

**Nathalia Rodrigues Lopes**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENais DA DENERVAÇÃO  
SELETIVA DAS FIBRAS SENSORIAIS RENais NA HIPERTENSÃO  
RENOVASCULAR EXPERIMENTAL**

Documento de defesa apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, pelo programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

**Nathalia Rodrigues Lopes**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIOS DA DENERVAÇÃO  
SELETIVA DAS FIBRAS SENSORIAIS RENAIOS NA HIPERTENSÃO  
RENOVASCULAR EXPERIMENTAL**

Documento de defesa apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina, pelo  
programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

**Orientadora**

Profa. Dra. Cássia Marta de Toledo  
Bergamaschi

**Coorientadora**

Profa. Dra. Érika Emy Nishi

São Paulo  
2019

Lopes, Nathalia Rodrigues

Efeitos cardiovasculares e renais da denervação seletiva das fibras sensoriais renais na hipertensão renovascular experimental / Nathalia Rodrigues Lopes. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Título em Inglês: Cardiovascular and renal effects of selective denervation of renal sensory fibers in experimental renovascular hypertension.

1. Sistema Nervoso Simpático.
2. Hipertensão Renovascular.
3. Denervação Aferente.
4. Estresse Oxidativo.
5. Angiotensina II.
6. Proteinúria.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Chefe do Departamento de Fisiologia: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Carmo Pinho Franco

Chefe da disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória: Prof. Dr. Ruy Ribeiro  
de Campos Junior

Coordenador do programa de pós-graduação em Farmacologia: Prof.<sup>a</sup> Dra. Regina  
Helena da Silva

**Nathalia Rodrigues Lopes**

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIOS DA DENERVAÇÃO  
SELETIVA DAS FIBRAS SENSORIAIS RENAIOS NA  
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR EXPERIMENTAL**

**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares**

**Profa. Dra. Ita Pfeferman Heilberg**

Professora Associada do Departamento de Nefrologia

Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

**Profa. Dra. Miriam Aparecida Boim**

Professora Livre-Docente do Departamento de Nefrologia

Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

**Dr. Marcio Galindo Kiuchi**

Médico Cardiologista - Visiting Research Fellow

University of Western Australia (UWA)

**Suplente**

**Dr. Juan José Augusto Moyano Muñoz**

Pós-doutor do Departamento de Nefrologia

Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

Apoio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP: 2017/12383-2)

*Em memória do meu leal e  
grande amigo, meu cachorro,  
Lubby.*

*“Transportai um punhado de  
terra todos os dias e fareis  
uma montanha.”*

**Confúcio**

## **Agradecimentos**

*Agradeço a Deus, acima de tudo,*

*Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem à inteligência e o entendimento. Provérbios 2:6*

*Agradeço a toda minha família por todo apoio e incentivo e, é claro, pela educação de excelência que me deram. Vocês são minha inspiração, eu amo vocês!*

*Certa vez li uma frase em um livro de um dos mais célebres empreendedores e inspiradores de jovens no mundo inteiro, Walt Disney, e, a frase dizia exatamente o seguinte: "Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas, é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade". Ninguém faz nada sozinho, a ideia pode partir de você, no entanto, para chegar a seu objetivo, com plena certeza, você precisará de um bom trabalho em equipe. Portanto, dedico este espaço para agradecer todos que fizeram parte do desenvolvimento do presente trabalho:*

*Agradeço à Profa. Dra. Cássia Bergamaschi, ao Prof. Dr. Ruy Campos e a Profa. Dra. Erika Nishi pela orientação, transmissão de conhecimento, sobretudo, pela oportunidade de fazer parte da equipe.*

*À Profa. Dra. Guiomar Gomes e ao Prof. Dr. Guus Schoorlemmer pelas discussões e desenvolvimento dos experimentos.*

*Ao Dr. Alex Sato, pela orientação e desenvolvimento dos experimentos.*

*À Profa. Dra. Adriana Girardi, ao Dr. Renato e aos Mestrados Flávia Martins e Acaris, por toda ajuda com a realização dos experimentos de biologia molecular.*

*Aos amigos que pude fazer nesta caminhada, Maycon, Beatriz Martins, Taís, Bianca, Gisele, Tales, Carol Shimoura, Carol Rocha, Michelle, Polliane, Gláucia, Roberto, Lysien, Amanda, Giovanna, Crisllaine, Milene, Samuel, Sarah, Antônio, Gustavo e Guilherme. Aprendi e aprendo todos os dias com vocês, obrigado pela ajuda, orientação, ensinamentos e amizade. Todos foram fundamentais no desenvolvimento do trabalho.*

*Aos funcionários, Toninho, Ayrton, Kátia e Eliane.*

*Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Departamento de Fisiologia.*

*Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.*

*Meus sinceros agradecimentos,*

*Nathalia*

## ***Lista de Figuras***

---

<b>Figura 1:</b> Esquema representativo da ineração aferente e eferente renal Adaptado (Osborn, John, 2015).....	5
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo dos efeitos da sinalização aferente renal e da ativação dos nervos eferentes. (Adaptado: Alicia A. Thorp e Markus P. Schlaich, 2015).....	13
<b>Figura 3:</b> Imagem representativa da membrana em fenda presente no podócito, evidenciando as principais proteínas associadas, como a podocina e nefrina. (Adaptado Mar Ruiz Gómez e colaboradores).....	17
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo controle (animais normotensos) em relação ao tempo.....	21
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo hipertenso renovascular (2R-1C) em relação ao tempo.....	21
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo hipertenso renovascular (2R-1C) submetido ao procedimento de denervação afferente renal (DAx) em relação ao tempo.....	22
<b>Figura 7:</b> Imagem representativa do modelo experimental de hipertensão renovascular (2R1C).....	23
<b>Figura 8:</b> Confirmação da denervação seletiva das fibras sensoriais aferentes por marcação imunohistoquímica do CGRP na parede pélvica. À esquerda imagem do grupo 2R1C DAx e à direita do grupo 2R1C DAx.....	24
<b>Figura 9:</b> Traçado representativo do registro eletrofisiológico da atividade nervosa simpática renal (ANSr). Após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg, i.v.) é possível detectar o ruído de fundo remanescente e subtraí-lo da análise.....	25

<b>Figura 10:</b> Efeitos da denervação aferente renal na PAM (A), FC (B) e ANSr no rim isquêmico (C) e contralateral (D).....	32
<b>Figura 11:</b> Imagens representativas do registro basal da atividade nervosa simpática renal (ANSr) do animal controle e rins isquêmico e contralateral dos animais 2 rins, 1 clipe (2R1C) e 2R1C submetido à denervação aferente renal (DAx).....	33
<b>Figura 12:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de creatinina (A) e ureia sérica (B).....	35
<b>Figura 13:</b> Efeitos da denervação aferente renal na produção de ROS do rim isquêmico (A) e contralateral (B).....	36
<b>Figura 14:</b> Avaliação da expressão gênica do receptor AT-1 (A) e das subunidades de NADPH oxidases, p47phox (B) e gp91phox (C) no rim clipado.....	37
<b>Figura 15:</b> Avaliação da expressão gênica do receptor AT-1 (A) e das subunidades da NADPH oxidase, p47phox (B) e gp91phox (C) nos rins contralaterais.....	38
<b>Figura 16:</b> Efeitos da denervação aferente renal no padrão de excreção de proteínas na urina de acordo com o peso molecular. À esquerda o grupo 2R1C DAx, ao meio o grupo 2R1C e á direita o grupo controle.....	41
<b>Figura 17:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de proteinúria (A), microalbuminúria (B) e AGT urinário (C).....	42
<b>Figura 18:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de RBP4.....	42
<b>Figura 19:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de podocina em ambos os rins (Imunoblotting).....	43
<b>Figura 20:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de nefrina em ambos os rins (Imunoblotting).....	43
<b>Figura 21:</b> Efeitos da denervação aferente renal nos níveis proteicos de megalina e cubilina em ambos os rins.....	44

**Figura 22:** Esquema representativo dos efeitos da denervação aferente renal no modelo de hipertensão renovascular.....54

***Listas de Tabelas***

---

<b>Tabela 1:</b> Representação dos genes e sequências de primers utilizados.....	29
<b>Tabela 2:</b> Efeitos da denervação aferente renal na ingestão de água e ração, fluxo urinário, e, carga excretada e concentração plasmática de sódio e potássio (24h).....	34
<b>Tabela 3:</b> Efeitos da denervação aferente renal na concentração de enzimas antioxidantes em ambos os rins.....	39
<b>Tabela 4:</b> Efeitos da denervação aferente renal na concentração de citocinas.....	40

## ***Lista de Abreviaturas***

---

2R1C: 2 rins-1clipe

AGT: Angiotensinogênio

Ang II: Angiotensina II

ANSr: Atividade Nervosa Simpática Renal

AT1: Receptor de Angiotensina II do tipo 1

BFG: Barreira de Filtração Glomerular

CGRP: Peptídeo Relacionado ao Gene de Calcitonina

DAx: Denervação Aferente

DC: Débito Cardíaco

FC: Frequência Cardíaca

GPx: Glutationa Peroxidase

HA: Hipertensão Arterial

IRC: Insuficiência Renal Crônica

L4: Vértebra Lombar 4

MBG: Membrana Basal Glomerular

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NHE3: Trocador Sódio-Hidrogênio 3

NTS: Núcleo do Trato Solitário

O<sub>2</sub>: Oxigênio

PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

RBP-4: Proteína-4 de Ligação ao Retinol

RFG: Ritmo de Filtração Glomerular

RVLM: Região Rostroventrolateral do Bulbo

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RVP: Resistência Vascular Periférica

SFO: Órgão Subfornical

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SOD: Superóxido Dismutase

SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TRVP1: Receptor Vanilóide de Potencial Transitório 1

T6: Vértebra Torácica 6

T8: Vértebra Torácica 8

VDF: Volume Diastólico Final

## Resumo

---

Sabe-se que o estresse oxidativo e o aumento da atividade nervosa simpática renal (ANSr) exercem um importante papel na hipertensão arterial (HA). Sob condições fisiológicas, as fibras simpáticas renais controlam a liberação de renina, a reabsorção de sódio e a vasoconstrição renal. Além da inervação do sistema nervoso simpático (SNS), o rim é inervado por fibras sensoriais, ou aferentes, que sinalizam alterações intrarrenais para o encéfalo e, através de vias neurohumorais, podem modificar a ANSr. Na HA, estudos evidenciam que os nervos renais contribuem para o desenvolvimento da injúria, inflamação e aumento na excreção renal de proteínas. Apesar dos estudos clínicos mostrarem que a denervação renal é um método efetivo na redução da pressão arterial (PA) em pacientes hipertensos refratários ao tratamento farmacológico, à remoção das fibras simpáticas renais pode comprometer o papel fisiológico do SNS no controle renal da PA diante de desafios homeostáticos. Portanto, diante dessas evidências este trabalho avaliou os efeitos da denervação seletiva das fibras sensoriais renais em parâmetros cardiovasculares e renais de ratos Wistar 2 rins, 1 clipe (2R1C). Para a indução da HA, a artéria renal esquerda foi parcialmente ocluída pela inserção de um clipe de prata (0,2 mm de abertura). Após 4 semanas, a denervação aferente renal (DAx) foi realizada através da exposição do nervo renal à uma solução de capsaicina 33 mM por 15 minutos, sabe-se que a capsaicina em altas concentrações é capaz de dessensibilizar o receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV1) e depletar a produção de substância P e do gene relacionado ao peptídeo de calcitonina (CGRP). Após 2 semanas da DAx, foi observado redução significante da pressão arterial média (PAM) e da ANSr para ambos os rins isquêmico e contralateral. Quanto ao estresse oxidativo, observou-se uma redução das espécies reativas de oxigênio em ambos os rins, isquêmico e contralateral, sem alteração na atividade das enzimas antioxidantes no grupo 2R1C. Adicionalmente, houve aumento na expressão de receptores AT-1 de Ang II e das subunidades da NADPH oxidase, p47phox e gp91phox no rim isquêmico dos animais hipertensos e a DAx foi capaz de reduzir estes níveis. Ademais, a DAx foi capaz de melhorar proteinúria e a

microalbuminúria, sem alteração na excreção de proteínas de baixo peso molecular, como RBP4 nos ratos hipertensos. Entretanto, com relação à avaliação da expressão das proteínas estruturais dos podócitos, podocina e nefrina, e dos receptores endocíticos presentes no túbulo renal, megalina e cubilina, não se obteve diferenças entre os grupos em ambos os rins. Em conjunto, nossos dados demonstram que apesar da DAx reduzir parcialmente a PAM, a ANSr, o estresse oxidativo renal, a proteinúria e a lesão glomerular são melhorados no modelo renovascular. Portanto, o presente estudo sugere que a remoção das fibras aferentes renais é um método efetivo na melhora da HA e hiperatividade simpática em um modelo de hipertensão experimental.

**Palavras-chaves:** 1. Sistema Nervoso Simpático. 2. Hipertensão Renovascular. 3. Denervação Aferente. 4. Estresse Oxidativo. 5. Angiotensina II. 6. Proteinúria.

## Abstract

---

It is known that oxidative stress and increased renal sympathetic nervous activity (rSNA) play an important role in arterial hypertension (AH). Under physiological conditions, renal sympathetic fibers control renin release, sodium reabsorption, and renal vasoconstriction. In addition to innervation of the sympathetic nervous system (SNS), the kidney is innervated by sensory or afferent fibers, which signal intrarenal changes to the brain and, through neurohumoral pathways, can modify the rSNA. In AH, studies have shown that the renal nerve contributes to the development of injury, inflammation and increased renal excretion of proteins. Although clinical studies have shown that renal denervation is an effective method of reducing blood pressure (BP) in hypertensive patients refractory to pharmacological treatment, the removal of renal sympathetic fibers may compromise the physiological role of SNS in renal BP control of homeostatic challenges. Therefore, in light of these evidences, this work evaluated the effects of selective denervation of renal sensory fibers on cardiovascular and renal parameters of Wistar rats 2 kidneys, 1 clip (2K1C). For the induction of AH, the left renal artery was partially occluded by the insertion of a silver clip (0.2 mm gap). After 4 weeks, afferent renal denervation (ARD) was performed by exposing the renal nerve to a 33 mM capsaicin solution for 15 minutes, it is known that capsaicin at high concentrations is able to desensitize the transient potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) and deplete the production of substance P and the calcitonin peptide-related gene (CGRP). After 2 weeks of ARD, there was a significant reduction of mean arterial pressure (MAP) and rSNA for both ischemic and contralateral kidneys. As for oxidative stress, a reduction in both kidneys was observed, ischemic and contralateral in the 2K1C group. In addition, there was an increase in the expression of Ang II AT-1 receptors and the subunits of NADPH oxidase, p47phox and gp91phox in the ischemic kidney of hypertensive animals and ARD was able to reduce these levels. Also, ARD was able to improve proteinuria and microalbuminuria, without alteration in the excretion of low molecular weight proteins, such as RBP4 in hypertensive rats. However, in

relation to the evaluation of the expression of the structural proteins of the podocytes, podocin and nephrine, and of the endocytic receptors present in the renal tubule, megalin and cubilin, no differences were found between groups in both kidneys. Taken together, our data demonstrate that although ARD partially reduces BP, rSNA, renal oxidative stress, proteinuria, and glomerular damage are significantly improved in the renovascular model. Therefore, the present study suggests that the removal of renal afferent fibers is an effective method in improving AH and sympathetic hyperactivity in a model of experimental hypertension.

**Key words:** 1. Sympathetic Nervous System. 2. Renovascular Hypertension. 3. Afferent Denervation. 4. Oxidative Stress. 5. Angiotensin II. 6. Proteinuria

## **Sumário**

<i>Lista de Figuras</i> .....	10
<i>Lista de Tabelas</i> .....	13
<i>Lista de Abreviaturas</i> .....	14
<i>Resumo</i> .....	16
<i>Abstract</i> .....	18
<i>Sumário</i> .....	18
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivo</b> .....	19
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	19
3.1 Animais .....	19
3.2 Protocolo Experimental .....	20
<i>Design Experimental</i> .....	20
3.3 Indução da Hipertensão Renovascular .....	22
3.4 Denervação Aferente Renal .....	23
3.5 Canulação e registro da PAM e FC.....	24
3.6 Registro da ANS do rim isquêmico e contralateral basal .....	25
3.7 Avaliação do fluxo urinário e coleta de urina de 24h.....	26
3.8 Coleta das amostras de rim e soro .....	26
3.9 Avaliação dos parâmetros de função renal .....	27
3.10 Avaliação da produção de ROS no rim .....	28
3.11 Quantificação da expressão gênica do receptor AT-1 e das subunidades da NADPH oxidase no rim por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) .....	28
3.12 Avaliação da perda urinária de proteínas através da separação por peso molecular.....	29
3.13 Quantificação da expressão proteica da megalina, cubilina, podocina e nefrina no rim por imunoblotting.....	30

4. ANÁLISE DE RESULTADOS .....	31
5. <b>Resultados</b> .....	31
5.1 Efeitos da denervação aferente renal em parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e ANS renal para ambos os rins dos animais hipertensos renovasculares.....	31
5.2 Efeitos da denervação aferente renal em parâmetros metabólicos e eletrolíticos renais dos animais hipertensos renovasculares .....	33
5.3 Efeitos da denervação aferente renal no estresse oxidativo e inflamação renal dos animais hipertensos renovasculares .....	35
5.4 Efeitos da denervação aferente renal na proteinúria e expressão de proteínas renais dos animais hipertensos renovasculares.....	40
6. <b>Discussão</b> .....	47
7. <b>Conclusão</b> .....	55
8. <b>Anexos</b> .....	56
8.1 <i>Artigos publicados</i> .....	56
8.2 <i>Artigo em revisão</i> .....	56
8.3 <i>Artigos em redação</i> .....	57
8.4 <i>Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</i> .....	58
Referências Bibliográficas.....	59

## 1. Introdução

---

Conceituada como a capacidade dos sistemas biológicos de permanecerem em estado de equilíbrio mesmo em condições de constante alteração do meio externo, a homeostase ou homeostasia, foi primariamente descrita por Claude Bernard, fisiologista francês (1813-1878), ao introduzir o conceito de meio interno (*milieu intérieur*), o qual segundo este pesquisador, todos os mecanismos vitais, apesar de serem bastante distintos, apresentam como função primordial manter o meio interno constante (constância), ou seja, em equilíbrio. Desta forma, Walter Cannon (1871-1945), um fisiologista americano, criou então o termo homeostase para nomear essas condições internas constantes do organismo (Cannon, 1929; Abramov e Mourão Jr, 2012).

