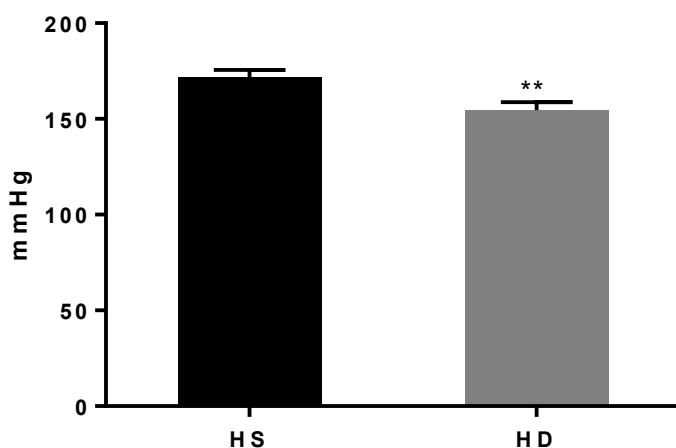
Seguindo o comportamento da PAS, a pressão arterial diastólica também se apresentou mais baixa nos hipertensos desnervados em relação a seu controle *sham* (HS= 139,7 ± 3,57mmHg e HD= 124,45 ± 3,7mmHg).



**Figura 17:** Pressão Arterial Diastólica. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). \*\*p=0,008 vs. HS. Teste t-Student.

#### 4.2.1.3 Pressão Arterial Média (PAM)

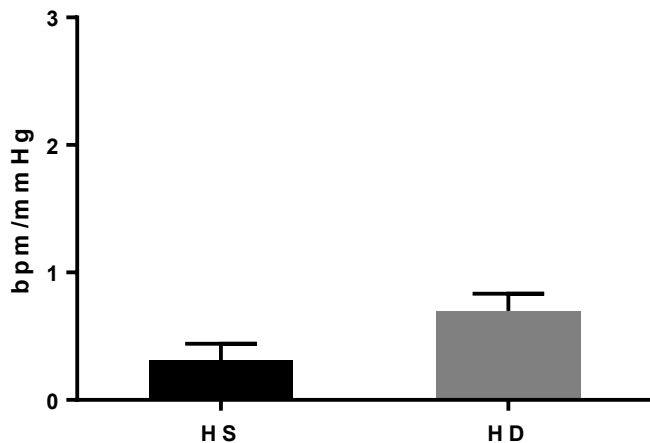
Acompanhando a PAS e a PAD, os valores de pressão arterial média também se apresentaram significativamente mais baixa nos hipertensos desnervados (HS=  $171,5 \pm 4,07$ mmHg e HD=  $154,65 \pm 4,03$ mmHg), demonstrando que a DRB é capaz de atenuar a hipertensão em ratos SHR.



**Figura 18:** Pressão Arterial Média. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). \*\*p=0,008 vs. HS. Teste t-Student.

#### 4.2.1.4 Resposta Bradicárdica

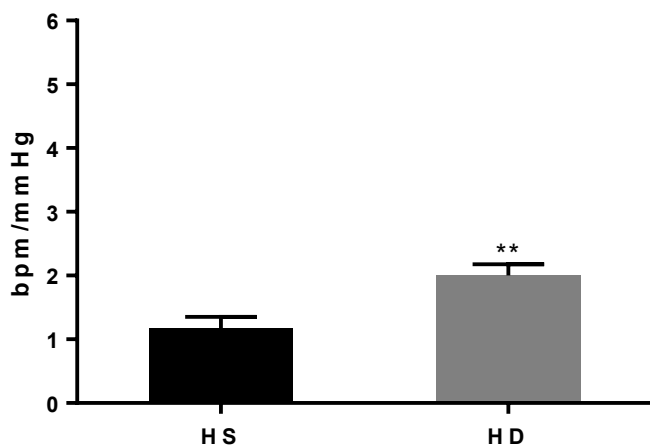
Apesar de não significativo ( $p=0,054$ ), pode-se observar uma tendência de aumento da resposta bradicárdica nos animais hipertensos desnervados em relação aos hipertensos *sham* (HS=  $0,31 \pm 0,13$  e HD=  $0,7 \pm 0,13$  bpm/mmHg).



**Figura 19:** Resposta Bradicárdica. HS: Hipertenso *sham* (n=9); HD: Hipertenso Desnervado (n=9). Teste t-Student.

#### 4.2.1.5 Resposta Taquicárdica

A resposta taquicardia apresentou-se aumentada nos animais hipertensos desnervados em relação ao seu controle (HS =  $1,18 \pm 0,17$  e HD =  $2 \pm 0,17$  bpm/mmHg).



**Figura 20:** Resposta Taquicárdica. HS: Hipertenso *sham* (n=9); HD: Hipertenso Desnervado (n=11). \*\* p=0,004 vs. HS. Teste t-Student.

#### 4.2.1.6 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

A variabilidade da frequência cardíaca não apresentou diferença 33 dias após a retirada dos nervos renais entre os animais hipertensos.

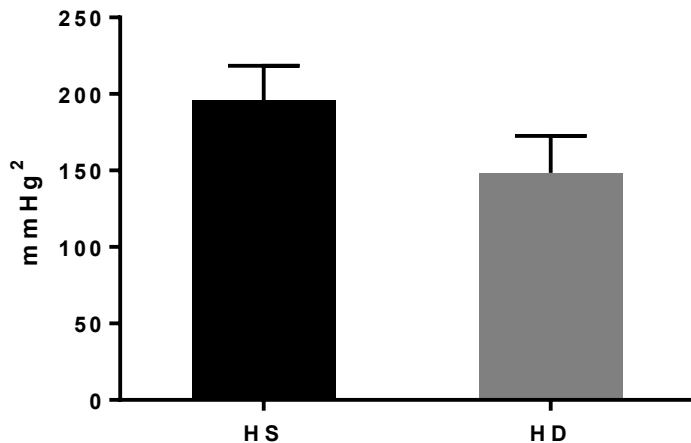
Tabela 4: Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais hipertensos.

	HS	HD
FC (bpm)	371,73 ± 11,48	361,89 ± 9,26
IP (ms)	164,42 ± 4,96	167,96 ± 4,01
DP IP (ms)	15 ± 0,92	13,49 ± 1,07
Var IP (ms <sup>2</sup> )	233,57 ± 27,32	192,45 ± 31,44
RMSSD (ms)	7,61 ± 1,38	6,97 ± 0,78
LF IP (ms <sup>2</sup> )	4,31 ± 1,04	5,98 ± 1,13
HF IP (ms <sup>2</sup> )	20,96 ± 7,37	14,65 ± 3,87
LF %	9,9 ± 1,17	13,2 ± 1,23
HF %	35 ± 6,28	30,2 ± 4,16
LF (nu)	34,77 ± 3,55	32 ± 3,12
HF (nu)	73,72 ± 3,55	68 ± 3,12
LF/HF	0,44 ± 0,08	0,58 ± 0,08

Tabela representativa das médias dos parâmetros de variabilidade da Frequência Cardíaca. HS=hipertenso *sham*; HD=hipertenso desnervado. FC (bpm): Frequência cardíaca; IP (ms): Intervalo de pulso; DP IP (ms): Desvio Padrão do Intervalo de pulso; Var IP (ms<sup>2</sup>): Variância do Intervalo de Pulso; RMSSD (ms): Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos; LF IP: Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>), percentual (%) e normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência absoluto (ms<sup>2</sup>), percentual (%) e normalizado (un); LF/HF IP: Balanço simpato-vagal. Teste t-Student.

#### 4.2.1.7 Variância Pressão Arterial Sistólica (VPAS)

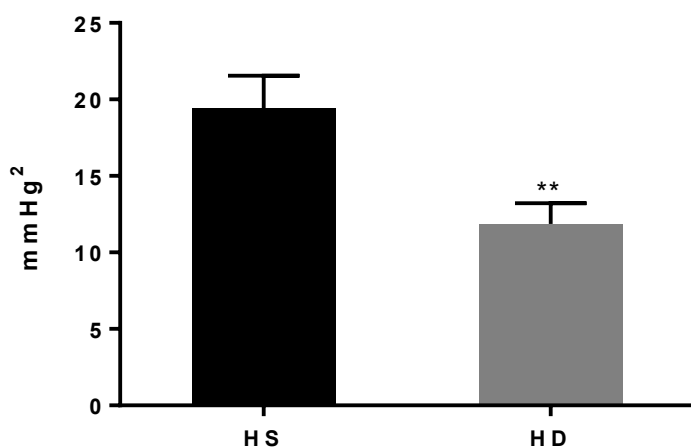
A VPAS não se alterou com a desnervação renal entre os hipertensos (HS = 195,9 ± 22,54 e HD = 148,4 ± 24,2mmHg<sup>2</sup>).



