TALES LYRA DE OLIVEIRA

Papel dos nervos renais no diabetes *mellitus* experimental

Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

São Paulo - SP
2018

TALES LYRA DE OLIVEIRA

Papel dos nervos renais no diabetes *mellitus* experimental

Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Fisiofarmacologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória, Departamento de Fisiologia, pelo Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Orientador

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior

Professor Titular do Departamento de Fisiologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Coorientadora

Profa. Dra. Cássia Marta de Toledo Bergamaschi

Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

São Paulo - SP
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lyra de Oliveira, Tales

Papel dos nervos renais no diabetes mellitus experimental / Tales Lyra de Oliveira. - São Paulo, 2018.

XXIV, 190f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Título em inglês: Role of renal nerves in experimental diabetes mellitus.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Chefe do Departamento de Fisiologia: Profa. Dra. Eliana Beraldi Ribeiro

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmacologia: Profa. Dra. Regina Helena da Silva

TALES LYRA DE OLIVEIRA

Papel dos nervos renais no diabetes *mellitus* experimental

PRESIDENTE DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior

Professor Titular do Departamento de Fisiologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Profa. Dra. Erika Bevilaqua Rangel

Professora Adjunta da Disciplina de Nefrologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Profa. Dra. Lisete Campagno Michelini

Professora Titular do Departamento de Fisiologia e Biofísica

Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen

Professora Colaboradora Livre Docente do Departamento de Cardiopneumologia

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Professor Associado Livre Docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica

Universidade de São Paulo

Suplentes

Prof. Dr. Bruno Moreira Silva

Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Professor Associado Livre Docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica

Universidade de São Paulo

Apoio Financeiro
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP: 2014/26387-1)

Dedico esta conquista primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, clareza de pensamento e discernimento.

À minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Patrícia, por não medirem esforços para a construção do meu aprendizado.

Aos meus amigos, pois sem eles meus dias teriam sido vazios.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me colocado em uma família tão especial e por iluminar meus caminhos, dando-me paz de espírito, saúde física e mental, clareza de pensamento e discernimento.

Aos meus pais, Carlos e Patrícia, por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Não tenho dúvidas que construíram uma família íntegra e bem alicerçada. Tudo o que sou devo à educação que recebi, provinda de muito esforço, trabalho e abdicações. Peço desculpas pelas ausências em vários momentos de confraternização familiar, mas infelizmente o tempo e a distância física, nem sempre são justos. Grato por me fazerem uma pessoa melhor nessa passageira jornada terrena.

À minha família, que tanto incentiva a realização dos meus objetivos. Tenho muito orgulho de fazer parte de uma família tão especial. Agradeço as minhas avós, Marluce e Dirlene, por serem grandes exemplos de perseverança, amor ao próximo e simplicidade, como também aos meus tios e primos que sempre me deram apoio e força a cada decisão tomada.

Ao meu orientador, Prof. Ruy Campos, pelo comprometimento, competência e responsabilidade que exerce sua profissão. Se hoje consigo dar passos mais largos na minha vida profissional, devo à oportunidade e confiança que me conferiste. A minha coorientadora, Profa. Cássia Bergamaschi, pelas importantes discussões científicas.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular com quem pude conviver nesses quatro anos de muito aprendizado. Gostaria de agradecer de forma especial a Gisele Lincevicius, Caroline Gusson, Nadia Maruyama, Lysien Zambrano,

Núbia Fardin, Roberto Pontes, Gláucia Veiga, Elizabeth Sales, Nathalia Rodrigues, Michelle Louvaes, Maycon Milanez e Héder Frank. Também não posso deixar de agradecer ao Dr. Alex Sato pela importante colaboração, sobretudo na realização de técnicas de biologia molecular, aos técnicos de laboratório e bioteristas, Toninho e Airton, e a secretária da Disciplina, Kátia Monteiro, pela disponibilidade, compreensão e cooperação em toda a minha permanência no laboratório.

Aos professores que colaboraram com esse estudo, sobretudo em suas linhas de atuação e expertise: Prof. Fernando Nogueira e a Dra. Polliane Morais (estresse oxidativo; Faculdade de Odontologia - USP); Profa. Guiomar Nascimento (histologia renal: Departamento de Fisiologia – UNIFESP); Profa. Mirian Boim, a Ma. Vanessa Varela e a técnica Milene Ormanji (função renal; Disciplina de Nefrologia – UNIFESP). Agradeço por todo o empenho e ensinamentos.

Às minhas amigas-irmãs que ganhei no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Gisele Lincevicius e Caroline Gusson, com quem pude dividir momentos inesquecíveis. A presença cotidiana de vocês foi essencial nessa trajetória. Que nossa amizade seja separada apenas por vírgulas, nunca por um ponto final. E, aos amigos do coração que acompanham a minha trajetória dando-me incentivo, força e motivação, Marcelo Buscariolli, Návylla Candeia, Fernanda Lima, Jamylle Ferro, Monique Vércia, Dannielle Melo, Lysien Zambrano, Lilian Souza e Vanessa Varela. Tenho em vocês exemplos de comprometimento e dedicação.

Às agências de fomento ligadas a pesquisa e desenvolvimento que financiaram a realização deste estudo: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”.

Chico Xavier

RESUMO

Introdução: O diabetes *mellitus* (DM) promove aumento da atividade nervosa simpática renal (ANSr), desbalanço autonômico, disfunção cardiovascular, metabólica e renal. O aumento da ANSr parece ter estreita relação com a instalação e manutenção da condição de nefropatia diabética e de neuropatia autonômica. Recentemente, a denervação renal bilateral (BRD) tem sido utilizada como alternativa terapêutica em patologias que cursam com hiperatividade nervosa simpática renal. **Objetivos:** A partir destas informações, a presente tese buscou avaliar o papel dos nervos renais sobre o balanço autonômico, cardiovascular, metabólico e renal em animais diabéticos. **Materiais e Métodos:** Protocolo CEUA - UNIFESP 1787250714. Para isto, foram utilizados ratos Wistar com 8 semanas de idade separados em três grupos experimentais independentes: controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal (DM BRD), sendo n=6-8 animais por grupo. O DM foi induzido por uma única dose de estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg, ip) 4 semanas antes dos experimentos e a BRD cirúrgica foi realizada 2 semanas antes das avaliações. Os resultados foram expressos como média ± EPM e comparados por meio do teste de análise de variância (ANOVA), utilizando nível de significância de $P<0,05$. **Resultados:** O DM foi confirmado pela redução do peso corporal (CTR: 351,5 ± 4,1; DM: 242,1 ± 6,7 g) e pelo aumento da glicemia (CTR: 100,3 ± 3,7; DM: 509,1 ± 14,4 mg/dL). Por sua vez, a BRD reduziu significativamente a glicemia (410,5 ± 5,8 mg/dL) e aumentou o peso corporal (302,4 ± 5,7 g). O DM promoveu prejuízo da função renal gerando glicosuria e albuminuria (CTR: 0,01 ± 0,001 e 0,08 ± 0,008; DM: 2,7 ± 0,19 e 0,39 ± 0,04 g/kg/24h), mas a BRD atenuou significativamente esses indicadores de lesão renal (1,3 ± 0,19 e 0,13 ± 0,04 g/kg/24h). Houve redução da frequência cardíaca (FC) basal no grupo DM (CTR: 352 ± 13; DM: 292 ± 11bpm) associada a uma redução da sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial (resposta bradicárdica: CTR: -2,17 ± 0,06; DM: -1,92 ± 0,04 bpm/mmHg e resposta taquicárdica: CTR: -2,55 ± 0,04; DM: -2,09 ± 0,03 bpm/mmHg), mas a BRD normalizou significativamente a FC (372 ± 23 bpm) e melhorou a sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial (resposta bradicárdica: -2,09 ± 0,14 e resposta taquicárdica: -3,13 ± 0,05 bpm/mmHg). A ANSr foi significativamente aumentada (CTR: 82,6 ± 3,93; DM: 124,8 ± 6,45 pps), enquanto

que a ANS esplâncnica (ANSe) foi reduzida no grupo DM (CTR: 120,5 ± 4,76; DM: 72,3 ± 5,70 pps) e, a BRD foi capaz de normalizar a ANSe (100,0 ± 9,23 pps). A expressão gênica do cotransportador de Na^+/glicose 2 (SGLT2) e a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNFα) renais estiveram aumentados no DM (CTR: 1,00 ± 0,24 e 233,3 ± 17,54; DM: 12,33 ± 1,25 normalizado HPRT1 e 244,1 ± 12,19 pg/mL), porém, a BRD normalizou esses parâmetros (1,53 ± 0,85 normalizado HPRT1 e 190,9 ± 7,53 pg/mL). Agudamente, a microinjeção de insulina na região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) promoveu aumento significante da PA (CTR: 8,7 ± 2,26; DM: 23,9 ± 19,27; DM BRD: 12,8 ± 4,25 %) e da ANSe (CTR: 14,2 ± 3,50; DM: 21,2 ± 9,41; DM BRD: 17,5 ± 3,80 %) apenas nos grupos DM, contudo, aumentou a ANSr em todos os grupos avaliados (CTR: 25,7 ± 4,62; DM: 20,6 ± 3,33 %), em comparação às medias basais. **Conclusão:** Em conjunto, os resultados demonstram que os nervos renais estão envolvidos de forma significante no balanço autonômico, na função cardiovascular, metabólica e renal no modelo de DM. É possível que os mecanismos envolvidos na melhora desses parâmetros por meio da BRD sejam mediados pelo SGLT2 e TNFα renais. As alterações cardiovasculares no DM podem ser consequentes às ações diferenciais (centrais ou periféricas) da insulina.

Palavras Chaves: Diabetes *mellitus*. Atividade nervosa simpática. Insulina. Sistema nervoso simpático. Sistema renina angiotensina aldosterona. Denervação renal.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus (DM) promotes increased renal sympathetic nerve activity (rSNA), autonomic imbalance, cardiovascular, metabolic and renal dysfunction. Apparently, the rSNA increases is directly associated with development and maintenance of neuropathy diabetic and autonomic nephropathy condition. Recently, there has been an important interest in clinical and experimental studies about bilateral renal denervation (BRD) procedure as a therapeutic alternative in some diseases related with renal sympathoexcitation. **Aims:** Protocol CEUA – UNIFESP 1787250714. Therefore, the present study evaluated the role of renal nerves on the autonomic, cardiovascular, metabolic and renal balance in the streptozotocin-diabetic animal model. Methods: 8-week-old Wistar rats were separated into three experimental groups: control (CTR), diabetic (DM) and denervated diabetic (DM BRD), with n=6-8 animals per group. DM was induced by one dose of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg, ip) 4 weeks prior to the final experiments while the surgical BRD was performed 2 weeks before final experiments. The results were expressed as mean ± SEM and were compared by analysis of variance (ANOVA), $P<0.05$ was considered as the significance level. **Results:** DM was confirmed by body weight reduction (CTR: 351.5 ± 4.1, DM: 242.1 ± 6.7 g) and glycemia increases (CTR: 100.3 ± 3.7, DM: 509.1 ± 14.4 mg/dL). BRD significantly reduced glycemia (410.5 ± 5.8 mg/dL) and increased body weight (302.4 ± 5.7 g) in diabetic animals. DM promoted impairment of renal function such as glycosuria and albuminuria (CTR: 0,01 ± 0,001 and 0,08 ± 0,008, DM: 2.7 ± 0.19 and 0,39 ± 0,04 g/kg/24h), however BRD significantly attenuated these parameters (1,3 ± 0,19 and 0,13 ± 0,04 g/kg/24h). The heart rate (HR) was decreased in the DM animals (CTR: 352 ± 13, DM: 292 ± 11 bpm), associated with reduction of arterial baroreceptor reflex sensitivity to HR control (bradycardic response: CTR: -2.17 ± 0.06, DM: -1.92 ± 0.04 bpm/mmHg and tachycardic response: CTR: -2.55 ± 0.04, DM: -2.09 ± 0.03 bpm/mmHg). Interestingly, BRD was able to normalized HR (372 ± 23 bpm) and improved baroreflex sensitivity to the HR control (bradycardic response: -2.09 ± 0.14 and tachycardic response: -3.13 ± 0.05 bpm/mmHg) in the DM model. The rSNA was significantly increased (CTR: 82.6 ± 3.93, DM: 124.8 ± 6.45 pps), while splanchnic SNA (sSNA) was decreased in the diabetic animals (CTR: 120.5 ± 4.76, DM: 72.3 ±

5.70 pps), however BRD normalized sSNA (100.0 ± 9.23 pps) in the diabetic animals. The Na+/glucose cotransporter 2 (SGLT2) gene expression and tumor necrosis factor (TNFα) concentration were increased in the kidneys of DM group (CTR: 1.00 ± 0.24 and 233.3 ± 17.54, DM: 12.33 ± 1.25 normalized HPRT1 and 244.1 ± 12.19 pg/mL), meanwhile BRD was able to normalize (1.53 ± 0.85 normalized HPRT1 and 190.9 ± 7.53 pg/mL) these parameters.. Acutely, insulin microinjection in the rostoventrolateral medulla area (RVLM) increased mean arterial pressure (MAP; CTR: 8.7 ± 2.26, DM: 23.9 ± 19.27, DM BRD: 12.8 ± 4.25 %) and sSNA (CTR: 14.2 ± 3.50, DM: 21.2 ± 9.41, DM BRD: 17.5 ± 3.80%) only in DM groups, however, the rSNA was increased in all groups evaluated (CTR: 25.7 ± 4.62, DM: 20.6 ± 3.33%), compared to baseline means. **Conclusion:** Taken together, our results suggest that the renal nerves have an important role in the autonomic balance, cardiovascular, metabolic and renal function in the DM model. Furthermore, the reduction of renal SGLT2 and TNFα appears to be mechanisms involved in the improvement of these parameters (cardiovascular, autonomic, metabolic and renal) induced by BRD in the experimental DM. Cardiovascular changes in DM can be achieved by central or peripheral differential actions of insulin.

Keywords: Diabetes mellitus. Sympathetic nerve activity. Insulin. Sympathetic nervous system. Renin angiotensin aldosterone system. Renal denervation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama mundial de casos de DM por região em 2017 e sua estimativa para 2045 em indivíduos com 20 a 79 anos de idade. 28

Figura 2. Representação esquemática do ciclo vicioso perverso decorrente da interação do DM e a instalação do quadro de nefropatia diabética e neuropatia cardíaca..... 31

Figura 3. Efeitos da ativação do SNS sobre o controle fisiológico de diferentes órgãos. 34

Figura 4. Representação esquemática da fisiopatologia do DM. 54

Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental. 60

Figura 6. Representação esquemática do registro da ANS esplâncnica, renal e lombar. 63

Figura 7. Representação esquemática da técnica de BRD. 65

Figura 8. Desenho esquemático da localização dos punches bilaterais. 80

Figura 9. Parâmetros gerais de caracterização do DM. 83

Figura 10. Parâmetros gerais cardiovasculares. 84

Figura 11. Atividade nervosa simpática (ANS). 86

Figura 12. Traçado representativo do efeito do DM sobre atividade nervosa simpática renal (ANSr) basal. 87

Figura 13. Traçado representativo do efeito da denervação renal bilateral sobre atividade nervosa simpática lombar (ANSl) basal. 88

Figura 14. Traçado representativo do efeito da denervação renal bilateral sobre atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe) basal. 89

Figura 15. Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial. 91

Figura 16. Parâmetros metabólicos de caracterização do DM. 93

Figura 17. Concentrações plasmáticas e urinárias de Na^+ e K^+. 95

Figura 18. Indicadores de lesão glomerular. 97

Figura 19. Marcador de função renal - creatinina. 99

Figura 20. Marcador de função renal - ureia. 101

Figura 21. Marcadores de hidratação. 102

Figura 22. Balanço hídrico. 103

Figura 23. Morfologia renal. 104

Figura 24. Expansão mesangial. 105

Figura 25. Fibrose glomerular e túbulo-intersticial. 107

Figura 26. Peso dos órgãos internos: rins e coração. 109

Figura 27. Correlações metabólicas, renais e autonômicas. 111

Figura 28. Expressão gênica dos componentes do SRAA nos rins. 113

Figura 29. Conteúdo proteico de tirosina hidroxila (TH) e renina nos rins. ... 115

Figura 30. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) e do cotransportador de Na^+/Glicose (SGLT2) nos rins. 116

Figura 31. Concentração de citocinas nos rins. 117

Figura 32. Concentração de citocinas no coração. 118

Figura 33. Perfil oxidativo nos rins. 120

Figura 34. Perfil oxidativo no coração. 122

Figura 35. Perfil oxidativo no soro. 124

Figura 36. Parâmetros cardiovasculares após infusão de insulina na região RVLM. 126

Figura 37. Atividade nervosa simpática renal (ANSr) e esplâncnica (ANSe) após infusão de insulina na região RVLM. 128

Figura 38. Expressão gênica dos componentes do SRAA no NTS. 130

Figura 39. Expressão gênica dos componentes do SRAA no PVN. 132

Figura 40. Expressão gênica dos componentes do SRAA na região RVLM. 134

Figura 41. Expressão gênica de interleucinas na região RVLM. 135

Figura 42. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) no NTS, PVN e RVLM. 136

Figura 43. Parâmetros cardiovasculares após infusão endovenosa de insulina. 138

Figura 44. Parâmetros autonômicos e glicêmicos após infusão endovenosa de insulina. 140

Figura 45. Representação esquemática dos principais resultados e possíveis hipóteses da presente tese. 162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais tipos de DM. 26

Tabela 2. Diluições utilizadas dos anticorpos primários e secundários. 71

Tabela 3. Representação dos *slopes*, inclinação da reta através de regressão linear, por meio da razão da variação da FC pela variação da PAM ou por meio da razão da variação da ANS pela variação da PAM. 92

LISTA DE ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio
Ang II	Angiotensina II
ANS	Atividade nervosa simpática
ANSe	Atividade nervosa simpática esplâncnica
ANSl	Atividade nervosa simpática lombar
ANSm	Atividade nervosa simpática músculo esquelética
ANSr	Atividade nervosa simpática renal
AP5	Antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA
AT_1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT_2	Receptor de angiotensina do tipo 2
BHE	Barreira hematoencefálica
BRD	Denervação renal bilateral
CAD	Cetoacidose diabética
CTR	Controle
DM	Diabetes *mellitus*
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FC	Frequência cardíaca
FPR	Fluxo plasmátio renal
HE	Hematoxilina-Eosina
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase tipo 1
icv	Intracerebroventricular

IML	Coluna intermédio lateral
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
LCR	Líquido céfalorraquidiano
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
Losartana	Antagonista de receptores AT1
NA	Neuropatia autonômica
NBQX	Antagonista de receptores glutamatérgicos não-NMDA
NHE_3	Trocador Na^+/H^+
NMDA	N-metil D-Aspartato
NPS	Neurônios simpáticos pré-ganglionares
OSF	Órgãos subfornais
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
Ref	Referência
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RI	Receptor de insulina
ROS	Espécie reativa de oxigênio

RVLM	Região rostroventrolateral do bulbo
SGLT1	Cotransportador de Na^+/glicose/H_2O tipo 1
SGLT2	Cotransportador de Na^+/glicose tipo 2
SHU9119	Antagonista do receptor de melanocortina tipo 3 e 4
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STZ	Estreptozotocina
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato gastrointestinal
TH	Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25
1.1 Epidemiologia e fisiopatologia do diabetes *mellitus* (DM) 25
1.2 Papel do sistema nervoso autônomo (SNA) 32
1.3 Disfunção na sensibiliade do reflexo barorreceptor arterial e balanço simpato/vagal 34
1.4 Papel sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) 36
1.5 Papel do estresse oxidativo 38
1.6 Papel da denervação renal bilateral (BRD) 40
1.7 Controle fisiológico da glicemia 41
1.7.1 Papel dos rins no controle glicêmico 43
1.7.2 Papel da insulina perifericamente 47
1.7.3 Papel da insulina no sistema nervoso central (SNC) 50
2. OBJETIVOS 55
2.1 Objetivo geral 55
2.2 Objetivos específicos 55
3. MATERIAIS E MÉTODOS 58
3.1 Delineamento experimental 58
3.2 Modelo experimental 58
3.3 Primeira série de experimentos 60
3.3.1 Cateterização arteriovenosa femoral 60
3.3.2 Análise da sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial cardíaco 61
3.3.3 Análise da atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe) basais e da sensibilidade reflexa do barorreceptor arterial para esses territórios.... 61
3.3.4 Denervação renal bilateral (BRD) 64
3.4 Segunda série de experimentos 65
3.4.1 Gaiola metabólica 65
3.4.2 Excreção urinária (Na^+, K^+, glicose e albumina) 66
3.4.3 Concentração plasmática (Na+, K+, glicose e albumina).... 66
3.4.4 Marcadores de função renal (ureia e creatinina) 67
3.4.5 Balanço hídrico 67