Portanto, para um sistema complexo são necessários mecanismos de controle efetivos que mantenham a homeostase, diante disso, um sistema que possui um importante papel em manter este equilíbrio é o sistema circulatório, cuja principal função é conduzir e distribuir elementos vitais para todos os tecidos do corpo, como por exemplo, oxigênio ( $O_2$ ). Todavia, para o sistema circulatório fluir normalmente, o coração trabalha constantemente bombeando o sangue para todo o organismo. A força para fazer com que o sangue circule é gerada, sobretudo, pela contração do músculo ventricular cardíaco e o fluxo sanguíneo se dá pelo extenso sistema de vasos que torna todos os órgãos do corpo, de certa forma, conectados por um sistema de vasos comunicantes. Logo, o clássico conceito de pressão arterial (PA) pode ser facilmente

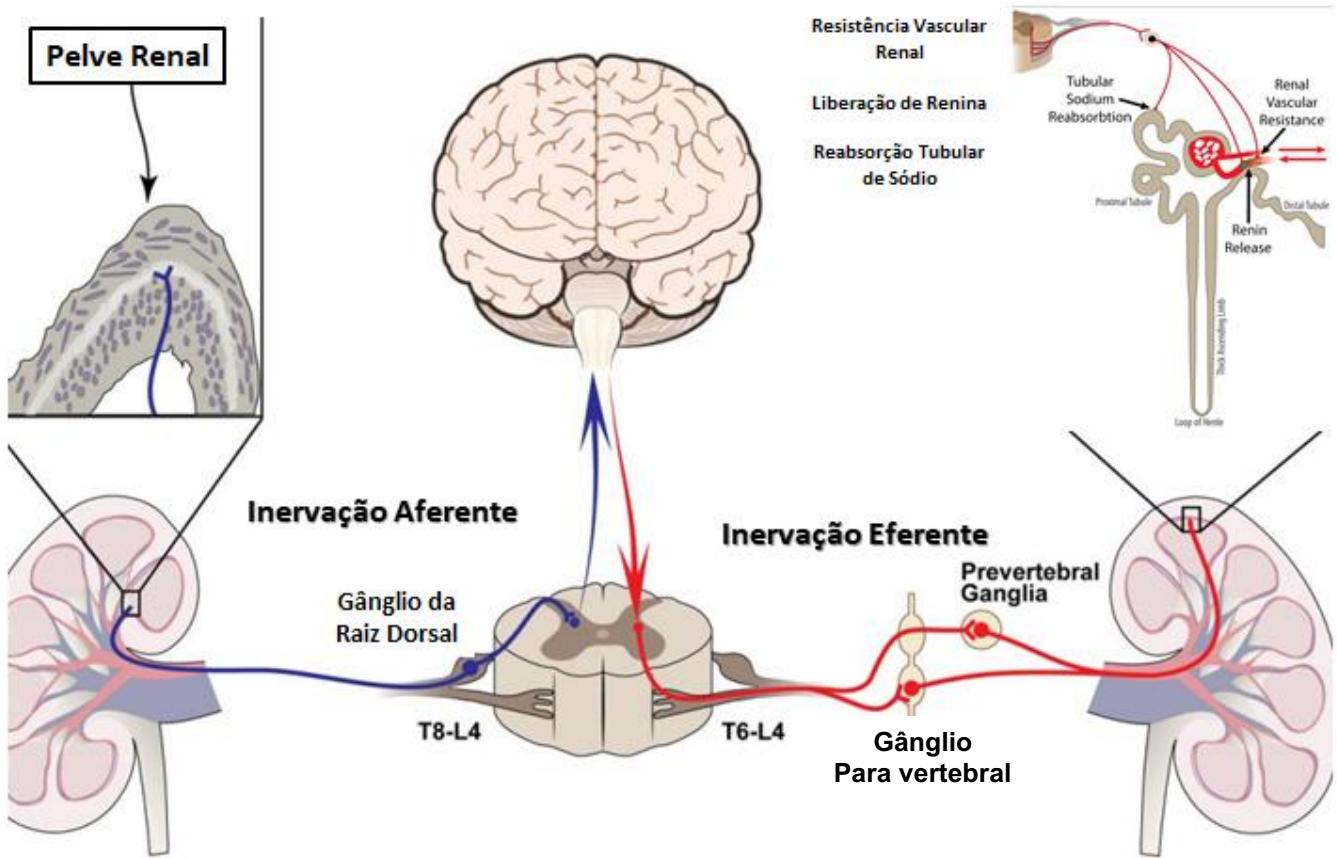
compreendido, ou seja, é o coração que impulsiona o sangue fazendo com que ele exerce uma força contra a parede das artérias (Binda *et al.*, 2013).

Por conseguinte, a geração e manutenção de um nível adequado de PA é uma necessidade básica para a sobrevivência dos mamíferos, mantendo a homeostase do organismo. Sabe-se que a mesma é derivada de um produto, no qual débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica (RVP) exercem grande influência. O DC é caracterizado pela quantidade de sangue ejetado pelos ventrículos por unidade de tempo, no qual DC é igual à frequência cardíaca (FC) multiplicada pelo volume sistólico (VS), fórmula ( $DC = FC \times VS$ ). No entanto, a RVP relata a pressão necessária para que ocorra o fluxo sanguíneo, logo tem grande influência da Lei Poiseuille (Jean-Louis-Marie Poiseuille, 1797-1869), a qual se dá pela fórmula  $Q = \Delta P \pi R^4 / 8 \eta l n$ , onde  $Q$  é o determinante do fluxo,  $\Delta P$  é o gradiente pressórico existente entre as duas extremidades do tubo (*i.e.*  $P_1 - P_2$ ),  $R$  é o raio,  $l$  é o *comprimento do tubo* e  $\eta$  o *coeficiente de viscosidade do líquido*. Desta maneira, vale salientar ainda, que a RVP é determinada, majoritariamente, pelo raio do vaso, visto que é uma grandeza elevada à quarta potência, afetando então demasiadamente o fluxo sanguíneo. (Binda *et al.*, 2013) (Howard *et al.*, 2019)

Para tanto, níveis elevados ou reduzidos de PA perturbam consideravelmente a manutenção da homeostase do organismo. No entanto, como citado acima, o sistema biológico dispõe de diversos mecanismos neurais, hormonais e locais de ajustes finos, e isso se aplica ao controle da PA. Dentre os sistemas hormonais envolvidos no controle da PA, pode-se destacar o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), cuja cascata de ativação

culmina principalmente em promoção do aumento da PA através da ligação da angiotensina II (Ang II) ao seu respectivo receptor do tipo 1 (AT-1). É sabido que o SRAA é bem mais complexo que isso e que estudos enfatizam a existência de um contrabalanço na regulação da PA e de outras funções, no entanto, o foco deste trabalho é evidenciar melhor qual o papel do SRAA no aumento da PA, visto que diversos estudos elucidam, inclusive, estudos em nosso laboratório, que em condições de doenças cardiovasculares esse sistema está exacerbado e atua de modo a manter os níveis elevados da PA. Além disso, outro sistema que possui total protagonismo no controle da PA é a ação do sistema nervoso simpático (SNS) principalmente para os vasos, o coração e os rins (Johns *et al.*, 2011). Nos rins, o SNS influencia a função renal e ativação do SRAA. Deste modo, a inervação simpática, ou eferente, do rim ocorre através de uma rede densa de fibras pós-ganglionares que correm ao longo da artéria e do hilo renal, subdividindo-se e penetrando no córtex e no aparelho justaglomerular e túbulos (Dibona e Kopp, 1997); (Dibona, 2001). A estimulação da atividade nervosa simpática renal (ANSr) libera neurotransmissores como neuropeptídio Y, ATP e, principalmente, noradrenalina (Esler *et al.*, 1984), a qual age em receptores adrenérgicos alfa-1 localizados nos túbulos renais e vasos sanguíneos que, respectivamente, aumentam a reabsorção renal de sódio e consequentemente de fluidos e promovem vasoconstrição renal, reduzindo o fluxo sanguíneo renal. Já a estimulação dos receptores adrenérgicos beta-1 aumenta a secreção de renina pelas células granulares do aparelho justaglomerular e consequentemente aumenta a produção de Ang II sistemicamente. Por sua vez, a Ang II causa vasoconstrição, liberação de aldosterona, aumento na reabsorção de sódio e

água, dentre outros efeitos, ao atuar em receptores AT-1. Adicionalmente, a Ang II circulante ao agir em regiões específicas do encéfalo envolvidas no controle neural da PA aumenta a ativação do SNS e induz o aumento da sede e o apetite ao sódio. (Dibona e Kopp, 1997); (Dibona, 2001). Nossos grupos demonstraram que o aumento da ANSr interage com o SRA intrarrenal ativando a cascata de sinalização que leva a reabsorção de sódio mediada pelo principal transportador do túbulo proximal, o trocador de sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3) (Pontes, Crajoinas, *et al.*, 2015; Pontes, Girardi, *et al.*, 2015). Assim, esta alça de feedback positivo contribui para o aumento de PA. Além da inervação simpática, o rim é inervado por fibras sensoriais, ou aferentes, que, através de polissinapses, atingem diversas regiões encefálicas, incluindo os centros de regulação cardiovascular e renal (Solano-Flores *et al.*, 1997) como o núcleo do trato solitário (NTS), região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), órgão subfornicial (SFO) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Como mostra a **Figura 1 (adaptado de Osborn, John, 2015)**.



**Figura 1: Esquema representativo da ineração aferente e eferente renal**

Adaptado: (Osborn, John, 2015).

Assim, as fibras aferentes renais parecem contribuir de forma importante na regulação da resistência vascular sistêmica e no controle da PA. Essas fibras estão localizadas principalmente na parede da pelve renal, onde funcionam como quimiorreceptores, respondendo as variações na composição do fluido intersticial, e como mecanorreceptores, que respondem ao estiramento provocado por flutuações na pressão hidrostática (Johns *et al.*, 2011). Outro estudo do nosso grupo demonstrou que a estimulação elétrica das fibras aferentes leva à ativação de neurônios catecolaminérgicos na região RVLM e redução da ANS<sub>r</sub> acompanhada do aumento da excreção de sódio e redução da atividade do transportador NHE3 do rim contralateral (Nishi *et al.*,

2017) indicando que as fibras aferentes influenciam a ANSr e a função renal sob condições fisiológicas.

Haja vista a importância destes sistemas e como elucidado acima, o distúrbio dos mecanismos que regulam a PA pode resultar na elevação dos níveis de PA, ou hipertensão arterial (HA), a qual só foi considerada clinicamente importante após a criação do aparelho no qual era possível medir e estimar seus níveis, o esfigmomanômetro (Samuel Siegfried Karl Ritter von Basch, 1881), e, após Hervey Cushing (1901) modernizar o dispositivo e introduzi-lo na comunidade médica. Sabe-se, atualmente, que indivíduos que apresentam PA  $\geq 140/90$  mmHg são considerados hipertensos. (Malachias et al., 2016)

Conceituada como uma condição clínica multifatorial, a HA é caracterizada pelos níveis tensionais elevados contra a parede dos vasos sanguíneos e associada a fatores genéticos e alterações metabólicas, hormonais e a fenômenos tróficos do coração e dos vasos. (Kohlmann Jr. et al., 1999). A HA, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (Global Brief on Hypertension, 2013), é responsável por 9,4 milhões de mortes por ano, sendo 45% das mortes relacionadas às doenças do coração e 51% das mortes provocadas por acidentes vasculares encefálicos. Ainda, segundo a pesquisa de risco global da HA, em 2025 haverá 1,6 bilhão de pacientes no mundo. Ademais, estima-se que a mesma seja responsável por 10% de todo o custo global de saúde, com o gasto de US\$ 370 bilhões de dólares por ano (Malachias et al., 2016). Se não tratada, a HA pode danificar o endotélio vascular, levando a uma resposta proliferativa, arteriosclerose e, consequentemente, deterioração de órgãos vitais como o coração, os rins e o

encéfalo, respostas estas que potencializam os riscos de acidente vascular encefálico, doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica (Malachias *et al.*, 2016). No Brasil, a prevalência da HA é acima de 30% na população adulta e estudos populacionais realizados nos últimos quinze anos mostram que apenas 52% dos indivíduos têm conhecimento de que são hipertensos. Além disso, apenas 35% dos pacientes hipertensos que sabem de sua condição são tratados e, destes, apenas 67% apresentam controle adequado da HA (Malachias *et al.*, 2016). A HA é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. Vale salientar, ainda, que a HA é uma condição complexa uma vez que fatores ambientais, tais como hábitos alimentares, sedentarismo, tabagismo, alta ingestão de sódio podem interagir e contribuir para o seu desenvolvimento ou perpetuação (Perry *et al.*, 1994; Pickering, 1997). Finalmente, hoje se sabe que existem vários genes que são relacionados à HA e, portanto, há também um importante componente genético no desenvolvimento da mesma (Kunes e Zicha, 2009).

Apesar dos avanços na prevenção e no tratamento da HA, como alteração no estilo de vida e na dieta e os diversos fármacos anti-hipertensivos, o índice alto de controle inadequado da PA demonstra a necessidade de novas estratégias terapêuticas. (Malachias *et al.*, 2016) A HA pode ser classificada como primária ou essencial, sem uma causa conhecida, ou como secundária, com uma causa definida. Dentre as HA secundárias, a hipertensão arterial renovascular é a de maior prevalência (Malachias *et al.*, 2016). Ainda, a prevalência da hipertensão renovascular é de 30 a 40% entre pacientes que possuem doenças cardiovasculares como, por exemplo, insuficiência cardíaca,

doença periférica vascular e coronariana. (Weber e Dieter, 2014) Portanto, a investigação dos mecanismos envolvidos nessa condição é de extrema importância.

Como já descrito, diversos mecanismos neurais, hormonais, locais e renais estão envolvidos no desenvolvimento da HA humana e experimental, como o aumento da ativação do SRAA, SNS, ademais, a ação de outras substâncias ou hormônios vasoconstritores, como as endotelinas e a arginina vasopressina (De Champlain *et al.*, 2004). Além desses mecanismos clássicos, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (De Champlain *et al.*, 2004) e marcadores inflamatórios tem sido destacado na gênese da HA. (Campos *et al.*, 2015) Ainda, uma possível atenuação dos mecanismos vasodilatadores como óxido nítrico (NO), peptídeo natriurético atrial, bradicinina e prostaglandinas pode estar envolvida nessa doença (De Champlain *et al.*, 2004). A importância da ANSr e sua interação com o SRAA tem sido assunto de debate quanto ao fator dominante na fisiopatologia da HA humana e experimental. Uma das hipóteses estabelece que a ativação do SNS seja predominante na gênese da HA (Esler *et al.*, 2010) e a outra sugere que as ações intrarrenais do SRAA é que predominam nesta situação (Navar, 2010). A hipótese da presente dissertação é que esses dois sistemas se comunicam através dos nervos renais e, desta forma, contribuem para os diversos mecanismos envolvidos na HA. O papel da inervação simpática renal na gênese e evolução da HA ganhou nova ênfase a partir do desenvolvimento da técnica de denervação renal por radiofrequência para pacientes hipertensos resistentes ao tratamento farmacológico (Krum *et al.*, 2009). Anteriormente a denervação renal, experimentos que deram base a esta aplicação clínica

mostraram o envolvimento do aumento da atividade simpática com a hipertensão. Na década de 20, experimentos feitos em cães mostraram que a estimulação do nervo esplâncnico era capaz de alterar a PA (Smithwick e Thompson, 1953). Já na década de 40, estudos mostraram que pacientes que foram submetidos à retirada do nervo simpático esplâncnico apresentaram uma importante redução da PA, porém com efeitos colaterais diversos (Patel *et al.*, 2015; Wimmer e Mauri, 2015). Assim, a denervação simpática mostrou ser eficaz em reduzir a PA antes mesmo do surgimento dos fármacos existentes atualmente (Patel *et al.*, 2015; Wimmer e Mauri, 2015). Estudos clínicos realizados em pacientes hipertensos refratários ao tratamento farmacológico com a associação de três ou quatro classes diferentes de agentes anti-hipertensivos mostraram que a denervação renal bilateral por radiofrequência foi eficaz em reduzir a PA sistólica e diastólica de forma sustentada durante o período de três anos (Krum *et al.*, 2014). Novos estudos têm sido realizados para aprimorar o procedimento da denervação renal em pacientes, no entanto, os mecanismos anti-hipertensivos da denervação renal ainda não são totalmente conhecidos. (Esler *et al.*, 2010) Todavia, os estudos em pacientes hipertensos resistentes apontam para o papel do SNS, em especial dos nervos renais, na manutenção da HA e geração de simpatoexcitação para outros órgãos (Hering *et al.*, 2013). Embora estudos levantem questionamentos quanto à eficácia da denervação renal, em especial o estudo SIMPLICITY HTN-3 que não atingiu a eficácia primária da denervação renal em pacientes com HA resistente, sabe-se atualmente que os dados desse estudo foram falhos, sobretudo pela falta de confirmação do sucesso do procedimento e a

falta de experiência dos intervencionistas. (Esler *et al.*, 2010) (Bhatt *et al.*, 2014) (Bakris e Bhatt, 2015)

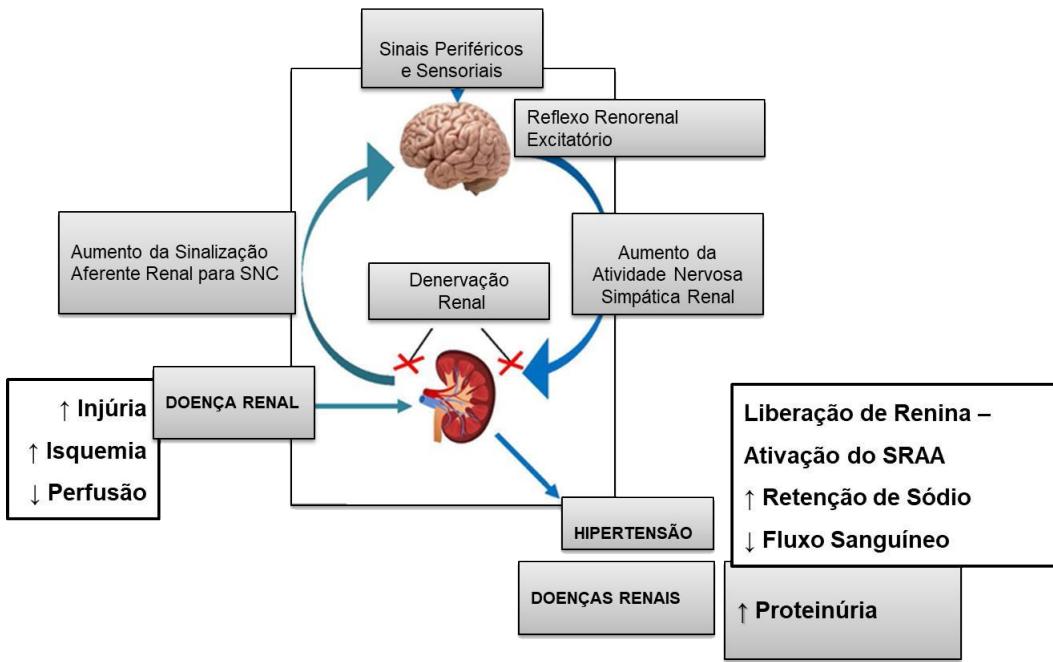
Recentemente, estudos como o SPYRAL-HTN ON/OFF (Böhm *et al.*, 2019) (Banek *et al.*, 2016; Kjeldsen *et al.*, 2018) e RADIANCE SOLO (Azizi *et al.*, 2019) trazem uma nova abordagem do método, demonstrando que a denervação renal pode ser eficaz se realizada e conduzida de forma adequada (Singh and Denton, 2018) (Schlaich *et al.*, 2018). Portanto, avanços no procedimento têm sido realizados e a denervação renal em humanos apresenta-se como uma estratégia terapêutica promissora (Esler e Guo, 2017). O fato de a denervação renal melhorar a função cardíaca e vascular, o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina em pacientes sugere a participação de vias aferentes renais (Schlaich *et al.*, 2014). Desta forma, estudos em modelos experimentais podem contribuir para o entendimento dos mecanismos pelos quais a denervação renal reduz a PA e, assim, aprimorar o procedimento. Haja vista a importância das fibras simpáticas no controle da reabsorção de sódio, liberação de renina e vasoconstrição renal, sobretudo em condições de hipotensão, a remoção permanente da inervação simpática pode prejudicar o ajuste renal da PA. De fato, experimentos realizados em ovelhas com insuficiência renal crônica (IRC) submetidas à denervação renal mostraram que os mecanismos cardiovasculares e renais compensatórios estavam comprometidos numa situação de desafio homeostático, provavelmente pela remoção das fibras simpáticas (Singh *et al.*, 2017). Neste estudo, foi demonstrado que a denervação renal, utilizando o mesmo cateter utilizado nos estudos clínicos, reduziu a PA e melhorou a função renal após 2 e 5 meses nas ovelhas com IRC, sem alterar esses parâmetros nas ovelhas

saudáveis (Singh et al., 2017). No entanto, o mesmo estudo induziu hemorragia para desafiar o sistema cardiovascular reduzindo PA e, assim, avaliar a capacidade do controle neural da função renal para retornar a PA a níveis basais após a denervação renal em ovelhas com IRC e saudáveis (Singh et al., 2017). Foi observado que a PA diminuiu mais rapidamente e com maior intensidade após a hemorragia tanto nas ovelhas com IRC quanto nas ovelhas saudáveis submetidas à denervação renal em comparação às ovelhas com a inervação renal intacta (Singh et al., 2017). Durante a hemorragia, as respostas compensatórias de aumento na atividade da renina plasmática, vasoconstricção e redução no RFG e na excreção de sódio estavam comprometidas nas ovelhas denervadas, indicando que a denervação das fibras simpáticas compromete a função renal durante desafios pressóricos. Diante disso, a hipótese do nosso estudo é que a remoção seletiva das fibras aferentes leva à melhora da hiperatividade simpática renal e alterações cardiovasculares e renais em um modelo de HA neurogênica em ratos.