**Figura 21:** Variância da Pressão Arterial Sistólica. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). Teste t-Student.

#### 4.2.1.8 Modulação de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (LF PAS)

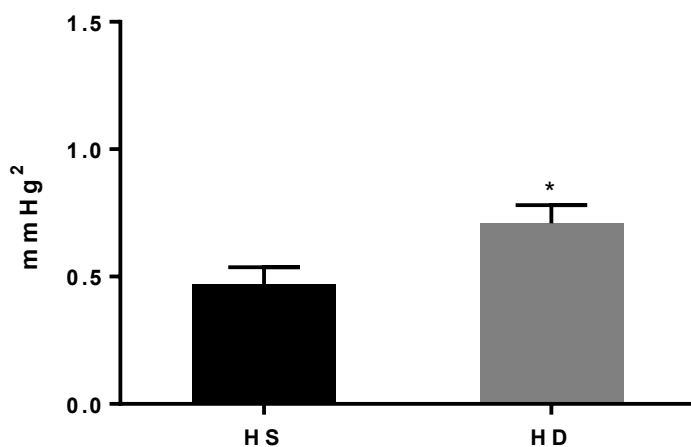
A modulação simpática sobre a pressão sistólica diminuiu nos animais hipertensos desnervados quando comparados ao grupo hipertenso com os nervos renais intactos (HS =  $19,42 \pm 2,13$  e HD =  $11,87 \pm 1,35$ mmHg<sup>2</sup>).



**Figura 22:** Modulação de baixa frequência da Pressão Arterial Sistólica. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). \*\*p=0,009 vs. HS. Teste t-Student.

#### 4.2.1.9 Alfa LF

O índice alfa LF, apresentou-se aumentada nos hipertensos desnervados em relação aos hipertensos *sham* (HS =  $0,47 \pm 0,06$  e HD =  $0,71 \pm 0,07$  ms/mmHg<sup>2</sup>), evidenciando que a DRB é capaz de melhorar a função barorreflexa de ratos espontaneamente hipertensos.



**Figura 23:** Alfa LF. HS: Hipertenso *sham* (n=11); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). \* p=0,02 vs. HS. Teste t-Student.

## 4.2.2 Resultados Metabólicos

### 4.2.2.1 Gaiola Metabólica

Os animais hipertensos submetidos à desnervação renal ingeriram mais água em relação ao seu controle *sham*. Não foram encontradas diferenças nos demais parâmetros metabólicos.

**Tabela 5:** Ingestão de água, volume urinário, ingestão de ração e volume de fezes dos animais hipertensos.

	HS	HD
Água (mL)	31,81±2,13	40,87±2,72*
Urina (mL)	12,64±2,26	11,92±1,59
Ração (g)	20,15±1,43	23,96±1,87
Fezes (g)	11,77±0,77	12,14±1
Balanço hídrico (%)	38,71±4,57	30±3,75

Tabela representativa das médias dos parâmetros metabólicos. HS=hipertenso *sham* (n=7); HD=hipertenso desnervado (n=7). \*p=0,02 vs. HS t-student.

### 4.2.2.2 Análises Urinárias



A retirada dos nervos renais não alterou a quantidade de creatinina, sódio ou proteína urinários em ratos SHR 30 dias após a intervenção.

**Tabela 6:** Creatinina, sódio e proteína urinários dos animais hipertensos.

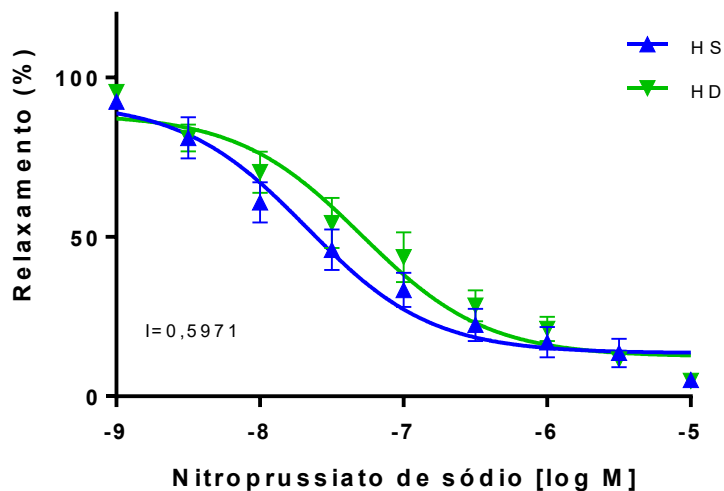
	HS	HD
Creatinina g/L	0,88±0,17	0,89±0,09
Sódio mEq/L	69,75±5,46	72,5±6,56
Proteína g/L	2,17±0,15	2,21±0,07

Tabela representativa das médias das análises urinárias. HS=hipertenso *sham*; HD=hipertenso desnervado. Teste t-Student

## 4.2.3 Resultados Reatividade Vascular

### 4.2.3.1 Relaxamento endotélio-indepedente

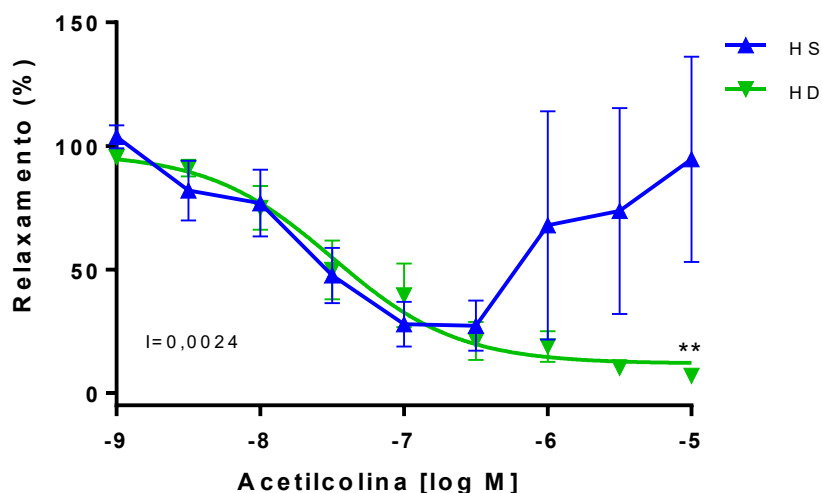
A curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio, que avalia o relaxamento independente do endotélio apresentou comportamento semelhante entre os hipertensos, evidenciando que a desnervação renal não altera esta função em ratos SRH.



**Figura 24:** Curva concentração-resposta Nitroprussiato de sódio. HS: Hipertenso *sham* (n=9); HD: Hipertenso Desnervado (n=11). ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

### 4.2.3.2 Relaxamento endotélio-depentente

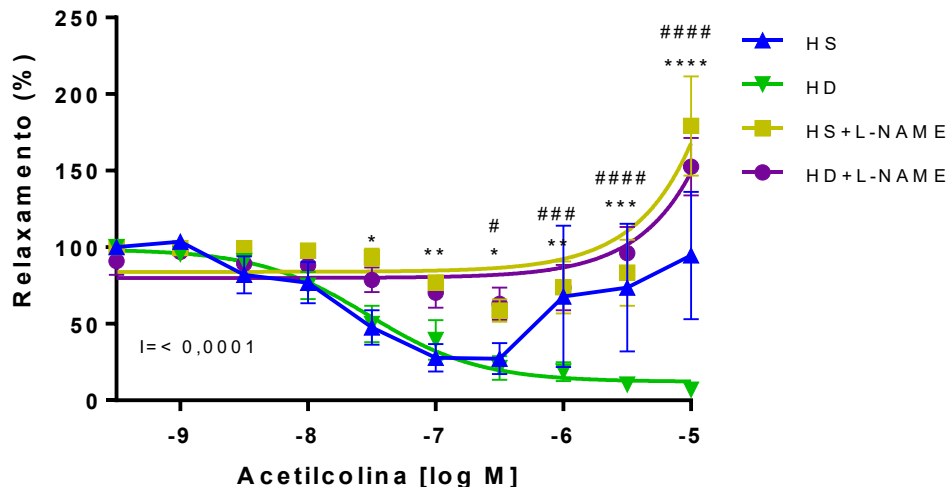
Os animais hipertensos *sham* apresentaram uma vasoconstrição sustentada ao final da curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh), o que indica a presença de disfunção endotelial nesses animais. Contrariamente, os ratos hipertensos desnervados, apresentaram relaxamento completo das artérias de resistência, indicando que a desnervação renal tem o potencial de prevenir a disfunção endotelial nestes vasos em ratos SRH.