3.4.6 Expressão gênica de componentes do SRAA, do receptor de insulina (RI) e do cotransportador de Na+/glicose (SGLT2) nos rins 67
3.4.6.1 Isolamento de RNA total 68
3.4.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) 68
3.4.6.3 Sequências dos *primers* 69
3.4.7 Conteúdo proteico de renina e tirosina hidroxilase (TH) nos rins 70
3.4.8 Perfil inflamatório 72
3.4.8.1 Extração de proteínas 72
3.4.8.2 Dosagem das citocinas 72
3.4.9 Perfil oxidativo 73
3.4.9.1 Determinação da atividade da catalase (CAT) 73
3.4.9.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) 73
3.4.9.3 Determinação da atividade da glutationa peroxidase (GPx) 74
3.4.9.4 Determinação da atividade da glutationa redutase (GR) 74
3.4.9.5 Análise do total antioxidante (TAS) 75
3.4.10 Histologia renal 75
3.5 Terceira série de experimentos 77
3.5.1 Microinjeção na região RVLM 77
3.5.2 Expressão gênica de componentes do SRAA, do receptor de insulina (RI) e citocinas inflamatórias no NTS, PVN e RVLM 78
3.5.2.1 Isolamento de RNA total 79
3.5.2.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) 81
3.5.2.3 Sequências dos primers 81
3.6 Quarta série de experimentos 82
3.6.1 Infusão periférica de insulina 82
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 82
5. RESULTADOS 83
5.1 Parâmetros gerais de caracterização do DM 83
5.1.1 Peso corporal e glicemia 83
5.2 Parâmetros cardiovasculares e autonômicos 84
5.2.1 Pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) 84

5.2.2 Atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe) 85
5.2.3 Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe).....90
5.3 Parâmetros metabólicos.....93
5.3.1 Ingestão de água, fluxo urinário e consumo de ração.....93
5.3.2 Concentração plasmática e carga excretada de Na^+ e K^+.....94
5.3.3 Concentração urinária e carga excretada de glicose e albumina.....96
5.3.4 Concentração plasmática e urinária, carga excretada e *clearance* de creatinina 98
5.3.5 Concentração plasmática e urinária, carga excretada e *clearance* de ureia..100
5.3.6 Hematócrito e razão do consumo de água pelo fluxo urinário.....102
5.3.7 Osmolaridade plasmática e urinária 103
5.3.8 Histologia renal.....104
5.3.8.1 Morfologia renal.....104
5.3.8.2 Expansão mesangial 105
5.3.8.3 Fibrose glomerular e tubulointersticial.....106
5.3.9 Peso dos órgãos internos: rins e coração 108
5.3.10 Correlações de variáveis metabólicas, renais e autonômicas 110
5.3.11 Expressão gênica de componentes do SRAA nos rins 112
5.3.12 Conteúdo proteico de tirosina hidroxila (TH) e renina nos rins.....114
5.3.13 Expressão gênica de receptores de insulina (RI) e do cotransportador de Na+/Glicose (SGLT2) nos rins 116
5.3.14 Perfil inflamatório nos rins 117
5.3.15 Perfil inflamatório no coração 118
5.3.16 Perfil oxidativo nos rins.....119
5.3.17 Perfil oxidativo no coração 121
5.3.18 Perfil oxidativo no soro 123
5.4 Análises funcionais e moleculares em regiões centrais importantes para o controle cardiovascular (NTS, PVN e RVLM) 125
5.4.1 Microinjeções na região RVLM: parâmetros cardiovasculares.....125

5.4.2 Microinjeções na região RVLM: parâmetros autonômicos 127
5.4.3 Expressão gênica de componentes do SRAA no NTS..... 129
5.4.4 Expressão proteica de componentes do SRAA no PVN 131
5.4.5 Expressão proteica de componentes do SRAA na região RVLM..... 133
5.4.6 Expressão gênica de interleucinas na região RVLM 135
5.4.7 Expressão gênica de receptores de insulina (RI) no NTS, PVN e RVLM..... 136
5.5 Infusão endovenosa de insulina 137
5.5.1 Parâmetros cardiovasculares 137
5.5.2 Parâmetros autonômicos e glicêmicos 139
6. DISCUSSÃO 141
6.1 Balanço autonômico e cardiovascular 142
6.2 Balanço metabólico e função renal 147
6.3 Efeitos da insulina sobre o SNC 158
6.4 Efeitos da insulina periférica sobre a ANSr 160
7. CONCLUSÃO 163
REFERÊNCIAS..... 164
ANEXO 186
APÊNDICE..... 187

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e fisiopatologia do diabetes *mellitus* (DM)

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença de etiologia múltipla caracterizada pela presença de hiperglicemia decorrente da falta de insulina e/ou de sua incapacidade em exercer adequadamente seus efeitos (De Ferranti *et al.*, 2014). A falta de insulina impede a captação eficiente e utilização da glicose pelas células. Como resultado, a glicemia aumenta, levando a uma condição denominada hiperglicemia. Apesar da condição de hiperglicemia, a utilização celular da glicose reduz-se ainda mais, aumentando a mobilização de lipídeos e de proteínas como fontes de energia, o que pode ocasionar um quadro clínico deletério chamado de cetoacidose diabética, que dentre outras consequências sistêmicas, está associada às disfunções neurológicas, cardiovasculares e renais (Bell *et al.*, 1989). Portanto, alterações nas ações fisiológicas da insulina podem afetar o metabolismo de vários nutrientes, condição encontrada no DM (Defronzo *et al.*, 2015).

A hiperglicemia presente no DM provoca sinais e sintomas, tais como poliuria, polidipsia, polifagia e perda de peso (Jorgensen *et al.*, 2010). O DM constitui atualmente uma das maiores emergências mundiais de saúde, com destaque nos países subdesenvolvidos que apresentam os maiores índices de incidência e prevalência da doença. Portanto, é de extrema importância o entendimento da instalação e desenvolvimento desta patologia. Existem três tipos principais de DM: DM tipo 1, DM tipo 2 e diabetes gestacional. As principais características dos tipos de diabetes podem ser melhor evidenciadas na Tabela 1 (Mcewen *et al.*, 2011; Ogurtsova *et al.*, 2017).

Tabela 1. Principais tipos de DM.

DM tipo 1	DM tipo 2	Diabetes gestacional
• Fatores de risco: história familiar de diabetes, genética, infecções e outras influências ambientais. • Aparece de forma repentina e até o momento é incurável. • Sem a administração de insulina exógena, uma pessoa com diabetes tipo 1 não sobrevive.	• Fatores de risco: excesso de peso corporal, sedentarismo, má nutrição, genética, história familiar de diabetes, história prévia de diabetes gestacional e idade avançada. • Doença silente que dificulta seu diagnóstico precoce. • Pode ser controlada por meio de mudanças na dieta e prática de atividade física. Porém, em alguns casos, é necessária medicação.	• Aparece durante a gravidez. • Pode levar a uma série de riscos para a saúde da gestante e do filho. • Associado a um aumento do risco de ambos (gestante e filho) desenvolverem diabetes tipo 2 no futuro.

Fonte: Modelo adaptado da Federação Internacional de Diabetes (IDF), 2018.

As consequências humanas, sociais e econômicas relacionadas ao DM são devastadoras. Em adição aos 425 milhões de adultos que atualmente têm diabetes no mundo, há também cerca de 352 milhões com intolerância à glicose, o que os coloca em alto risco de desenvolver a doença no futuro. Em 2017, o diabetes causou aproximadamente 4 milhões de mortes em indivíduos com idade entre 20 e 79 anos e custou cerca de $ 727 bilhões de dólares em despesas com saúde no mundo. Se este aumento não for interrompido, um estudo epidemiológico sugere que, em 2045, existirão cerca de 629 milhões de indivíduos com a doença (Cho *et al.*, 2018).

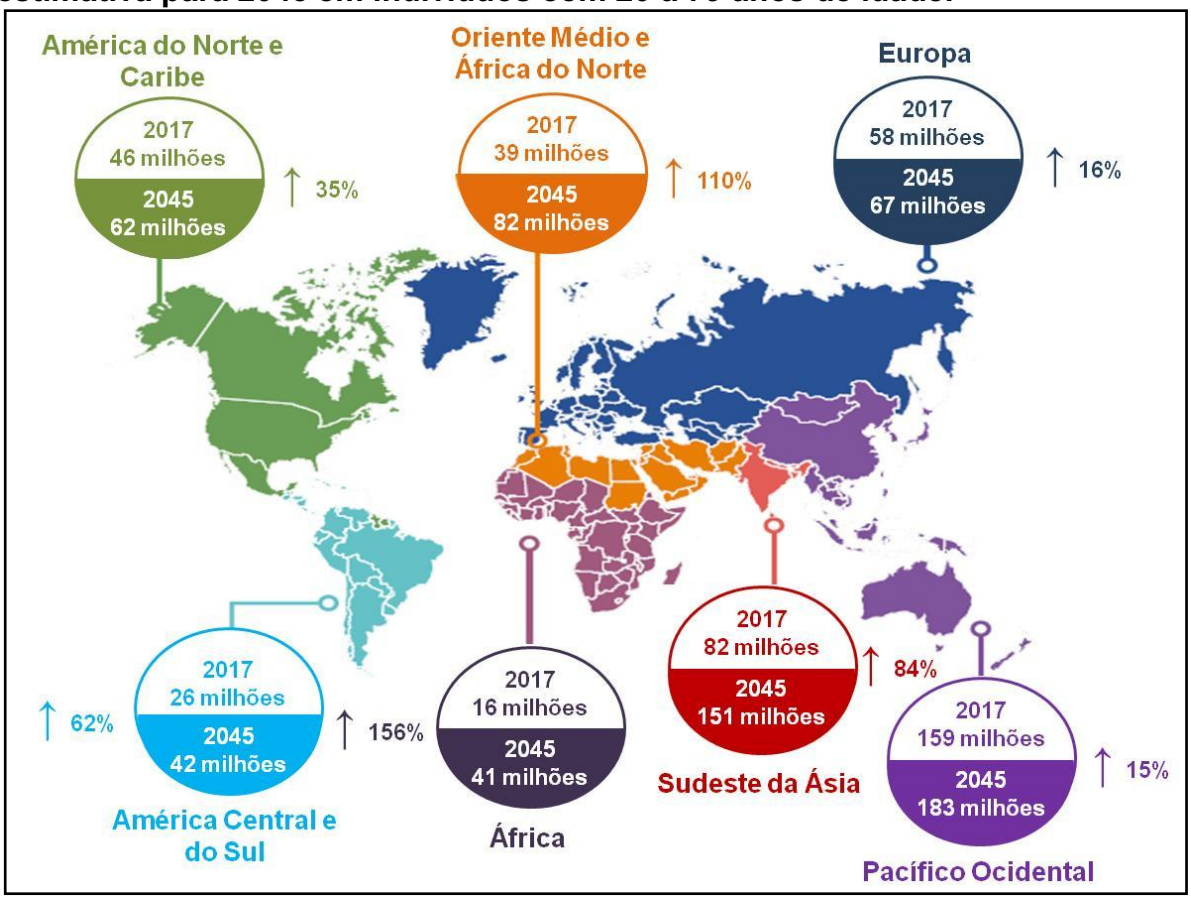
Infelizmente, muitos países ainda desconhecem o impacto econômico e social do DM. A falta de conhecimento é a maior barreira para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção da doença que podem ajudar a deter seu alarmante crescimento. Contudo, apesar de uma melhor conscientização da população e dos avanços na prevenção e tratamento do DM, o aumento no número

de novos casos dessa doença em várias regiões do mundo é preocupante (Cho *et al.*, 2018).

Desta forma, em relação ao contexto mundial sobre a crescente incidência e prevalência do DM, observa-se que a região do Pacífico Ocidental, fortemente povoada, possui cerca de 159 milhões de adultos com diabetes; substancialmente mais do que qualquer outra região. No entanto, a América do Norte e a região do Caribe apresentam a maior prevalência *per capita* da doença, ou seja, um em cada oito adultos tem DM. A Europa tem o maior número de crianças com diabetes tipo 1 do mundo; aproximadamente 140 mil, o que condiz com um aumento de cerca de 21,6 mil novos casos por ano. Na região do Sudeste Asiático, 24,2% de todos os partos são afetados pela hiperglicemia durante a gravidez. No Oriente Médio e na região da África do Norte, dois a cada cinco adultos com diabetes não são diagnosticados (Ogurtsova *et al.*, 2017).

Na América Central e do Sul, o número de pessoas com diabetes pode aumentar em 65% até 2040. É particularmente difícil estimar o número total de pessoas com diabetes na região da África, pois mais de três quartos dos países carecem de um sistema que possibilite o registro adequado das informações sobre saúde. Ainda assim, em 2015, estimou-se existir entre 9,5 e 29,3 milhões de pessoas com DM nesta região. Destas, três quartos são estimativas e não casos diagnosticados, o que corresponde ao mais alto valor comparado a qualquer outra região do mundo (Ogurtsova *et al.*, 2017). O panorama mundial de casos de DM por região em 2017 e sua estimativa para 2045 pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Panorama mundial de casos de DM por região em 2017 e sua estimativa para 2045 em indivíduos com 20 a 79 anos de idade.



Fonte: Modelo adaptado de (Cho *et al.*, 2018).

No Brasil, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2017 existisse cerca de 18 milhões de adultos com diabetes, ou seja, cerca de 8% da população do país (OMS, 2017). É sabido que o impacto do DM como problema de saúde pública decorre não apenas do seu perfil clínico diretamente relacionado à hiperglicemia, mas também das complicações crônicas associadas à instalação da neuropatia periférica, que ocorre em 30-50% dos indivíduos diabéticos (Callaghan *et al.*, 2012). A neuropatia periférica possui estreita relação com anormalidades estruturais e funcionais do sistema nervoso somático, especialmente dos nervos sensitivos, e do sistema nervoso autônomo (SNA), sendo negativamente

influenciada pelo tempo de evolução do diabetes e pela presença da hiperglicemia não controlada (Tominaga *et al.*, 1999; Argoff *et al.*, 2006; Association, 2014).

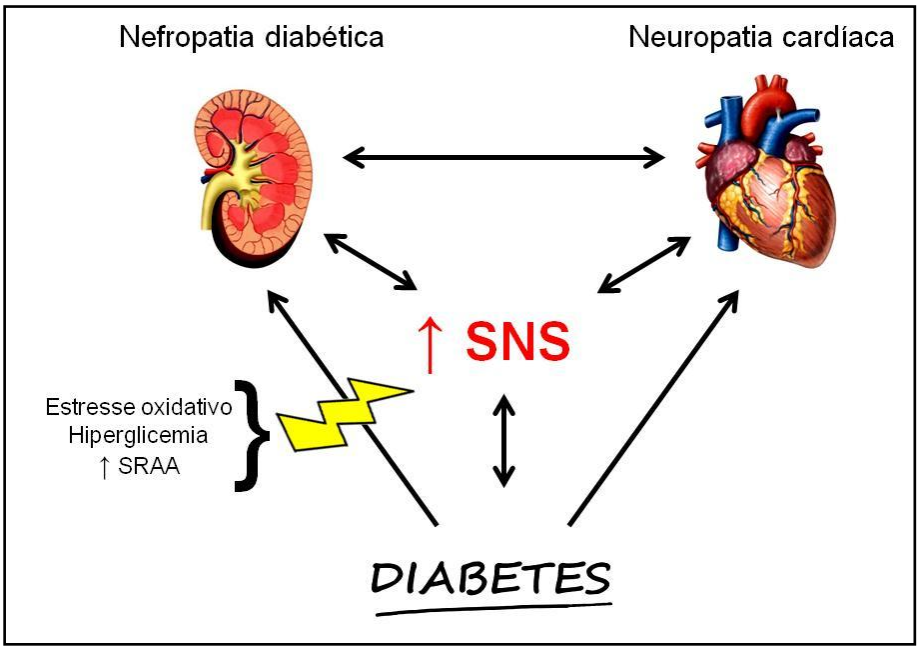
Há pouco tempo, a fisiopatologia da disfunção autonômica cardiovascular em modelos de DM tem sido foco de investigação (Lefrandt *et al.*, 2010; Kuehl e Stevens, 2012; Pálsson e Patel, 2014). De um modo geral, a disfunção autonômica é uma condição que afeta de forma negativa a evolução do diabetes, podendo ocasionar uma doença neurodegenerativa (Goldstein *et al.*, 2002). Desta forma, a neuropatia autonômica (NA) é considerada uma importante complicação do DM. Entretanto, apesar de sua estreita relação com o aumento do risco de mortalidade por causas cardiovasculares (Ewing *et al.*, 1980; Ewing, 1996; Kuehl e Stevens, 2012) e associação com múltiplos sinais, sintomas e alterações funcionais (Vinik *et al.*, 2003), ainda são escassos estudos conclusivos sobre sua fisiopatologia.

O modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) tem sido utilizado para um melhor entendimento da evolução do DM, sobretudo em estudos que relacionam o DM às desordens autonômicas cardiovasculares (Salman *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2017). A STZ promove toxidade e morte seletiva das células β-pancreáticas resultando em uma síndrome com características semelhantes àquela encontrada em humanos com diabetes tipo I, isto é, apresentam sinais clínicos característicos, tais como: hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosuria, poliuria, polifagia, polidipsia e perda de peso (Maeda *et al.*, 1995). Dentre as complicações sistêmicas geradas pelo diabetes, vale destacar também a nefropatia diabética que é a principal causa de doença renal crônica nos países ocidentais e está associada a um elevado índice de mortalidade (Cooper, 1998; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2014).

Os estágios iniciais da nefropatia diabética são caracterizados patologicamente por hipertrofia das células glomerulares e tubulares com espessamento da membrana basal glomerular e, clinicamente pelo desenvolvimento de hiperfiltração e microalbuminuria. A nefropatia diabética progride, geralmente ao longo de vários anos, para a glomerulosclerose com acúmulo de proteínas na matriz extracelular das células mesangiais glomerulares (Selby *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 2014). Assim, à medida que a fibrose tubulointersticial progride ocasiona declínio da taxa de filtração glomerular levando à doença renal terminal (Koulis *et al.*, 2015). Em modelos de diabetes por STZ, os animais apresentam níveis glicêmicos acima de 250 mg/dL e desenvolvem sinais típicos da doença, associados ao aumento da atividade nervosa simpática renal (ANSr) (Patel *et al.*, 2011).

O nervo simpático renal desempenha um importante papel na patogênese da nefropatia diabética implicando aumento da sensibilidade intrarenal à noradrenalina (Salman *et al.*, 2011). Sabe-se que o aumento da ANSr é capaz de produzir vasoconstrição renal, aumento da reabsorção tubular de Na^+ e secreção de renina com consequente formação de angiotensina II (Ang II) (Nordlander *et al.*, 1985). Logo, à medida que ocorre uma maior formação de Ang II haverá hiperativação simpática produzindo, assim, um ciclo vicioso perverso no que diz respeito à evolução da doença renal (Giacchetti *et al.*, 2005). A Figura 2 demonstra de forma esquemática a interação do DM com a instalação do quadro de nefropatia diabética e neuropatia cardíaca.