Sabe-se que diversos fatores podem promover a ativação das aferências renais, como acidose, isquemia, estresse oxidativo, inflamação, fatores endoteliais, fibrose, como também pela Ang II (Sobotka et al., 2011; Böhm et al., 2013). No modelo de hipertensão renovascular, já foi verificado que há alterações intrarrenais, tais como aumento de marcadores profibróticos e aumento da síntese de renina, e que estes fatores parecem ter direta relação com o aumento da ANSr e o aumento na expressão de receptores AT1 em uma região do SNC envolvida com o controle cardiovascular, a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) (Oliveira-Sales et al., 2009) (Campos et al., 2011). As fibras aferentes renais contêm como principais neurotransmissores a

substância P e o CGRP e, uma vez ativadas, um reflexo simpatoinibitório é deflagrado, provocando uma resposta em que o rim contralateral aumenta a natriurese e diurese consequente à atividade eferente reduzida, tal mecanismo fisiológico é denominado reflexo reno-renal (Johns *et al.*, 2011). Entretanto, a atividade das fibras aferentes renais exacerbada parece resultar em efeito simpatoexcitatório em condições fisiopatológicas como a HA (Kopp e Buckley-Bleiler, 1989), podendo levar a maior ativação do SRAA e elevando ainda mais a PA. Os mecanismos pelos quais o reflexo reno-renal simpatoinibitório sob condições normais se torna simpatoexcitatório sob condições fisiopatológicas não estão elucidados. Estudos do nosso grupo sugerem que a influência das aferências renais na neurotransmissão GABAérgica no PVN pode contribuir para o aumento da ANSr no modelo renovascular (Nishi *et al.*, dados não publicados).

A **Figura 2** esquematiza o reflexo reno-renal entre as fibras aferentes renais e a ativação simpática para o rim na HA. Acredita-se, portanto, que o efeito da denervação renal seja decorrente da interrupção deste ciclo nas diversas condições patológicas caracterizadas por aumento da ANSr (Schlaich *et al.*, 2013).



**Figura 2: Esquema representativo dos efeitos da sinalização aferente renal e da ativação das fibras eferentes. (Adaptado: Alicia A. Thorp e Markus P. Schlaich, 2015).**

Além disso, um estudo mostrou que em células epiteliais tubulares, ambas as substâncias, noradrenalina e CGRP, induzem apoptose e liberação de fatores profibróticos capazes de estimular a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, (Kim e Padanilam, 2013) evidenciando, assim, a hipótese de contribuição para o aparecimento de injúrias renais.

A HA renovascular é causada por obstrução parcial (cerca de 70% do lúmen) de uma ou ambas as artérias renais ocasionando a isquemia parcial do(s) rim(s) (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Acredita-se que a maioria dos pacientes que apresentam estenose da artéria renal, seja de uma ou de ambas as artérias, desenvolvem HA devido à ativação do SRAA, à deficiência na função renal e à ativação do SNS (Piecha *et al.*, 2012).

Portanto, um modelo experimental de HA interessante para estudar a interação entre o SRAA endógeno e a hiperatividade simpática renal é o renovascular desenvolvido por Goldblatt e colaboradores (Goldblatt *et al.*, 1934). Nesse modelo, conhecido como 2 rins, 1 clipe (2R-1C), a HA é induzida pela inserção de um clipe de prata ao redor de uma das artérias renais para reduzir o fluxo sanguíneo renal em aproximadamente 50%, levando ao aumento na liberação de renina. Dessa forma, ocorre o aumento dos níveis endógenos de Ang II em resposta à isquemia renal produzindo HA sustentada.

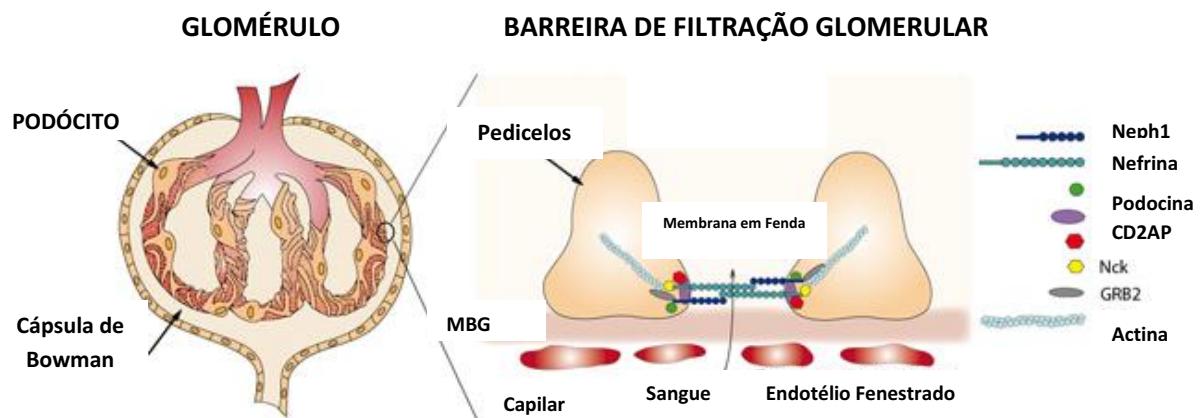
Embora o mecanismo inicial para induzir a HA seja a ativação do SRAA, outras alterações também são observadas nesse modelo, como o aumento da ANSr, estresse oxidativo e inflamação (Campos *et al.*, 2011) . Sabe-se que a HA associada aos níveis elevados de Ang II está relacionada ao aumento da produção de ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) no músculo liso vascular, principalmente via ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (Rajagopalan *et al.*, 1996). Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram a importância do estresse oxidativo no SNC em ratos hipertensos 2R1C, sobretudo em duas regiões envolvidas com a regulação autonômica cardiovascular: a RVLM e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Campos *et al.*, 2011) (Nishi *et al.*, 2013). Verificou-se que a HA e a hiperatividade simpática renal foram associadas com um aumento na expressão do receptor AT-1 e dos marcadores de estresse oxidativo, como as subunidades p47phox e gp91 phox da NADPH oxidase, no RVLM e PVN, bem como nos rins clipados de ratos 2R-1C (Campos *et al.*, 2011). As subunidades p47phox e gp91phox são cruciais para a ativação da NADPH oxidase, a qual envolve um processo de múltiplos passos, iniciado pela fosforilação da serina da subunidade p47phox citosólica.

Após a estimulação do receptor AT-1 pela Ang II, a subunidade p47phox citoplasmática liga-se às subunidades de membrana gp91phox e p22phox para ativar a enzima, resultando assim na produção de ânion  $O_2^-$  (Groemping *et al.*, 2003). Uma vez que a ativação dos receptores AT-1 na RVLM contribui para o aumento do estresse oxidativo e ANSr no modelo 2R-1C (Nishi *et al.*, 2013), e que a denervação total, ou seja, tanto das fibras simpáticas como aferentes do rim isquêmico, reduz o estresse oxidativo no RVLM e PVN (Nishi *et al.*, em revisão), o presente projeto visou estudar a contribuição das fibras aferentes renais no estresse oxidativo renal e ANS tanto para o rim isquêmico quanto o contralateral. Ademais, estudos experimentais sugerem que os nervos renais possui um importante papel na injúria e inflamação renal (Banek, 2016-2018). Foi demonstrado que a denervação renal foi capaz de reduzir a albuminúria, deposição de colágeno IV, fibrose renal, bem como, marcadores inflamatórios nos rins em um modelo experimental de glomerulonefrite (Veelken *et al.*, 2008). Sabe-se que os nervos renais, especialmente os nervos eferentes como reportado (Harrison, DG, 2015) medeiam à inflamação renal através da ativação de células-T e aumento de citocinas inflamatórias. Recentemente, um estudo sugeriu que a atividade do nervo aferente renal medeia à resposta hipertensiva no modelo DOCA-sal, no entanto, a inflamação é mediada primariamente pela atividade simpática renal. No entanto, em outro modelo de hipertensão (Ang-II-Sal) a infusão de Ang-II não é associada com a infiltração de células-T nos rins e a denervação renal não interfere neste parâmetro (Foss *et al.*, 2018). Nos rins, as catecolaminas possuem um efeito direto na proliferação de células tubulares através dos receptores  $\beta$ - adrenérgicos (Wolf *et al.*, 1996), que, quando ativados excessivamente, causam lesões renais.

Vale destacar também, que o rim é um dos principais órgãos em manter a homeostase. Em média, 25% do DC é destinado aos rins, o que pode demonstrar sua importância. Sabe-se que a barreira de filtração nos glomérulos é eficiente em impedir a filtração de grandes quantidades de proteínas. No entanto, em torno de 0,01 a 0,05% da concentração plasmática de proteína, principalmente a albumina, pode ser encontrada no filtrado. No túbulo proximal ocorre a reabsorção de aproximadamente > 99% das proteínas através de endocitose por receptores presentes na membrana apical, denominadas megalina e cubilina (Norden *et al.*, 2014). A albumina é reabsorvida predominantemente por endocitose, sofrendo posteriormente degradação pelos lisossomos. É sabido, que a megalina é uma proteína transmembranar da família de receptores de LDL que se liga à albumina e outras proteínas e atua através de fosforilação. A mesma facilita a internalização de cubilina, uma proteína que se liga à albumina, colesterol HDL, transferrina, cadeias leves de IgG e apolipoproteína A1 (Hosojima *et al.*, 2009) (Tenten *et al.*, 2013).

Experimentos em animais e estudos clínicos em pacientes com glomerulopatias têm demonstrado que a lesão do podócito tem um papel fundamental no desenvolvimento da proteinúria (Mundel e Shankland, 2002). A arquitetura microscópica e a integridade da barreira de filtração glomerular (BFG) dependem de três diferentes camadas, como célula endotelial glomerular, membrana basal glomerular (MBG) e célula epitelial visceral ou podócitos, que formam entre si o diafragma ou fenda de filtração. Sabe-se que os podócitos possuem a estrutura mais complexa e importante papel na filtração glomerular, visto que, possuem proteínas, como a podocina e nefrina, que atuam de forma relevante em impedir que proteínas ultrapassem a BFG.

Desta forma, o desenvolvimento da proteinúria pode estar associado à filtração glomerular, através do comprometimento da membrana em fenda (figura 3) do podócito, com a desagregação ou mutação das proteínas do diafragma na fenda (nefrina, podocina, CD2AP, Neph) (Gloy *et al.*, 2000); (Mundel e Shankland, 2002).



**Figura 3: Imagem representativa da membrana em fenda presente no podócito, evidenciando as principais proteínas associadas, como a podocina e nefrina.**  
Adaptado: (Tutor *et al.*, 2014)

No entanto, o desenvolvimento de proteinúria também pode ser de origem tubular, através do comprometimento dos receptores endocíticos megalina e cubilina no túbulo proximal (Hosojima *et al.*, 2009).

Um estudo demonstrou que as catecolaminas influenciam a função dos podócitos, os quais são considerados a chave principal na gênese da injúria glomerular. A ativação simpática causa hipercontração dos podócitos, podendo resultar na interrupção da BFG e o acesso e extravasamento de grandes moléculas, como a albumina (Gloy *et al.*, 2000). O estresse oxidativo e a Ang II também podem comprometer a função dos podócitos, resultando em albuminúria (Gloy *et al.*, 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação do receptor AT-1 pela Ang II inibe a expressão gênica e proteica da megalina

em cultura de células de túbulo proximal (linhagem OKP) (Hosojima *et al.*, 2009). Sabe-se que as fibras simpáticas interagem com o SRAA intrarrenal para ativar a reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 no túbulo proximal (Pontes, Crajinas, *et al.*, 2015). No entanto, não se sabe se os nervos renais podem influenciar diretamente ou indiretamente através do SRAA a reabsorção de proteínas ou expressão dos receptores endocíticos de proteínas no túbulo proximal. No presente estudo, avaliamos se o mecanismo pelo qual a denervação aferente renal reduz a proteinúria envolve a expressão da megalina e cubilina e/ou nefrina e podocina no rim dos ratos hipertensos renovasculares. Adicionalmente, estudos recentes têm mostrado que lesões do túbulo proximal parecem contribuir para a progressão de doenças renais. Sabe-se que proteínas de baixo peso molecular (99% dos aproximadamente 1,5 g / 24 h de proteína é filtrada pelo glomérulo renal. Portanto, quando há uma disfunção ocorre então à chamada “proteinúria tubular”, compreendendo proteína-4 de ligação ao retinol (RBP4), albumina e muitas outras proteínas (Norden *et al.*, 2014). No presente estudo, foi avaliado se a proteinúria no modelo renovascular resulta de mecanismos glomerulares, tubulares ou ambos e, ainda, a influência da ineração aferente renal nessas alterações. Diante dessas evidências, a hipótese da presente dissertação foi que as fibras aferentes renais contribuem para a HA, simpatoexcitação e alterações renais, como função, estresse oxidativo, inflamação e proteinúria em ratos hipertensos renovasculares (2 Rins-1 Clipe).

## **2. Objetivo**

---

Este estudo avaliou o efeito da denervação aferente do rim isquêmico nas alterações cardiovasculares, renais e hiperativação simpática para os rins isquêmico e contralateral em ratos 2R-1C.

## **3. Materiais e Métodos**

---

### **3.1 Animais**

Para desenvolver este trabalho todos os procedimentos e protocolos experimentais foram conduzidos após a análise e aprovação de acordo com as diretrizes recomendadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (processo 1645050517). Foram utilizados ratos Wistar com cinco (5) semanas de idade (peso entre 150-180 g), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) credenciada à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA UNIFESP – Registro 1). Os animais tiveram acesso livre à ração e água e foram mantidos com temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar de  $60 \pm 5\%$  e ciclo de claro-escuro de 12 horas (das 7 às 19h), controlados automaticamente no biotério setorial da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da UNIFESP (Registro CEUA/UNIFESP 24).

### **3.2 Protocolo Experimental**

Os animais foram distribuídos em três (3) grupos experimentais (n=5-6/grupo):

**CTL:** animais normotensos, com idade pareada aos hipertensos, submetidos ao procedimento de denervação renal “sham”; foram estudados 2 semanas após a denervação “sham”.

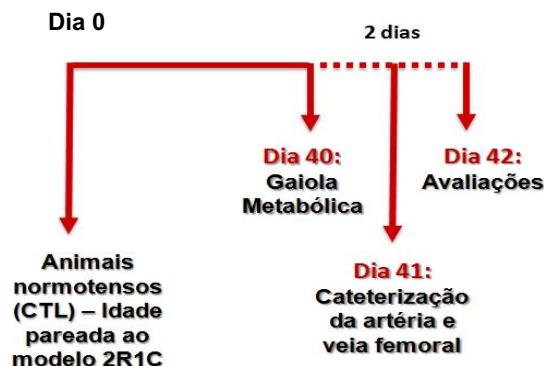
**2R-1C:** a HA foi induzida nos animais com 5 semanas de idade, após 4 semanas os animais foram submetidos ao procedimento de denervação renal “sham”; foram estudados 2 semanas após a denervação “sham”, ao completar 6 semanas da indução da HA.

**2R-1C+DAx:** a HA foi induzida nos animais com 5 semanas de idade, após 4 semanas os animais foram submetidos ao procedimento de denervação renal aferente (DAx); foram estudados 2 semanas após a denervação aferente, ao completar 6 semanas da indução da HA.