**Figura 25:** Curva concentração-resposta Acetilcolina. HS: Hipertenso *sham* (n=8); HD: Hipertenso Desnervado (n=10). p=0,0051 vs. HS. ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.2.3.3 Curva concentração-resposta Acetilcolina com L-NAME

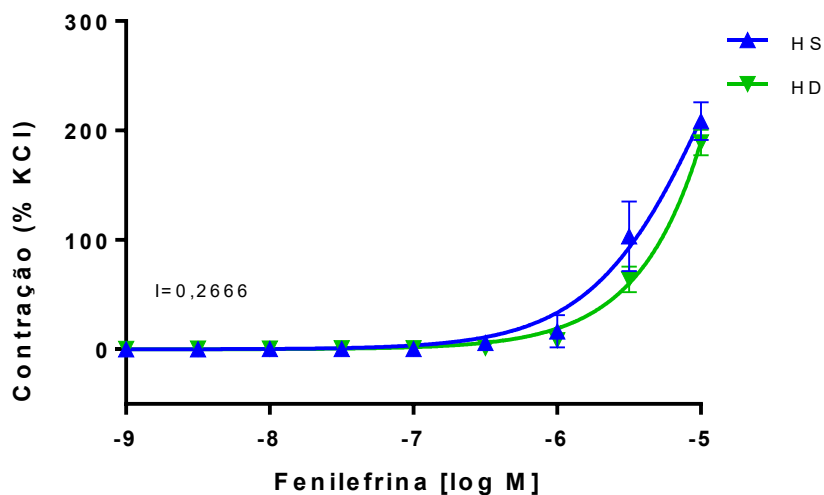
Ao inibir o óxido nítrico, os animais hipertensos apresentaram uma importante vasoconstrição que se inicia na dose ACh -7,5 logM em ambos os grupos e se intensifica até a última dose, evidenciando que a ausência de óxido nítrico impede o relaxamento das artérias mesentéricas nos animais hipertensos, e a DRB não foi capaz de alterar esta resposta.



**Figura 26:** Curva concentração-resposta Acetilcolina e Curva concentração-resposta Acetilcolina + L-NAME. L-NAME: N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster. HS: Hipertenso *sham* (n=8); HD: Hipertenso Desnervado (n=10); HS+L-NAME: (n=8); HD+L-NAME: (n=11). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 HS vs. HS+L-NAME; #p<0,05; ###p<0,001; ####p<0,0001, HD vs. HD+L-NAME. ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.2.3.4 Curva concentração-resposta Fenilefrina

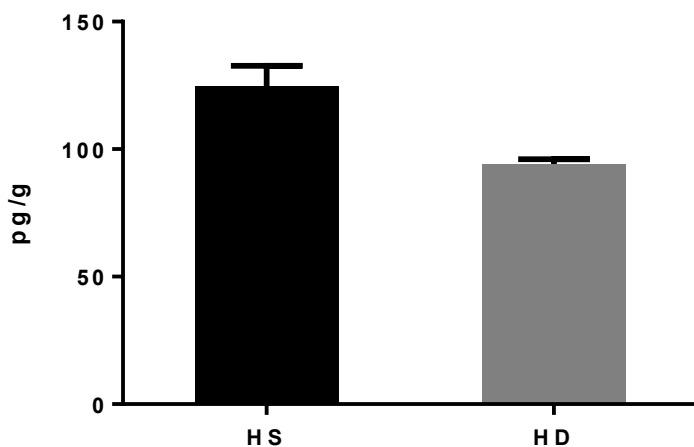
A resposta vasoconstrictora avaliada através da curva concentração-resposta à fenilefrina apresentou comportamento semelhante entre os animais hipertensos, demonstrando que a desnervação renal não influencia na função contrátil das artérias de resistência de ratos SHR.



**Figura 27:** Curva concentração-resposta Fenilefrina. HS: Hipertenso *sham* (n=8); HD: Hipertenso Desnervado (n=11). ANOVA de 2 vias seguida de teste complementar de Sidak.

#### 4.2.4 Noradrenalina Renal

Os animais hipertensos desnervados continham uma menor quantidade de noradrenalina nos rins 33 dias após a desnervação renal quando comparados ao seu controle *sham*. Apesar de não significativa, esta diferença demonstra a efetividade da técnica utilizada para retirada dos nervos renais (HS =  $124,5 \pm 8,16\text{pg}$  e HD =  $94,19 \pm 1,83\text{pg}$ ).

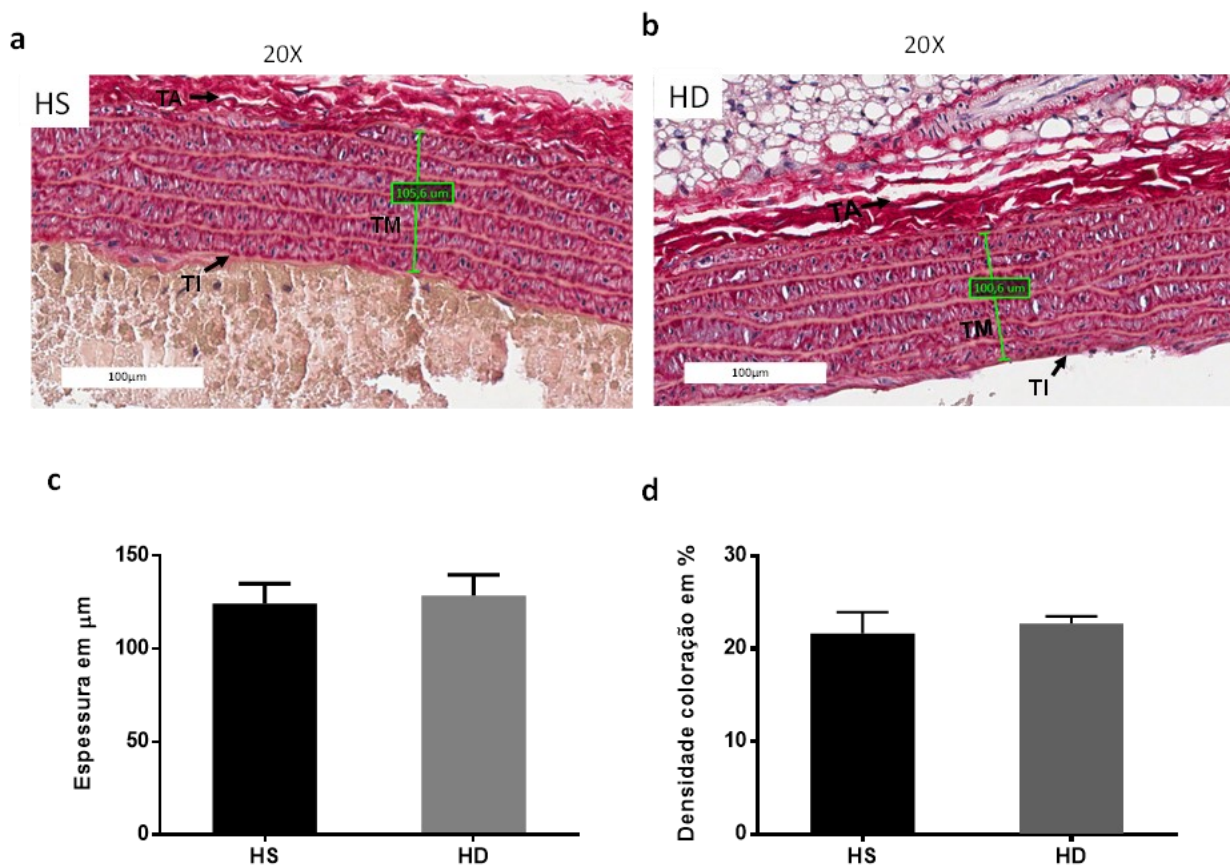


**Figura 28:** Noradrenalina renal. HS: Hipertenso *sham*; HD: Hipertenso Desnervado (n=2). \*\* p=0,034 vs. NS. Teste t-Student.