Figura 2. Representação esquemática do ciclo vicioso perverso decorrente da interação do DM e a instalação do quadro de nefropatia diabética e neuropatia cardíaca.



O DM promove várias alterações orgânicas, dentre elas: hiperglicemia, estresse oxidativo e aumento da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que em associação ocasionam hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS). Estas alterações interagem entre si e promovem um ciclo vicioso perverso com a instalação e a manutenção das condições de nefropatia diabética e neuropatia cardíaca. Fonte: Modelo modificado de (Iyngkaran *et al.*, 2013).

Atualmente, existem duas importantes correntes científicas a respeito dos mecanismos geradores e mantenedores das alterações cardiovasculares e renais associadas à doença cardiovascular. Uma estabelece que o rim seja o principal órgão para tais alterações (Navar, 2010), enquanto a outra sugere que o sistema nervoso central (SNC) tem um papel dominante (Esler *et al.*, 2010). Assim, tendo o entendimento de que os rins se comunicam com o SNC e vice-versa, com possibilidades de interferência recíproca em seus mecanismos de controle, um dos objetivos da presente tese foi investigar as possíveis alterações induzidas pelo DM nestes dois sistemas.

1.2 Papel do sistema nervoso autônomo (SNA)

Estudos usando modelos de DM têm investigado os mecanismos envolvidos na disfunção do controle neural da função cardiovascular (Page e Watkins, 1978; Fazan *et al.*, 1997; Boychuk *et al.*, 2015). Apesar do fato de que alterações na atividade vasomotora simpática terem sido relatadas em indivíduos diabéticos, a importância destes mecanismos na geração e manutenção da doença ainda é um assunto pouco esclarecido. Neste sentido, um estudo clínico demonstrou que indivíduos diabéticos jovens apresentam uma menor atividade nervosa simpática basal para os vasos da musculatura esquelética, entretanto, em condições de hiperglicemia há um considerável aumento da atividade vasomotora simpática para esse território (Hoffman *et al.*, 1994).

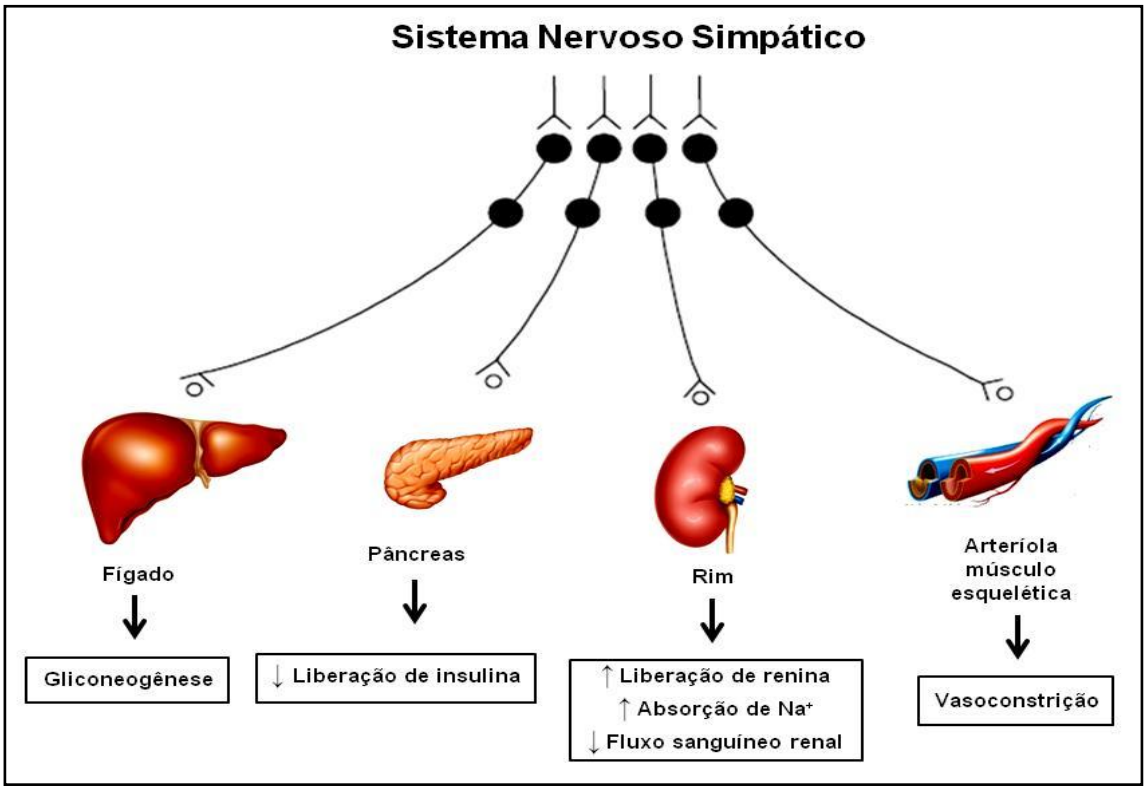
Em ratos diabéticos induzidos por STZ demonstrou-se por outro lado que o estado hiperglicêmico promove um aumento da atividade nervosa simpática para o território renal (ANSr) (Patel *et al.*, 2011). Neste estudo foi demonstrado que a administração de Ang II no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) promoveu maior aumento da ANSr, pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) nos ratos diabéticos comparados aos respectivos controles. Também foi evidenciado que o bloqueio de receptores de Ang II do tipo 1 (AT1) no PVN produziu redução desses parâmetros apenas em ratos diabéticos, sugerindo, portanto, uma importante interação entre Ang II e o sistema nervoso simpático (SNS) com repercussão para o território renal no diabetes. Os mecanismos subjacentes pelos quais há aumento da ANSr no diabetes ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, aparentemente a Ang II atuando em regiões específicas do encéfalo importantes

para o controle cardiovascular desempenha um papel fundamental (Patel *et al.*, 2011; Rafiq *et al.*, 2015).

Curiosamente, animais com diabetes tipo I não se tornam hipertensos, apesar do aumento da ANSr, porém, vale destacar que a PA é consequência de vários fatores e, portanto, não se pode descartar a possibilidade de que haja ativação simpática preferencial ou seletiva para o território renal no DM. Neste sentido, na presente tese foi registrada a atividade nervosa simpática (ANS) para os territórios esplâncnico, renal e lombar com o objetivo de avaliar se há ajuste preferencial ou seletivo para tais territórios na condição de diabetes. Do mesmo modo, é oportuno esclarecer que a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), importante região neural de controle cardiovascular, é capaz de promover padrões de atividade vasomotora simpática organizados de forma topográfica com ajustes preferenciais ou seletivos para territórios distintos (Mcallen *et al.*, 1997; Kumagai *et al.*, 2012). Portanto, o presente estudo também buscou investigar o controle topográfico da região RVLM sobre o controle da ANS para o território renal e esplâncnico na condição de DM.

Assim, de acordo com a divisão anatômica da inervação simpática avaliada neste estudo, é sabido que: 1) o nervo esplâncnico contibui para a inervação de órgãos viscerais incluindo o fígado e o pâncreas; 2) o nervo renal contribui para a inervação dos rins; e 3) o nervo lombar contribui para a inervação da vasculatura dos músculos dos membros posteriores dos animais (Stocker e Muntzel, 2013; Schlaich *et al.*, 2015). Baseando-se nestas informações, a Figura 3 representa de forma esquemática uma visão geral do efeito da ativação do SNS sobre o controle fisiológico de diferentes órgãos.

Figura 3. Efeitos da ativação do SNS sobre o controle fisiológico de diferentes órgãos.



A ativação do SNS promove: 1) gliconeogênese hepática; 2) diminui a liberação de insulina pelas células β-pancreáticas; 3) aumenta a reabsorção de Na^+ e liberação de renina, como também reduz o fluxo sanguíneo renal; e 4) promove vasoconstrição das arteríolas que nutrem os músculos esqueléticos. Fonte: Modificado de (Schlaich *et al.*, 2015).

1.3 Disfunção na sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial

Além da hiperatividade simpática, é importante destacar que indivíduos e animais diabéticos apresentam diminuição da sensibilidade dos barorreceptores arteriais (Patel e Zhang, 1995; Ewing, 1996; Schaan *et al.*, 2004; Skrapari *et al.*, 2006). Os barorreceptores arteriais exercem um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da PA. Logo, o controle da variabilidade da PA pelo barorreflexo é a chave para o equilíbrio fisiológico do sistema cardiovascular. Esta evidência pode ser comprovada por meio de estudo clínico que observou que o prejuízo da função barorreflexa é um fator de risco independente para morte súbita

pós-infarto do miocárdio (La Rovere *et al.*, 1998). Além disto, indivíduos diabéticos que apresentam reflexos cardiovasculares intactos têm menor risco de mortalidade comparados àqueles que apresentam algum tipo de prejuízo da função reflexa autonômica (Ewing, 1996).

Estudos têm mostrado que a atividade dos barorreceptores arteriais pode controlar de forma efetiva as atividades simpática e parassimpática para o coração, indicando que alterações nas vias aferentes e/ou eferentes do reflexo barorreceptor arterial podem contribuir para a disfunção autonômica do diabetes (De Angelis *et al.*, 2000; De Angelis *et al.*, 2002; Dall'ago *et al.*, 2007). Desta forma, é provável que a redução na habilidade para regular adequadamente a FC durante mudanças na PA esteja relacionada a alterações na regulação do tônus simpático e parassimpático no DM, embora alterações na função de receptores periféricos e/ou ainda na integração neural, sobretudo no bulbo, do reflexo comandado pelos barorreceptores não possam ser excluídas (De Angelis *et al.*, 2002).

Como já mencionado, a região RVLM é considerada uma importante região de controle do reflexo barorreceptor arterial e, portanto, possíveis alterações nesta região associadas ao DM podem contribuir para disfunção barorreflexa. É importante ressaltar que clinicamente a isquemia miocárdica silente e arritmias cardíacas são complicações frequentes e graves do DM que colocam o paciente em risco de morte. E, a neuropatia autonômica desempenha um importante papel na patogênese dessas complicações (Ewing, 1996). Tanto as fibras nervosas parassimpáticas quanto as fibras simpáticas cardíacas podem ser afetadas com a progressão do DM, levando a uma diminuição da variabilidade da FC e prejuízo da função barorreflexa (Mcdowell *et al.*, 1994; Ziegler e Gries, 1997; Chon *et al.*, 2014). Assim, este

desbalanço no controle autonômico associado a outras comorbidades que ocorrem no sistema cardiovascular decorrentes do DM podem contribuir para arritmias e o iminente risco de morte.

Curiosamente, pacientes diabéticos apresentam uma menor percepção de dor cardíaca (Airaksinen e Koistinen, 1992). Como resultado, a isquemia ou o infarto do miocárdio podem estar associados a sintomas leves e silentes que não são facilmente reconhecidos pelo paciente. Estas observações sugerem um comprometimento dos aferentes cardíacos (sensoriais), bem como da função autônoma eferente, que podem agravar o risco de morte cardíaca nestes indivíduos. As fibras aferentes cardíacas são responsáveis por iniciar os ajustes reflexos cardiovasculares protetores, além disso, a percepção de dor durante a isquemia miocárdica, contudo, ainda são necessárias mais evidências científicas sobre o impacto do DM sobre a função nervosa sensorial do coração (Longhurst, 1984; Pálsson e Patel, 2014). Vale destacar que outros aferentes, provenientes, por exemplo, do território renal, podem promover hiperativação do SRAA e contribuir também para a disfunção autonômica no DM (Phillips e Campos, 2017).

1.4 Papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

A ativação do SRAA também tem sido apontada como um importante mecanismo envolvido no desenvolvimento e na manutenção do DM. Já foi demonstrado que o SRAA circulante está suprimido no diabetes, contudo, intrarrenalmente pode estar hiperativado (Giacchetti *et al.*, 2005). O SRAA é um sistema complexo e constituído por diversas classes de angiotensinas com ações diferenciadas e ainda não totalmente conhecidas. Classicamente, o SRAA promove

vasoconstrição, retenção de Na^+ e água, polidipsia, aumento da ANS, além de hipertrofia vascular e cardíaca (Salman *et al.*, 2011), principalmente via receptor AT1 de Ang II (Bonnet *et al.*, 2002). Ademais, ainda se questiona qual a real contribuição das angiotensinas, atuando central ou perifericamente, na evolução do diabetes, uma vez que, além das clássicas ações endócrinas deste sistema, sabe-se que mecanismos autócrinos e parácrinos do SRAA intrarrenal e no SNC também são importantes.

Além disto, estudos têm demonstrado que o DM promove hiperatividade simpática renal produzindo como consequência ativação do SRAA, dada a evidência de que a Ang II exerce efeitos estimulatórios centrais e periféricos sobre o SNS, facilitando a liberação de noradrenalina nas terminações nervosas e amplificando a resposta ao estímulo simpático (Giacchetti *et al.*, 2005; Salman *et al.*, 2011). Uma hipótese interessante sugere que o aumento sistêmico da Ang II, mesmo por curtos períodos de tempo, é capaz de provocar alterações em longo prazo no SNC incluindo aumento na expressão de receptores de Ang II em regiões relacionadas ao controle cardiovascular (Xue *et al.*, 2012). De fato, em situações fisiopatológicas como na hipertensão arterial e na insuficiência cardíaca, o aumento da atividade do SNS é em grande parte determinada pelas ações centrais da Ang II (Esler, 2010).

Seguindo o mesmo racional, tem sido demonstrado que o DM promove hiperativação do SRAA, resultando em aumento do estresse oxidativo, lesão tecidual, apoptose endotelial e disfunção microvascular (Muris *et al.*, 2013), além de aumentar a concentração de Ang II em cardiomiócitos e fibroblastos sugerindo que o SRAA tecidual desempenha um papel essencial na disfunção cardíaca induzida pelo diabetes (Kumar *et al.*, 2008). No mesmo sentido, a expressão gênica e proteica de

renina nos rins de ratos com diabetes está aumentada em células justaglomerulares e tubulares proximais (Wilkinson-Berka *et al.*, 2002). Esta evidência corrobora outro achado que demonstrou a existência de um elemento responsivo à glicose na região promotora do gene do angiotensinogênio, em que altas concentrações extracelulares de glicose poderiam estimular a síntese de angiotensiogênio renal de forma dose-dependente (Choi *et al.*, 1997).

Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que a presença de altas concentrações de glicose em células mesangiais de ratos estimula a formação da Ang II e do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) (Singh *et al.*, 1999; Giacchetti *et al.*, 2005). Desta maneira, ativações simultâneas do SNS e do SRAA têm sido apontadas como mecanismos desencadeadores e mantenedores das alterações cardiovasculares e renais no DM. Ademais, considerando que o estado hiperglicêmico ocasionado pelo DM propicia um aumento de Ang II tecidual, que é um potente gerador de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Giacchetti *et al.*, 2005), não se pode excluir a possibilidade de que o desbalanço oxidativo também possa ser um mecanismo agravante na fisiopatologia do diabetes.

1.5 Papel do estresse oxidativo

A neuropatia autonômica periférica característica do DM promove redução da função das terminações quimiossensíveis cardíacas (Airaksinen e Koistinen, 1992; Ewing, 1996). Um dos fatores que contribui sobremaneira para a cardiomiopatia e a neuropatia periférica no DM é o aumento do estresse oxidativo (Baynes, 1991; Kelany *et al.*, 2016), pois terminações nervosas aferentes cardíacas são reconhecidamente sensíveis às EROs (Huang *et al.*, 1995; Ustinova e Schultz,

1996). Assim, é possível que a elevada presença das EROs no tecido cardíaco durante a progressão do diabetes possa ocasionar alterações na função aferente cardíaca.

Como discutido anteriormente, estudos indicam que tanto a atividade do nervo vagal quanto do nervo simpático cardíaco estão marcadamente reduzidas no diabetes (Schaan *et al.*, 2004; Dall'ago *et al.*, 2007), sendo o aumento do estresse oxidativo um dos principais mecanismos envolvido no prejuízo das propriedades reflexas das terminações nervosas sensoriais cardíacas na condição de DM (Ieda *et* al., 2006). Já foi bem documentado que o diabetes está associado com aumento do estresse oxidativo, sobretudo pelo aumento do acúmulo de peróxidos lipídicos no plasma de ratos (Kakkar *et al.*, 1995) e de humanos (Ozdemirler *et al.*, 1995). Além disso, é importante ressaltar que o estresse oxidativo é apontado como um dos principais contribuintes para doença cardiovascular em diabéticos (Giugliano *et al.*, 1995). Assim, interessantemente, o tratamento de animais diabéticos com antioxidantes reduziu o estresse oxidativo e melhorou o relaxamento do endotélio dos vasos coronarianos (Rösen *et al.*, 1995).

É importante destacar que o funcionamento do barorreflexo e do quimiorreflexo cardíaco não estão prejudicados em ratos diabéticos, induzidos pela STZ, tratados com insulina. Portanto, este achado correlaciona a disfunção aferente cardíaca à hiperglicemia e à depleção de insulina, descartando os efeitos citotóxicos da STZ. No mesmo sentido, a hiperglicemia promovida pelo diabetes ocasiona a geração de EROs por meio de vários mecanismos, incluindo a auto-oxidação de glicose, glicação proteica, aumento do fluxo de substrato por meio da via do poliol e depressão dos sistemas antioxidantes naturais (Baynes, 1991; Liu *et al.*, 2017).

Assim, provavelmente, um ou mais destes mecanismos estão envolvidos no comprometimento da função aferente cardíaca em ratos diabéticos. Desta forma, acreditamos que o desbalanço oxidativo também esteja relacionado com a simpatoexcitação e consequentes danos renais presentes no DM, desta forma, na presente tese o balanço oxidativo também foi avaliado. Neste contexto, já foi demonstrado, por exemplo, que a denervação renal é capaz de reduzir a produção de EROs e de melhorar o balanço oxidativo em modelos de infarto agudo do miocárdio (Feng *et al.*, 2017), de hipertensão com hidronefrose (Peleli *et al.*, 2016), de miocardiopatia (Wang *et al.*, 2016) e de doença cardiovascular e renal (Peleli *et al.*, 2017), contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da BRD sobre o balanço oxidativo em animais com DM.

1.6 Papel da denervação renal bilateral (BRD)

Nos últimos anos, pudemos observar um grande interesse de pesquisas clínicas e experimentais voltadas para a abordagem da denervação renal bilateral (BRD), por radiofrequência, como uma nova alternativa de tratamento para pacientes hipertensos refratários (Schmieder *et al.*, 2012; Kario *et al.*, 2015; De Jager *et al.*, 2017). Em algumas pesquisas, a BRD, além de contribuir no controle da PA, surpreendentemente propiciou redução da glicemia de jejum e aumento da sensibilidade à insulina (Mahfoud *et al.*, 2011; Witkowski *et al.*, 2011; Schlaich, 2017). A melhora no controle glicêmico provavelmente foi resultante da atenuação da hiperatividade simpática renal e foi acompanhada de redução da resistência à insulina. Nesse sentido, estudos em animais diabéticos demonstraram que a BRD promove diminuição da concentração de Na^+ e creatinina plasmática, redução da

taxa de hiperfiltração glomerular, diminuição da ativação do SRAA e melhora dos parâmetros glicêmicos devido especialmente a redução da resistência insulínica (Luippold *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2014).

É sabido que a hiperativação do SNS contribui para a resistência insulínica e síndrome metabólica estando associada com obesidade e maior risco de desenvolvimento de diabetes (Katayama *et al.*, 2013). Entretanto, os mecanismos subjacentes aos efeitos da BRD nas alterações cardiovasculares e renais associadas ao DM ainda são pouco esclarecidos. Deste modo, as repercussões da BRD foram avaliadas sobre marcadores de função e lesão renal bem como sua contribuição nas disfunções autonômicas, sobretudo na região RVLM de animais diabéticos foram objetivos da presente tese.