#### ***Design Experimental***

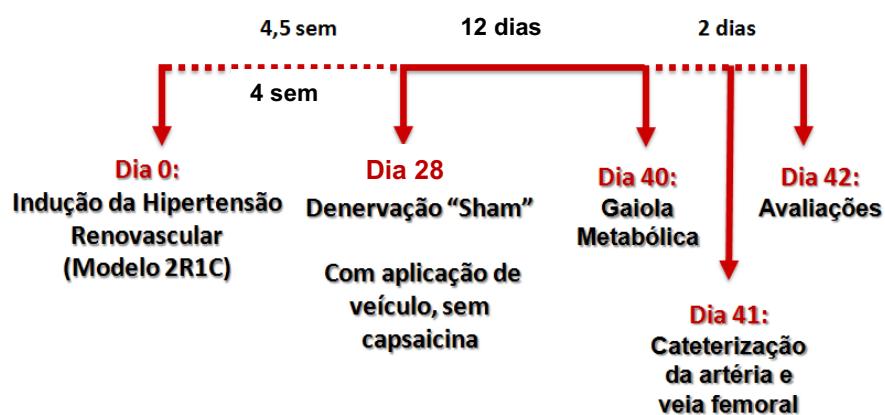
Os seguintes protocolos foram seguidos:

### Grupo CTL:



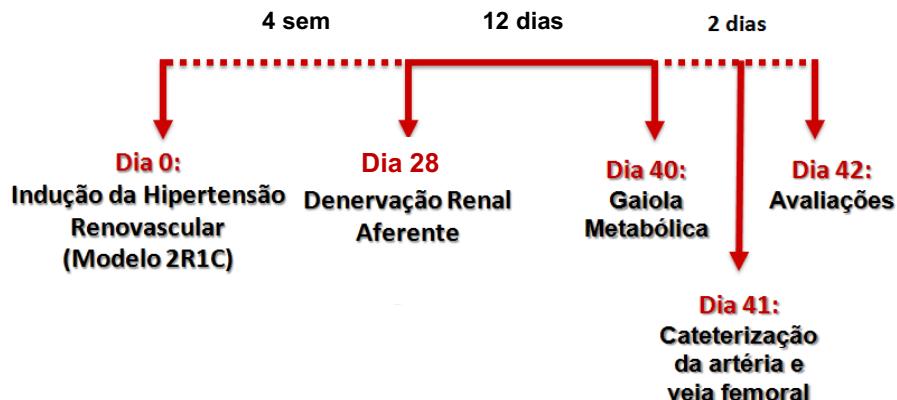
**Figura 4: Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo controle (animais normotensos) em relação ao tempo.**

### Grupo 2R-1C:



**Figura 5: Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo hipertenso renovascular (2R-1C) em relação ao tempo.**

### Grupo 2R-1C+DAx:

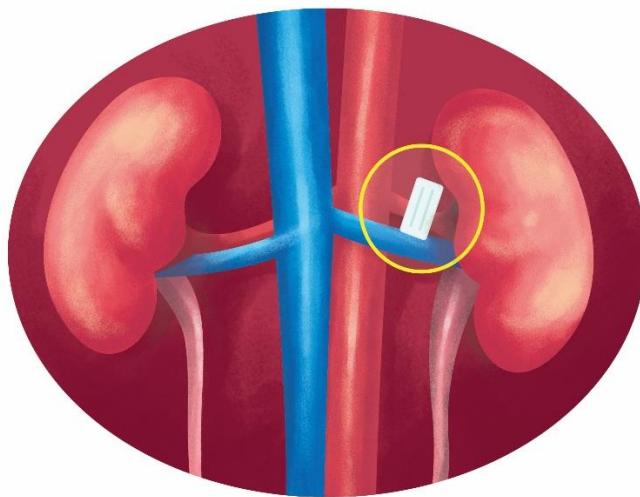


**Figura 6: Esquema representativo do protocolo seguido para o grupo hipertenso renovascular (2R-1C) submetido ao procedimento de denervação aferente renal (DAx) em relação ao tempo.**

### 3.3 Indução da Hipertensão Renovascular

Para a obtenção de animais hipertensos foi utilizado o modelo de hipertensão renovascular (modelo Goldblatt, 2 rins-1 clipe). Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg) intraperitonealmente, a artéria renal esquerda foi cuidadosamente separada do tecido conectivo e respectiva ineração e então parcialmente ocluída pela colocação de um clipe de prata (0,2 mm de abertura). A profundidade da anestesia foi monitorada através da presença ou ausência de determinados sinais, como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações da frequência cardíaca e respiratória, as quais sofrem modificações de acordo com o plano anestésico atingido. Posteriormente, esperou-se um período de

quatro semanas para obtenção de um estado hipertensivo estável. Os animais controles não foram submetidos à clipagem renal, no entanto, tiveram idade pareada aos clipados.

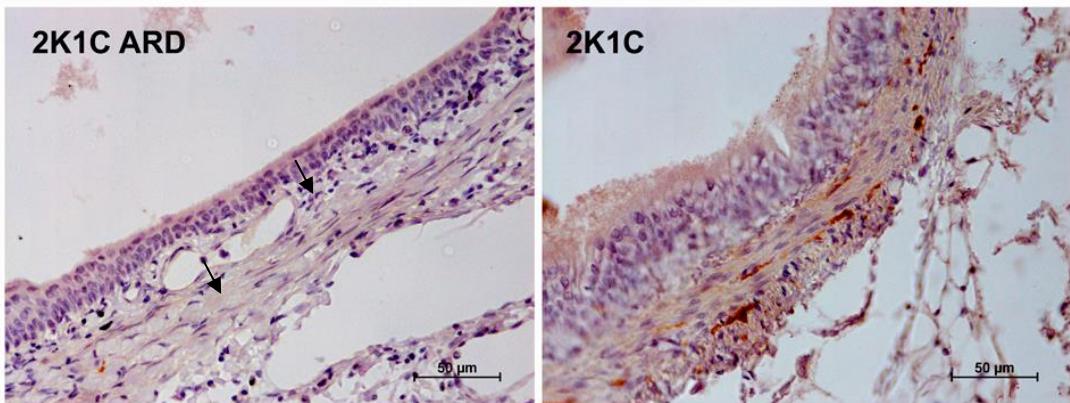


**Figura 7:** Imagem representativa do modelo experimental de hipertensão renovascular (2R1C).

### 3.4 Denervação Aferente Renal

A deafferentação do rim isquêmico dos ratos hipertensos ( $PAM > 140$  mmHg) foi executada empregando-se o método recentemente descrito (Foss *et al.*, 2015) no qual a ablação seletiva das fibras sensoriais CGRP positivas é efetuada por meio da exposição do nervo renal a uma solução de capsaicina 33 mM (diluída em 0,1% etanol e 0,1% Tween 80) durante 15 minutos. Cabe ressaltar que os grupos foram estudados 2 semanas após o procedimento de deafferentação, quando os níveis renais de CGRP estão quase abolidos e não há resposta funcional dos aferentes renais, ou seja, não houve reinervação das fibras aferentes (Foss *et al.*, 2015). No presente estudo, a denervação aferente renal foi certificada pela marcação imunohistoquímica do CGRP na pelve renal.

Os grupos de cirurgia “sham”, ratos 2R-1C foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico descrito acima, porém com aplicação de veículo (0,1% etanol e 0,1% Tween 80), sem capsaicina.



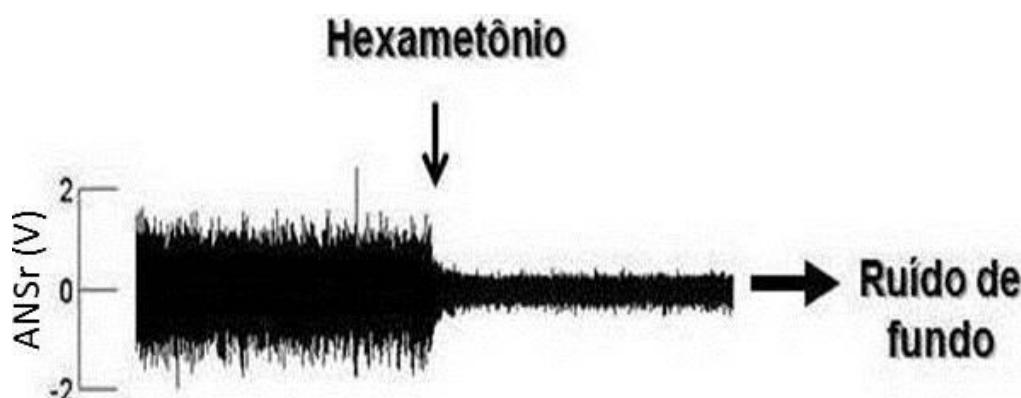
**Figura 8: Confirmação da denervação seletiva das fibras sensoriais aferentes por marcação imunohistoquímica do CGRP na parede pélvica. À esquerda imagem do grupo 2R1C DAX e à direita do grupo 2R1C.**

### 3.5 Canulação e registro da PAM e FC

A cateterização da veia e artéria femoral foi realizada nos animais anestesiados com ketamina (100 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip) para a infusão de fármacos e registro direto da PA, respectivamente. A PA pulsátil dos animais foi registrada após ~24h de recuperação cirúrgica através do sistema PowerLab (ADInstruments, Sydney, Australia) nos animais acordados, durante 15min. A partir do registro da PA pulsátil, foi calculada a PA média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

### 3.6 Registro da ANS do rim isquêmico e contralateral basal

Após o registro da PA e FC, os animais foram lentamente anestesiados com uretana (1,2 g/kg, ev) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para evitar alterações nos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, os nervos renais foram expostos retroperitonealmente para a implantação de um eletrodo de prata bipolar em cada um deles. A atividade nervosa simpática renal (ANSr) foi amplificada (20 K) e filtrada (100-1000 Hz) (Neurolog, Digitimer, Welwyn Garden City, Herts, UK) e registrada. Ao final dos experimentos, o nível de ruído basal do sistema de registro do nervo simpático renal foi determinado pela administração do bloqueador ganglionar hexametônio (30 mg/kg, iv).



**Figura 9:** Traçado representativo do registro eletrofisiológico da atividade nervosa simpática renal (ANSr). Após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg, i.v.) é possível detectar o ruído de fundo remanescente e subtraí-lo da análise.

Assim, a ANS foi analisada posteriormente através dos programas LabChart e Spike Histogram (ADIInstruments) que permitem a discriminação e contagem dos potenciais nervosos dos diferentes territórios acima do ruído de

fundo. Os potencias foram quantificados e expressos em potenciais por segundo (pps).

### **3.7 Avaliação do fluxo urinário e coleta de urina de 24h**

Os animais foram mantidos nas gaiolas metabólicas individuais (Nalgene, Ugo Basile, Itália) por 48 horas, sendo as primeiras 24 horas apenas para adaptação, e após esse período, foi quantificado o volume de ingestão de líquido e volume urinário nas próximas 24 horas. Amostras de urina foram coletadas, centrifugadas e armazenadas em freezer -20 ou -80 °C para dosagens posteriores.

### **3.8 Coleta das amostras de rim e soro**

Após a realização do protocolo experimental, todos os grupos foram eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em tubo seco e centrifugado para posterior coleta do soro. Em seguida, os rins foram retirados utilizando material esterilizado, e então seccionados transversalmente ao meio com o auxílio de bisturis, sendo que uma parte foi preparada para histologia e a outra parte para a técnica de PCR e western blotting e ELISA. Estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para um freezer a uma temperatura de –80° C.

### **3.9 Avaliação dos parâmetros de função renal**

A concentração sérica de creatinina foi mensurada pelo método de Jaffe através de kit disponível comercialmente (Labtest).

A concentração sérica de ureia foi realizada pelo método de reação de azul de indofenol através do kit ureia ce (Labtest)

A determinação da proteinúria total foi realizada pelo método de reação com o complexo de vermelho de pirogalol e molibdato de sódio em meio ácido através do kit sensiprot (Labtest).

A concentração de sódio e potássio urinário e sérico foi realizada por meio do fotômetro de chama Corning 410C com uma diluição de 20x para o soro e expresso em mmol/L. A urina de 24 horas foi utilizada para a determinação do sódio e potássio urinário ao longo desse período e foi expresso em mmol/L/dia.

O angiotensinogênio (AGT) urinário, microalbuminúria e mediadores inflamatórios (IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) renais foram medidos através de um ensaio imunoabsorvente de enzimas ligadas a uma fase sólida comercial (ELISA) (Immuno-Biological Laboratories, Japan, Bethyl e RD Systems, respectivamente). Os níveis urinários de angiotensinogênio e microalbuminúria foram normalizados pelos níveis de creatinina urinária. Ademais, os níveis dos mediadores inflamatórios foram normalizados pela concentração de proteínas no tecido renal, mensurada pela equação de Beer-Lambert (Nanodrop, ThermoFisher). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.10 Avaliação da produção de ROS no rim**

A avaliação da produção e acúmulo de ROS foi realizada através da coloração com diidroetídio (DHE). Cortes de 30 µm foram feitos em um criostato e posicionados em lâminas histológicas gelatinizadas (0,5%). As lâminas foram incubadas em solução DHE 20 µM (Invitrogen, CA, EUA) diluída em solução salina tamponada fosfato, protegidas da luz e a 37°C por 15 min. Fotos em alta resolução (objetiva de 20x) da fluorescência de DHE no córtex renal foram capturadas pela câmera Nikon digital sight DSRI1 acoplada ao microscópio de epifluorescência eclipse 80i (Nikon Instruments, Japão) numa excitação de 420 nm com um filtro de emissão de rodamina. A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o programa ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **3.11 Quantificação da expressão gênica do receptor AT-1 e das subunidades da NADPH oxidase no rim por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)**

Foi avaliado o nível de expressão de RNAm de AT-1, p47phox e gp91phox no córtex renal através de PCR quantitativo em tempo real, conforme descrito abaixo.

O RNA total dos rins foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ambion-Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação da transcriptase reversa foi realizada através do kit *High Capacity cDNA Reverse*

*Transcription* (Applied Biosystems Life/Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O qRT-PCR foi realizado no termociclador RotorGene (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha) utilizando o Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems/Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão do gene de AT-1, gp91phox e p47phox foi normalizada pelos níveis de RNAm de HPRT1 mensurados concomitantemente.

As sequências dos primers foram (PCR Two Step):

**Tabela 1: Representação dos genes e sequências de primers utilizados.**

Gene	Primer	Sequência (5' ao 3') Forward e Reverse	Temperatura de Anelamento
HPRT1	5'	5'CAGGCCAGACTTGGAT-3' 5'-CCGCTGTCTTAGGCTTG 3'	60º C
AT-1	5'	5'-ATCCAAGATGACTGCCCAA-3' 5'-GCCAAGGCGAGATTGAGAAG-3'	60º C
gp91phox:	5'	5'-CTCTCCTCCTCAGGGGTTTC-3' 5'-GCATTCACACACCCTCCAC- 3	60º C
p47phox:	5'	5'-TCCCTGCATCCTATTGGAG - 3' 5'-GGGACACCTCATCCTCTCA - 3'	60º C

### 3.12 Avaliação da perda urinária de proteínas através da separação por peso molecular

As amostras de urina contendo 5 µg de creatinina foram solubilizadas em tampão SDS (2% SDS, glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,1%, Tris a 50 mM, pH 6,8), e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE utilizando géis

de poliacrilamida a 12%. Após a eletroforese, os geis contendo amostras de urina foram corados com prata utilizando o kit ProteoSilver Plus (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, Missouri, EUA) para detectar as proteínas urinárias e, então, digitalizados para análise qualitativa.

### **3.13 Quantificação da expressão proteica da megalina, cubilina, podocina e nefrina no rim por imunoblotting**

Os rins coletados a fresco foram homogeneizados em PBS gelado contendo inibidores de protease e fosfatase. Uma alíquota do homogenato separada para a determinação de proteína pelo método de Lowry. Os homogenatos foram solubilizados em tampão de amostra e as proteínas foram separadas através de um gel de poliacrilamina 7,5%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana de fluoreto de polivinilidina (PDVF) e, então, incubadas com solução bloqueio (leite 5%) por 1 h. Os anticorpos primários utilizados foram: 1:2.000 anti-Podocina (Santa Cruz), 1:1.000 anti-Nefrina (Abcam), 1:50.000 anti-Megalina (Doação), 1:1.000 anti-Cubilina e, por fim, 1:5.000 anti-GAPDH (Abcam), diluídos em solução bloqueio. Após a lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado (1:2.000) anti-camundongo ou anti-coelho. Anticorpos conjugados foram detectados pela técnica de quimioluminescência, de acordo com instruções do fabricante. As bandas visualizadas foram digitalizadas e quantificadas utilizando o programa ImageJ. Vale salientar que as expressões das proteínas de interesse foram normalizadas pela expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

#### 4. ANÁLISE DE RESULTADOS

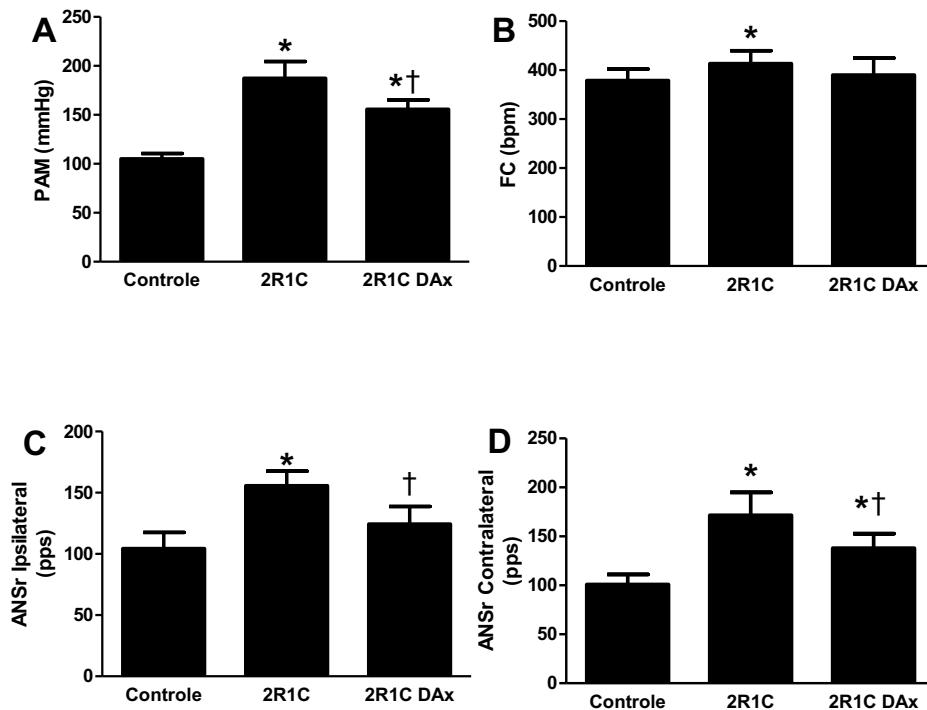
Os dados foram expressos em Média  $\pm$  DP. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de análise de variância, ANOVA, de uma via, seguido, pelo teste Tukey. Software utilizado: Graphpad Prism. Só foram considerados estatisticamente significantes valores de  $p<0,05$ .