#### 4.2.5 Resultados histologia

##### 4.2.5.1 Camada média da aorta

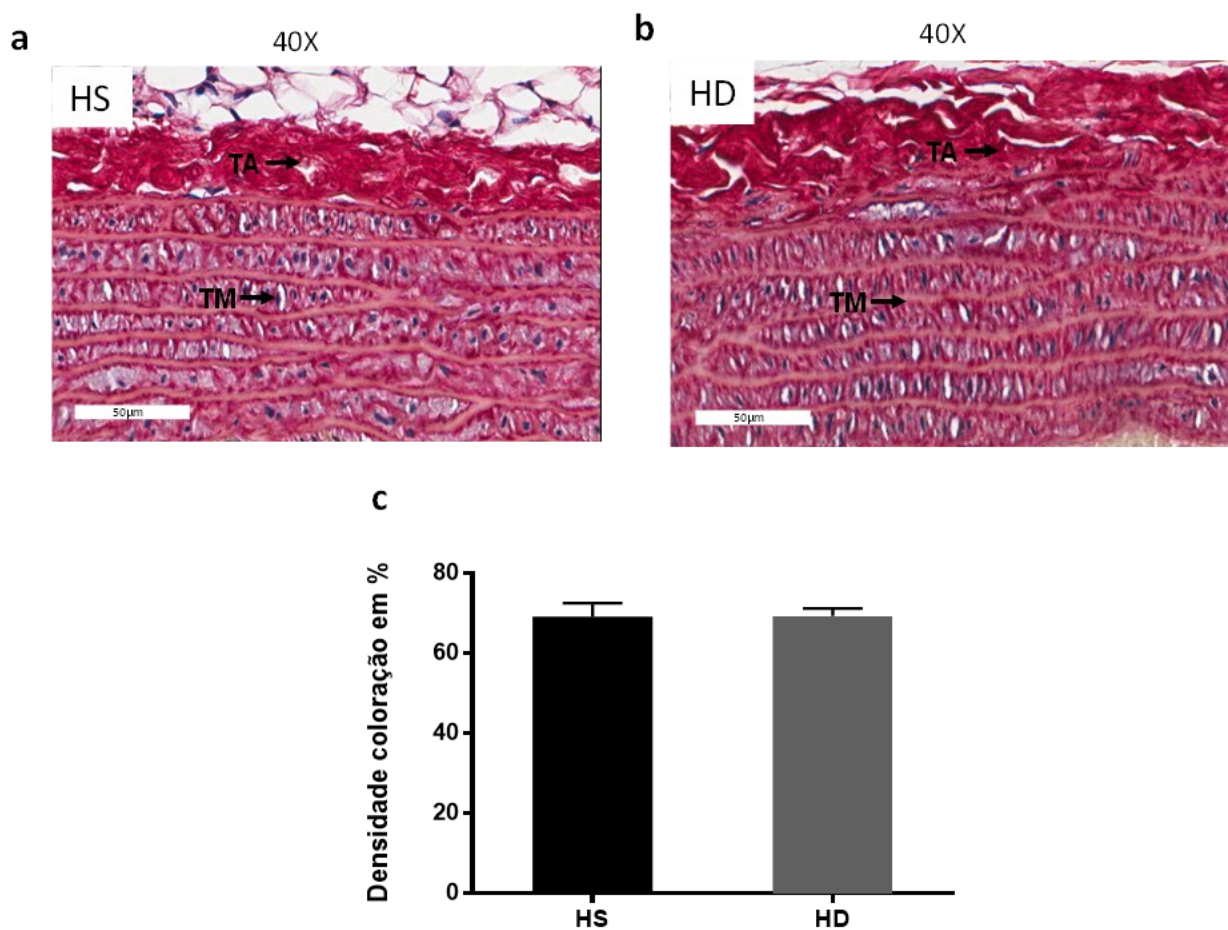
A camada média da aorta foi avaliada com a intenção de investigar um possível remodelamento nos ratos hipertensos que poderia ser minimizado pela desnervação renal. Contudo, tanto a espessura da camada média (HS =  $124,5 \pm 10,57\mu\text{m}$  e HD =  $128,8 \pm 11,04\mu\text{m}$ ) quanto a fração de área ocupada pelas fibras de colágeno (HS =  $21,65 \pm 2,28\%$  e HD =  $22,72 \pm 0,76\%$ ) não sofreram alterações com a intervenção, indicando que a DRB não alterou o remodelamento observado nestes animais.



**Figura 29:** Cortes transversais de aorta de ratos hipertensos submetidos à cirurgia *sham* (a) ou à desnervação renal (b), corados pelo Picrosirius e analisados sob a incidência de luz normal policromática. Medida da espessura da camada média da aorta expressa em µm, representada pela linha verde. Gráfico representativo da espessura da camada média da aorta (c). Fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada média da aorta (d). TA: Túnica Adventícia; TM: Túnica Média; TI: Túnica Íntima. Hipertenso *sham*; HD: Hipertenso desnervado (n=4). Teste t-Student.

#### 4.2.5.2 Camada adventícia da aorta

Assim como na camada média, a fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada adventícia da aorta não se alterou após a intervenção HS =  $69,19 \pm 3,381\%$  e HD =  $69,34 \pm 1,895\%$ ).



**Figura 30:** Cortes transversais de aorta de ratos hipertensos submetidos à cirurgia *sham* (a) ou à desnervação renal (b), corados pelo Picrosirius e analisados sob a incidência de luz normal policromática. Fração de área ocupada pelas fibras de colágeno na camada adventícia da aorta (c). TA: Túnica Adventícia; TM: Túnica Média. HS: Hipertenso *sham*; HD: Hipertenso desnervado (n=4). Teste t-Student.

#### 4.3 Efeitos das desnervação renal em ratos normotensos e hipertensos

Em resumo, tanto os ratos normotensos quanto hipertensos que foram submetidos à desnervação renal bilateral apresentaram valores de pressão arterial (PAS, PAD e PAM) mais baixo em relação a seus respectivos controles, o que demonstra que a DRB não só é capaz de atenuar a hipertensão em ratos SHR, mas também diminuir os valores de PA em ratos normotensos.

Chama atenção que na avaliação da atividade barorreflexa, os animais hipertensos desnervados apresentaram um maior valor de resposta taquicárdica e índice alfa em relação ao grupo hipertenso *sham*, enquanto os normotensos submetidos a desnervação exibiram aumento da resposta bradicárdica em relação a seu controle *sham*. Essas

alterações, entretanto, não refletiram na variância da pressão arterial, que não se alterou com a intervenção entre os normotensos ou hipertensos. A modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (LF PAS) apresentou-se reduzida nos animais hipertensos desnervados em relação aos hipertensos *sham*, porém não se alterou entre os animais normotensos. Esta observação sugere que a retirada dos nervos renais diminui a modulação simpática para os vasos em animais hipertensos, sem alterar este controle em animais normotensos.

Importantemente, os animais SRH demonstraram prejuízo no relaxamento endotélio-dependente nas artérias de resistência, refletido através de uma vasoconstrição sustentada na curva concentração-resposta à acetilcolina. Por sua vez, os ratos SHR submetidos à desnervação renal exibiram relaxamento completo ao serem desafiados com acetilcolina, demonstrando que a DRB é capaz de preservar a função endotelial destes animais. Nos animais normotensos, não foi evidenciado prejuízo do relaxamento endotélio-dependente e a desnervação renal não prejudicou ou melhorou esta resposta. Ao utilizarmos o inibidor de óxido nítrico L-NAME previamente à curva de relaxamento dependente do endotélio, os animais normotensos exibiram aproximadamente 40% de relaxamento, enquanto os animais hipertensos exibiram uma resposta vasoconstrictora. Apesar da intervenção não ter alterado esta resposta, estes dados evidenciam a capacidade de relaxamento de ratos normotensos na ausência de óxido nítrico, enquanto os hipertensos perdem completamente a resposta vasodilatadora dependente do endotélio.

Ao investigarmos a histologia da aorta, observamos que a espessura da camada média, bem como a área ocupada por fibras de colágeno não se difere entre normotenso *sham* e hipertensos, sugerindo que não há remodelamento deste vaso nos animais hipertensos. Contudo, dentre todos os grupos, os animais normotensos que foram submetidos a DRB, exibiram uma menor área ocupada por fibras de colágeno, apresentando-se significativamente diferente dos grupos hipertenso *sham* ( $p= 0,0039$ ) e hipertenso desnervado ( $p= 0,0004$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A retirada dos nervos renais foi capaz de prevenir o aumento de pressão arterial observada em ratos espontaneamente hipertensos. Os animais hipertensos que foram submetidos à DRB apresentaram uma pressão arterial média aproximadamente 17mmHg mais baixa do que os ratos hipertensos *sham* (fig. 18). Wang *et al*, 2018 demonstraram que até 41 semanas após a desnervação renal, os animais SHR apresentam pressão arterial sistólica mais baixa quando comparados a hipertensos *sham* (62), o que está de acordo com nossos resultados e com o de outros autores, que demonstraram que a retirada dos nervos renais é capaz de retardar ou atenuar o desenvolvimento da hipertensão nestes animais (63-65).