1.7 Controle fisiológico da glicemia

A glicose é um carboidrato essencial para os mamíferos, pois é responsável pelo fornecimento de energia a todos os tipos celulares via adenosina trifosfato (ATP), tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, detendo um papel central no metabolismo e homeostasia celular (Wright *et al.*, 2007). A glicose é uma molécula orgânica polar com alto peso molecular (~180 g/mol), insolúvel à membrana plasmática, portanto, dependente de proteínas carreadoras para realizar seu transporte através das células. Estas proteínas, chamadas de transportadores de glicose, podem ser divididas em duas grandes famílias: os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e os cotransportadores de Na+/glicose (SGLTs) (Thorens e Mueckler, 2010).

Os GLUTs, 14 subtipos já foram identificados em humanos, têm a capacidade de realizar um fluxo bidirecional de glicose, sendo o gradiente de concentração de glicose o fator que determina a direção, intracelular ou extracelular, do seu transporte. Desta forma, admitindo que a glicose é o substrato energético mais consumido pelas células, as forças de gradiente garantem o influxo deste substrato, contudo, quando a concentração intracelular de glicose é maior que a extracelular, condição comum em territórios que fazem transporte de glicose em células polarizadas, as forças de gradiente promovem o efluxo da glicose também através dos GLUTs (Mueckler e Thorens, 2013). Em relação aos SGLTs, 6 subtipos já foram identificados em humanos, estes fazem parte de uma família de proteínas transportadoras de glicose acopladas ao Na^+. A direção do transporte de glicose pelos SGLTs através da membrana plasmática ocorre devido à força motriz produzida pelo gradiente de Na+, que é mantida pela bomba Na^+/K^+, isto é, atua deslocando o Na^+ e a glicose sempre no sentido do meio extracelular para o meio intracelular (Wright *et al.*, 2011; Wright, 2013).

Praticamente todas as células do organismo são capazes de atender às suas demandas energéticas a partir da glicose, sobretudo as hemácias e as células do SNC, que são tipos celulares extremamente dependentes desse carboidrato. As hemácias não apresentam mitocôndrias para o seu metabolismo aeróbio, por isso necessitam de uma absorção constante de glicose. Enquanto que o SNC apresenta uma estrutura de permeabilidade altamente seletiva, barreira hematoencefálica (BHE), para sua proteção, o que impede a entrada de macromoléculas, como os lipídeos, tornando-se dependente de um contínuo fornecimento de glicose via GLUT1 e GLUT3. Desta forma, quadros de hipoglicemia podem ocasionar

convulsões, perda de consciência e dano celular irreversível. Por outro lado, a hiperglicemia promove glicotoxicidade, que pode levar a diversos distúrbios orgânicos, tais como cetoacidose diabética, síndrome e coma hiperosmolar hiperglicêmica (Joost *et al.*, 1994; Shepherd e Kahn, 1999). Neste contexto, é importante salientar que os rins apresentam importantes transportadores de glicose que contribuem diretamente para o controle glicêmico sistêmico tanto em condições fisiológicas quanto patológicas.

1.7.1 Papel dos rins no controle glicêmico

A importância dos ris na manutenção do controle glicêmico foi reconhecida desde a década de 60 (Krebs *et al.*, 1963; Owen *et al.*, 1969). Diversos estudos demonstraram que os rins têm uma importante maquinaria bioquímica, podendo simultaneamente utilizar, produzir e adicionar glicose ao sangue, sobretudo durante períodos prolongados de jejum, prevenindo a instalação de quadros severos de hipoglicemia (Adrogué, 1992; Cersosimo *et al.*, 1994). Assim, a glicose filtrada pelos glomérulos é completamente reabsorvida de forma ativa pelos túbulos renais. Porém, o excesso de glicose que ultrapassa o limiar de reabsorção tubular é excretado pela urina, glicosuria, com a finalidade de evitar que a glicemia se eleve e alcance valores de toxidade. Desta maneira, os rins impedem o desenvolvimento de uma condição de hiperglicemia acentuada, que pode ocasionar sérias complicações sistêmicas, tais como hiperosmolaridade plasmática e desidratação intracelular (Nathan *et al.*, 1993).

Estudos recentes demonstraram que a atividade do SNA, em especial a secreção de catecolaminas, é o estímulo de maior importância para a produção

renal de glicose (Stumvoll *et al.*, 1995). De forma análoga à produção hepática, a gliconeogênese renal depende basicamente de dois fatores: 1) disponibilidade de alguns substratos (lactato, glicerol, alanina e glutamina); e 2) atividade enzimática intratubular (Cersosimo *et al.*, 1994). Vale salientar que as catecolaminas têm a capacidade de aumentar a disponibilidade destes substratos a partir da degradação do glicogênio muscular por meio da glicólise anaeróbia produzindo lactato, da lipólise do tecido adiposo produzindo ácidos graxos e glicerol e pela ação proteolítica produzindo aminoácidos, como alanina e glutamina. Apesar das poucas evidências acerca da ação direta das catecolaminas sobre a atividade enzimática do túbulo proximal, o aumento da gliconeogênese renal que acompanha a hipoglicemia parece depender basicamente do estímulo proveniente da adrenalina presente na corrente sanguínea (Cersosimo *et al.*, 1998).

Alguns estudos clínicos utilizando metodologias refinadas demonstraram que os rins participam da manutenção do controle glicêmico de forma imprescindível e muito mais intensa do que se acreditava (Stumvoll *et al.*, 1995; Cersosimo *et al.*, 1999). É sabido que o fígado e os rins respondem a um sistema de controle neuro-humoral adaptado à mobilização e armazenamento de nutrientes, tendo como prioridade o controle glicêmico. A contribuição dos rins para a manutenção do equilíbrio glicêmico depende essencialmente do fluxo sanguíneo renal, que é aproximadamente 1,2 L/min, equivalendo a 20% do débito cardíaco, ou seja, os rins recebem um aporte sanguíneo que ultrapassa suas necessidades de oxigênio e de nutrientes. Ao passar pelos rins, este volume de sangue transporta cerca de 1000 mg (ou 1 g) de glicose/min, dos quais 20% (ou 200 mg) são filtrados pelos glomérulos e atingem o túbulo proximal, segmento em que são totalmente

reabsorvidos. Portanto, qualquer modificação no fluxo sanguíneo renal, no ritmo de filtração glomerular e na função tubular podem ocasionar alterações importantes no controle da glicemia (Meyer *et al.*, 1998).

A reabsorção de glicose nos rins é mediada através dos SGLTs e dos GLUTs, localizados na membrana apical e basolateral dos túbulos proximais, respectivamente (Vestri *et al.*, 2001). Aproximadamente, 90% da reabsorção renal de glicose é mediada pelo SGLT2, cotransportador de 1 molécula de Na^+ juntamente com 1 molécula de glicose, presente no segmento S1 e S2 do túbulo proximal, enquanto que o SGLT1, cotransportador de 2 molécula de Na^+ juntamente com 1 molécula de glicose e 264 moléculas de H_2O, presente no segmento S3 do túbulo proximal, é responsável por apenas 10% da reabsorção de glicose (Thomas *et al.*, 2014). A glicose reabsorvida no túbulo proximal atravessa o citoplasma das células epiteliais tubulares sem sofrer alteração bioquímica, sendo transportada para o fluido peritubular por meio do GLUT2, localizado no segmento S1 e S2, e do GLUT1, localizado no segmento S3 (Hoffman e Ziyadeh, 1995; Chin *et al.*, 1997).

Visto que a atividade da glicoquinase, enzima indispensável para a utilização intracelular de glicose, é pequena ou praticamente inexistente nas células epiteliais tubulares, o transporte transcelular de glicose e sua secreção para o espaço extracelular é favorecido. Em contrapartida, a elevada atividade da glicofosfatase nestas células, enzima que promove a desfosforilação da glicose, possibilita o transporte passivo da glicose para o espaço extracelular, facilitando o efluxo da glicose que foi reabsorvida, como também da glicose formada no túbulo proximal a partir da gliconeogênese (Bell *et al.*, 1989). Desta forma, esta carga de glicose

mistura-se ao restante da carga de glicose proveniente diretamente do fluxo sanguíneo renal (~800 mg), que não passou pelo processo de filtração glomerular.

É sabido que a atividade do SGLT2 está elevada no DM, o que contribui para o aumento da glicemia (Rahmoune *et al.*, 2005). Recentemente, inibidores do SGLT2 foram desenvolvidos e representam uma importante classe de fármacos hipoglicemiantes, sendo amplamente utilizados na terapêutica farmacológica de pacientes com DM. Os inibidores do SGLT2 (iSGLT2) bloqueiam a reabsorção de glicose renal, resultando em glicosuria e, consequente, redução da glicemia (Rosenstock *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que esses inibidores podem reduzir a pressão arterial sistêmica (PAS) de pacientes com DM tipo 2 (Baker *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2018).

Outro achado interessante mostrou que o uso em longo prazo de um iSGLT2, empagliflozina, promove proteção renal, retarda a progressão da doença renal e reduz o risco de mortalidade por doença cardiovascular em pacientes com DM (Zinman *et al.*, 2015; Wanner *et al.*, 2016). Estas descobertas chamaram a atenção da comunidade científica que vem empreendendo esforços para desvendar os mecanismos envolvidos entre a inibição do SGLT2 e a proteção cardiorrenal. É importante salientar que a identificação de novas vias fisiopatológicas pode ser útil não somente para o entendimento dos benefícios clínicos gerados pelos iSGLT2, mas também como embasamento sobre a fisiopatologia do DM e os mecanismos associados a doença cardiorrenal. Até o presente momento, os mecanismos fisiológicos que regem a regulação e a expressão do SGLT2 renal, especialmente na condição de DM, ainda não foram claramente compreendidos (Vestri *et al.*, 2001). Neste sentido, acreditamos que a BRD pode promover efeitos benéficos, locais e

sistêmicos, associados a alterações destes cotransportadores de glicose renais na condição de DM. Assim, a partir desta hipótese, avaliamos os efeitos da BRD sobre a expressão gênica do SGLT2 nos rins.

1.7.2 Papel da insulina perifericamente

O pâncreas, órgão fundamental no metabolismo da glicose, é constituído basicamente por dois tipos de tecidos: 1) ácinos, secretores de suco digestivo no duodeno, e 2) ilhotas pancreáticas, ou ilhotas de Langerhans, que são formadas a partir de 4 tipos de células: α, β, δ, e PP. As células α compõem cerca de 25% das ilhotas e secretam o hormônio glucagon em resposta à hipoglicemia. As células β compõem cerca de 60% das ilhotas e secretam insulina em resposta à hiperglicemia. As células δ compõem 10% das ilhotas e secretam o hormônio somatostatina em resposta à hipoglicemia. As células PP, encontradas em menor proporção, secretam o polipeptídeo pancreático em resposta à hipoglicemia (Robertson e Harmon, 2006).

Para influenciar a secreção das ilhotas pancreáticas, o cérebro exerce um papel fundamental contribuindo diretamente para este controle através de inervações do SNA (regulação autonômica), e indiretamente por meio de substâncias circulantes, em sua maioria hormônios, que afetam a atividade das ilhotas (Kaneto *et al.*, 1974). O pâncreas é ricamente inervado por ambos os sistemas autonômicos: simpático, via nervo esplâncnico, e parassimpático, via nervo vago. A estimulação do nervo vago aumenta a produção pancreática de insulina, enquanto que o estímulo do nervo esplâncnico reduz a produção de insulina e aumenta a produção de glucagon (Frohman *et al.*, 1967; Bloom e Edwards, 1975).

As fibras pré-ganglionares parassimpáticas que inervam o pâncreas originam-se do núcleo motor dorsal do vago (NMDV), como parte da via eferente bulbar, e formam os ramos hepático e gástrico vagais que fazem sinapse com os gânglios intrapancreáticos. Os gânglios intrapancreáticos fazem conexão com os nervos pós-ganglionares antes de inervarem as ilhotas pancreáticas (Streefland *et al.*, 1998). Atividade vagal provavelmente atua por meio de ações da acetilcolina no receptor muscarínico do tipo M_3 nas células α e β estimulando a secreção de glucagon e insulina, respectivamente (Karlsson e Ahrén, 1998).

Em relação à inervação simpática, as fibras pré-ganglionares originam-se da medula espinhal em nível de C8 a L3, dirigindo-se através dos nervos esplâncnicos menores e maiores para fazer sinapse nos gânglios paravertebrais ou gânglio celíaco. Por fim, as fibras pós-ganglionares noradrenérgicas entram no pâncreas, embora algumas fibras pré-ganglionares também possam atingir as ilhotas pancreáticas (Bloom e Edwards, 1984). Nas células α pancreáticas, os adrenoreceptores do tipo α_2 e β_2 agem para aumentar a liberação de glucagon. Em contrapartida, nas células β, os receptores do tipo α_2 estão acoplados a proteína Gi e sua sinalização atua reduzindo a secreção de insulina estimulada pela glicose, sendo este o principal efeito da ativação simpática nas células β (Skoglund *et al.,* 1988). No entanto, vale destacar que as células β pancreáticas também contêm adrenoceptores do tipo β_2, que podem estimular a liberação de insulina (Ahrén e Lundquist, 1981).

O mecanismo de ação da insulina inicia-se por sua ligação ao seu receptor de membrana, uma proteína heterotetramérica constituída por duas subunidades α, extracelulares, onde há um sítio de ligação para a insulina, e duas subunidades β,

transmembranares, responsáveis pela transmissão do sinal por meio da atividade da tirosina quinase. Desta forma, a insulina irá promover a autofosforilação do seu receptor e posterior ativação da enzima tirosina quinase, propiciando o metabolismo intracelular e os efeitos desejáveis sobre os carboidratos, lipídeos e proteínas. Basicamente, estas ações resultarão no aumento da captação de glicose pelas células (Kasuga *et al.*, 1982).

No estado de jejum, o controle glicêmico depende do equilíbrio entre a produção hepática de glicose e a sua utilização através de órgãos dependentes (por exemplo, fígado, músculos e tecido adiposo) e não dependentes (por exemplo, cérebro e rins) de insulina. Em quadros de hiperglicemia, a insulina promove o armazenamento da glicose sob a forma de glicogênio, especialmente no fígado e nos músculos. Ademais, o excesso de glicose, que não pôde ser armazenado na forma de glicogênio, é convertido em gordura e armazenado no tecido adiposo, sob ação da insulina (Moore *et al.*, 2012).

Além dos efeitos primários que a insulina causa no controle glicêmico, ela também promove uma série de outros eventos celulares, tais como: 1) estimula a vasodilatação e recrutamento capilar nas células endoteliais; 2) controla o metabolismo basal dos cardiomiócitos; 3) promove ação antilipolítica sobre os adipócitos; 4) regula a invasão de macrófagos do tecido adiposo branco por meio de mecanismos anti-inflamatórios e imunológicos; 5) estimula a captação de glicose pelo músculo esquelético; 6) suprimi a gliconeogênese e glicogenólise e intensifica a síntese de glicogênio; e 7) regula a sua própria secreção bem como age na manutenção da quantidade de células β-pancreáticas (Rask-Madsen e Kahn, 2012).

A partir deste contexto, mais recentemente, as ações da insulina no SNC têm apresentado grande interesse e destaque.

1.7.3 Papel da insulina no sistema nervoso central (SNC)

Recentemente, efeitos atípicos da insulina estão sendo discutidos, sobretudo suas ações sobre o SNC, tais como aprendizado, memória, regulação do apetite, função reprodutiva, controle da temperatura corporal, produção hepática de glicose, bem como a regulação do metabolismo periférico e controle cardiovascular. A sinalização insulínica central também modula a atividade de canais de certos neurotransmissores, a síntese de colesterol cerebral e a função mitocondrial (Kleinridders *et al.*, 2014). Desta forma, a interrupção da ação da insulina no cérebro pode levar ao comprometimento da função neuronal e da sinaptogênese. Além desses achados, já foi demonstrado que a insulina exerce uma importante ação no hipotálamo suprimindo a liberação de glicose pelo fígado (Ribeiro *et al.*, 2015).

Portanto, a função da insulina no controle da glicemia ocorre por meio de uma ação coordenada do SNA que influencia diretamente os níveis circulantes de glicose (Perseghin *et al.*, 1997). Desta forma, o eixo das vias neurais é essencial para a comunicação entre o fígado e outros órgãos no controle do metabolismo corporal, assim, aferentes vagais do trato gastrointestinal (TGI) levam informações ao cérebro sobre o influxo de nutrientes enquanto que regiões sensoriais coordenam o gasto e a reserva energética do organismo. Neste sentido, os mecanismos de comunicação entre TGI e SNC representam uma maquinaria coordenada entre fatores ambientais e o metabolismo da glicose (Zhang *et al.*, 2016).

Estudos sobre a ação da insulina na modulação da atividade do SNA de ratos (Morgan *et al.*, 1993) e de humanos (Berne *et al.*, 1992) demonstraram que a hiperinsulinemia promove aumento da ANS de maneira não uniforme para territórios distintos. Por exemplo, a administração de insulina no terceiro ventrículo de roedores promove redução da ingestão de alimento e alteração da ANS, que pode ser caracterizada por aumento ou redução, dependendo do território, sem alterar, contudo, parâmetros cardiovasculares como PA e FC, ou seja, agindo de maneira específica e não global (Muntzel *et al.*, 1995). É sabido que estados de hipoglicemia causam elevação da PA (Feldman-Billard *et al.*, 2010) e a região RVLM é apontada como um ponto-chave nesta hipertensão em resposta a redução da glicemia (Verberne e Sartor, 2010).

Em contraste, a hiperglicemia nesta região promove redução da PA (Lee *et al.*, 2009). Por exemplo, após uma refeição, a PA tende a diminuir, e esta redução é atribuída a vasodilatação esplâncnica, ao passo que ocorre aumento da ANS para os vasos que suprem a musculatura esquelética (ANSm), em resposta a ingestão de nutrientes, sobretudo a glicose, e elevação nos níveis de insulina plasmática. Este mecanismo compensatório é importante para a redistribuição de sangue na região mesentérica, sem ocasionar hipotensão. Contudo, indivíduos com prejuízo neste ajuste autonômico, especialmente na condição de DM, apresentam hipotensão arterial pós-prandial (Fagius e Berne, 1994; 2000).

Como já descrito, a região RVLM, que inclui neurônios pré-simpáticos, desempenha um papel importante na regulação da PA (Guertzenstein e Silver, 1974). Os neurônios da região RVLM enviam sinais diretamente para os neurônios simpáticos pré-ganglionares (NPS) na coluna intermédio lateral (IML) regulando a

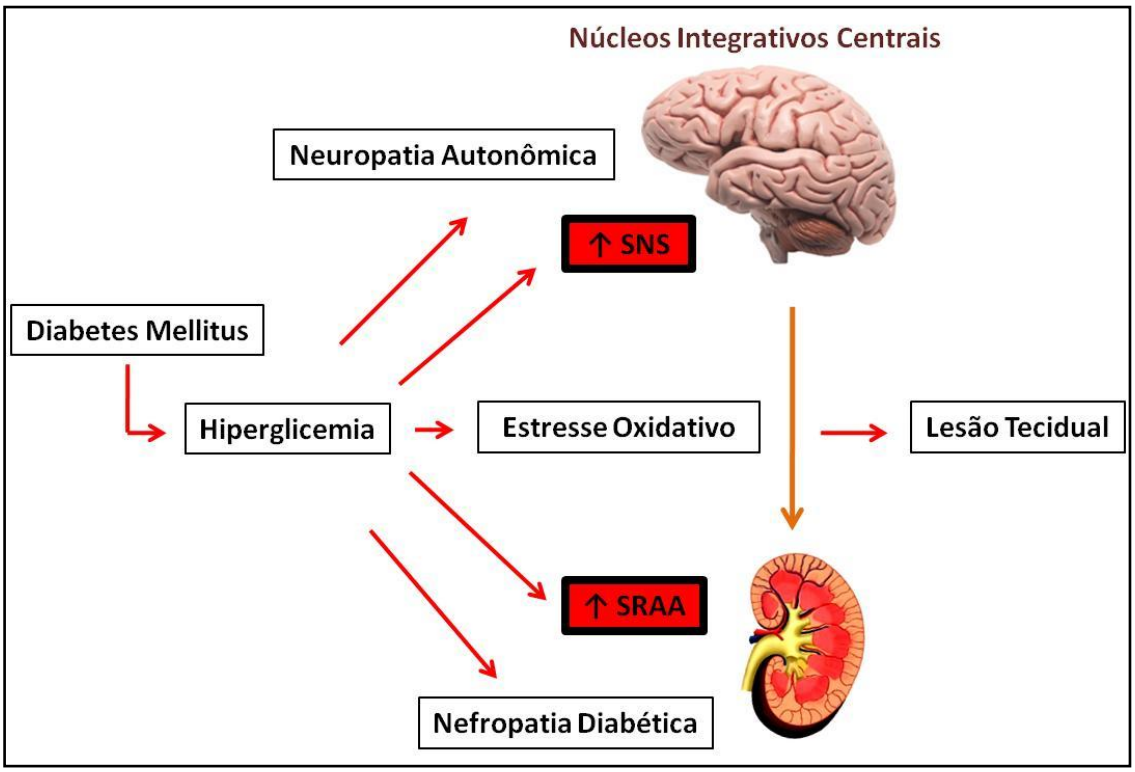
atividade dos nervos simpáticos periféricos, controlando a resistência vascular e o débito cardíaco, e consequantemente, a PA (Pilowsky e Goodchild, 2002). Um estudo recente demonstrou que a insulina pode despolarizar os neurônios da região RVLM e o antagonista do receptor de insulina, S961, promove hiperpolarização desses neurônios, porém, este efeito hiperpolarizante foi suprimido na presença de uma solução com insulina. Vale destacar que todos os neurônios da região RVLM que foram despolarizados pela insulina mostraram imunorreatividade para receptores de insulina (RI) (Oshima *et al.*, 2017). Portanto, estes resultados comprovam que a insulina pode promover ativação de neurônios da região RVLM via RI. Além disso, é importante frisar também que a insulina possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e que existe correlação entre as concentrações de insulina no plasma e no líquido céfalorraquidiano (LCR), sendo cerca de 25% da plasmática e podendo aumentar proporcionalmente após as refeições ou por meio da infusão periférica de insulina (Margolis e Altszuler, 1967; Sartorius *et al.*, 2015).