#### 5. *Resultados*

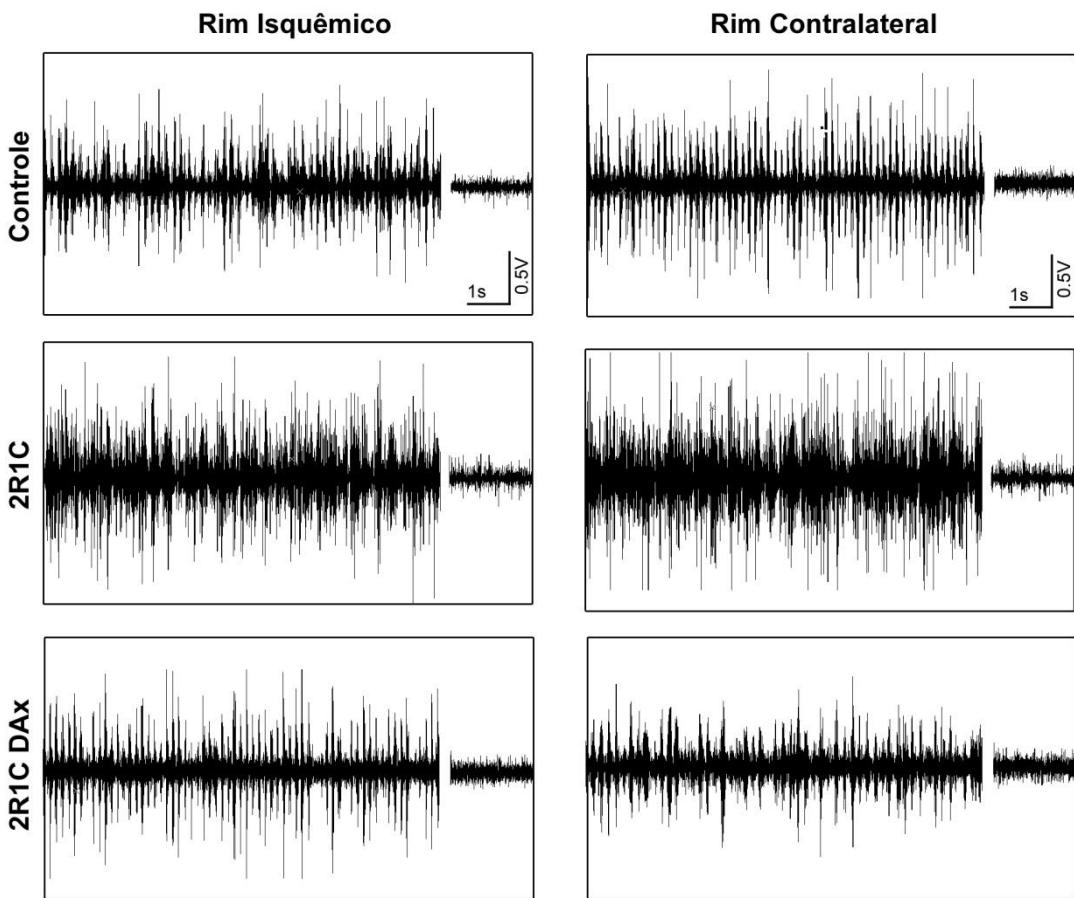
---

##### **5.1 Efeitos da denervação aferente renal em parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e ANS renal para ambos os rins dos animais hipertensos renovasculares**

A DAx do rim isquêmico reduziu de forma significante a PAM (figura 10A) (de  $187 \pm 10$  para  $156 \pm 10$  mmHg) em ratos hipertensos renovasculares quando comparado ao controle ( $105 \pm 5$  mmHg) ( $n= 12$ ). Observou-se um aumento na FC basal dos animais (figura 10B) 2R1C ( $414 \pm 26$  vs  $379 \pm 24$  bpm), contudo, a DAx não modificou este parâmetro. Ademais, a ANSr estava aumentada para os rins isquêmico (figura 10C) ( $156 \pm 12$ ,  $n = 5$ , vs  $104 \pm 13$  pps,  $n = 5$ ) e contralateral (figura 10D) ( $172 \pm 23$ ,  $n=5$ , vs  $101 \pm 10$  pps,  $n=5$ ) e, após a DAx, houve redução da ANSr para ambos os rins ( $124 \pm 14$ ,  $n = 5$  e  $138 \pm 15$  pps,  $n = 5$ , respectivamente), ( $n=5$ /grupo). A figura 11 mostra traçados representativos do registro basal da ANSr, na qual pode-se observar a redução nos disparos do nervo no grupo DAx.



**Figura 10:** Efeitos da denervação aferente renal na PAM (A), FC (B) e ANSr no rim isquêmico (C) e contralateral (D) de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \* $p<0,05$  vs Controle & † $p<0,05$  vs 2R1C (Tukey – ANOVA).



**Figura 11:** Imagens representativas do registro basal da atividade nervosa simpática renal (ANSr) do animal controle e rins isquêmico e contralateral dos animais 2 rins, 1 clipe (2R1C) e 2R1C submetido à denervação aferente renal (DAX).

## 5.2 Efeitos da denervação aferente renal em parâmetros metabólicos e eletrolíticos renais dos animais hipertensos renovasculares

Os animais hipertensos apresentaram aumento na ingestão de água em relação ao controle ( $56 \pm 25$ , n=6, vs  $29 \pm 2$  mL / 24h, n=7) e a DAX reduziu este parâmetro ( $36 \pm 4$  mL / 24 h, n=7). Não houve diferença na ingestão de ração entre os grupos estudados. Todavia, o fluxo urinário dos animais hipertensos estava aumentado ( $65 \pm 29$ , n = 6, vs  $15 \pm 4$  mL / 24h, n=7) e foi reduzido após DAX ( $16 \pm 3,5$  mL / 24 h, n=7).

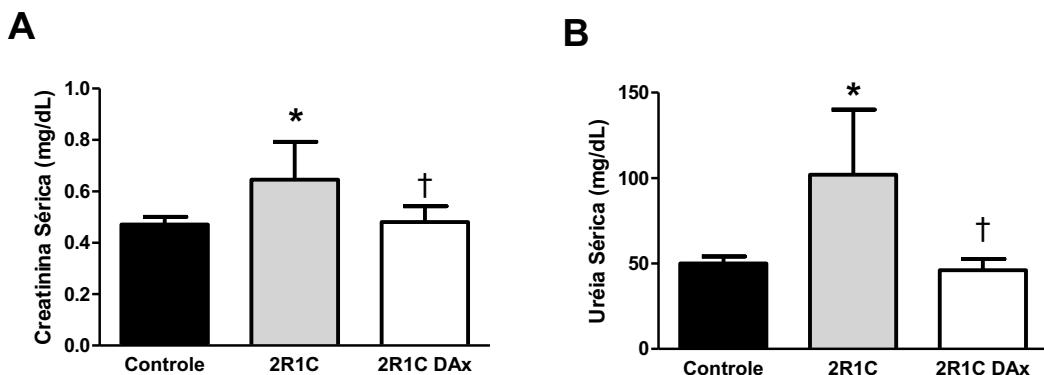
Já em relação à avaliação da carga excretada na urina e concentração sérica de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos estudados como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2: Efeitos da denervação aferente renal (DAX) na ingestão de água e ração, fluxo urinário de 24h, e, carga excretada na urina (CEu de 24h) e concentração sérica de sódio e potássio de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C)**

	Controle N= 7	2R1C N= 6	2R1C DAX N= 7
Ração (g/24h)	28 ± 2,5	22 ± 7,5	28 ± 2,5
Água (mL/24h)	29 ± 2	56 ± 25*	36 ± 4†
Urina (mL/24h)	15 ± 3,5	65 ± 29*	16 ± 3,5†
CEu $\text{Na}^+$ (mmol/24h)	2 ± 0,5	1,5 ± 0,7	1,6 ± 0,4
CEu $\text{K}^+$ (mmol/24h)	5 ± 1,7	4,5 ± 1,6	4,8 ± 1
$\text{Na}^+$ sérico (mM)	138 ± 8	139 ± 4,5	140 ± 2,7
$\text{K}^+$ sérico (mM)	5,4 ± 1,3	4,7 ± 1	4,8 ± 0,5

**Dados expressos em média ± DP.\*p<0,05 vs Controle & †p<0,05 vs 2R1C (Tukey – ANOVA de 1 via).**

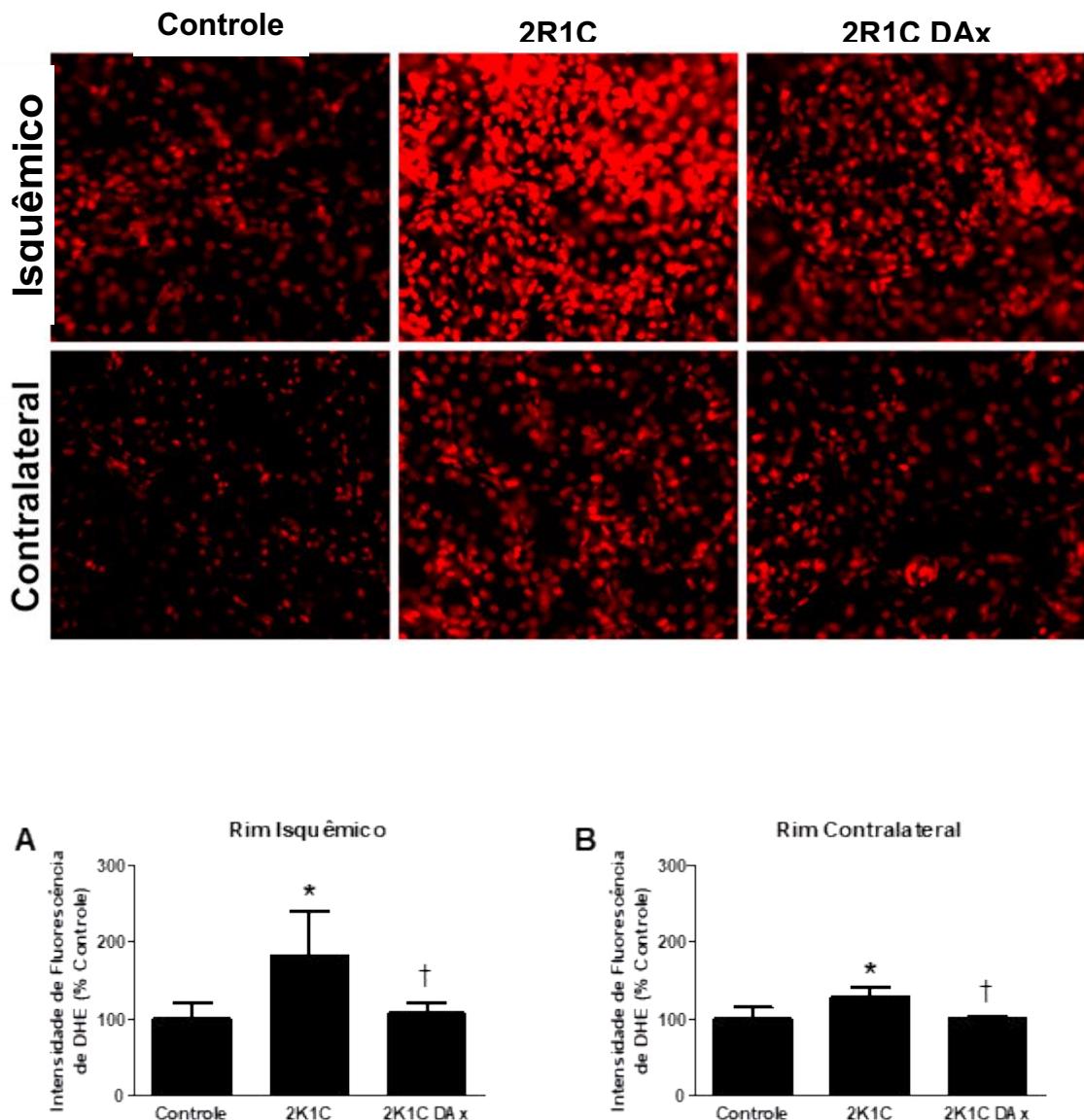
Por conseguinte, a DAx também foi eficiente em diminuir os níveis séricos de creatinina (de  $0,64 \pm 0,14$  para  $0,48 \pm 0,06$  mg/dL , n=6) e ureia (de  $102,0 \pm 38,0$  para  $46,00 \pm 6,7$  mg/dL, n=6) dos animais hipertensos renovasculares quando comparado ao grupo controle ( $0,47 \pm 0,02$ , n=6).



**Figura 12: Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de creatinina (A) e ureia sérica (B) de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \*p<0,05 vs Controle & †p<0,05 vs 2R1C (Tukey – ANOVA).**

### 5.3 Efeitos da denervação aferente renal no estresse oxidativo e inflamação renal dos animais hipertensos renovasculares

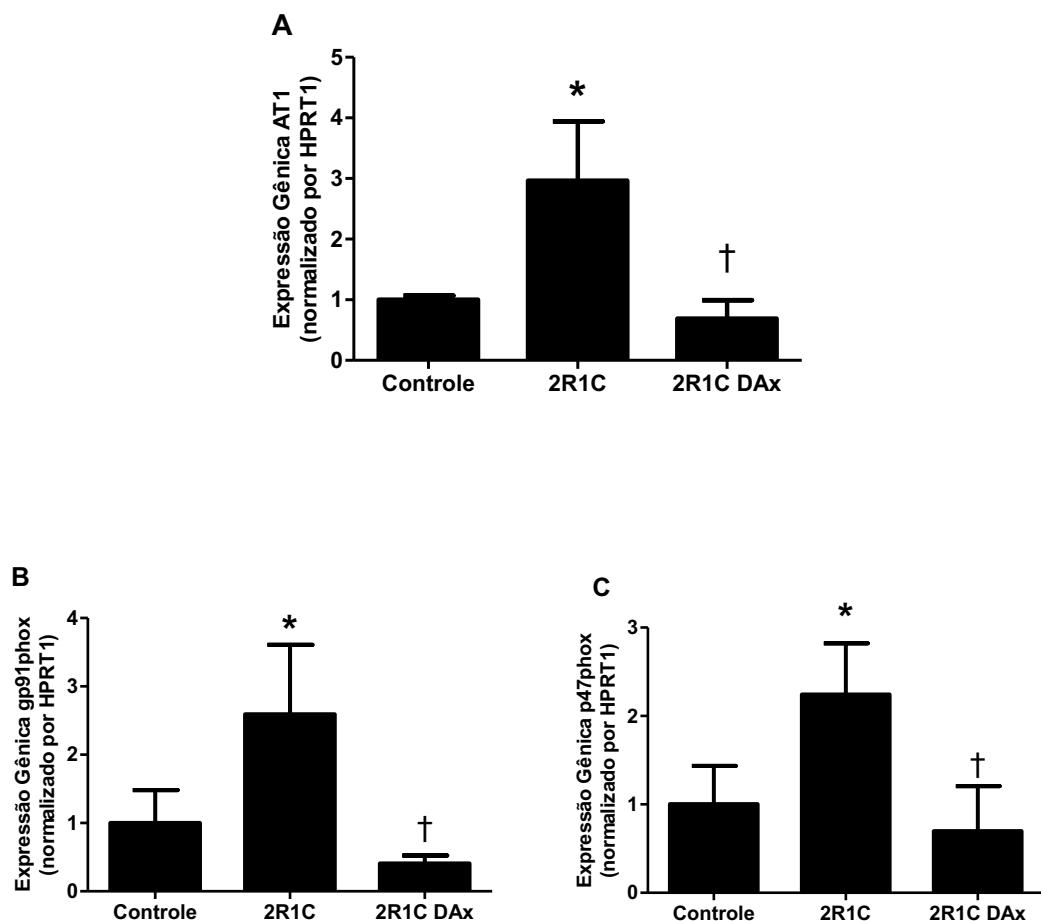
Interessantemente, a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), pela técnica de DHE em ambos os rins, mostrou que a DAx foi capaz de reduzir a intensidade tanto do rim isquêmico (76%, n=4 por grupo) quanto do contralateral (27%, n=4 por grupo) dos animais hipertensos renovasculares, como mostra a figura 13..



**Figura 13: Efeitos da denervação aferente renal na produção de ROS do rim isquêmico (A) e contralateral (B) de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \*p<0,05 vs Controle & †p<0,05 vs 2R1C (Tukey – ANOVA).**

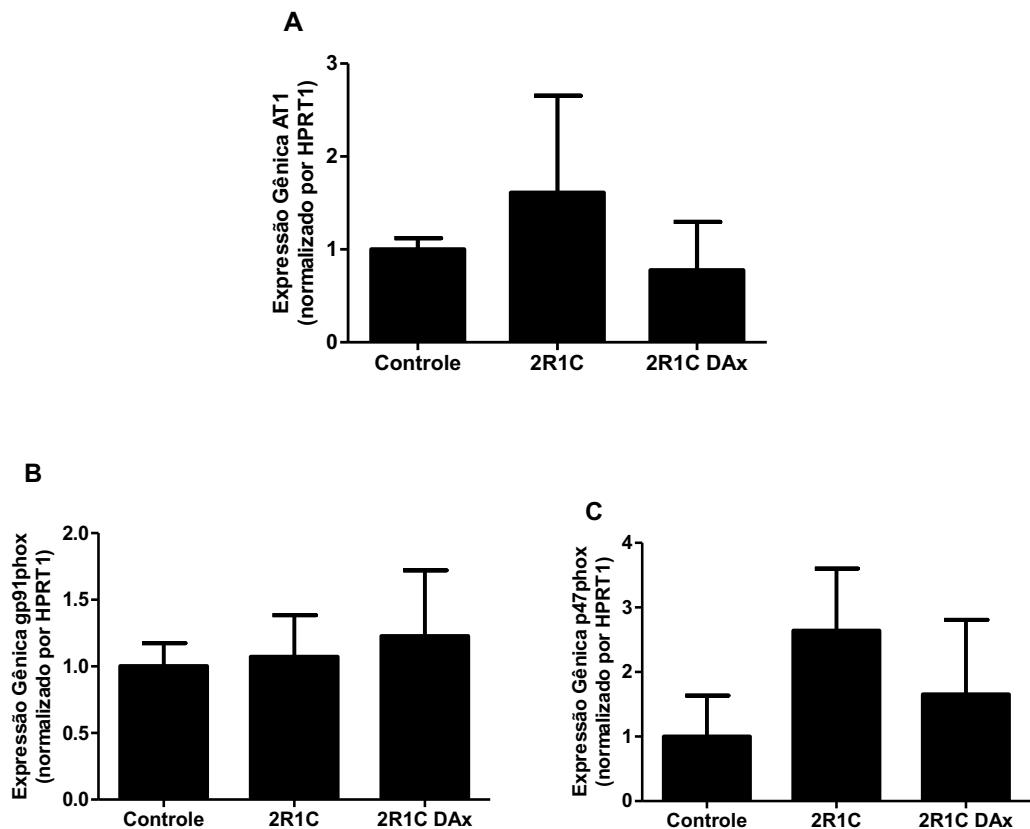
Ademais, a quantificação de RNAm dos receptores AT-1 de Ang II no rim isquêmico do animal hipertenso ( $n=4$ ) encontrava-se elevada e, após a DAX, houve uma redução significante comparada ao grupo controle (76%,  $n=4$ ) (figura A). A expressão gênica das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase, gp91phox (figura B) e p47phox (figura C) encontravam-se

elevadas no rim isquêmico dos animais hipertensos ( $n=4$ ), porém a DAX reduziu tanto p47phox (68%) como gp91phox (84%) quando comparado ao grupo controle ( $n=4$ ).



**Figura 14:** Avaliação da expressão gênica do receptor AT-1 (A) e das subunidades de NADPH oxidases, p47phox (A) e gp91phox (B) no rim isquêmico de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \* $p<0,05$  vs Controle & † $p<0,05$  vs 2R1C (Tukey – ANOVA).

Não se obteve mudança entre os grupos na expressão gênica dos receptores AT-1 (figura 16A), e das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase, gp91phox (figura 16B) e p47phox (16figura C) no rim contralateral ( $n=4$ /grupo).