Acredita-se que a pressão arterial elevada em pacientes hipertensos resistentes e em ratos SHR, deve-se, ao menos em parte, ao aumento da atividade aferente renal nesses indivíduos. Desta forma, especula-se que ao impedir os sinais aferentes renais para o cérebro através da desnervação renal bilateral, a pressão arterial se reduz pela diminuição do fluxo simpático renal (66-68). Este mecanismo parece ser verdadeiro também para ratos normotensos. Observamos que semelhantemente ao que observamos com os ratos SHR, o grupo normotenso desnervado apresentou importante diminuição da PA em relação aos normotensos *sham*, evidenciando que a DRB também altera os valores de pressão arterial nestes animais (fig.1 – 3).

Com base nas pesquisas sobre as variações da frequência cardíaca e da pressão arterial por meio da análise espectral, podemos inferir que as alterações na modulação simpática colaboraram para os valores de pressão arterial mais baixa nos animais hipertensos desnervados. Embora a frequência cardíaca e sua variabilidade tenham sido semelhantes entre os grupos (tabelas 1 e 4), ao examinar a variabilidade da pressão arterial, observamos uma redução de aproximadamente 40% na modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (LF PAS) em animais hipertensos desnervados em comparação aos hipertensos não desnervados (fig. 22). A LF PAS representa a modulação simpática para os vasos, desta forma, a DRB foi capaz de diminuir esta modulação em animais espontaneamente hipertensos, o que possivelmente colaborou para a queda da PA.



Adicionalmente, a sensibilidade dos barorreceptores apresenta-se comprometida em animais espontaneamente hipertensos, resultando em prejuízos no controle da pressão arterial(69, 70). Uma diminuição da modulação simpática é capaz de melhorar a atividade barorreflexa(71, 72), o que de fato ocorreu entre os ratos hipertensos desnervados; o menor valor de LF PAS é acompanhado de um maior valor de alfa LF e de resposta taquicárdica – ambos indicadores da função barorreflexa – neste grupo em relação aos hipertensos que mantiveram os nervos renais. Ainda mais, a resposta bradicárdica demonstrou uma tendência de aumento nos hipertensos desnervados em relação aos hipertensos *sham* ( $p=0,054$ ), apresentando-se 112% mais elevada no grupo HD. A melhora da função barorreflexa em ratos SHR submetidos a desnervação renal já foi previamente documentada e associada à redução da atividade do nervo simpático, além disso, esse aprimoramento é resultado de um aumento na sensibilidade à queda da pressão arterial, afim de evitar que grandes quedas ocorram, tanto em ratos SHR quanto em indivíduos com hipertensão resistente(73), como evidenciado pela melhora da resposta taquicárdica nos hipertensos desnervados do presente estudo.

Uma vez que a baixa sensibilidade barorreflexa é um fator preditor independente de mortalidade e de eventos cardiovasculares adversos graves em pacientes hipertensos(74), melhorias na função barorreflexa após a desnervação renal têm o potencial de aprimorar diretamente o risco de mortalidade nesses pacientes.

Nos ratos normotensos, a LF PAS não é diferente entre os grupos, demonstrando que nestes animais a queda de pressão provavelmente está associada a outros fatores que não a modulação simpática para os vasos. Seguindo este comportamento, o alfa LF e a resposta taquicárdica também não são diferentes após a intervenção nos animais normotensos, contudo, observamos um aumento importante na resposta bradicárdica dos normotensos desnervados em relação aos normotenso *sham*. Uma hipótese para explicar este comportamento, seria o fato de os ratos Wistar apresentarem um valor mais baixo de PA, tornando-os mais sensíveis aos incrementos de pressão, enquanto em ratos SHR, é necessário um maior incremento de pressão arterial para ativar a resposta bradicárdica(75). Isso se manifesta pela resposta bradicárdica resultante do aumento da PA induzido pela administração de fenilefrina.

É esperado que os animais hipertensos apresentem maior variabilidade da pressão arterial, em parte devido ao prejuízo da atividade barorreflexa. No presente estudo, os animais hipertensos apresentaram claramente uma maior variância da pressão arterial sistólica em relação aos normotensos ( $p=0,0001$  NS vs. HS). No entanto, apesar de demonstrada uma melhor função barorreflexa no grupo hipertenso desnervado em relação ao *sham*, este comportamento não se refletiu na variância da pressão arterial sistólica. Esses resultados estão em concordância com um estudo prévio que demonstrou a melhora na função barorreflexa sem refletir na variabilidade da pressão arterial(73).

Esses achados evidenciam a característica multifatorial da hipertensão, indicando que a regulação da pressão arterial envolve uma interação complexa entre vários mecanismos fisiológicos e não pode ser atribuída exclusivamente a um único fator, como a modulação simpática.

Sabendo-se que a desnervação renal leva à queda da resistência vascular renal e aumento da excreção renal de água e sódio (18), é esperado um aumento do volume urinário nos animais desnervados. Em nosso estudo anterior, demonstramos um aumento significativo do volume urinário 72 horas após a DRB em ratos espontaneamente hipertensos, não acompanhado de uma maior ingestão de água(51), sugerindo que a queda de pressão experimentada por esses animais poderia estar relacionada com um estado de menor volemia. De acordo com estes achados, Salman *et al.*, evidenciaram diurese aumentada em ratos normotensos e hipertensos agudamente à retirada unilateral dos nervos renais (76). Contudo, no estudo em questão, ao avaliarmos os efeitos da desnervação bilateral na diurese mais de 30 dias após o procedimento, não foram encontradas diferenças no volume urinário entre os hipertensos ou normotensos (tabelas 2 e 5), o que está de acordo com Juan Gao *et al*, 2016, que demonstraram que a partir de 2 semanas após a desnervação não é observado aumento da diurese em animais SHR (60). Entretanto, existe um aumento do volume urinário nos primeiros 15 dias após a retirada dos nervos renais, o que aparentemente reflete na queda mais acentuada da pressão neste período. Porém, após 30 dias, outros fatores parecem estar envolvidos nos mecanismos de redução da pressão arterial, independentemente do aumento da diurese.

Interessantemente, observamos uma maior ingestão de água nos animais hipertensos desnervados em relação aos hipertensos *sham*. No entanto, o balanço hídrico desses animais não difere do controle hipertenso ou do grupo normotenso *sham*. Além disso, esse aumento na ingestão de água não foi acompanhado por um aumento na excreção de sódio (tabela 6).

O endotélio vascular desempenha um papel crucial na fisiologia cardiovascular, regulando o tônus vascular e desempenhando funções antioxidantes, anti-inflamatórias e antitrombóticas. As células endoteliais regulam o tônus vascular por meio da síntese de óxido nítrico (NO), prostaglandinas e outros fatores relaxantes (77, 78). A disfunção endotelial é caracterizada por uma mudança nas ações do endotélio em direção a uma redução da vasodilatação, proliferação celular, adesão e ativação plaquetária, estado pró-inflamatório e pró-trombótico(79).

A disfunção endotelial está associada à fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, hipercolesterolemia e resistência à insulina, levando a alterações nas células endoteliais e resultando em inflamação, oxidação lipoproteica e remodelamento vascular, contribuindo para o aumento da resistência periférica e remodelamento das artérias de resistência (80, 81). Como consequência, ocorrem alterações estruturais, mecânicas e funcionais destes vasos, o que está associado ao desenvolvimento e complicações da hipertensão (82).

Na hipertensão, a disfunção endotelial está associada à redução da disponibilidade de óxido nítrico, resultando em comprometimento do relaxamento endotélio-dependente induzido pela acetilcolina.

No presente estudo, testamos a hipótese de que a desnervação renal bilateral poderia melhorar a disfunção endotelial presente em ratos SHR, o que seria evidenciado por uma melhor resposta à ACh após a intervenção. Como observado na figura 25, os ratos hipertensos submetidos à desnervação renal apresentaram relaxamento satisfatório quando desafiados a acetilcolina, enquanto os ratos hipertensos *sham* exibiram uma vasoconstrição sustentada ao final da curva, evidenciando a presença de disfunção endotelial neste grupo.

Embora haja um aparente consenso sobre a disfunção endotelial nas artérias de resistência de ratos SHR, existem discrepâncias entre os estudos que compararam as

respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio nesses animais com ratos normotensos(83). É importante destacar que quando analisados separadamente, aproximadamente 75% dos hipertensos *sham* do estudo em questão apresentaram disfunção endotelial nos vasos de resistência, enquanto o restante dos ratos deste grupo exibiu relaxamento satisfatório quando desafiados com acetilcolina. Esses resultados indicam que nem todos os animais hipertensos resistentes estudados apresentavam disfunção endotelial. Em 1993, Junyi Li *et. al.* demonstraram que ratos SRH nem sempre apresentam um relaxamento dependente do endotélio prejudicado(84), no entanto, é importante considerar que, se esses animais tivessem sido estudados em uma idade mais avançada, uma proporção maior deles poderia apresentar prejuízos mais evidentes nas artérias de resistência(83). Em 2011, Schiffrin relatou que na hipertensão humana, 100% dos indivíduos hipertensos em estágio I apresentam remodelamento das pequenas artérias, enquanto apenas 60% apresentam disfunção endotelial(85), corroborando com os achados do estudo em questão.