A passagem da insulina através da BHE ocorre por meio de um mecanismo de transporte saturável, facilitado por transportadores mediados por RI no endotélio, que são ativos principalmente em níveis basais de insulina plasmática (Baura *et al.*, 1993; Filippi *et al.*, 2013). Além disso, existem regiões do cérebro, como regiões do hipotálamo, que carecem de uma barreira eficaz, permitindo o acesso mais rápido à insulina. De fato, já foi comprovada uma rápida sinalização insulínica no hipotálamo após a infusão de insulina periférica (Kleinridders *et al.*, 2013). No SNC, a insulina pode ser sintetizada no hipocampo, no córtex pré-frontal e no bulbo olfatório, sendo liberada por exocitose (Hoyer, 2004; Kuwabara *et al.*, 2011), enquanto que os RI

estão localizados predominantemente no bulbo olfatório, hipotálamo, hipocampo, córtex e cerebelo, e em menor expressão no estriado, tálamo, mesencéfalo e tronco cerebral (Dou *et al.*, 2005; Fernandez e Torres-Alemán, 2012), apresentando-se em maior concentração nas células neuronais e em menor concentração nas células gliais (Gerozissis, 2004). Em relação à transdução do sinal pelo RI no SNC, ocorre de forma semelhante à sinalização periférica (Sharma *et al.*, 2008; Filippi *et al.*, 2013). Assim, sugere-se que a sinalização da insulina no SNC seja essencial para a função mitocondrial e, consequentemente, para a regulação do balanço energético cerebral (Gerozissis, 2004).

Neste sentido, interessantemente, níveis elevados de insulina no LCR, que ocorre durante um quadro de hiperinsulinemia e resistência insulínica, pode estimular neurônios da região RVLM via RI e, desta forma, promover elevação da PA ou mesmo, ativações simpáticas preferenciais, assim, esta hipótese foi testada no presente estudo. Lakhi e colaboradores demonstraram que a insulina também despolariza neurônios do órgão subfornical (OSF) (Lakhi *et al.*, 2013). Assim, sugere-se que um mecanismo semelhante possa existir em neurônios da região RVLM. Deste modo, torna-se clara a influência exercida pela insulina no SNC, sobretudo na região RVLM, na modulação do SNA e no controle da glicemia. Contudo, apesar destes achados, estudos mais aprofundados das vias centrais de ação da insulina, bem como de suas conexões com núcleos centrais envolvidos no controle do SNA e da glicemia são necessários, particularmente para o entendimento da disfunção autonômica no DM. A partir destes achados, a Figura 4 ilustra de forma esquemática a fisiopatologia do DM.

Figura 4. Representação esquemática da fisiopatologia do DM.



O estado hiperglicêmico ocasionado pelo DM não tratado promove importantes alterações funcionais, tais como: neuropatia autonômica, hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS), aumento do estresse oxidativo, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a instalação da nefropatia diabética. Em conjunto, estas alterações ocasionam lesão em diferentes tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos nervos renais sobre o balanço autonômico, cardiovascular, metabólico e renal no diabetes *mellitus* (DM) induzido por estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Primeira série experimental: Avaliar se existe ajuste seletivo ou preferencial sobre o controle tônico e reflexo da atividade vasomotora simpática para três territórios distintos (renal, lombar e esplâncnico), bem como, verificar se os nervos renais apresentam um papel importante sobre este ajuste por meio da denervação renal em animais diabéticos. Para tanto, avaliamos:

1. Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da frequência cardíaca em animais acordados;
2. Atividade nervosa simpática basal renal, lombar e esplâncnica por meio do registro direto destes nervos em animais anestesiados;
3. Controle reflexo exercido pelos barorreceptores arteriais sobre os três territórios simpáticos distintos em animais anestesiados.

Segunda série de experimentos: Investigar o papel dos nervos renais sobre o balanço metabólico, expressão gênica e proteica de componentes do SRAA, perfil inflamatório e oxidativo, morfologia e função renal de animais diabéticos submetidos à denervação renal. Para isto, avaliamos:

1. Parâmetros metabólicos como ingestão de água, fluxo urinário e consumo de ração;
2. Concentração plasmática e a carga excretada dos íons Na^+ e K^+;
3. Concentração plasmática e urinária de alguns indicadores de lesão glomerular, tais como glicose e albumina;
4. Função renal por meio de marcadores bioquímicos como *clearance* de creatinina e de ureia;
5. Balanço hídrico por meio da osmolaridade plasmática e urinária;
6. Peso de órgãos internos, tais como rins e coração;
7. Correlações metabólicas, renais e autonômicas;
8. Expressão gênica dos componentes do SRAA (enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensinogênio (AGT), receptores de pró-renina, AT_1 e AT_2) nos rins, por meio da técnica de qRT-PCR;
9. Conteúdo proteico de tirosina hidroxilase (TH) e de renina nos rins;
10. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) e do cotransportador de Na^+/glicose (SGLT2) nos rins;
11. Perfil inflamatório nos rins e coração;
12. Perfil oxidativo nos rins, coração e soro;
13. Histologicamente, a morfologia renal (quantidade de glomérulos e área glomerular) por meio da coloração hematoxilina-eosina (HE), a presença de expansão mesangial por meio da coloração do ácido periódico de Schiff (PAS) e a presença de fibrose glomerular e tubulointersticial por meio da coloração picrosírius e tricrômio de masson.

Terceira série de experimentos: Avaliar funcionalmente ajustes topográficos do SNS e cardiovasculares, por meio de microinjeções de insulina na região RVLM, bem como a expressão gênica de componentes do SRAA, receptores de insulina e o perfil inflamatório no SNC de animais diabéticos submetidos ou não à denervação renal. Assim, avaliamos:

1. Os efeitos da ação da insulina na região RVLM sobre a atividade simpática renal (ANSr) e esplâncnica (ANSe);
2. Expressão gênica dos componentes do SRAA (enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensinogênio (AGT), receptores de pró-renina, AT_1 e AT_2) no NTS, PVN e RVLM, por meio da técnica de qRT-PCR;
3. Expressão gênica de algumas importantes citocinas, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNFα), interleucina 1β (IL 1β), interleucina 6 (IL 6) e interleucina 10 (IL 10) na região RVLM, por meio da técnica de qRT-PCR;
4. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) no NTS, PVN e RVLM.

Quarta série de experimentos: Avaliar os efeitos da administração intravenosa de insulina sobre a atividade vasomotora simpática, função cardiovascular e glicemia de animais diabéticos submetidos ou não à denervação renal. Assim, avaliamos:

1. Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSr) e glicemia de animais anestesiados durante um período de 2 h (curva temporal).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFESP sob protocolo de n° 17872507/14. Utilizamos ratos Wistar, com 8 semanas de idade, pesando entre 300g e 320g, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina – CEDEME da UNIFESP. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória nas seguintes condições: a) ciclo claro/escuro de 12 horas; b) temperatura ambiente 23 ± 2 ºC; c) oferta *ad libitum* de água e ração para roedores. Assim, os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais (n=6-8/grupo):

1. **Controles (CTR)**: ratos normoglicêmicos com 12 semanas de idade;
2. **Diabéticos (DM)**: ratos que receberam a STZ (via i.p) para indução do DM com 8 semanas de idade e após 4 semanas foram avaliados;
3. **Diabéticos submetidos à denervação renal bilateral (DM BRD)**: ratos que receberam a STZ (via i.p) para indução do DM com 8 semanas de idade e após 4 semanas foram avaliados. Porém, esses animais tiveram os nervos renais bilateralmente denervados 2 semanas antes da avaliação final.

3.2 Modelo experimental

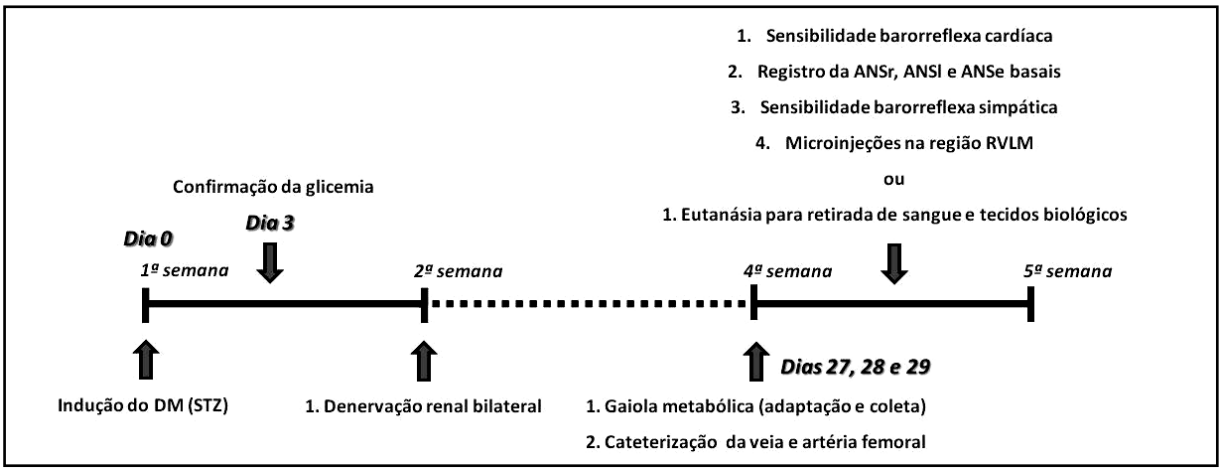
A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico sintetizado pela cepa *Streptomycetes achromogenes* que tem efeito citotóxico seletivo sobre as células β-

pancreáticas. Essa droga é utilizada para induzir o DM, tanto insulino-dependente quanto não insulino-dependente, de acordo com a dose e com o número de vezes que a droga é administrada como também a associação a dietas hipercalóricas. A destruição das células β-pancreáticas pode ser avaliada por meio da glicemia e da insulinemia. Se a destruição destas células for inferior a 60%, a insulina basal e a glicemia permanecem normais; se a destruição celular ficar entre 70-90%, haverá hiperglicemia de jejum e hipoinsulinemia; enquanto que a destruição de todas as células β-pancreáticas configura um estado incompatível com a vida quando não tratado imediatamente com insulina exógena (Bolzán e Bianchi, 2002).

A STZ tem sido utilizada com sucesso na obtenção de modelos de DM em ratos, camundongos, hamsters, porcos e em outras espécies de animais (Rees e Alcolado, 2005). A atividade diabetogênica da STZ tem sido demonstrada experimentalmente em doses entre 25 e 100 mg/kg, sendo observada cetonúria apenas em altas doses da droga. No presente estudo, a STZ foi preparada minutos antes da aplicação intraperitoneal (ip) por meio da diluição da droga (60 mg/kg) em solução tampão de citrato de Na^+ (0,1 M; pH 4,5; 300 µL) (Niu *et al.*, 2016; Gharibi *et al.*, 2017).

Entre os animais que receberam STZ foram selecionados, após 3 dias, apenas aqueles que apresentaram glicemia acima de 300 mg/dL monitorada por meio de glicosímetro comercial (Accu-chek Advantage, Roche Diagnostics, Indiana, EUA). Desta forma, quatro semanas após a indução do DM os animais foram avaliados. A Figura 5 representa esquematicamente o delineamento experimental do estudo desde o protocolo de indução do DM à execução dos experimentos.

Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental.



Os animais recebram uma única dose de estreptozotocina (STZ) via ip para indução do DM. Após 3 dias da indução, foi verificada a glicemia por meio de punção caudal. Em um grupo de animais diabéticos, depois de 2 semanas da indução do DM, foi realizado o procedimento de denervação renal bilateral (BRD). Após 2 semanas da DRB, os experimentos foram realizados.

3.3 Primeira série de experimentos

3.3.1 Cateterização arteriovenosa femoral

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (80 e 10 mg/kg, respectivamente, ip) e tiveram a artéria e a veia femoral cateterizadas para registro direto da PAM e infusão de fármacos, respectivamente. Foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ), previamente conectados a tubos de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ). Após a introdução dos tubos, os mesmos foram exteriorizados na região cervical dos animais. Após 24 horas, a PAM e a FC, parâmetros derivados da pressão arterial pulsátil, foram registradas *online* por meio de uma placa analógico-digital (PowerLab, ADInstruments, Austrália). Tanto a PAM quanto a FC foram obtidas a partir do sinal de PA pulsátil. A frequência de aquisição foi sempre de 2 kHz e com software de aquisição LabChart 7 (PowerLab, ADInstruments, Austrália). Os registros de PAM e da FC foram obtidos

em animais não anestesiados após um período de 10 minutos de adaptação as condições experimentais.

3.3.2 Análise da sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial cardíaco

Após 24h da cateterização arteriovenosa, a sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da FC foi avaliada por meio do registro da PAM e da FC em animais acordados. Assim, as respostas reflexas bradicárdicas e taquicárdicas produzidas pela infusão em bolus, de forma aleatória, de fenilefrina (1, 2 e 3 *μ*g/kg, iv) e de nitroprussiato de sódio (2, 5 e 7 *μ*g/kg, iv), respectivamente, foram quantificadas (Lincevicius *et al.*, 2017). A razão da variação da FC pela variação da PAM foi utilizada para avaliar a sensibilidade do reflexo barorreceptor cardíaco, sendo que o grau de variação da FC foi demonstrado pela inclinação (*slope*) da linha adquirida na análise de regressão linear e expresso em bpm/mmHg (Farah *et al.*, 1999)

3.3.3 Análise da atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe) e da sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para esses territórios

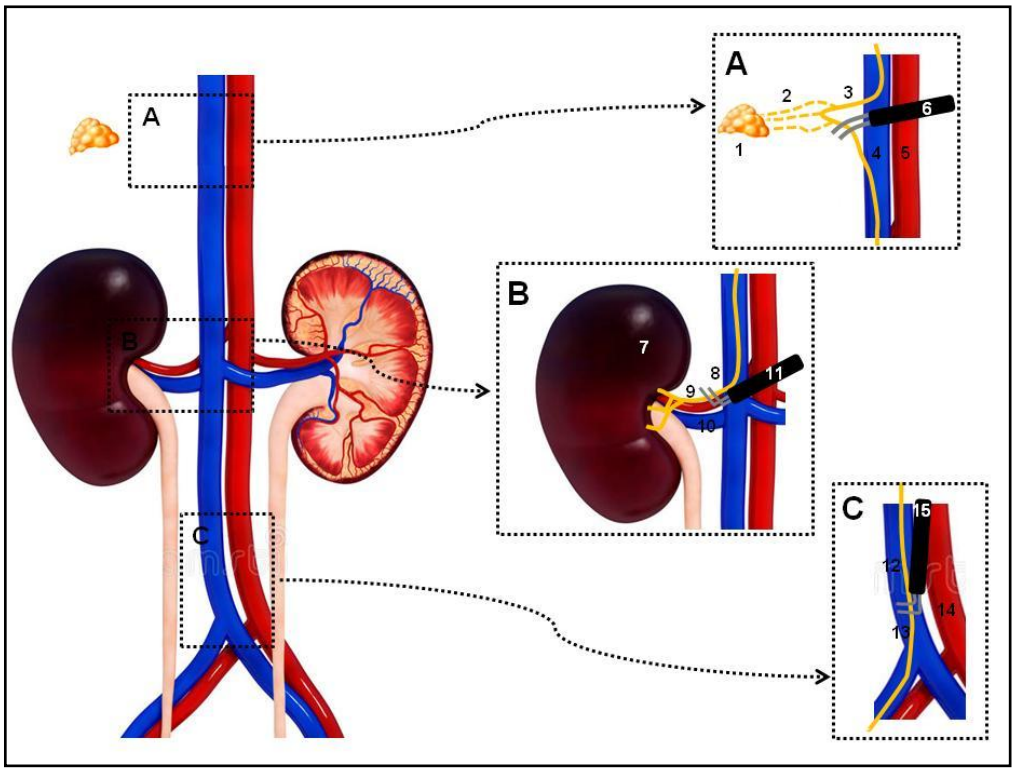
Para registrar a atividade nervosa simpática pós-ganglionar renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe), os animais foram previamente anestesiados lentamente com uretano (1,2 – 1,4g/kg; Sigma-Aldrich, EUA) e, assim, foi realizado o procedimento de traqueostomia para reduzir a resistência das vias aéreas superiores, facilitando a remoção de secreções traqueobrônquicas e para que o ar inspirado fosse enriquecido com 100% de O_2, caso necessário. A temperatura

corporal dos animais foi mantida a 37 ºC por meio de um sistema servo-controlado (Letica Scientific Instruments, USA). Os animais foram posicionados em decúbito ventral com auxílio de aparelho estereotáxico (David Kopf, UK) e foi realizada uma incisão na região retroperitoneal esquerda para expor os nervos renal, lombar e esplâncnico esquerdos.

Os nervos foram localizados, dissecados e posicionados em eletrodo bipolar de prata, sendo mantidos imersos em óleo mineral (vaselina líquida) durante todo o experimento. O sinal dos nervos foi caracterizado com auxílio do osciloscópio (Tektronix TDS 220, USA) e de um amplificador (Neurolog, UK). A atividade dos nervos foi amplificada 20.000 vezes usando um filtro com faixa de frequência de 100 a 1000 Hz. Todos os registros foram adquiridos em frequência de amostragem mínima de 2 kHz. A representação do registro da ANS esplâncnica, renal e lombar pode ser visualizada na Figura 6.

A sensibilidade reflexa do barorreceptor arterial para os territórios renal, lombar e esplâncnico foi avaliada sobre o registro da ANS destes nervos. Para esta análise foi realizada, durante um minuto, a infusão contínua com auxílio de uma bomba de infusão (Kd Scientific, EUA) de fármacos vasoativos na veia femoral, fenilefrina (concentração: 100 µg/mL; volume final: 0,2 mL; taxa de infusão: 0,2 mL/min) e nitroprussiato de sódio (concentração: 200 µg/mL; volume final: 0,1 mL; taxa de infusão: 0,1 mL/min), para avaliar as respostas reflexas dos nervos simpáticos registrados (Lincevicius *et al.*, 2017).