**Figura 15:** Avaliação da expressão gênica do receptor AT-1 (A) e das subunidades da NADPH oxidase, p47phox (B) e gp91phox (C) nos rins contralaterais de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). (Tukey – ANOVA).

Não foi observado mudança na avaliação das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx) em ambos os rins.

**Tabela 3: Efeitos da denervação aferente renal na concentração de enzimas antioxidantes em ambos os rins de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C).**

	<b>Controle</b> (n = 8)	<b>2R1C</b> (n = 6)	<b>2R1C DAX</b> (n = 6)
<b>Rim Isquêmico</b>			
SOD, U/mg	0,098 ± 0,035	0,132 ± 0,038	0,110 ± 0,069
GPx, U/mg	0,036 ± 0,009	0,041 ± 0,013	0,039 ± 0,013
<b>Rim Contralateral</b>	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)
GPx, U/mg	0,038 ± 0,010	0,036 ± 0,010	0,033 ± 0,011
SOD, U/mg	0,112 ± 0,033	0,161 ± 0,074	0,130 ± 0,038

**Dados expressos em média ± DP. (Tukey – ANOVA).**

Além disso, não se obteve mudanças na avaliação dos mediadores inflamatórios, interleucina-10 (anti-inflamatório), interleucina-6 e fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (pró-inflamatórios) em ambos os rins. Entretanto, foi possível observar uma diminuição na expressão de TNF- $\alpha$  no rim contralateral dos animais hipertensos.

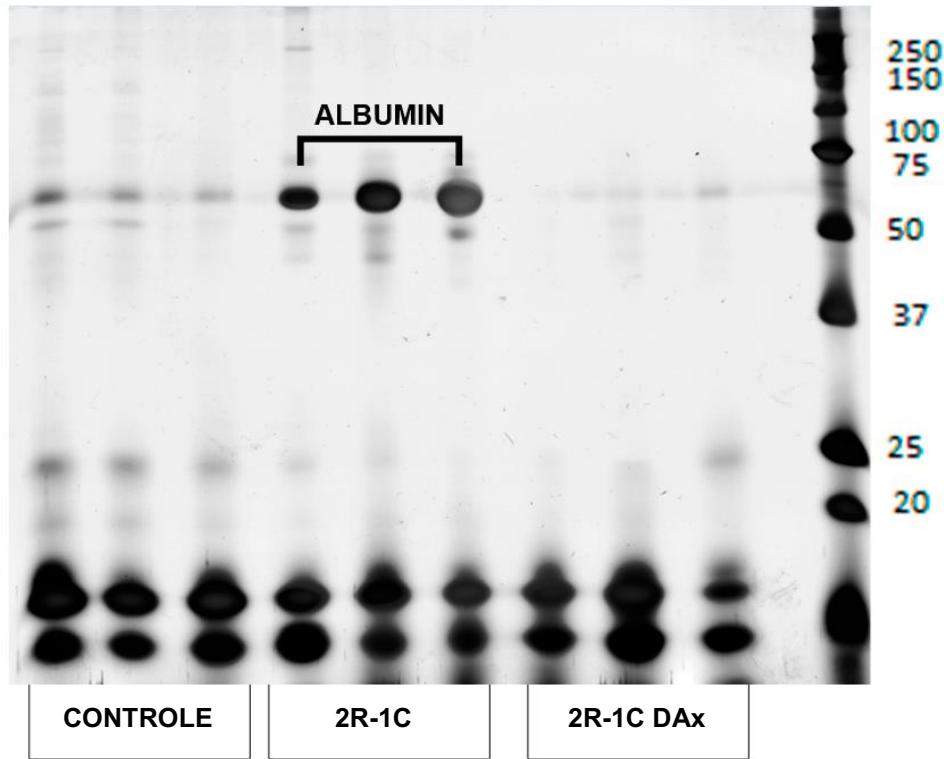
**Tabela 4: Efeitos da denervação aferente renal na concentração renal de citocinas de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C).**

	<b>Controle</b>	<b>2R1C</b>	<b>2R1C DAX</b>
<b>Rim Isquêmico</b>	(n = 8)	(n = 6)	(n = 6)
IL-10, U/mg	24,03 ± 7,10	21,74 ± 15,74	20,93 ± 15,11
IL-6, U/mg	112,8 ± 35,1	93,44 ± 64,24	90,87 ± 67,52
TNF-α, U/mg	10,9 ± 2,9	9,6 ± 5,9	11,8 ± 9,1
<b>Rim Contralateral</b>	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)
IL-10, U/mg	23,26 ± 4,8	16,30 ± 10,83	25,04 ± 7,1
IL-6, U/mg	110,7 ± 27,64	84,7 ± 38,2	124,6 ± 34,23
TNF-α, U/mg	11,2 ± 3,1	<b>7,7 ± 3,9*</b>	13,0 ± 4,4

Dados expressos em média ± DP. \*p<0,05 vs Controle (Tukey – ANOVA).

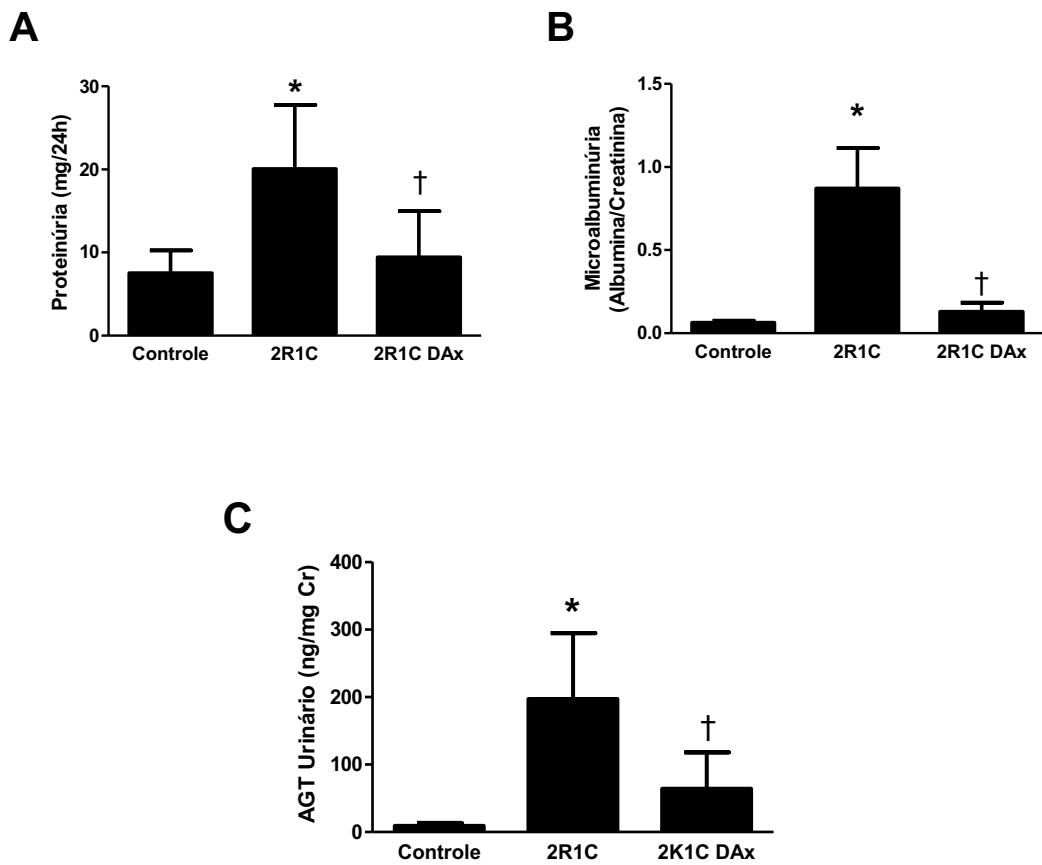
#### **5.4 Efeitos da denervação aferente renal na proteinúria e expressão de proteínas renais dos animais hipertensos renovasculares**

Com relação à avaliação do padrão de excreção de proteínas na urina pelo peso molecular, é possível observar uma predominância maior de albuminúria (peso molecular da albumina: 69 kDa) nos animais hipertensos renovasculares. Todavia, após a DAX essa predominância diminui se comparada ao grupo controle. Ademais, não foi possível observar diferença entre os grupos, com relação à expressão de proteínas de baixo peso molecular.



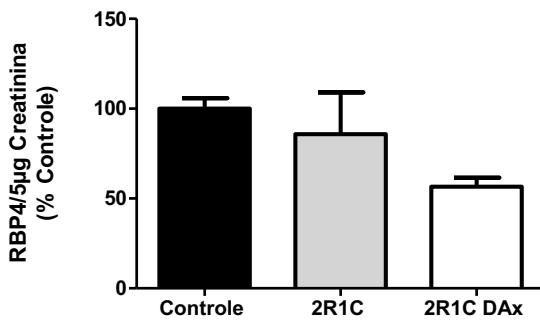
**Figura 16:** Efeitos da denervação aferente renal no padrão de excreção de proteínas na urina de acordo com o peso molecular. À esquerda o grupo controle, ao meio o grupo 2R1C e à direita o grupo 2R1C DAx.

Adicionalmente, a DAx foi capaz de melhorar proteinúria ( $20 \pm 3$ ,  $n = 6$  a  $9 \pm 2$  mg/dia,  $n=7$ ) e a microalbuminúria ( $0,87 \pm 0,24$  a  $0,13 \pm 0,05$ ,  $n=4$ ) do grupo hipertenso. Da mesma forma, foi possível observar uma diminuição dos níveis de AGT urinário ( $197,2 \pm 97,7$  a  $64,31 \pm 53,90$ ,  $n=5$ ) após a realização da DAx.



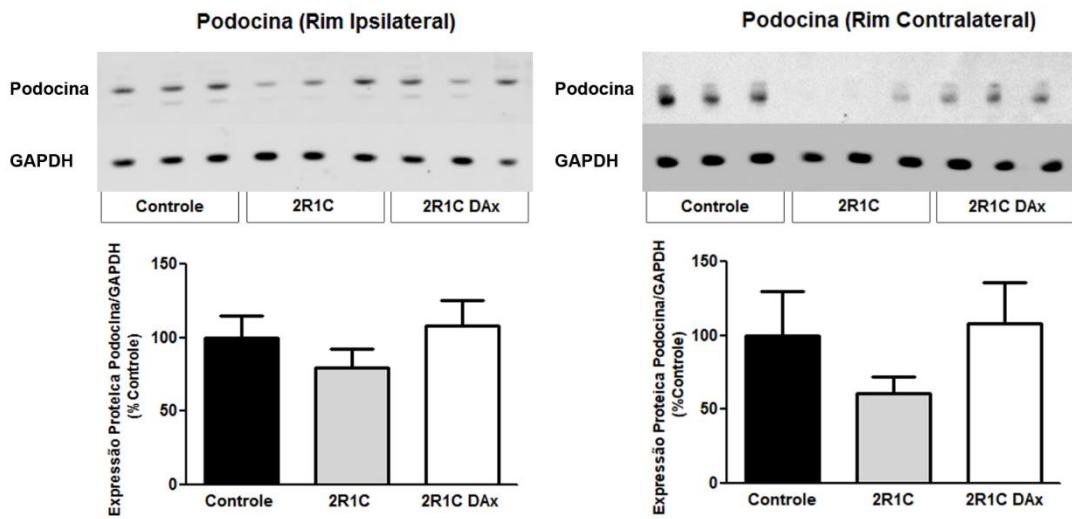
**Figura 17:** Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de proteinúria (A), microalbuminúria (B) e AGT urinário (C) de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \* $p<0,05$  vs Controle & † $p<0,05$  vs 2R1C (Tukey – ANOVA).

No entanto, em relação à avaliação da excreção de proteínas de baixo peso molecular (proteína-4 de ligação ao retinol – RBP4), não se obteve diferença entre os grupos estudados.

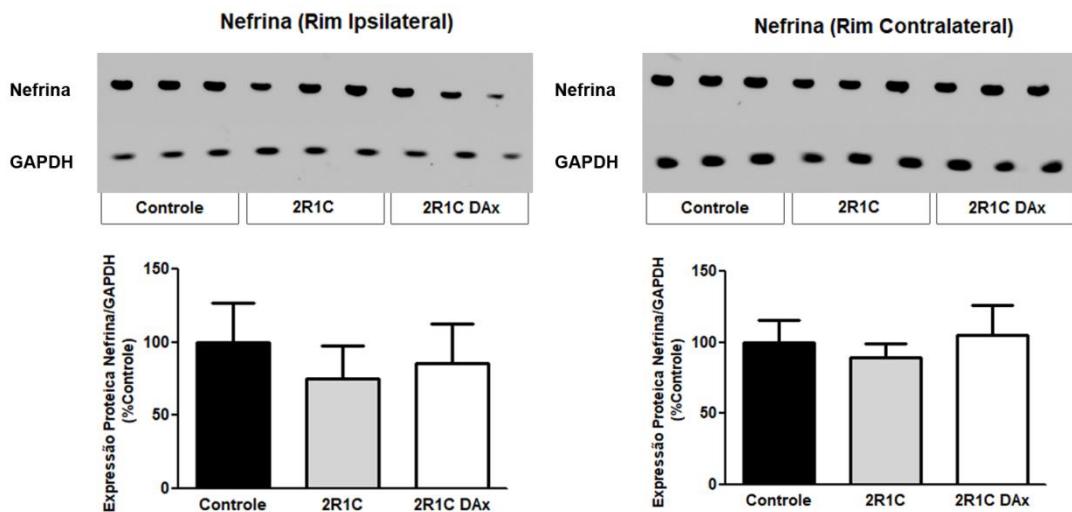


**Figura 18: Efeitos da denervação aferente renal nos níveis de RBP4 de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). \*p<0,05 vs Controle & †p<0,05 vs 2R1C (Tukey – ANOVA).**

Finalmente, como mostrado nas figuras a seguir, a expressão proteica das proteínas estruturais da “slit membrane”, podocina (~42 kDa) (Figura 20) e nefrina (185-200 kDa) (Figura 21), em ambos os rins, rim isquêmico e contralateral, não se obteve diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, é notável uma tendência do grupo hipertenso em expressar menos a podocina, principalmente no rim contralateral.

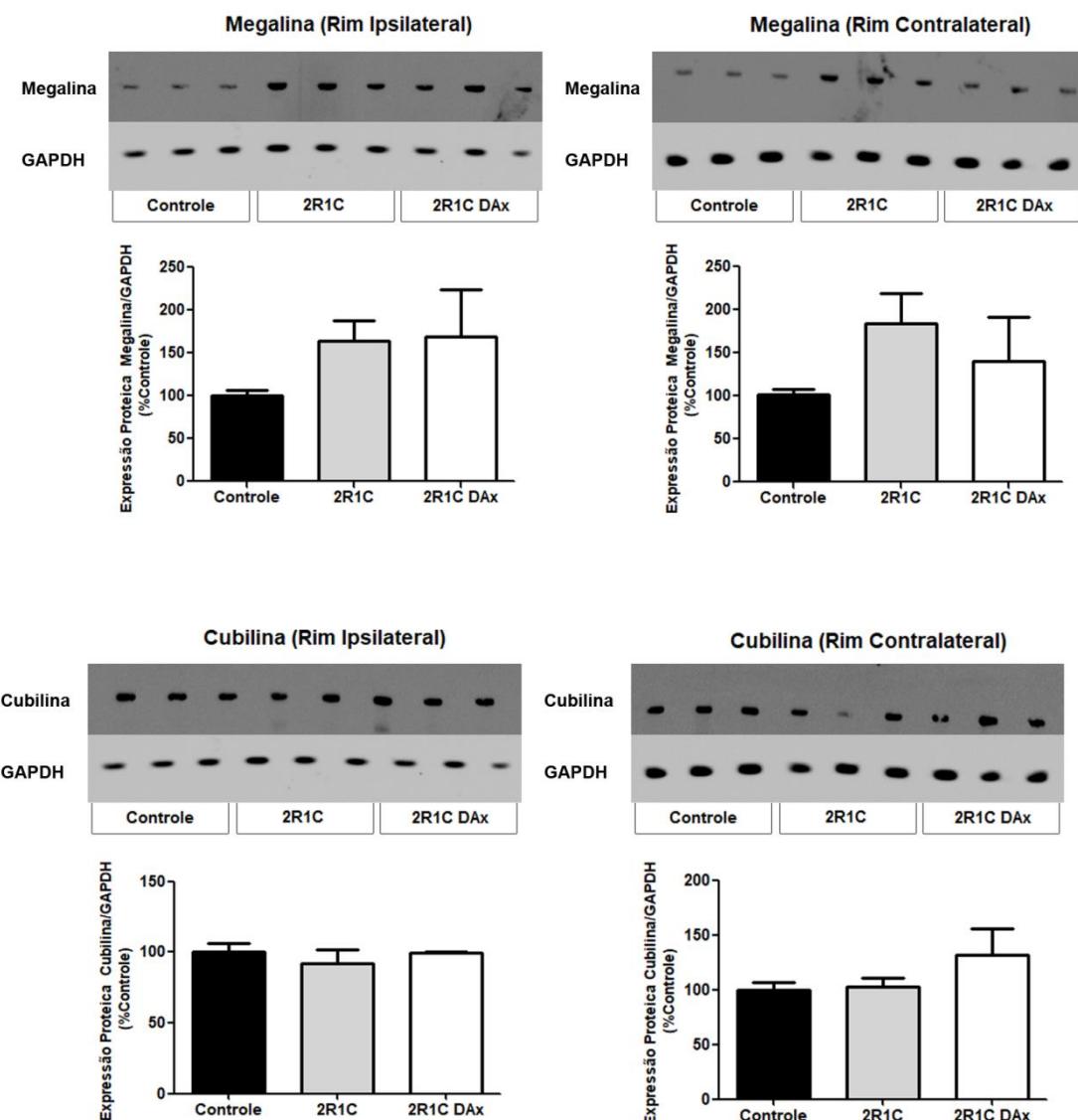


**Figura 19:** Efeitos da denervação aferente renal nos níveis proteicos de podocina em ambos os rins de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). (Tukey – ANOVA).



**Figura 20:** Efeitos da denervação aferente renal nos níveis proteicos de nefrina em ambos os rins de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). (Tukey – ANOVA).

Adicionalmente, não houve alteração na expressão dos receptores endocíticos megalina (<600 kDa) e cubilina (460 kDa) em ambos os rins.