O mecanismo pelo qual a DRB previne a disfunção endotelial em ratos espontaneamente hipertensos não pode ser elucidado por este estudo, porém, a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode levar à disfunção endotelial, aumento da contração, redução da vasodilatação e remodelamento estrutural, resultando em aumento da resistência periférica e hipertensão(86). Em ratos SHR, o aumento de ROS e consequente diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico é considerado um dos principais mecanismos de disfunção endotelial nas artérias de resistência destes animais (87). Ainda mais, o aumento de espécies reativas de oxigênio na hipertensão está associado a um aumento da atividade simpática(88), que por sua vez, pode ser atenuada através da remoção dos nervos renais – como demonstrado no presente estudo. De fato, a redução de ROS após a desnervação renal já foi relatada anteriormente(89-91). É possível que a redução da modulação simpática e consequente diminuição na produção de espécies reativas oxigênio seja o mecanismo responsável pela ação vasoprotetora da DRB.

Os fatores relaxantes derivados do endotélio não se resumem apenas ao NO. Fazem parte desse grupo a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), bradicinina, peptídeo natriurético-C e outras substâncias (92-95) que

juntamente ao NO, desempenham papéis fundamentais na regulação do tônus vascular (96). As artérias mesentéricas dos ratos normotensos foram capazes de apresentar relaxamento mesmo na ausência do óxido nítrico, como evidenciado pela resposta dependente do endotélio com a presença do inibidor de óxido nítrico L-NAME. Ainda que este relaxamento seja mais sutil em relação a curva realizada com a presença do NO, nos animais hipertensos, na ausência de óxido nítrico, as artérias estudadas perdem sua capacidade de relaxamento, apresentando uma resposta vasoconstrictora frente à acetilcolina. Esses achados evidenciam que a presença de óxido nítrico é essencial para a vasodilatação de artérias mesentéricas em ratos espontaneamente hipertensos, enquanto os ratos normotensos possuem outras vias vasodilatadoras disponíveis. Outra hipótese seria a possibilidade de variação na sensibilidade ao L-NAME entre as duas linhagens de ratos(84).

Como demonstrado anteriormente por nosso grupo, aortas de ratos SHR apresentam uma melhora do relaxamento endotélio-independente (induzida por nitroprussiato de sódio) dez dias após a DRB, assim como uma maior vasoconstricção na curva concentração-resposta à fenilefrina(51) quando comparados a seus controles *sham*. Ao avaliarmos artérias mesentéricas de ratos hipertensos trinta dias após a DRB, não encontramos diferenças nas respostas de relaxamento independente do endotélio ou na vasoconstricção induzida por fenilefrina. Ainda mais, os ratos hipertensos *sham* apresentaram respostas semelhantes aos normotensos, indicando que não havia prejuízo dessas funções nos grupos estudados.

Para além das artérias mesentéricas, ratos SHR possuem artérias condutoras mais rígidas quando comparadas às de ratos normotensos (97, 98). Além da pressão arterial, modificações intrínsecas na parede arterial também contribuem para o aumento da rigidez. Isso ocorre porque a rigidez é influenciada pela estrutura e função arterial, e as mudanças no tônus vasomotor, possivelmente de origem endotelial, podem promover alterações nas propriedades mecânicas das artérias condutoras dos SHR (99).

Uma vez que o envolvimento da ativação simpática no remodelamento em vasos de ratos e humanos hipertensos fora descrito anteriormente, (100-102) era esperado que a aorta dos animais hipertensos apresentasse maior rigidez em relação aos animais normotensos.

No estudo em questão, avaliamos a espessura da camada média da aorta e a área ocupada por fibras de colágeno, a fim de investigarmos rigidez arterial e remodelamento deste vaso que possivelmente seria atenuado pela desnervação renal. Contudo, as aortas dos animais normotensos *sham* e hipertensos exibiram resultado semelhantes, sugerindo que os ratos SHR não apresentavam rigidez ou remodelamento arterial, independentemente da desnervação renal.

Decerto, o endurecimento da aorta não pode ser atribuído apenas ao espessamento da parede, pois a relação entre espessura média e diâmetro interno permanece constante com a idade tanto em SHR quanto em ratos normotensos. As modificações no conteúdo de colágeno não desempenham um papel dominante no endurecimento aórtico relacionado à idade em SHR, porque a fibrose e a relação elastina/colágeno diminui de forma semelhante com o envelhecimento em ambos os ratos SHR e Wistar, sugerindo que o aumento da pressão não é o principal fator envolvido no processo de enrijecimento da aorta(99). Sendo assim, o aumento da rigidez no SHR não pode ser simplesmente consequência de uma mudança na estrutura da parede, mas também de uma mudança na organização e conteúdo da camada média com consequentes alterações no tônus vascular, possivelmente modulado pela ativação simpática elevada encontrada nesses animais.

Adicionalmente, em um estudo conduzido por Stoiber et al., pacientes submetidos à desnervação renal bilateral apresentaram restauração da distensibilidade da aorta seis meses após a intervenção. Notavelmente, essa restauração não apresentou correlação com mudanças na pressão arterial, uma vez que mesmo os pacientes classificados como "não respondedores" demonstraram uma melhoria na distensibilidade da aorta. Esses resultados sugerem a possibilidade de uma ação direta da desnervação renal bilateral sobre a vasculatura central(103). De forma semelhante, os animais hipertensos do presente estudo podem ter apresentado uma melhora da rigidez da aorta após a desnervação renal, mesmo que não evidenciado na investigação realizada.

Interessantemente, os animais normotensos que foram desnervados apresentaram os menores valores de área ocupada por fibras de colágeno em relação aos outros grupos. É possível que em ratos normotensos, mesmo uma diminuição sutil na modulação simpática seja capaz de impactar de forma mais significativa a estrutura

do vaso. Um estudo histológico mais aprofundado com diferenciação dos tipos de fibras de colágeno faz-se necessário para responder estas questões.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a desnervação renal bilateral foi capaz de reduzir a pressão arterial em ratos SHR e normotensos. Esse efeito hipotensor pode estar relacionado à redução da modulação simpática para os vasos, melhora na função barorreflexa e preservação da função endotelial nas artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos.

Esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial e destacam o potencial da desnervação renal como uma estratégia terapêutica para pacientes com hipertensão resistente. Estudos futuros são necessários para investigar os efeitos a longo prazo e a aplicabilidade clínica da desnervação renal em pacientes hipertensos.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Northup GW. Influencing the vegetative nervous system through manipulation. 1945. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2000;100(10):647-52. Epub 2000/12/06.
2. Aires MM, Cravo S, Baldo VC. Sistemas Neurovegetativos. In: Koogan G, editor. *Fisiologia*. Rio de Janeiro 2012. p. 347-51.
3. Guyton AC, Hall JE. Características básicas das funções simpática e parassimpática. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed 2006. p. 750-6.
4. Guyton AC, Hall JE. Sistema rim-líquidos corporais para o controle da pressão arterial. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª ed 2006. p. 216-20.
5. Goldstein DS, Robertson D, Esler M, Straus SE, Eisenhofer G. Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. *Annals of internal medicine*. 2002;137(9):753-63. Epub 2002/11/06.
6. Stella A, Zanchetti A. Functional role of renal afferents. *Physiological reviews*. 1991;71(3):659-82. Epub 1991/07/01.
7. Schlaich MP, Sobotka PA, Krum H, Whitbourn R, Walton A, Esler MD. Renal Denervation as a Therapeutic Approach for Hypertension. *Hypertension*. 2009;54(6):1195.
8. Grassi G, Ram VS. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2016;10(5):457-66.
9. Atherton DS, Deep NL, Mendelsohn FO. Micro-anatomy of the renal sympathetic nervous system: a human postmortem histologic study. *Clin Anat*. 2012;25(5):628-33. Epub 2011/10/07.
10. Barajas L. Innervation of the renal cortex. *Federation proceedings*. 1978;37(5):1192-201. Epub 1978/04/01.
11. Bell-Reuss E, Trevino DL, Gottschalk CW. Effect of renal sympathetic nerve stimulation on proximal water and sodium reabsorption. *The Journal of clinical investigation*. 1976;57(4):1104-7. Epub 1976/04/01.
12. Kirchheim H, Ehmke H, Persson P. Sympathetic modulation of renal hemodynamics, renin release and sodium excretion. *Klinische Wochenschrift*. 1989;67(17):858-64. Epub 1989/09/01.
13. Kon V. Neural control of renal circulation. *Mineral and electrolyte metabolism*. 1989;15(1-2):33-43. Epub 1989/01/01.
14. Zanchetti A, Stella A, Leonetti G. Regulation of renin secretion. *Contributions to nephrology*. 1977;8:44-56. Epub 1977/01/01.
15. DiBona GF. Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;289(3):R633-41. Epub 2005/08/18.
16. Ye S, Gamburd M, Mozayeni P, Koss M, Campese VM. A limited renal injury may cause a permanent form of neurogenic hypertension. *American journal of hypertension*. 1998;11(6 Pt 1):723-8. Epub 1998/07/10.
17. Campese VM. Neurogenic factors and hypertension in renal disease. *Kidney international Supplement*. 2000;75:S2-6. Epub 2000/06/01.
18. DiBona GF, Esler M. Translational medicine: the antihypertensive effect of renal denervation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010;298(2):R245-53. Epub 2009/12/04.
19. Campese VM, Kogosov E. Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. *Hypertension*. 1995;25(4 Pt 2):878-82. Epub 1995/04/01.