Figura 6. Representação esquemática do registro da ANS esplâncnica, renal e lombar.



Registro da ANSe: 1) Glândula adrenal; 2. Nervos simpáticos para a adrenal; 3) Nervo esplâncnico; 4) Veia cava inferior; 5) Artéria aorta abdominal; 6) Eletrodo bipolar. (B) Registro da ANSr: 7) Rim esquerdo; 8) Nervo renal esquerdo; 9) Artéria renal esquerda; 10) Veia renal esquerda; 11) Eletrodo bipolar. (C) Registro da ANSl: 12) Nervo lombar; 13) Veia cava inferior; 14) Artéria aorta abdominal; 15) Eletrodo bipolar.

Ao final dos experimentos, o nível de ruído de fundo do registro dos nervos simpáticos renal e esplâncnico foi determinado pela administração do bloqueador ganglionar hexametônio (30 mg/kg, iv; Sigma-Aldrich, EUA) (Estrela *et al.*, 2016). No entanto, para a determinação do ruído de fundo do sistema de registro do nervo simpático lombar, foi utilizada a análise "*interburst*", pois cerca de 10% das fibras do nervo lombar são pré-ganglionares e não respondem ao hexametônio (Muntzel *et al.*, 2012). A atividade simpática foi analisada posteriormente por meio do programa computacional Spike Histogram (PowerLab, ADInstruments, Austrália) que permite a discriminação e a contagem dos potenciais nervosos dos diferentes territórios

avaliados a partir de um ruído de fundo. Dessa forma, somente foram quantificados os potenciais acima do ruído de fundo do sistema de registro. Os dados foram apresentados em número de disparos por segundo (pps) utilizando-se um *software* específico (PowerLab – ADInstruments, Austrália) como descrito por Yang & Coote (2006).

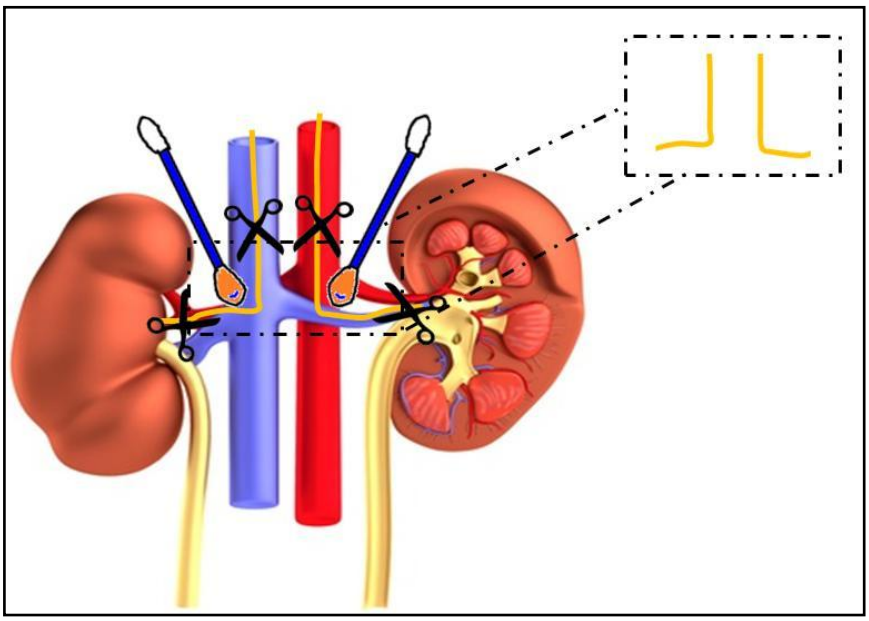
3.3.4 Denervação renal bilateral (BRD)

Duas semanas após a indução do diabetes, um grupo de animais diabéticos foi anestesiado com cetamina e xilazina (80 e 10 mg/kg, ip, respectivamente) para a cirurgia de denervação renal bilateral (BRD). A profundidade da anestesia foi acompanhada por meio da ausência de alguns reflexos, tais como: reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e, pela monitorização hemodinâmica invasiva, que sofre modificações de acordo com os planos anestésicos atingidos. Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral para realização da tricotomia, assepsia e antissepsia do campo cirúrgico. Em seguida, uma incisão mediana tóraco-lombar foi realizada e os flancos direito e esquerdo foram divulsionados para acesso ao pedículo renal na cavidade retroperitoneal. O pedículo renal foi delicadamente isolado do tecido conectivo e, então, o nervo renal foi separado do feixe vásculo-nervoso.

Com isso, toda a inervação visível ao longo da artéria renal foi seccionada e removida. Imediatamente após, hastes flexíveis com algodão em suas extremidades umedecidas com solução contendo fenol 10% diluído em etanol absoluto foi aplicada em torno da artéria renal durante 2 minutos. Este procedimento foi realizado bilateralmente para denervação dos nervos renais direito e esquerdo. Após o

procedimento de BRD, foi realizada aproximação e rafia dos planos musculares e cutâneos. Desta forma, é importante ressaltar que a técnica aplicada para a denervação promoveu a remoção total do nervo renal, ou seja, retirada tanto das aferências quanto das eferências renais (Figura 7). A confirmação da denervação renal foi feita por meio da expressão proteica da enzima tirosina hidroxilase (TH) no tecido renal.

Figura 7. Representação esquemática da técnica de BRD.



Descrição da técnica de denervação renal bilateral (BRD). Observa-se nesta representação esquemática a remoção dos nervos renais em toda a sua extensão visível ao plano cirúrgico, desde o cajado da artéria renal até o hilo renal. Em seguida, hastes flexíveis com algodão em duas extremidades, umedecidas com fenol a 10%, foram aplicadas ao longo da artéria renal.

3.4 Segunda série de experimentos

3.4.1 Gaiola metabólica

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (Nalgene, Rochester, Nova Iorque, EUA) após quatro semanas da indução do diabetes. Os animais foram mantidos nestas gaiolas por 48 horas, sendo as primeiras 24 horas

usadas apenas para adaptação e, após esse período foi quantificado o consumo de água (mL), a excreção de urina (mL) e o consumo de ração (g), sendo a urina coletada para análises bioquímicas posteriores.

3.4.2 Excreção urinária (Na^+, K^+, glicose e albumina)

A urina coletada na gaiola metabólica durante 24 horas foi utilizada para dosagem de Na^+, K^+, glicose e albumina. A concentração de Na^+ e K^+ urinário foi mensurada por meio de fotometria de chama (Corning 410C, Sherwood Scientifics, Cambridge, UK), sendo utilizada uma diluição de 400x para a análise de Na^+ e 500x para a análise de K^+ e os valores obtidos foram expressos em mmol/L. A concentração de glicose e de albumina urinária foi determinada por meio de kit colorimétrico (Ref. 133-1 e Ref. 19-1, Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil, respectivamente) e os resultados obtidos foram apresentados em mg/dL. O volume de urina que os animais excretaram durante as 24h foi utilizado para determinar a excreção urinária diária (carga excretada) de Na^+ e K^+ (mmol/kg/24h) e de glicose e albumina (g/kg/24h).

3.4.3 Concentração plasmática (Na^+, K^+, glicose e albumina)

Os animais foram decapitados ao final do protocolo experimental e amostras de sangue foram coletadas em tubos não heparinizados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para separar o plasma das células sanguíneas. A quantificação de Na^+ e K^+ no plasma foi realizada por meio de fotometria de chama (Corning 410C, Sherwood Scientific's, Cambridge, UK) com diluição de 100x e os valores obtidos foram expressos em mmol/L. A concentração

de glicose e de albumina plasmática foram determinadas por meio de kit colorimétrico (Ref. 133 e Ref. 19, Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil, respectivamente) e os resultados obtidos foram apresentados em g/dL.

3.4.4 Marcadores de função renal (ureia e creatinina)

A determinação da concentração de ureia e creatinina plasmática e urinária foi realizada por meio de analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus, Roche), utilizando kits colorimétricos para determinação de creatinina e ureia (Ref. 96 e Ref. 104, Labtest Diagnostics, Vista Alegre, Minas Gerais, Brasil, respectivamente). Os resultados obtidos da concentração plasmática e urinária de creatinina e de ureia foram apresentados em mg/dL ou em g/dL. O *clearance* foi obtido pela multiplicação da concentração urinária dos respectivos marcadores pelo fluxo urinário de 24h e o resultado foi dividido pela concentração plasmática dos mesmos (mL/min).

3.4.5 Balanço hídrico

As osmolaridades plasmática e urinária foram mensuradas por meio de osmômetro (Osmomat 030, Gonatec CO, Iran). Assim, o primeiro passo foi mensurar os valores das amostras padrão (controle de qualidade) para calibração do aparelho e, em seguida, mensurar as amostras de urina e de plasma dos grupos experimentais. Ao atingir o ponto de congelamento (*freezing*), o aparelho forneceu o valor final em mOsm/kgH_2O.

3.4.6 Expressão gênica de componentes do SRAA, do receptor de insulina (RI) e do cotransportador de Na^+/glicose (SGLT2) nos rins.

Os animais foram eutanasiados por meio de decaptação e os rins foram coletados e armazenados em solução estabilizadora de RNA (RNA*later*™ Stabilization Solution, Ambion, Bartlesville, OK, EUA) a -80°C para posterior processamento.

3.4.6.1 Isolamento de RNA total

O RNA total dos rins foi extraído utilizando trizol. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260 nm, usando o equipamento NanoDrop1000 (Thermo Scientific, USA). A pureza e a integridade das amostras foram determinadas pela razão entre os valores de absorbâncias de 260 nm e 280 nm, bem como entre 260 nm e 230 nm. Somente as amostras que apresentaram razões entre 1.9 e 2.1 foram utilizadas (Simões *et al.*, 2013).

3.4.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O cDNA foi preparado a partir de aproximadamente 100 ng de RNA total com o uso do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, uma alíquota de cDNA diluído 20x foi combinada aos componentes do reagente Master Mix QuantiNova™ SYBR® Green PCR (Qiagen, USA) e *primers* específicos para cada gene. A reação consistiu na ativação da enzima Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, seguida de 45 ciclos com as seguintes etapas: denaturação do DNA a 95°C por 5 segundos e anelamento dos *primers* seguido de extensão a 60°C por 15 segundos. Os produtos

foram analisados e quantificados a partir do número de ciclos necessários para obtenção dos valores arbitrários (normalizados) de fluorescência na fase log-linear da reação. Diluições seriadas de amostras controle foram analisadas simultaneamente para estabelecimento de uma curva-padrão. A amplificação do gene HPRT1 (gene constitutivo mais estável) foi utilizada a fim de normalizar os resultados obtidos. Vale frisar que a especificidade dos produtos gerados foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos produtos (Gholami *et al.*, 2017).

3.4.6.3 Sequências dos *primers*

Seguem abaixo descritas as sequências dos *primers* utilizados no estudo de acordo com o banco de dados de nucleotídeos do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI):

1. **Sequências do *primer* HPRT1**

HPRT1 Fw: 5´- CAGGCCAGACTTTGTTGGAT - 3´ Tm=58,5ºC

HPRT1 Rv: 5´- CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG - 3´

2. **Sequências do *primer* Pró-renina**

Pró-Renina Fw: 5´- ACACATCCCTGGTGAGGAAG - 3´ Tm=60ºC

Pró-Renina Rv: 5´- AGGCCAAGCCAGTCATAATC - 3´

3. **Sequências do *primer* AGT**

AGT Fw: 5´- TCCAAGGGAAGATGAGAGGC - 3´ Tm=60ºC

AGT Rv: 5´- AAGTTGTTCTGGGCGTCACT - 3´

4. **Sequências do *primer* ECA_1**

ECA_1 Fw: 5´- ACAGTCTCAACCTGCTCAGC - 3´ Tm=59ºC

ECA_1 Rv: 5´- TGCTTCCGTCAAAGACCCTC - 3´

5. **Sequências do *primer* AT_1**

AT_1 Fw: 5´- ATCCAAGATGACTGCCCCAA - 3´ Tm=59ºC

AT_1 Rv: 5´- GCCAAGGCGAGATTGAGAAG - 3´

6. **Sequências do *primer* receptor AT_2**

AT_2 Fw: 5´- GGTCTGCTGGGATTGCCTTA -3´ ´ Tm=59ºC

AT_2 Rv: 5´- GGAAGGGAAGCCAGCAAATG -3´

7. **Sequências do *primer* RI**

RI Fw: 5´- TCGAGGAGAGACCTTGGAAA - 3´ Tm=60ºC

RI Rv: 5´- TCGTGAGGTTGTGCTTGTTC - 3´

8. **Sequências do *primer* SGLT2**

SGLT2 Fw: 5´- GCATGATTAGCCGCATTCTT - 3´ Tm=60ºC

SGLT2 Rv: 5´- TTAGAGCAGCCCACCTCAGT - 3´

3.4.7 Conteúdo proteico de renina e tirosina hidroxilase (TH) nos rins

Os animais foram eutanasiados por meio de decaptação e os rins foram coletados e homogeneizados com uso de homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.) em solução contendo tampão PBS (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de Na^+ monobásico, 7,2 mM fosfato de Na^+ dibásico; pH 7,4), inibidores de protease, pepstatina A (0,7 µg/mL), leupeptina (0,57 µg/mL) e PMSF (40 µg/mL). Neste tampão, o tecido renal foi macerado e homogeneizado, permanecendo em gelo por 10 min. Após, as amostras foram centrifugadas (7000 g, por 5 minutos, a 4° C), para a remoção de debris celulares. O sobrenadante foi mantido em gelo e a concentração proteica foi determinada pela absorbância em 280 nm utilizando um

microvolume (2 µL) de cada amostra por meio do espectrofotômetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific, USA).

As proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra e separadas em gel de poliacrilamida 7,5%. As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de polivinilidenedifluorida (PVDF-Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA) em 350 mA por 8 a 10 h a 4°C, utilizando um sistema tipo sanduíche (GE HealthCare TE 62). A membrana de PVDF contendo as proteínas transferidas foi incubada com solução de bloqueio (5% de leite e 0,1% Tween 20 em PBS; pH 7,4) por no mínimo 2 h, em temperatura ambiente, para bloqueio das ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight,* a 4°C, com anticorpo primário. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio, como podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Diluições utilizadas dos anticorpos primários e secundários.

Anticorpos	Diluição	Espécie	Marca
(1^{ário}) Anti-renina	1:500	Mouse	Santa Cruz
(1^{ário}) Anti-TH	1:1000	Rabbit	Cell Signaling
(1^{ário}) Anti-βactina	1:10000	Rabbit	Abcam
(2^{ário}) Anti-mouse	1:30000	Goat	Santa Cruz
(2^{ário}) Anti-rabbit	1:3000	Goat	Cell Signaling

Abreviações: TH = tirosina hidroxilase.

Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 5 vezes (10 minutos cada lavagem) em solução de bloqueio e incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas em solução de bloqueio (5 vezes; 10 minutos cada lavagem) e, em PBS

(2 vezes; 2 minutos cada lavagem), por fim, foram incubadas durante 1 minuto, em ECL (reagente para imunodetecção por meio de quimioluminescência). Para detecção das bandas, foi utilizado um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare). As bandas foram analisadas por densitometria utilizando o programa Image J (versão 1.51) (Milanez *et al.*, 2018).

3.4.8 Perfil inflamatório

3.4.8.1 Extração de proteínas

Os rins dos animais foram inicialmente utilizados para a extração de proteínas totais. Para isto, um fragmento do rim direito foi pesado (300 mg), colocado em 0,8 ml de tampão de extração gelado, com a seguinte composição: trizma base 100 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de Na^+ 100 mM; pirofosfato de Na^+ 10 mM; ortovanadato de Na^+ 10 mM; PMSF 2 mM e 0,1 mg/mL de aprotinina.

Em seguida, os rins foram rapidamente homogeneizados no tampão de extração por meio do aparelho *Polytron*, durante 30 s, em velocidade máxima. Após, foi adicionado triton 10% e, depois de 30 min, o homogenato foi centrifugado a 12000 g, por 40 min, a 4 °C. A partir da alíquota adquirida dos respectivos homogenatos, foi dosado o conteúdo de proteínas totais, em duplicata, pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O sobrenadante foi separado e armazenado em freezer -80 °C para posterior dosagem das citocinas por espectofotometria.

3.4.8.2 Dosagem das citocinas

Os rins coletados, preparados e armazenados em freezer -80 °C, conforme item 3.4.8.1, foram descongelados para quantificação das concentrações das

citocinas TNFα, IL 6 e IL 10. Todo o protocolo para análise das citocinas foi realizado conforme orientações do fabricante utilizado o método de imunoabsorção enzimática (DuoSet ELISA) de captura (R&D SYSTEM, INC., Minneapolis, USA).

3.4.9 Perfil oxidativo

3.4.9.1 Determinação da atividade da catalase (CAT)

O rim direito dos animais foi homogeneizado em 10% de tampão fosfato (50 Mm; pH 7,4), centrifugado a 1500 g por 10 minutos. Assim, o sobrenadante foi separado e utilizado no ensaio de acordo com o método de Aebi. Este método baseia-se no acompanhamento da decomposição do peróxido de hidrogênio, H_2O_2, determinada por meio de espectofotometria a 240 nm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína (Aebi, 1984).

3.4.9.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

O papel da SOD é acelerar a dismutação do tóxico radical superóxido ($0_2•^-$), produzido durante os processos oxidativos, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Esse método foi determinado pelo kit Ransel (Randox Laboratories UK) utilizando a xantina ($C_5H_4N_4O_2$) e a xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxidos e ácido úrico ($C_5H_4N_4O_3$). Os radicais superóxidos reagem com o cloreto de 2- (4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio, também chamado de INT, para formar um corante formazano vermelho. Essas reações podem ser melhor visualizadas através das seguintes fórmulas químicas: 1) $C_5H_4N_4O_2 \xrightarrow{XOD} C_5H_4N_4O_3 + 0_2•^-$, 2) $INT \xrightarrow{02•-}$ corante formazano vermelho ou 3) $0_2•^- + 0_2•^- + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$. Vale salientar que uma unidade de SOD promove uma

inibição de 50% da taxa de redução do INT e que a atividade da SOD é mensurada pelo grau de inibição dessa reação. Assim, utilizamos uma curva padrão e a variação da absorbância foi observada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Woolliams *et al.*, 1983).

3.4.9.3 Determinação da atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada utilizando o Kit Ransel (Randox Laboratories UK). A GPx é responsável por catalisar a reação de oxidação da glutationa (GSH) por meio do hidroperóxido de cumeno. Na presença da glutationa redutase (GR) e do NADPH, a glutationa oxidada (GSSH) é imediatamente convertida na sua forma reduzida com concomitante oxidação do NADPH para $NADP^+$. Essas reações podem ser melhor visualizadas através das seguintes fórmulas químicas: 1) $2\ GSH + ROOH \xrightarrow{GPx} ROH + GSSH + H_2O$, e 2) $NADPH + H^+ + GSSH \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2\ GSH$. A variação da absorbância foi observada em espectrofotômetro a 340 nm e os dados foram expressos em mU/mg de proteína (Paglia e Valentine, 1967).

3.4.9.4 Determinação da atividade da glutationa redutase (GR)

A atividade da enzima GR foi determinada utilizando o Kit Ransel (Randox Laboratories UK). A GR catalisa a redução da glutationa (GSSG) na presença de NADPH, que é oxidado a $NADP^+$. Essa reação pode ser melhor observada por meio da fórmula química: $NADPH + H^+ + GSSH \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2\ GSH$. A variação da absorbância foi observada em espectrofotômetro a 340 nm e os dados foram expressos em mU/mg de proteína (Melissinos *et al.*, 1981).

3.4.9.5 Análise do total antioxidante (TAS)

O total antioxidante foi determinado utilizando o Kit TAS (Randox Laboratories UK). Neste método, o reagente 2,2'-Azino-di- [3-etilbenzotiazolinossulfonato], ABTS, foi incubado com a peroxidase (metamioglobina) e com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para produzir o radical catiônico $ABTS^+$. O radical catiônico ABTS possui uma coloração verde-azulada, estável, que em contato com antioxidantes presentes nas amostras teciduais promovem a supressão desta produção de cor a um grau que é proporcional à sua concentração. A variação da absorbância foi verificada em espectrofotômetro a 600 nm e os dados foram expressos em nmol/mg de proteína (Miller *et al.*, 1993).