**Figura 21: Efeitos da denervação aferente renal nos níveis proteicos de megalina e cubilina em ambos os rins de ratos 2 rins, 1 clipe (2R1C). (Tukey – ANOVA)**

## 5.5 Sumário dos Resultados

Os principais achados do presente trabalho foram:

- a) A DAx foi eficaz em reduzir os níveis de PAM, entretanto não à normalidade quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, reduziu a ANSr para ambos os rins;
- b) A ingestão de água e fluxo urinário de 24h apresentavam-se elevados no grupo hipertenso renovascular, e a DAx reduziu esses parâmetros, sem alterar concentração sérica e a carga excretada de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Ademais, a DAx reduziu os níveis séricos de creatinina e ureia;
- c) Quanto ao estresse oxidativo, a DAx foi capaz de reduzir a expressão gênica de receptores AT-1 de Ang II e das subunidades de NADPH oxidases, p47phox e gp91phox no rim isquêmico dos animais hipertensos. Além disso, a DAx diminuiu os níveis de ROS em ambos os rins, sem alterar a atividade das enzimas antioxidantes ou marcadores de inflamação;
- d) Outro fator consistente de nossos resultados, foi que a DAx efetivamente diminuiu os níveis de proteinúria, albuminúria e AGT urinário, demonstrando ser uma técnica efetiva contra lesão renal neste modelo de hipertensão;
- e) Por fim, não foram observadas diferenças significativas na expressão proteica de podocina e nefrina, bem como dos receptores endocíticos megalina e cubilina em ambos os rins.

## 6. Discussão

---

Os principais achados do presente trabalho foram que a DAx diminui a PA, ANSr, ROS em ambos os rins e melhora a função renal, proteinúria e ativação do SRA intrarrenal dos animais hipertensos renovasculares. Estes dados permitem afirmar que as fibras aferentes renais desempenham um importante papel na manutenção da PA e ANSr no modelo de hipertensão renovascular. Corroborando a outros estudos experimentais que demonstraram que os nervos aferentes renais estão envolvidos na HA (Campese e Kogosov, 1995); (Wyss *et al.*, 1987) e da atividade do SNS (Oparil *et al.*, 1987; Campese e Kogosov, 1995).

Todavia, esses estudos prévios utilizaram o método denominado rizotomia dorsal (Kopp e Buckley-Bleiler, 1989), o qual é uma técnica cirúrgica que secciona as raízes dorsais da medula espinal nos níveis T9-L1, interrompendo, assim, não apenas os estímulos neurais aferentes do rim, como outras sinalizações aferentes viscerais, tanto somáticas quanto cutâneas neste nível vertebral (Kopp *et al.*, 2008). Desta forma, o método utilizado no presente projeto, recentemente descrito por Foss e colaboradores (2015), foi demonstrado ser seletivo na ablação das fibras aferentes renais com a utilização de capsaicina em alta concentração, como confirmado pela técnica de imunohistoquímica de CGRP na pelve renal. Sabe-se que a maioria das fibras aferentes renais são não mielinizadas e sensíveis à capsaicina (Knuepfer e Schramm, 1987) e que os receptores TRPV1 estão localizados ao longo dos axônios de fibras sensoriais, bem como em terminais nervosos (Szallasi *et al.*, 1993). Estes receptores são considerados canais catiônicos

não-seletivos ativados por ligante com uma permeabilidade nove vezes superior para íons  $\text{Ca}^{2+}$  em relação aos íons  $\text{Na}^+$  (Tominaga et al., 1998; Holzer, 2008) e um integrador de uma grande variedade de estímulos físicos e químicos exógenos e endógenos, incluindo a capsaicina, calor nocivo ( $>43^\circ\text{C}$ ), e prótons ( $\text{pH}<6,5$ ) (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Portanto, a aplicação de capsaicina 33 mM nos nervos renais dessensibiliza seletivamente as fibras aferentes (Foss et al., 2015), sem afetar as fibras simpáticas.

Uma vez que foi demonstrado que a denervação renal em ovelhas com insuficiência renal crônica (IRC) comprometeu os mecanismos compensatórios numa situação de hemorragia, como a liberação de renina na circulação e aumento da FC, potencialmente devido à remoção das fibras simpáticas (Singh et al., 2017), nosso estudo mostra que a denervação somente das fibras aferentes renais na hipertensão de origem renal é mais vantajosa para diminuir os efeitos deletérios da hiperatividade nervosa simpática renal, sem comprometer o papel fisiológico das fibras simpáticas, sobretudo diante de desafios de redução da volemia.

É sabido que no modelo 2R1C ocorre ativação do SRA (Cuzzocrea et al., 2004). A Ang II, além das suas ações clássicas como substância vasoconstritora, estimula a sensação de sede e apetite ao sódio em regiões encefálicas, como órgãos circumventriculares e regiões periventriculares (Davern e Mckinley, 2013). É provável que a Ang II tenha contribuído para que os animais hipertensos ingerissem mais água do que os animais normotensos (grupo controle) e, através do mecanismo de pressão-diurese, produzissem um volume urinário maior. Entretanto, os dados mostram que a denervação aferente renal foi eficaz em reduzir de forma significante os níveis de ingestão

de água e volume urinário nos animais hipertensos sem alterar carga excretada de sódio e potássio. Esse efeito pode ter sido parcialmente decorrente da redução da PA pela deafferentação renal, no entanto, não podemos descartar a possibilidade de um possível efeito sobre o SRAA em regiões centrais, circulante e/ou intrarrenais, visto que o aumento de AGT urinário nos animais hipertensos, um importante marcador de ativação do SRAA intrarrenal (Kobori *et al.*, 2007), foi reduzido pela DAx.

Ademais, diversos estudos realizados em ratos 2R1C, em nosso laboratório, demonstraram que ativação do SRAA contribui para o estresse oxidativo nos rins e no RVLM e PVN, levando a hiperatividade simpática e HA (Oliveira-Sales *et al.*, 2008) (Nishi *et al.*, 2013). Ademais, foi observado que o estresse oxidativo renal pode estar associado ao aumento da excreção de duas substâncias: 8-isoprostanato PGF2 e malondialdeído17 (Welch *et al.*, 2003) e, também com o aumento da imunorreatividade da nitrotirosina no rim no modelo 2R1C (Bosse e Bachmann, 1997). Portanto, os dados sugerem que o aumento do estresse oxidativo renal é um mecanismo envolvido na hipertensão arterial no modelo renovascular. Além disso, estudos do nosso grupo demonstraram que o aumento da expressão gênica de receptores AT-1 estava associado ao aumento na expressão de subunidades da NADPH oxidase e a redução da enzima antioxidante catalase no rim isquêmico de animais 2R1C (Nishi *et al.*, 2010) Os dados do presente estudo sugerem que os mecanismos subjacentes do estresse oxidativo são diferencialmente mediados nos rins contralateral e clipado (isquêmico) de ratos hipertensos renovasculares, visto que não foi observado aumento significativo da expressão gênica de receptores AT-1 e das subunidades da NADPH oxidase, p47phox e gp91phox no rim contralateral e

nem diferenças nas enzimas anti-oxidantes SOD e GPx. Além disso, o aumento do AGT urinário, ou seja, ativação do SRA intrarrenal pode agir indiretamente de modo a aumentar o estresse oxidativo no rim contralateral. Contudo, no rim clipado desses animais o estresse oxidativo parece ser uma consequência do aumento da atividade do nervo renal, ativação do SRA intrarrenal, aumento da expressão gênica de receptores AT-1 e das subunidades da NADPH oxidase, p47phox e gp91phox. Entretanto, a denervação aferente renal foi eficaz em reduzir os níveis de expressão dos genes de AT-1, p47phox e gp91phox no rim clipado.. Ademais, Peleli M. e colaboradores demonstraram que a denervação renal foi capaz de atenuar a hipertensão e a disfunção renal em um modelo de doença cardiovascular e renal em ratos Sprague Dawley, a qual está associado à redução da atividade da NADPH e da xantina oxidase (Peleli *et al.*, 2017). Embora nossos dados mostrem que a DAx foi eficaz em reduzir o estresse oxidativo tanto no rim clipado quanto no contralateral, mais experimentos precisam ser realizados para mostrar se foi um efeito direto ou indireto das fibras aferentes. Estudos de Kim e Padanilam (2012) demonstraram que o bloqueio de receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico para norepinefrina e receptor para CGRP impediu a formação de processos fibróticos, resposta inflamatória e morte celular tubular. Além disso, foi demonstrado no mesmo estudo que tanto a norepinefrina quanto o CGRP induziram apoptose e liberação de fatores profibróticos capazes de estimular a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos em células epiteliais tubulares, contribuindo, assim, para a geração de fibrose e inflamação renal (Kim e Padanilam, 2013). A hipótese é que o neuropeptídeo CGRP está presente durante diversas respostas e podem

induzir a liberação de citocinas em várias circunstâncias (Yaraee *et al.*, 2009). Uma vez que tanto a Ang II (Mezzano *et al.*, 2001), quanto o estresse oxidativo (Kim e Padanilam, 2013) contribuem para a inflamação e fibrose renal, foi investigado se a DAx modifica também inflamação no modelo renovascular. Entretanto, nossos dados da produção de citocinas, dentre elas, IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ , não foram diferentes entre os grupos, no entanto, TNF- $\alpha$  está diminuído no rim contralateral do grupo hipertenso, sabe-se que TNF- $\alpha$  é principalmente produzido pelos macrófagos após recrutamento, e, juntamente com IL-1 $\beta$  participam como gatilho para síntese e liberação de outras citocinas. Portanto, não podemos descartar a hipótese de que outros mediadores inflamatórios podem estar aumentados ou diminuídos no modelo renovascular, colaborando ainda mais para a progressão da doença.

Em um estudo anterior, demonstramos que a denervação renal, mas não a diminuição parcial da PA pela hidralazina, melhora a função renal, a lesão e o estresse oxidativo no rim isquêmico do modelo hipertensivo 2K1C (Nishi, 2019). No entanto, a redução parcial da PA melhorou a lesão renal, mostrando que diferentes mecanismos estão envolvidos nas alterações do rim isquêmico e contralateral dos animais hipertensos renovasculares, Baseado nisso, os dados da presente Tese indicam que a DAx melhora as alterações renais, sobretudo o estresse oxidativo e a proteinúria, independente da redução parcial da PA.

Outro fator preponderante e intrigante dos nossos resultados é que a presença de proteinúria e microalbuminuria indicam um comprometimento da função renal, no entanto, a DAx foi capaz de reverter estes parâmetros. A microalbuminuria (<30mg/24h) indica um comprometimento da BFG e é utilizada para o diagnóstico de lesão renal precoce em pacientes hipertensos

essenciais (Viberti e Karalliedde, 2014) (Ruilope *et al.*, 2014). Além disso, a presença de microalbuminuria, em pacientes hipertensos essenciais indica maior frequência de eventos cardiovasculares, de doença periférica e de mortalidade (Mogensen, 2010). Sabe-se, também, que a denervação renal total em pacientes hipertensos resistentes foi capaz de reduzir a prevalência de micro e macro albuminúria e, desta maneira, desde que a albuminúria seja um independente fator de risco renal e cardiovascular, o estudo sugere que há uma diminuição nestes riscos nos pacientes (Schimieder, RE, 2014). Além disso, outro estudo com pacientes com doença renal crônica e hipertensão resistente aponta que a denervação renal foi capaz de aumentar o RFG e reduzir albuminúria (Lugon JR, 2013). Portanto, como a DAX foi capaz de reverter a proteinúria, avaliamos os principais mecanismos subjacentes envolvidos.

É sabido que lesões glomerulares, tubulares ou ambas podem culminar em proteinúria maciça, portanto, avaliamos alguns dos principais e importantes elementos encarregados em manter uma filtração renal adequada. Estudos clínicos evidenciam que uma das causas predominantes de síndrome nefrótica em adultos são danos nos podócitos (Mundel e Shankland, 2002) (Shankland, 2006). Portanto, foi interessante avaliar se a proteinúria presente no modelo de hipertensão renovascular advinha de lesões nos podócitos, sobretudo, com diminuição da expressão de podocina e nefrina. Contudo, não observamos diferenças significativas entre os grupos, no entanto, é notável a tendência do grupo hipertenso em expressar menos a podocina. Ademais, o nosso resultado do padrão de excreção de proteínas mostra qualitativamente uma maior prevalência de albumina, assim como nosso resultado de microalbuminuria,

indicando um comprometimento glomerular nestes animais também. Sobretudo, não descartamos a hipótese de que o aumento de ANSr, ativação do SRA intrarrenal e estresse oxidativo neste modelo esteja favorecendo uma maior progressão da lesão renal.

Além disso, estudos recentes têm mostrado que lesões do túbulo proximal parecem contribuir também para a progressão de doenças renais (Peterson e Berggård, 1971). Camundongos nocaute para a megalina apresentam proteinúria de baixa massa molecular relativa e albuminúria (Leheste *et al.*, 2003). Ainda, nos estágios iniciais do diabetes são observados proteinúria de baixo peso molecular e albuminúria sugerindo que a função dos receptores endocíticos possa estar prejudicada (Mundel e Shankland, 2002; Tenten *et al.*, 2013). Em ratos espontaneamente hipertensos, apesar do aumento da expressão de megalina, uma diminuição na expressão de megalina na superfície da membrana apical do túbulo proximal foi demonstrada (Silva-Aguiar RP). Portanto, embora não tenhamos encontrado diferença estatística na abundância da megalina ou cubilina, não podemos descartar a possibilidade de que a localização ou avaliação funcional da maquinaria endocítica esteja alterada nos rins de ratos 2R1C. Outra explicação é que esses receptores estejam saturados (Mundel e Shankland, 2002; Tenten *et al.*, 2013), levando ao aumento da albuminúria no grupo hipertenso renovascular.

Em suma, a hipótese é que neste modelo a presença de proteinúria seja inicialmente uma lesão glomerular, visto que no modelo renovascular há uma diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumentando PA, ANSr e Ang II e, desta forma, no decorrer da progressão da doença com a presença de proteinúria maciça não descartamos a possibilidade de uma lesão tubular, aumentando

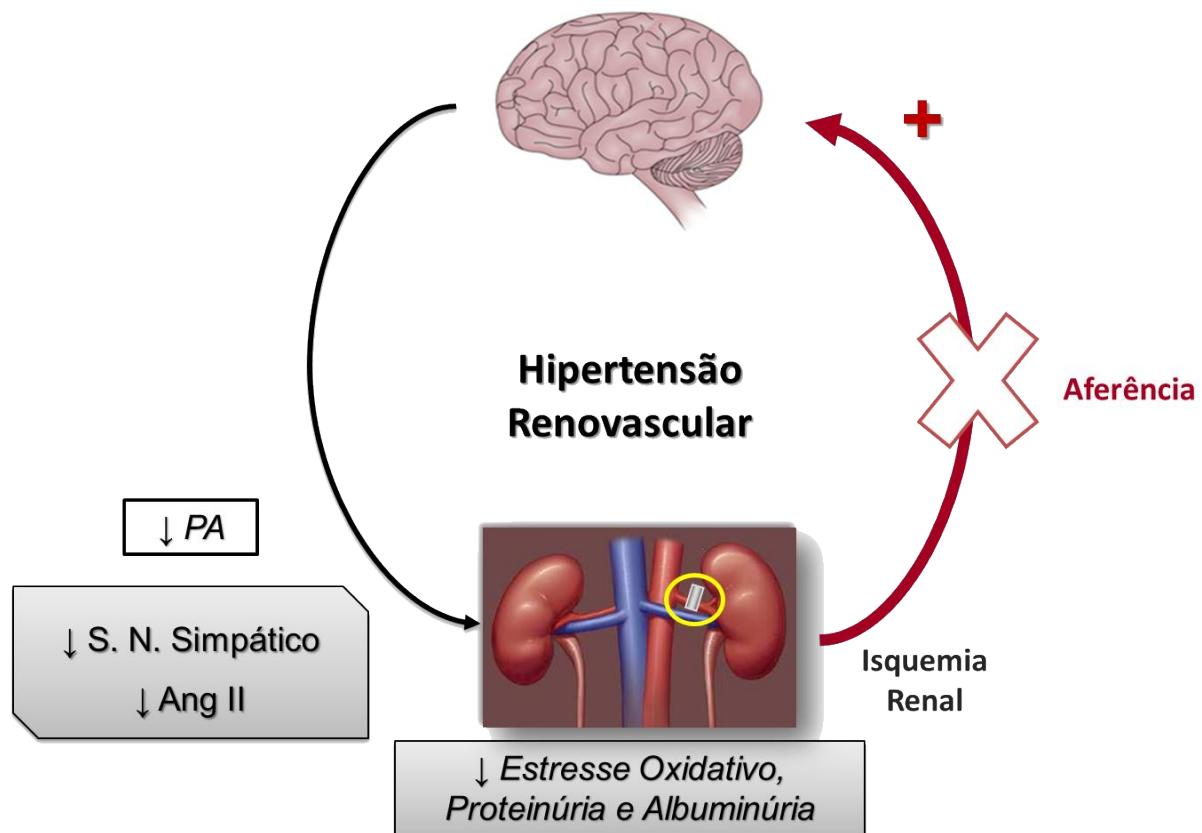
ainda mais a ação deletéria da doença e a evolução para uma insuficiência renal (IR), sobretudo na fase tardia da hipertensão renovascular quando o bloqueio do SRA ou a remoção do clipe renal não reverte a HA (Martínez-Maldonado, 2001). No entanto, mais experimentos precisam ser feitos para verificar tal possibilidade. Todavia, intrigantemente a DAx foi capaz de reduzir albuminúria nos animais 2R1C, mostrando ser um método eficaz em impedir a progressão da HA e consequente lesão renal.

Vale salientar ainda que lesões ou alterações em outras camadas que fazem parte da BFG podem acarretar em proteinúria, como o glicocálix no endotélio fenestrado. (Banek *et al.*, 2016) Estudos experimentais relataram que alterações no “glicocálix” estavam associadas à proteinúria, destacando a importância deste complexo (Pries *et al.*, 2000). Ademais, a MBG também possui total influência na filtração de macromoléculas, seu componente principal é o colágeno tipo IV, fornecendo suporte ao capilar glomerular (Andeen *et al.*, 2015) (Toblli *et al.*, 2012). Enfatizando este conceito, alterações ou mutações neste elemento podem culminar em aumento da lesão renal. Portanto, seria interessante avaliar também a composição de outras camadas da BFG frente à hipertensão renovascular e ainda se a DAx modula de forma positiva estes parâmetros.

## 7. Conclusão

---

Em conjunto, nossos dados indicam que as fibras aferentes renais podem contribuir para mecanismos de alteração renal, como o estresse oxidativo, proteinúria e albuminúria, e, assim, para a hipertensão arterial no modelo renovascular (figura 23). A remoção seletiva das fibras aferentes parece ser um método eficaz para reduzir a hiperatividade simpática renal e aumento do SRA intrarrenal, sem comprometer a função das fibras simpáticas no modelo 2R1C.



**Figura 22.** Esquema representativo dos efeitos da denervação aferente renal no modelo de hipertensão renovascular.

## 8. Anexos

### 8.1 Artigos publicados

Nishi EE, Martins BS, Milanez MI, **Lopes NR**, de Melo JF Jr, Pontes RB, Girardi AC, Campos RR, Bergamaschi CT. Stimulation of renal afferent fibers leads to activation of catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. Auton Neurosci. 2017; 204:48-56. doi: 10.1016/j.autneu.2017.01.003.

Nishi EE, **Lopes NR**, Gomes GN, Perry JC, Sato AY, Naffah-Mazzacoratti MG, Bergamaschi CT, Campos RR. Renal denervation ameliorates sympathetic overactivation, brain oxidative stress and renal lesion in renovascular hypertension independent of blood pressure reduction. Hypertension Research.