20. Campese VM, Kogosov E, Koss M. Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;26(5):861-5. Epub 1995/11/01.
21. Schlaich MP, Sobotka PA, Krum H, Lambert E, Esler MD. Renal sympathetic-nerve ablation for uncontrolled hypertension. *The New England journal of medicine*. 2009;361(9):932-4. Epub 2009/08/28.
22. Thoren P. Efferent renal nerve traffic in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice*. 1987;9 Suppl 1:259-79. Epub 1987/01/01.
23. Cruz; J, Neto; ED, Burdmann; EDA, ALVES; MAVFR, Filho; NS, Magalhães; RLd, et al. Funções do Nervo Renal. In: Sarvier, editor. *Atualidades em Nefrologia 2* São Paulo 1992. p. 37-45.
24. Irigoyen MC, Cestari IA, Moreira ED, Oshiro MS, Krieger EM. Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1988;21(4):869-72. Epub 1988/01/01.
25. Oliveira VL, Irigoyen MC, Moreira ED, Strunz C, Krieger EM. Renal denervation normalizes pressure and baroreceptor reflex in high renin hypertension in conscious rats. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II17-21. Epub 1992/02/01.
26. DiBona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2002;11(2):197-200. Epub 2002/02/22.
27. DiBona GF. Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):621-4. Epub 2003/03/08.
28. Esler M, Jennings G, Biviano B, Lambert G, Hasking G. Mechanism of elevated plasma noradrenaline in the course of essential hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1986;8 Suppl 5:S39-43. Epub 1986/01/01.
29. Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, et al. Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension*. 2004;43(2):169-75. Epub 2003/11/12.
30. Esler M, Jennings G, Lambert G. Noradrenaline release and the pathophysiology of primary human hypertension. *American journal of hypertension*. 1989;2(3 Pt 2):140S-6S. Epub 1989/03/01.
31. Smithwick RH, Thompson JE. Splanchnicectomy for essential hypertension; results in 1,266 cases. *Journal of the American Medical Association*. 1953;152(16):1501-4. Epub 1953/08/15.
32. Schlaich MP, Hering D, Sobotka PA, Krum H, Esler MD. Renal denervation in human hypertension: mechanisms, current findings, and future prospects. *Current hypertension reports*. 2012;14(3):247-53. Epub 2012/03/30.
33. Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, Sobotka PA, Sadowski J, Bartus K, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet*. 2009;373(9671):1275-81. Epub 2009/04/01.
34. Esler MD, Bohm M, Sievert H, Rump CL, Schmieder RE, Krum H, et al. Catheter-based renal denervation for treatment of patients with treatment-resistant hypertension: 36 month results from the SYMPPLICITY HTN-2 randomized clinical trial. *European heart journal*. 2014;35(26):1752-9. Epub 2014/06/06.

35. Bhatt DL, Kandzari DE, O'Neill WW, D'Agostino R, Flack JM, Katzen BT, et al. A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *The New England journal of medicine*. 2014;370(15):1393-401. Epub 2014/04/01.
36. Kandzari DE, Bohm M, Mahfoud F, Townsend RR, Weber MA, Pocock S, et al. Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. *Lancet*. 2018;391(10137):2346-55. Epub 2018/05/29.
37. Bohm M, Kario K, Kandzari DE, Mahfoud F, Weber MA, Schmieder RE, et al. Efficacy of catheter-based renal denervation in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal): a multicentre, randomised, sham-controlled trial. *Lancet*. 2020;395(10234):1444-51. Epub 2020/04/03.
38. Azizi M, Sanghvi K, Saxena M, Gosse P, Reilly JP, Levy T, et al. Ultrasound renal denervation for hypertension resistant to a triple medication pill (RADIANCE-HTN TRIO): a randomised, multicentre, single-blind, sham-controlled trial. *Lancet*. 2021;397(10293):2476-86. Epub 2021/05/20.
39. Azizi M, Schmieder RE, Mahfoud F, Weber MA, Daemen J, Davies J, et al. Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): a multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *Lancet*. 2018;391(10137):2335-45. Epub 2018/05/29.
40. Kario K, Yokoi Y, Okamura K, Fujihara M, Ogoyama Y, Yamamoto E, et al. Catheter-based ultrasound renal denervation in patients with resistant hypertension: the randomized, controlled REQUIRE trial. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2022;45(2):221-31. Epub 2021/10/17.
41. Ogoyama Y, Tada K, Abe M, Nanto S, Shibata H, Mukoyama M, et al. Effects of renal denervation on blood pressures in patients with hypertension: a systematic review and meta-analysis of randomized sham-controlled trials. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2022;45(2):210-20. Epub 2021/10/18.
42. Katurada K, Shinohara K, Aoki J, Nanto S, Kario K. Renal denervation: basic and clinical evidence. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2022;45(2):198-209. Epub 2021/12/19.
43. Foss JD, Fiege J, Shimizu Y, Collister JP, Mayerhofer T, Wood L, et al. Role of afferent and efferent renal nerves in the development of AngII-salt hypertension in rats. *Physiological reports*. 2018;6(3). Epub 2018/02/07.
44. Barbato E, Azizi M, Schmieder RE, Lauder L, Bohm M, Brouwers S, et al. Renal denervation in the management of hypertension in adults. A clinical consensus statement of the ESC Council on Hypertension and the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European heart journal*. 2023;44(15):1313-30. Epub 2023/02/16.
45. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II1-9. Epub 1992/02/01.
46. B F. Structural, myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance. In: M H, editor. *Hypotensive Drugs*. London 1956. p. 163-74.
47. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research*. 1977;41(1):19-26. Epub 1977/07/01.
48. Schiffrin EL. Resistance arteries as endpoints in hypertension. *Blood pressure Supplement*. 1997;2:24-30. Epub 1997/01/01.

49. Wang Y, Rijal B, Xu M, Li Z, An Y, Zhang F, et al. Renal denervation improves vascular endothelial dysfunction by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling activation in a rat model of type 2 diabetes mellitus with insulin resistance. *Acta diabetologica*. 2020;57(10):1227-43. Epub 2020/06/04.
50. Gabriels G, August C, Grisk O, Steinmetz M, Kosch M, Rahn KH, et al. Impact of renal transplantation on small vessel reactivity. *Transplantation*. 2003;75(5):689-97. Epub 2003/03/18.
51. Moreira NJD, Dos Santos F, Moreira ED, Farah D, de Souza LE, da Silva MB, et al. Acute renal denervation normalizes aortic function and decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Scientific reports*. 2020;10(1):21826. Epub 2020/12/15.
52. Dias LD, Casali KR, Leguisamo NM, Azambuja F, Souza MS, Okamoto M, et al. Renal denervation in an animal model of diabetes and hypertension: impact on the autonomic nervous system and nephropathy. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10:33. Epub 2011/04/19.
53. Mulder J, Hökfelt T, Knuepfer MM, Kopp UC. Renal sensory and sympathetic nerves reinnervate the kidney in a similar time-dependent fashion after renal denervation in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013;304(8):R675-R82.
54. Krieger EM. Neurogenic Hypertension in the Rat. *Circulation research*. 1964;15:511-21. Epub 1964/12/01.
55. Irigoyen MC, De Angelis K, Dos Santos F, Dartora DR, Rodrigues B, Consolim-Colombo FM. Hypertension, Blood Pressure Variability, and Target Organ Lesion. *Curr Hypertens Rep*. 2016;18(4):31. Epub 2016/03/24.
56. Alexander Barbara T, Hendon Andrew E, Ferril G, Dwyer Terry M. Renal Denervation Abolishes Hypertension in Low-Birth-Weight Offspring From Pregnant Rats With Reduced Uterine Perfusion. *Hypertension*. 2005;45(4):754-8.
57. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*. 1979;11(4):447-55. Epub 1979/07/01.
58. Wei S, Li D, Zhang Y, Su L, Wang Q, Yang D, et al. Perivascular radiofrequency renal denervation lowers blood pressure and ameliorates cardiorenal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *PloS one*. 2017;12(4):e0176888. Epub 2017/04/30.
59. Jiang J, Zheng JP, Li Y, Gan Z, Jiang Y, Huang D, et al. Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2016;38(4):393-8. Epub 2016/05/10.
60. Gao J, Kerut EK, Smart F, Katsurada A, Seth D, Navar LG, et al. Sympathoinhibitory Effect of Radiofrequency Renal Denervation in Spontaneously Hypertensive Rats With Established Hypertension. *American journal of hypertension*. 2016;29(12):1394-401. Epub 2016/08/20.
61. Mulder J, Hökfelt T, Knuepfer MM, Kopp UC. Renal sensory and sympathetic nerves reinnervate the kidney in a similar time-dependent fashion after renal denervation in rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013;304(8):R675-82. Epub 2013/02/15.
62. Wang M, Han W, Zhang M, Fang W, Zhai X, Guan S, et al. Long-term renal sympathetic denervation ameliorates renal fibrosis and delays the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American journal of translational research*. 2018;10(12):4042-53. Epub 2019/01/22.
63. Kline RL, Kelton PM, Mercer PF. Effect of renal denervation on the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1978;56(5):818-22. Epub 1978/10/01.