3.4.10 Histologia renal

Os animais foram eutanasiados por meio de decaptação e os rins foram coletados e fixados em solução de *Bouin*. Em seguida, os rins foram desidratados por crescentes concentrações de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados por xilol, e incluídos em parafina. O material parafinado foi levado ao micrótomo (Leica RM2125, EUA) para a realização de cortes com espessura de 5 µm. Em seguida, os cortes foram desparafinados com xilol, reidratados por decrescentes concentrações de etanol e submetidos a diferentes tipos de coloração: hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), picrosírius e tricrômio de masson.

A maioria dos corantes histológicos se comporta como compostos químicos ácidos ou básicos e tendem a formar ligações eletrostáticas com radicais ionizados dos tecidos. A combinação mais comum de corantes usada em histologia é a HE, pois distingue os diversos componentes estruturais celulares da matriz extracelular.

A hematoxilina possui característica química alcalina, ou seja, tem atração por elementos ácidos que compõem os tecidos (acidófila), tais como as proteínas, o retículo endoplasmático rugoso e os ácidos nucleicos, conferindo a essas estruturas a cor azul-púrpura. Já a eosina, por ser um corante com característica ácida (basófila), apresenta afinidade predominante pelo citoplasma, corando-o de róseo a vermelho (Lindberg *et al.*, 2014).

A coloração PAS é frequentemente usada para identificar estruturas que contêm uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína e proteoglicanos). A reação do PAS oxida seletivamente os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produzem uma cor púrpura-magenta (Tan e Heptinstall, 1969). Assim, a coloração PAS foi utilizada para evidenciar o acúmulo de carboidratos em áreas intraglomerulares, sobretudo na matriz mesangial e na membrana basal, que pode ser indicativo de um quadro histopatológico característico de expansão mesangial (Banki *et al.*, 2013).

As colorações picrosírius e tricrômio de masson são usadas para identificar fibras colágenas. Especificamente, a coloração picrosírius permite a visualização e diferenciação das fibras colágenas tipo I, que se apresentam como fibras grossas e na cor vermelha, das fibras colágenas tipo III, que se apresentam em feixes finos e na cor amarelo-esverdeada (Junqueira *et al.*, 1978). A coloração tricrômio de masson permite a identificação das fibras colágenas tipo I que se apresentam em feixes de variadas espessuras e na cor azul (Garvey, 1984). Desta forma, as colorações picrosírius e tricrômio de masson foram utilizadas para identificar fibras colágenas em regiões glomerulares e tubulointersticiais, o que pode ser indicativo de um quadro histopatológico característico de fibrose (Fong *et al.*, 2016).

Neste contexto, os cortes histológicos foram observados em microscópio triocular (Nikon, Japan) acoplado a uma câmara digital (DSRi1; Nikon). As fotomicrografias adquiridas foram projetadas na tela de computador (cada campo histológico apresentava uma área de 277.000 μm^2). Por meio da objetiva de 20x, magnificação de 200 vezes, foram estudados vinte campos corticais aleatórios em cada lâmina histológica. A análise quantitativa do número de glomérulos e da área glomerular através da coloração HE foi realizada por meio do programa de análise de imagens (Eclipse 80i; Nikon, Japan) utilizando o software NIS-Elements (Nikon) (Argeri *et al.*, 2016). Enquanto que a análise quantitativa da expansão mesangial e fibras colágenas por meio das colorações PAS, picrosírius e tricrômio de masson, respectivamente, foram realizadas através do programa ImageJ versão 1.47 (National Institutes of Health, EUA). Desta forma, foi realizado o reconhecimento da cor púrpura-magenta, vermelha, amarelo-esverdeada e azul para determinação do acúmulo de carboidratos, colágeno tipo I, colágeno tipo III e colágeno tipo I, respectivamente. Assim, o resultado foi obtido por meio do cálculo da densidade de área, definida pelo quociente entre a área ocupada pela coloração em questão e a área total do campo analisado. Por fim, o resultado final foi expresso em porcentagem (%), considerando a média do grupo CTR como normalizadora (100 %) da análise dos demais grupos.

3.5 Terceira série de experimentos

3.5.1 Microinjeção na região RVLM

Os animais foram anestesiados, traqueostomizados e posicionados em estereotáxico para registro da ANSr e ANSe, conforme tópico 3.3.3, 24 h após a

canulação da veia e da artéria femorais, conforme tópico 3.3.1. A musculatura da região cervical foi rebatida, expondo o osso occipital e a membrana atlanto-occipital. Com o auxílio de um osteomo, o osso occipital foi removido e a dura-máter rebatida, sendo exposto o *calamus scriptorius*, o qual foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas estereotáxicas. As coordenadas para a região RVLM (ântero-posterior: 3 mm; lateral: 1,8 mm; ventral: 3 mm; em relação ao *calamus scriptorius*) foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986).

As microinjeções foram realizadas por meio de micropipetas de vidro com pontas de 10 a 20 µm obtidas a partir de estiramento por aquecimento (David Kopf Instruments, UK). Em seguida, microinjeções de glutamato (0,1 M, 100 nL) (HORIUCHI et al., 2004) e de insulina (5 µU/nL) (Muntzel *et al.*, 1994; Rahmouni *et al.*, 2004; Bardgett *et al.*, 2010) foram feitas bilateralmente na região RVLM no volume de 100 nL. Os fármacos foram microinjetados por pressão com nitrogênio 20 PSI (Channel Pressure Injector, Micro Data Instruments, EUA). O primeiro fármaco injetado na região RVLM foi sempre o glutamato (0,1 M, 100 nL) para localização da área, apenas aumentos superiores a 30 mmHg da PAM foram considerados localização positiva.

3.5.2 Expressão gênica de componentes do SRAA, do receptor de insulina (RI) e citocinas inflamatórias no NTS, PVN e RVLM.

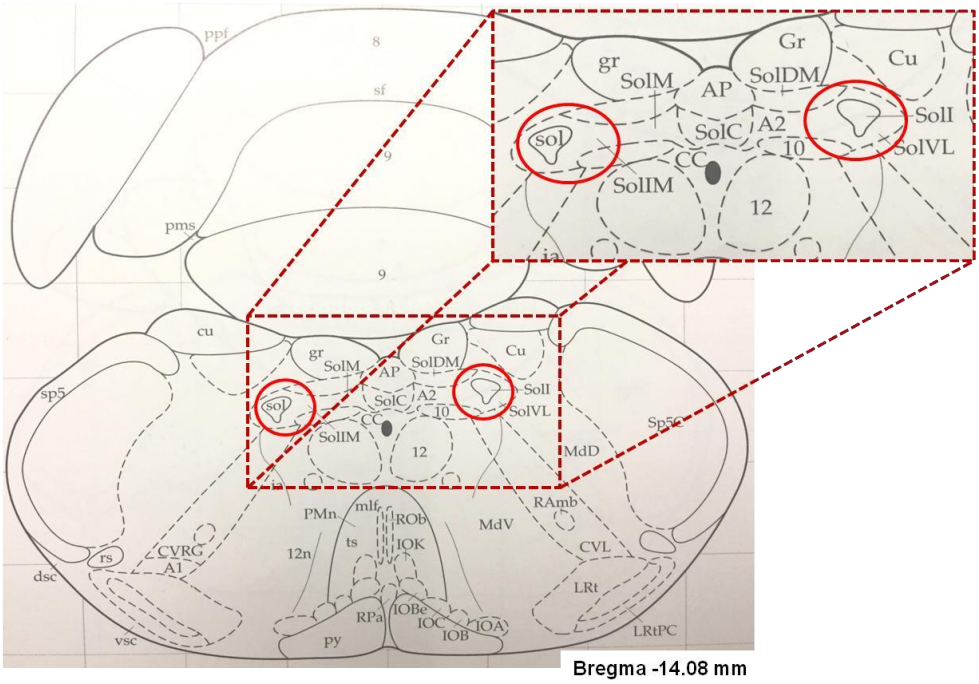
Os animais foram eutanasiados por meio de decaptação e os encéfalos foram coletados e armazenados em solução estabilizadora de RNA (RNA*later*™ Stabilization Solution, Ambion, Bartlesville, OK, EUA) a -80°C para posterior processamento.

3.5.2.1 Isolamento de RNA total

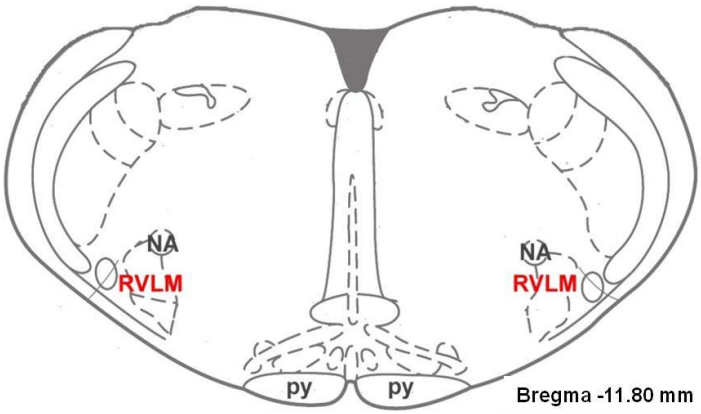
No dia do isolamento do RNA total, os *punches* bilaterais das regiões NTS intermediário, RVLM e PVN foram retirados dos *slices* do encéfalo com o auxílio de um microscópio cirúrgico (aumento de 25x) e de uma agulha específica (diâmetro externo: 1 mm e diâmetro interno: 0,5 mm), seguindo as coordenadas representadas na Figura 8 A, B e C. Assim, o RNA total das áreas centrais (NTS, RVLM e PVN) foi extraído a partir de um *pool* de *punches* isolados de 3 animais (representando n=1), utilizando o kit ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260 nm, usando o equipamento NanoDrop1000 (Thermo Scientific, USA). A pureza e a integridade das amostras foram determinadas pela razão entre os valores de absorbâncias em 260 nm e 280 nm, bem como entre 260 nm e 230 nm. Somente as amostras que apresentaram razões entre 1.9 e 2.1 foram utilizadas (Oliveira-Sales *et al.*, 2009).

Figura 8. Desenho esquemático da localização dos punches bilaterais.

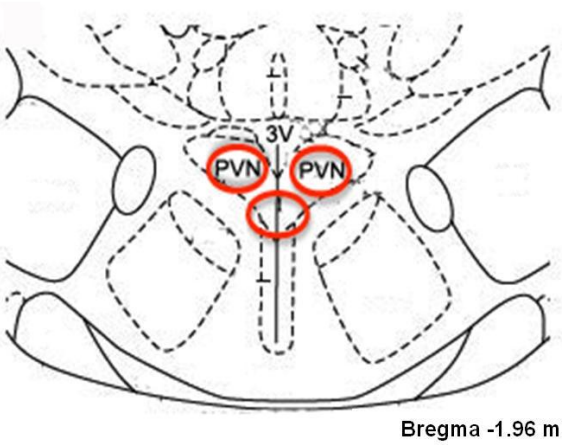
A



B



C



Desenho esquemático da localização dos *punches* bilaterais para a região do (A) núcleo do trato solitário intermediário (NTS), (B) região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), e (C) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). AP: Área postrema; SOL: Núcleo do trato solitário; solIM: Núcleo do trato solitário intermediário; NA: núcleo ambíguo; py: trato piramidal. Modificado de Paxinos & Watson, 1996.

3.5.2.2 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O protocolo utilizado para mensuração do RNAm por meio do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi descrito anteriormente no tópico 3.4.6.2, conforme realizado no tecido renal.

3.5.2.3 Sequências dos *primers*

Seguem abaixo descritas as sequências dos *primers* utilizados no estudo de acordo com o banco de dados de nucleotídeos do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), com exceção dos *primers* descritos no tópico 3.4.6.3:

1. **Sequências do *primer* TNFα**

TNFα Fw: 5´-TGACCCCCATTACTCTGACC-3´ Tm=60ºC

TNFα Rv: 5´-TTCAGCGTCTCGTGTGTTTC-3´

2. **Sequências do *primer* IL 1β**

IL 1β Fw: 5´-TGACCCATGTGAGCTGAAAG-3´ Tm=60ºC

IL 1β Rv: 5´-GGGATTTTGTCGTTGCTTGT-3´

3. **Sequências do *primer* IL 6**

IL 6 Fw: 5´-GCCAGAGTCATTCAGAGCAA-3´ Tm=60ºC

IL 6 Rv: 5´-CATTGGAAGTTGGGGTAGGA-3´

4. **Sequências do *primer* IL 10**

IL 10 Fw: 5´-TGGGAGAGAAGCTGAAGACC-3´ Tm=60ºC

IL 10 Rv: 5´-GCTCCACTGCCTTGCTTTTA-3´

3.6 Quarta série de experimentos

3.6.1 Infusão periférica de insulina

Os animais foram anestesiados, traqueostomizados e posicionados em estereotáxico para registro da ANSr, conforme tópico 3.3.3, 24 h após a cateterização da veia e da artéria femorais, conforme tópico 3.3.1. Assim, foi possível avaliar funcionalmente a PAM, FC, ANSr e glicemia dos animais durante um período de 2 h (curva temporal) após infusão intravenosa, pela veia femoral, de insulina humana regular (Humulin R, Eli Lilly, São Paulo, Brasil) na dose de 50 mU/kg (Patarrão *et al.*, 2015) em animais anestesiados. É importante salientar que foi utilizado um período de registro de 10 min antes da infusão da insulina, com o objetivo de garantir um período basal contínuo e sem interferências do fármaco a ser testado.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da presente tese foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e comparados por meio do teste T de *Student* ou análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste *Tukey*, para dados independentes, ou ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*, quando avaliadas duas variáveis simultaneamente, caso necessário. As correlações das variáveis metabólicas, renais e autonômicas foram analisadas pelo teste de correlação de *Pearson*. As análises foram feitas com auxílio do programa computacional *GraphPad Prism* (GraphPad, versão 6.0, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% ($P<0,05$).

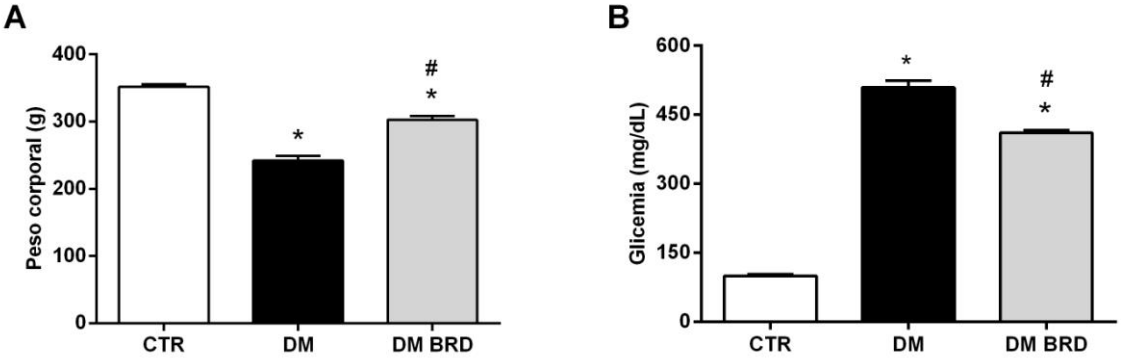
5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros gerais de caracterização do DM

5.1.1 Peso corporal e glicemia

A análise do peso corporal (Figura 9 A) mostrou diminuição de 31% e 14% (P<0,05) em ratos diabéticos (DM e DM BRD, respectivamente) comparados com ratos controles (CTR). Porém, a BRD promoveu aumento (25%, P<0,05) do peso corporal em comparação ao grupo DM. Em relação à concentração plasmática de glicose (Figura 9 B) após a indução do diabetes, os grupos DM e DM BRD aumentaram a glicemia em 408% e 309%, respectivamente (P<0,05) quando comparados ao grupo CTR. Entretanto, a BRD foi capaz de reduzir 19% (P<0,05) a glicemia dos animais diabéticos em comparação ao grupo DM.

Figura 9. Parâmetros gerais de caracterização do DM.



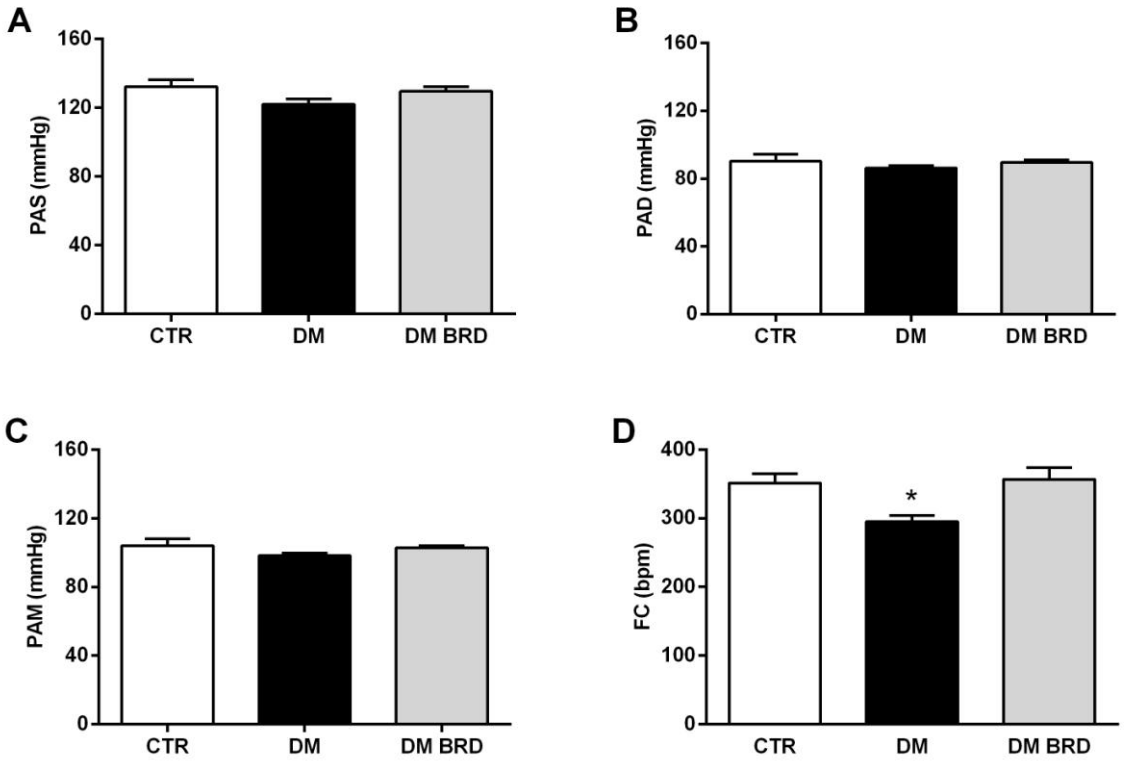
(A) Peso corporal e (B) Glicemia avaliadas nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.2 Parâmetros cardiovasculares e autonômicos

5.2.1 Pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)

Não houve diferenças estatísticas na pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) entre os grupos estudados (Figura 10 A, B e C). Contudo, o grupo DM apresentou uma redução significante da FC basal (292 ± 11 bpm) em relação ao CTR (352 ± 13 bpm). Enquanto que a BRD foi capaz de normalizar a FC nos animais diabéticos (372 ± 23 bpm), como pode ser verificado na Figura 10 D.

Figura 10. Parâmetros gerais cardiovasculares.