### 8.2 Artigo em revisão

Veiga AC, Ferreira GR, **Lopes NR**, Milanez MIO, Garcia ML, Oyama LM, Gomes GN, Carvalho PM, Nogueira FN, Bergamaschi CT, Campos RR, Nishi EE. Influence of afferent renal innervation in chronic kidney disease. Journal of Hypertension.

### **8.3 Artigos em redação**

Lopes NR, Milanez MIO, Veiga AC, Ferreira GR, Martins BS, Gomes GN, Carvalho PM, Nogueira FN, Campos RR, Bergamaschi CT, Nishi EE. Afferent innervation of the ischemic kidney contributes to renal dysfunction in renovascular hypertension

Ferreira GR, Garcia ML, Veiga AC, Lopes NR, Milanez MIO, Gomes GN, Oyama LM, Carvalho PM, Nogueira FN, Bergamaschi CT, Campos RR, Nishi EE. Effects of retroperitoneal white adipose tissue on cardiovascular and renal parameters in rats treated with high-fat diet.

Nishi EE, Martins BS, Lopes NR, Milanez MIO, Pontes RB, Campos RR, Bergamaschi CT, Central and cardiovascular effects of selective denervation of renal afferents in renovascular hypertension

## 8.4 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



### Comissão de Ética no Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos cardiovasculares e renais da Denervação seletiva dos Aferentes Renais de Ratos Wistar 2R-1C", protocolada sob o CEUA nº 1645050517, sob a responsabilidade de **Nathalia Rodrigues Lopes** e equipe; **Erika Emy Nishi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 18/09/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the cardiovascular and renal effects of selective denervation of renal afferents of Wistar rats 2R-1C", utilizing 48 Heterogenics rats (48 males), protocol number CEUA 1645050517, under the responsibility of **Nathalia Rodrigues Lopes** and team; **Erika Emy Nishi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/18/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2017** a **07/2019** Área: **Fisiologia Experimental**

Origem:	<b>CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia</b>				
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>	sexo:	<b>Machos</b>	idade:	<b>5 a 9 semanas</b>
Linhagem:	<b>Wistar</b>	Peso:	<b>150 a 350 g</b>		

Resumo: Sabe-se que o estresse oxidativo e o aumento da atividade nervosa simpática renal (ANSr) exercem um importante papel na hipertensão arterial (HA). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que a via da angiotensina II (Ang II)-receptor de Ang II tipo 1 (AT-1)-NADPH oxidase leva ao aumento do estresse oxidativo nos rins e nas regiões encefálicas pré-motoras do simpático no modelo experimental de HA renovascular. Ademais, estudos evidenciam que o nervo renal contribui para o desenvolvimento da injúria, inflamação e aumento na excreção de proteínas renais. Além da ineração simpática, o rim é inervado por fibras aferentes capazes de influenciar a ANSr. Sob condições fisiológicas, a ativação das fibras aferentes leva a uma resposta simpatoinibitória e, em contrapartida, o aumento exacerbado da atividade dos aferentes renais contribui para o aumento da pressão arterial, provavelmente decorrente de um efeito simpatoexcitatório na HA. Diante dessas evidências, a hipótese do presente projeto é que as fibras aferentes renais contribuem para a HA, simpatoexcitação e alterações renais, como função, estresse oxidativo e mecanismos envolvidos no aumento da proteinúria em ratos hipertensos renovasculares (2 Rins-1 Clipe). Portanto, o presente projeto pretende avançar nos estudos dos mecanismos pelos quais a denervação renal em pacientes com HA resistente ao tratamento farmacológico é eficaz em reduzir os níveis pressóricos e melhorar a função renal e contribuir para o aprimoramento de novas estratégias terapêuticas para a HA. ANIMAIS Serão utilizados: Ratos heterogênicos Wistar, machos, de 150 a 350 g, de 5 a 9 semanas Procedência: CEDEME Manutenção: Biotério de Fisiologia - UNIFESP/EPM Cronograma do estudo, início previsto para: 07/2017 com término previsto para: 07/2019

Local do experimento: Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória.

São Paulo, 18 de setembro de 2017

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## Referências Bibliográficas

ABRAMOV, D.; MOURÃO JR, C. **Biofísica Essencial**. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. ISBN 9788527719711.

ANDEEN, N. K. et al. The phenotypes of podocytes and parietal epithelial cells may overlap in diabetic nephropathy. **Kidney Int**, v. 88, n. 5, p. 1099-107, Nov 2015. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26376129> >.

AZIZI, M. et al. Six-Month Results of Treatment-Blinded Medication Titration for Hypertension Control Following Randomization to Endovascular Ultrasound Renal Denervation or a Sham Procedure in the RADIANCE-HTN SOLO Trial. **Circulation**, Mar 2019. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30880441> >.

BAKRIS, G. L.; BHATT, D. L. Reply: A mechanistic explanation for the minimal impact of renal denervation on 24-h ambulatory blood pressure in SIMPLICITY HTN-3. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 9, p. 959-60, Mar 2015. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744018> >.

BANEK, C. T. et al. Resting Afferent Renal Nerve Discharge and Renal Inflammation: Elucidating the Role of Afferent and Efferent Renal Nerves in Deoxycorticosterone Acetate Salt Hypertension. **Hypertension**, v. 68, n. 6, p. 1415-1423, 12 2016. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27698066> >.

BHATT, D. L. et al. A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. **N Engl J Med**, v. 370, n. 15, p. 1393-401, Apr 2014. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678939> >.

BINDA, M. et al. Avaliação da pressão arterial sistólica em equinos da raça Mangalarga marchador após exercício físico. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 132-138, 2013.

BOSSE, H. M.; BACHMANN, S. Immunohistochemically detected protein nitration indicates sites of renal nitric oxide release in Goldblatt hypertension. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 948-52, Oct 1997. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336398> >.

BÖHM, M. et al. Renal sympathetic denervation: applications in hypertension and beyond. **Nat Rev Cardiol**, v. 10, n. 8, p. 465-76, Aug 2013. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774592> >.

\_\_\_\_\_. Ambulatory heart rate reduction after catheter-based renal denervation in hypertensive patients not receiving anti-hypertensive medications: data from SPYRAL HTN-OFF MED, a randomized, sham-controlled, proof-of-concept trial. **Eur Heart J**, v.

40, n. 9, p. 743-751, Mar 2019. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30608521> >.

CAMPESE, V. M.; KOGOSOV, E. Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. **Hypertension**, v. 25, n. 4 Pt 2, p. 878-82, Apr 1995. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7721447> >.

CAMPOS, R. R. et al. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 38, n. 2, p. 144-52, Feb 2011. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678153> >.

. Mechanisms of renal sympathetic activation in renovascular hypertension. **Exp Physiol**, v. 100, n. 5, p. 496-501, Apr 2015. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25639235> >.

CANNON, W. Organization for physiological homeostasis. **Physiol Rev**, v. 9, p. 399-431, 1929.

CUZZOCREA, S. et al. Superoxide: a key player in hypertension. **FASEB J**, v. 18, n. 1, p. 94-101, Jan 2004. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718390> >.

DAVERN, P. J.; MCKINLEY, M. J. Brain regions influenced by the lateral parabrachial nucleus in angiotensin II-induced water intake. **Neuroscience**, v. 252, p. 410-9, Nov 2013. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994596> >.

DE CHAMPLAIN, J. et al. Oxidative stress in hypertension. **Clin Exp Hypertens**, v. 26, n. 7-8, p. 593-601, 2004 Oct-Nov 2004. ISSN 1064-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702613> >.

DIBONA, G. F. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 940, p. 395-406, Jun 2001. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458695> >.

DIBONA, G. F.; KOPP, U. C. Neural control of renal function. **Physiol Rev**, v. 77, n. 1, p. 75-197, Jan 1997. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9016301> >.

ESLER, M.; GUO, L. The future of renal denervation. **Auton Neurosci**, v. 204, p. 131-138, May 2017. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546827> >.

ESLER, M. et al. Measurement of total and organ-specific norepinephrine kinetics in humans. **Am J Physiol**, v. 247, n. 1 Pt 1, p. E21-8, Jul 1984. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742187> >.

ESLER, M. D. et al. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 376, n. 9756, p. 1903-9, Dec 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093036> >.

FOSS, J. D. et al. Role of afferent and efferent renal nerves in the development of AngII-salt hypertension in rats. **Physiol Rep**, v. 6, n. 3, 02 2018. ISSN 2051-817X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29405658> >.

\_\_\_\_\_. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 2, p. R112-22, Jan 2015. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411365> >.

GLOY, J. et al. Amino acid transport in podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 278, n. 6, p. F999-F1005, Jun 2000. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836988> >.

GOLDBLATT, H. et al. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION : I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. **J Exp Med**, v. 59, n. 3, p. 347-79, Feb 1934. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870251> >.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. **Cell**, v. 113, n. 3, p. 343-55, May 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732142> >.

HERING, D. et al. Substantial reduction in single sympathetic nerve firing after renal denervation in patients with resistant hypertension. **Hypertension**, v. 61, n. 2, p. 457-64, Feb 2013. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172929> >.

HOSOJIMA, M. et al. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 871-8, Feb 2009. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927221> >.

HOWARD, M. P.; TRUSKETT, T. M.; NIKOUBASHMAN, A. Cross-stream migration of a Brownian droplet in a polymer solution under Poiseuille flow. **Soft Matter**, v. 15, n. 15, p. 3168-3178, Apr 2019. ISSN 1744-6848. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30883631> >.

JOHNS, E. J.; KOPP, U. C.; DIBONA, G. F. Neural control of renal function. **Compr Physiol**, v. 1, n. 2, p. 731-67, Apr 2011. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23737201> >.

KIM, J.; PADANILAM, B. J. Renal nerves drive interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 24, n. 2, p. 229-42, Feb 2013. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264683> >.

KJELDSEN, S. E. et al. Renal denervation achieved by endovascular delivery of ultrasound in RADIANCE-HTN SOLO or by radiofrequency energy in SPYRAL HTN-OFF and SPYRAL-ON lowers blood pressure. **Blood Press**, v. 27, n. 4, p. 185-187, 08 2018. ISSN 1651-1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29936868> >.

KNUEPFER, M. M.; SCHRAMM, L. P. The conduction velocities and spinal projections of single renal afferent fibers in the rat. **Brain Res**, v. 435, n. 1-2, p. 167-73, Dec 1987. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3427451> >.

KOBORI, H. et al. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev**, v. 59, n. 3, p. 251-87, Sep 2007. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878513> >.

**KOHLMANN JR. , O.** et al. *III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial* 1999.

KOPP, U. C.; BUCKLEY-BLEILER, R. L. Impaired renorenal reflexes in two-kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 445-52, Oct 1989. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793217> >.

KOPP, U. C.; JONES, S. Y.; DIBONA, G. F. Afferent renal denervation impairs baroreflex control of efferent renal sympathetic nerve activity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 6, p. R1882-90, Dec 2008. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945951> >.

KRUM, H. et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. **Lancet**, v. 373, n. 9671, p. 1275-81, Apr 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332353> >.

\_\_\_\_\_. Percutaneous renal denervation in patients with treatment-resistant hypertension: final 3-year report of the Symplicity HTN-1 study. **Lancet**, v. 383, n. 9917, p. 622-9, Feb 2014. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210779> >.

KUNES, J.; ZICHA, J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. **Physiol Res**, v. 58 Suppl 2, p. S33-41, 2009. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20131935> >.

LEHESTE, J. R. et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. **FASEB J**, v. 17, n. 2, p. 247-9, Feb 2003. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475886> >.

MALACHIAS, M. V. V. B. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 8 - Hypertension and Associated Clinical Conditions. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 44-48, 09 2016. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819387> >.

MARTÍNEZ-MALDONADO, M. Role of hypertension in the progression of chronic renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16 Suppl 1, p. 63-6, 2001. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369824> >.

MEZZANO, S. A.; RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II and renal fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 635-8, Sep 2001. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566946> >.

MOGENSEN, C. E. Mistakes, misunderstandings and controversies in diabetes: A review and personal account. **J Diabetes Investig**, v. 1, n. 3, p. 97-100, Jun 2010. ISSN 2040-1116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843414> >.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221> >.

NAVAR, L. G. Counterpoint: Activation of the intrarenal renin-angiotensin system is the dominant contributor to systemic hypertension. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 6, p. 1998-2000; discussion 2015, Dec 2010. ISSN 1522-1601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148349> >.

NISHI, E. E. et al. Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v. 26, n. 7, p. 858-65, Jul 2013. ISSN 1941-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485486> >.

\_\_\_\_\_. Stimulation of renal afferent fibers leads to activation of catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. **Auton Neurosci**, v. 204, p. 48-56, 05 2017. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28126464> >.

\_\_\_\_\_. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. **Am J Hypertens**, v. 23, n. 5, p. 473-80, May 2010. ISSN 1941-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186128> >.

NORDEN, A. G.; LAPSLY, M.; UNWIN, R. J. Urine retinol-binding protein 4: a functional biomarker of the proximal renal tubule. **Adv Clin Chem**, v. 63, p. 85-122, 2014. ISSN 0065-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783352> >.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v. 22, n. 5, p. 484-92, May 2009. ISSN 1941-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229193> >.

OPARIL, S.; SRIPAIROJTHIKOON, W.; WYSS, J. M. The renal afferent nerves in the pathogenesis of hypertension. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 8, p. 1548-58, Aug 1987. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3319106> >.

PATEL, H. C. et al. Renal denervation for the management of resistant hypertension. **Integr Blood Press Control**, v. 8, p. 57-69, 2015. ISSN 1178-7104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26672761> >.

PELELI, M. et al. Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease, which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. **Redox Biol**, v. 13, p. 522-527, 10 2017. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28734244> >.

PERRY, I. J.; WHINCUP, P. H.; SHAPER, A. G. Environmental factors in the development of essential hypertension. **Br Med Bull**, v. 50, n. 2, p. 246-59, Apr 1994. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8205457> >.

PETERSON, P. A.; BERGGÅRD, I. Isolation and properties of a human retinol-transporting protein. **J Biol Chem**, v. 246, n. 1, p. 25-33, Jan 1971. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5541768> >.

PICKERING, T. G. The effects of environmental and lifestyle factors on blood pressure and the intermediary role of the sympathetic nervous system. **J Hum Hypertens**, v. 11 Suppl 1, p. S9-18, Aug 1997. ISSN 0950-9240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321735> >.

PIECHA, G.; WIECEK, A.; JANUSZEWICZ, A. Epidemiology and optimal management in patients with renal artery stenosis. **J Nephrol**, v. 25, n. 6, p. 872-8, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1724-6059. Disponível em: < [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023722) >.

PONTES, R. B. et al. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 308, n. 8, p. F848-56, Apr 2015. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25656367> >.

\_\_\_\_\_. Crosstalk between the renal sympathetic nerve and intrarenal angiotensin II modulates proximal tubular sodium reabsorption. **Exp Physiol**, v. 100, n. 5, p. 502-6, Apr 2015. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858030> >.

RAJAGOPALAN, S. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest**, v. 97, n. 8, p. 1916-23, Apr 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621776> >.

RUILOPE, L. et al. Effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha/\gamma$  agonist aleglitazar on renal function in patients with stage 3 chronic kidney disease and type 2 diabetes: a Phase IIb, randomized study. **BMC Nephrol**, v. 15, p. 180, Nov 2014. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407798> >.

SCHLAICH, M. P. et al. Targeting the sympathetic nervous system: critical issues in patient selection, efficacy, and safety of renal denervation. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 426-32, Mar 2014. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324047> >.

SCHLAICH, M. P.; KIUCHI, M. G.; ESLER, M. D. Renal Denervation-Ready for Prime Time!? The Steep SPYRAL Stairs to RADIANCE in Hypertension Treatment. **Hypertension**, v. 72, n. 2, p. 287-290, Aug 2018. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29941510> >.

SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 69, n. 12, p. 2131-47, Jun 2006. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16688120> >.

SINGH, R. R. et al. Catheter-Based Renal Denervation Exacerbates Blood Pressure Fall During Hemorrhage. **J Am Coll Cardiol**, v. 69, n. 8, p. 951-964, Feb 2017. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28231948> >.

SMITHWICK, R. H.; THOMPSON, J. E. Splanchnicectomy for essential hypertension; results in 1,266 cases. **J Am Med Assoc**, v. 152, n. 16, p. 1501-4, Aug 1953. ISSN 0002-9955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13061307> >.

SOBOTKA, P. A. et al. Sympatho-renal axis in chronic disease. **Clin Res Cardiol**, v. 100, n. 12, p. 1049-57, Dec 2011. ISSN 1861-0692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21688196> >.

SOLANO-FLORES, L. P.; ROSAS-ARELLANO, M. P.; CIRIELLO, J. Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. **Brain Res**, v. 753, n. 1, p. 102-19, Apr 1997. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125437> >.

SZALLASI, A.; LEWIN, N. A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 266, n. 2, p. 678-83, Aug 1993. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8355200> >.

TENTEN, V. et al. Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 24, n. 12, p. 1966-80, Dec 2013. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970123> >.

TOBLLI, J. E. et al. Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 546039, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844592> >.

TUTOR, A. S.; PRIETO-SÁNCHEZ, S.; RUIZ-GÓMEZ, M. Src64B phosphorylates Dumbfounded and regulates slit diaphragm dynamics: Drosophila as a model to study nephropathies. **Development**, v. 141, n. 2, p. 367-76, Jan 2014. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335255> >.

VEELKEN, R. et al. Autonomic renal denervation ameliorates experimental glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 7, p. 1371-8, Jul 2008. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400940> >.

VIBERTI, G.; KARALLIEDDE, J. Commentary: the birth of microalbuminuria: a milestone in the history of medicine. **Int J Epidemiol**, v. 43, n. 1, p. 18-20, Feb 2014. ISSN 1464-3685. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374830> >.

WEBER, B. R.; DIETER, R. S. Renal artery stenosis: epidemiology and treatment. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 7, p. 169-81, 2014. ISSN 1178-7058. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868169> >.

WELCH, W. J. et al. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. **Hypertension**, v. 41, n. 3 Pt 2, p. 692-6, Mar 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12623981> >.

WIMMER, N. J.; MAURI, L. Renal Denervation: Where to Now? **Curr Cardiol Rep**, v. 17, n. 12, p. 116, Dec 2015. ISSN 1534-3170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482759> >.

WOLF, G.; HELMCHEN, U.; STAHL, R. A. Isoproterenol stimulates tubular DNA replication in mice. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, n. 11, p. 2288-92, Nov 1996. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8941592> >.

WYSS, J. M. et al. Exacerbation of hypertension by high chloride, moderate sodium diet in the salt-sensitive spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 9, n. 6 Pt 2,

p. III171-5, Jun 1987. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3596784>>.

YARAEI, R. et al. Alterations in serum levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-1alpha, IL-1beta and IL-1Ra) 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran cohort study. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 13-14, p. 1466-70, Dec 2009. ISSN 1878-1705. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747989>>.