64. Liard JF. Renal denervation delays blood pressure increase in the spontaneously hypertensive rat. *Experientia*. 1977;33(3):339-40. Epub 1977/03/15.
65. Norman RA, Jr., Dzielak DJ. Role of renal nerves in onset and maintenance of spontaneous hypertension. *The American journal of physiology*. 1982;243(2):H284-8. Epub 1982/08/11.
66. Kopp UC. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2015;308(2):R79-95. Epub 2014/11/21.
67. Hering D, Marusic P, Walton AS, Lambert EA, Krum H, Narkiewicz K, et al. Sustained sympathetic and blood pressure reduction 1 year after renal denervation in patients with resistant hypertension. *Hypertension*. 2014;64(1):118-24. Epub 2014/04/16.
68. Albrecht I. The hemodynamics of early stages of spontaneous hypertension in rats. Part I: Male study. *Japanese circulation journal*. 1974;38(11):985-90. Epub 1974/11/01.
69. Moreira ED, Ida F, Oliveira VL, Krieger EM. Early depression of the baroreceptor sensitivity during onset of hypertension. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II198-201. Epub 1992/02/01.
70. Fernandez G, Lee JA, Liu LC, Gassler JP. The Baroreflex in Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(3):19. Epub 2015/03/11.
71. La Rovere MT, Pinna GD. Beneficial effects of physical activity on baroreflex control in the elderly. *Annals of noninvasive electrocardiology : the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc*. 2014;19(4):303-10. Epub 2014/05/23.
72. Sverrisdottir YB, Green AL, Aziz TZ, Bahuri NF, Hyam J, Basnayake SD, et al. Differentiated baroreflex modulation of sympathetic nerve activity during deep brain stimulation in humans. *Hypertension*. 2014;63(5):1000-10. Epub 2014/02/12.
73. Hart EC, McBryde FD, Burchell AE, Ratcliffe LE, Stewart LQ, Baumbach A, et al. Translational examination of changes in baroreflex function after renal denervation in hypertensive rats and humans. *Hypertension*. 2013;62(3):533-41. Epub 2013/07/03.
74. Ormezzano O, Cracowski JL, Quesada JL, Pierre H, Mallion JM, Baguet JP. EVALuation of the prognostic value of BARoreflex sensitivity in hypertensive patients: the EVABAR study. *Journal of hypertension*. 2008;26(7):1373-8. Epub 2008/06/14.
75. Simms AE, Paton JF, Pickering AE. Hierarchical recruitment of the sympathetic and parasympathetic limbs of the baroreflex in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *The Journal of physiology*. 2007;579(Pt 2):473-86. Epub 2006/12/16.
76. Salman I, Zubaid M, Abdullah N, Ameer O, M.H A, Md.A.H K, et al. Quantification of Acute Renal Denervation Diuresis and Natriuresis in Sprague Dawley and Spontaneously Hypertensive Rats 2009.
77. Alexander Y, Osto E, Schmidt-Trucksass A, Shechter M, Trifunovic D, Duncker DJ, et al. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovascular research*. 2021;117(1):29-42. Epub 2020/04/14.
78. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research*. 2015;116(7):1231-44. Epub 2015/03/31.
79. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26. Epub 1999/01/14.
80. Durier S, Fassot C, Laurent S, Boutouyrie P, Couetil JP, Fine E, et al. Physiological genomics of human arteries: quantitative relationship between gene expression and arterial stiffness. *Circulation*. 2003;108(15):1845-51. Epub 2003/10/08.

81. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *American journal of hypertension*. 2008;21(1):72-7. Epub 2007/12/20.
82. Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(7):375-84. Epub 2007/02/28.
83. Bernatova I, Conde MV, Kopincova J, Gonzalez MC, Puzserova A, Arribas SM. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 2009;27(6):S27-31. Epub 2009/08/06.
84. Li J, Bukoski RD. Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. *Circulation research*. 1993;72(2):290-6. Epub 1993/02/01.
85. Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension*. 2012;59(2):367-74. Epub 2011/12/29.
86. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2011;34(1):5-14. Epub 2010/10/29.
87. Viridis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, et al. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension*. 2009;53(6):1008-16. Epub 2009/04/22.
88. Hubens LE, Verloop WL, Joles JA, Blankestijn PJ, Voskuil M. Ischemia and reactive oxygen species in sympathetic hyperactivity states: a vicious cycle that can be interrupted by renal denervation? *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(4):313-20. Epub 2013/06/12.
89. Li Z, Li Q, Wang L, Li C, Xu M, Duan Y, et al. Targeting mitochondria-inflammation circle by renal denervation reduces atheroprone endothelial phenotypes and atherosclerosis. *Redox biology*. 2021;47:102156. Epub 2021/10/05.
90. Nagasu H, Satoh M, Kuwabara A, Yorimitsu D, Sakuta T, Tomita N, et al. Renal denervation reduces glomerular injury by suppressing NAD(P)H oxidase activity in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010;25(9):2889-98. Epub 2010/03/20.
91. Wu L-L, Zhang Y, Li X-Z, Du X-L, Gao Y, Wang J-X, et al. Impact of Selective Renal Afferent Denervation on Oxidative Stress and Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants*. 2022;11(5):1003.
92. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989;3(9):2007-18. Epub 1989/07/01.
93. Moncada S. Nitric oxide. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1994;12(10):S35-9. Epub 1994/12/01.
94. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation*. 1997;96(2):379-82. Epub 1997/07/15.
95. Raouf AK. Modulators of the Vascular Endothelin Receptor in Blood Pressure Regulation and Hypertension. *Current Molecular Pharmacology*. 2011;4(3):176-86.
96. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clinical cardiology*. 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10. Epub 1998/01/10.
97. Safar M, London G. The arterial system in human hypertension. *Textbook of Hypertension* London, UK: Blackwell Scientific. 1994:85-102.

98. Labat C, Cunha RS, Challande P, Safar ME, Lacolley P. Respective contribution of age, mean arterial pressure, and body weight on central arterial distensibility in SHR. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(4):H1534-H9.
99. Safar M, Chamiot-Clerc P, Dagher G, Renaud JF. Pulse Pressure, Endothelium Function, and Arterial Stiffness in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2001;38(6):1416-21.
100. Al-Sharea A, Lee MKS, Whillas A, Michell DL, Shihata WA, Nicholls AJ, et al. Chronic sympathetic driven hypertension promotes atherosclerosis by enhancing hematopoiesis. *Haematologica*. 2019;104(3):456-67. Epub 2018/10/27.
101. Brandt MC, Reda S, Mahfoud F, Lenski M, Bohm M, Hoppe UC. Effects of renal sympathetic denervation on arterial stiffness and central hemodynamics in patients with resistant hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(19):1956-65. Epub 2012/10/16.
102. Tsioufis C, Dimitriadis K. Sympathetic System-Related Artery Stiffness. *Hypertension*. 2019;73(5):975-6. Epub 2019/03/25.
103. Stoiber L, Mahfoud F, Zamani SM, Lapinskas T, Böhm M, Ewen S, et al. Renal sympathetic denervation restores aortic distensibility in patients with resistant hypertension: data from a multi-center trial. *Clinical Research in Cardiology*. 2018;107(8):642-52.