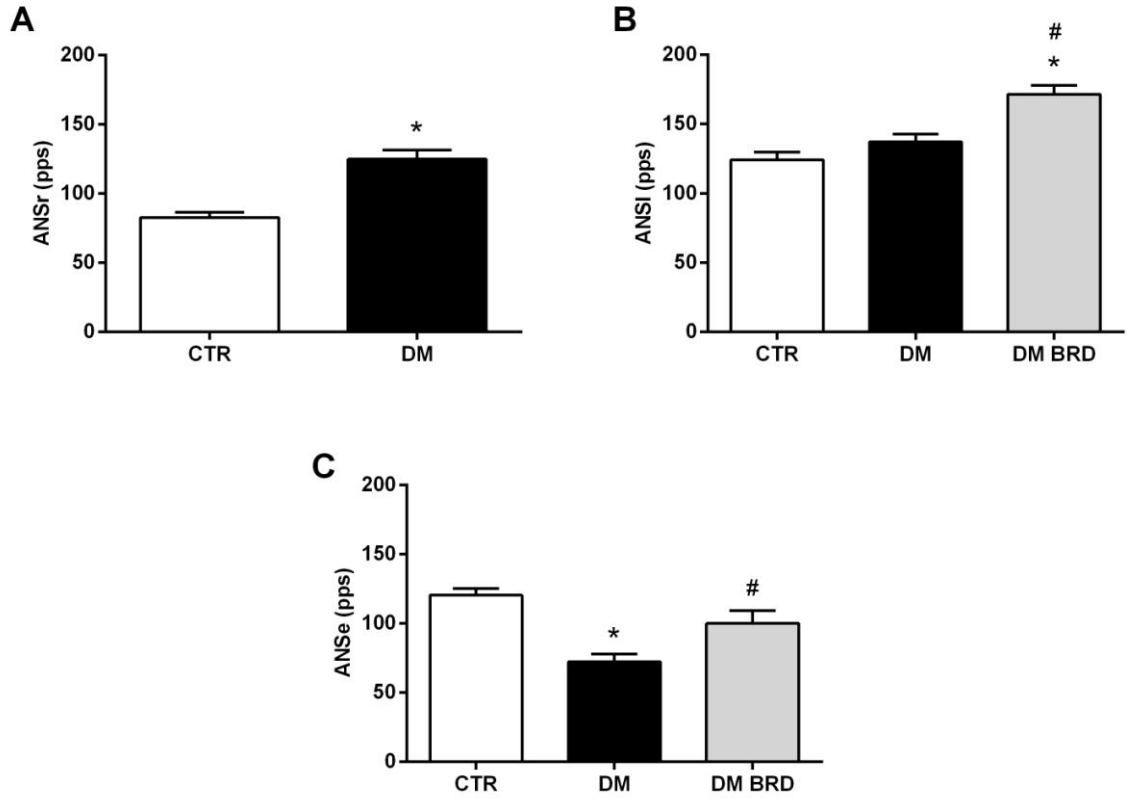


(A) Pressão arterial sistólica (PAS), (B) Pressão arterial diastólica (PAD), (C) Pressão arterial média (PAM) e (D) Frequência cardíaca (FC) avaliadas nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.2.2 Atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe)

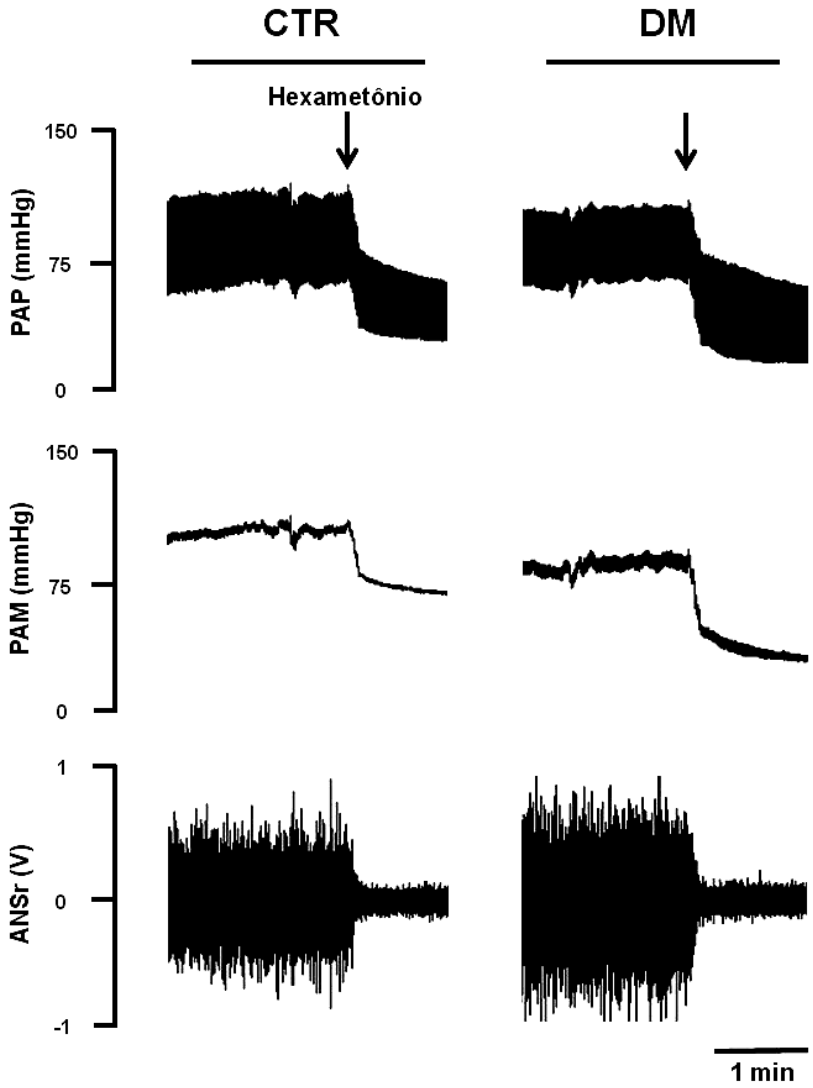
Um ajuste topográfico foi verificado sobre a atividade nervosa simpática basal nos animais diabéticos (DM), uma vez que respostas diferenciadas foram observadas para os territórios avaliados. Animais DM apresentaram aumento da ANSr (124,8 ± 6,45 pps) em comparação aos CTR (82,6 ± 3,93 pps). Contudo, a ANSl do grupo DM (137,0 ± 5,96 pps) não diferiu do CTR (124,2 ± 5,46 pps). Paradoxalmente, a ANSe basal encontrou-se reduzida no grupo DM (72,3 ± 5,70 pps) comparada ao grupo CTR (120,5 ± 4,76 pps). Após a BRD houve aumento da ANSl (171,5 ± 6,35 pps), bem como, da ANSe (100,0 ± 9,23 pps) nos animais diabéticos. É importante ressaltar que a BRD aumentou a ANSl basal também em relação aos animais CTR, enquanto que para o território esplâcnico, a ANS foi normalizada, não diferindo dos animais CTR. Estes resultados podem ser verificados na Figura 11 A, B e C. Os traçados representativos da ANSr, ANSl e ANSe seguem ilustrados nas Figuras 12, 13 e 14, respectivamente.

Figura 11. Atividade nervosa simpática (ANS).



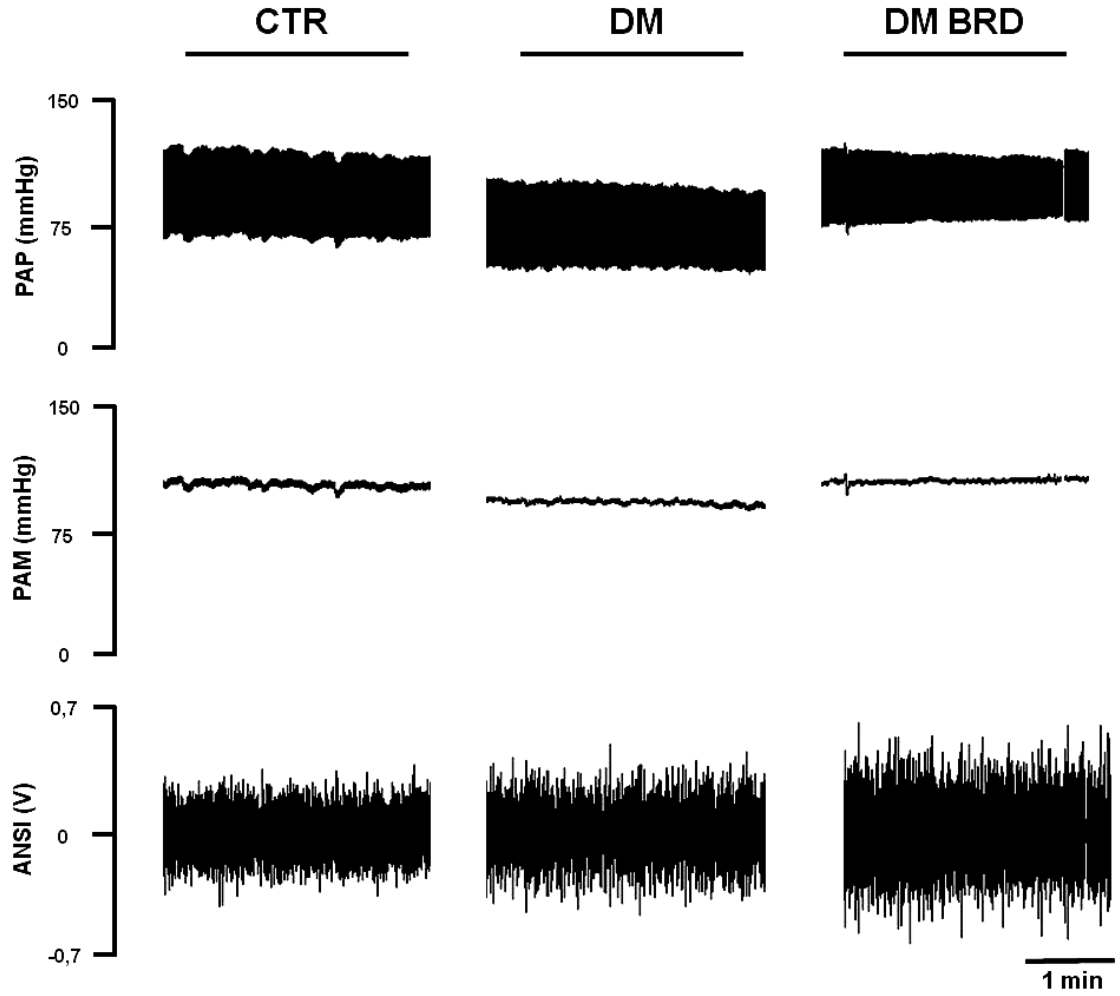
(A) Atividade nervosa simpática renal (ANSr), (B) Atividade nervosa simpática lombar (ANSl) e (C) Atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe) nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs. CTR; #P<0,05 vs. DM; teste t-*Student* (A) ou one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey* (B e C).

Figura 12. Traçado representativo do efeito do DM sobre atividade nervosa simpática renal (ANSr) basal.



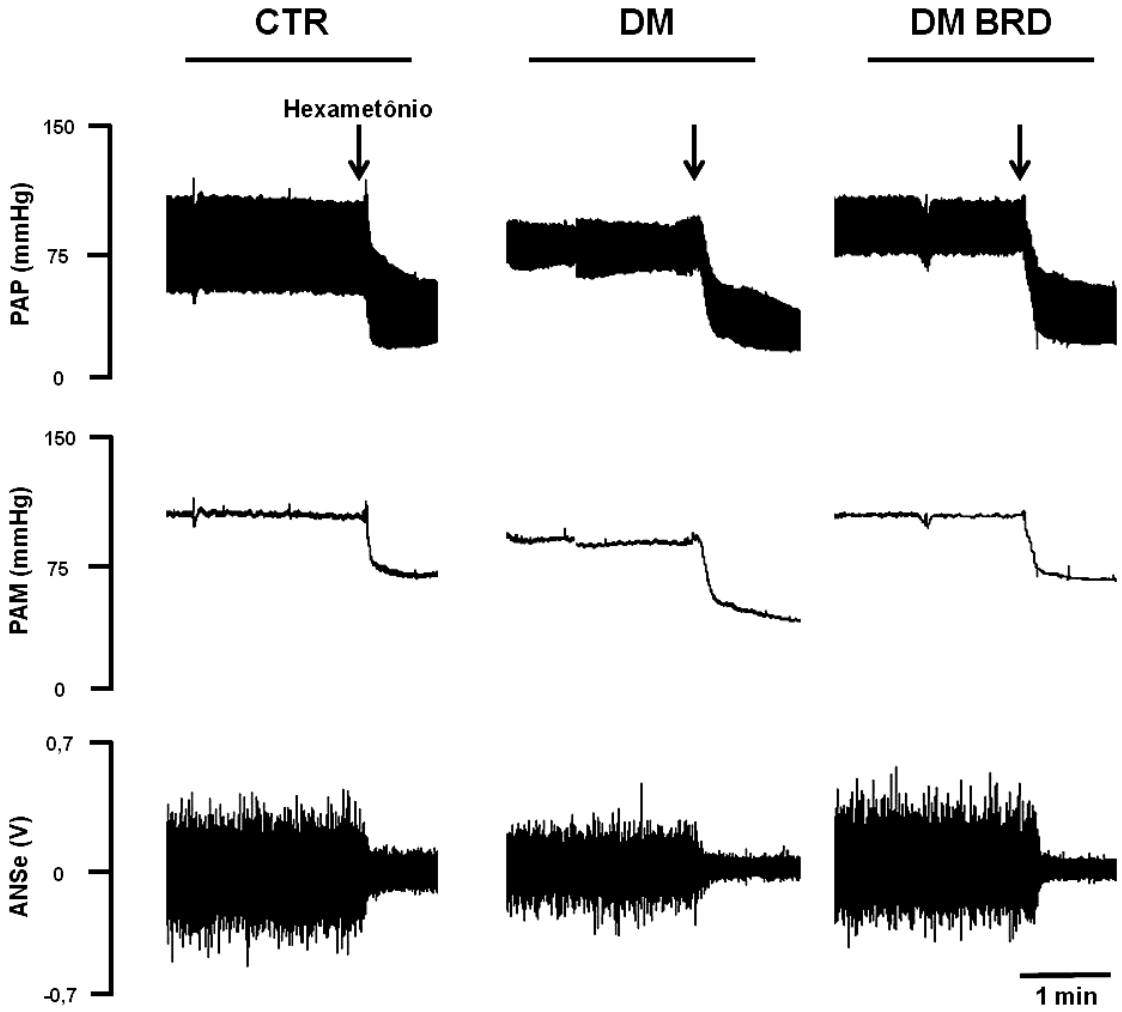
A seta preta indica o momento da infusão do hexametônio (30 mg/kg, iv), um bloqueador ganglionar utilizado para análise do ruído de fundo do registro. O traçado representa 1 min do experimento demonstrados nos grupos controle (CTR) e diabético (DM).

Figura 13. Traçado representativo do efeito da denervação renal bilateral sobre atividade nervosa simpática lombar (ANSl) basal.



O traçado representa 1 min do experimento demonstrados nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD).

Figura 14. Traçado representativo do efeito da denervação renal bilateral sobre atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe) basal.



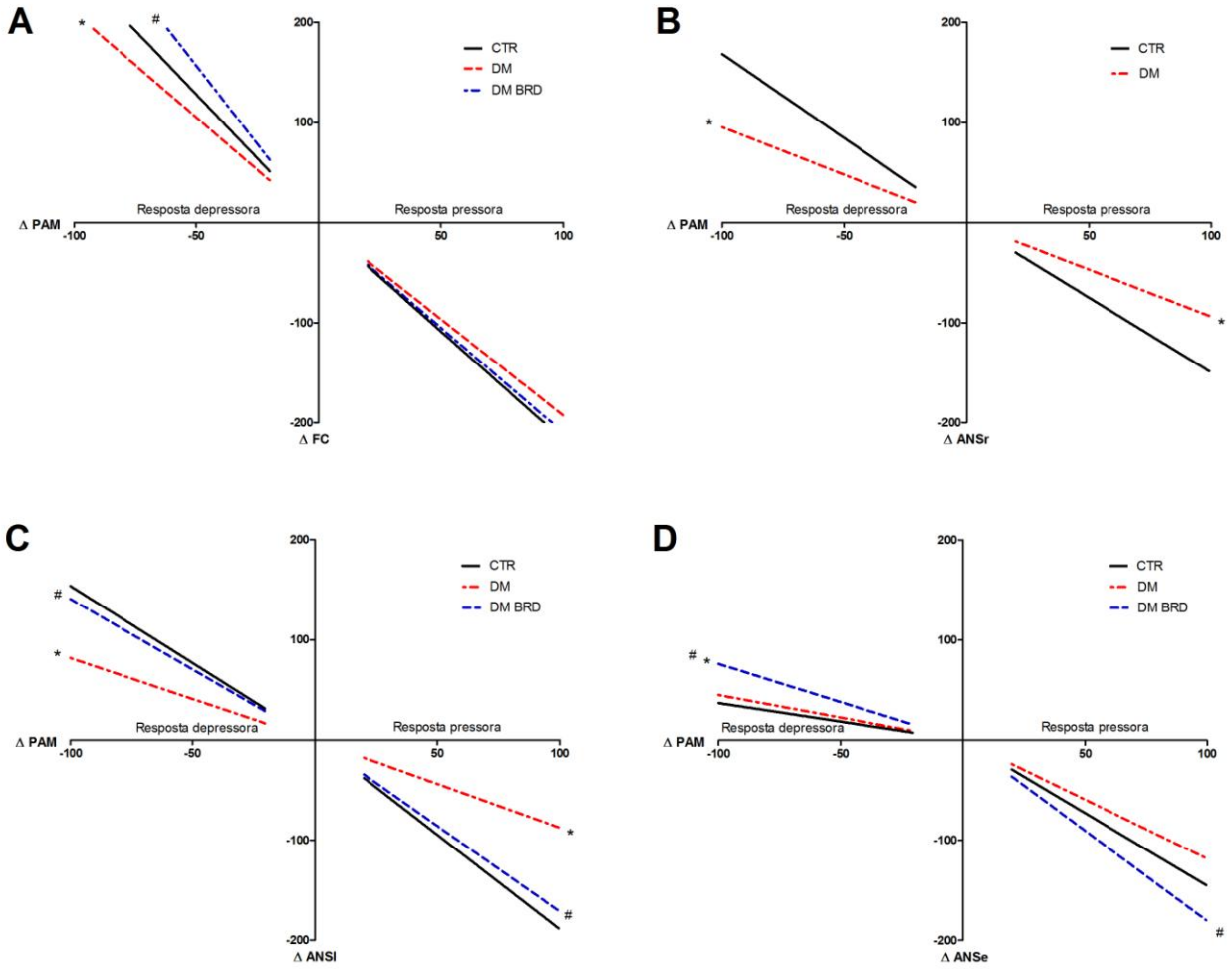
A seta preta indica o momento da infusão do hexametônio (30 mg/kg, iv), um bloqueador ganglionar utilizado para análise do ruído de fundo do registro. O traçado representa 1 min do experimento demonstrados nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD).

5.2.3 Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSr), lombar (ANSl) e esplâncnica (ANSe)

Em relação à sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da FC, a resposta taquicárdica reflexa, em consequência a doses crescentes e em bolus de nitroprussiato de sódio, nos animais diabéticos está significantemente reduzida comparada aos animais controles. A BRD foi capaz de aumentar e normalizar a sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial cardíaco nos animais diabéticos, como representado na Figura 15 A.

Em relação à sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da ANS, o grupo DM apresentou redução da sensibilidade à resposta pressora (fenilefrina) e depressora (nitroprussiato de sódio) tanto para o território renal quanto para o lombar, obervado pelo prejuízo da sensibilidade barorreflexa nas variações de PAM 5, 10, 20, 25, 30, 35 e 40 mmHg (Figura 15 B). Contudo, a BRD promoveu normalização da sensibilidade barorreflexa para o controle da ANSl e aumento da sensibilidade barorreflexa para o controle da ANSe, como mostrado na Figura 15 C e D. Os resultados do *slope* de cada grupo experimental seguem representados na Tabela 3.

Figura 15. Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial.



(A) Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da frequência cardíaca (FC) em resposta a doses pressoras de fenilefrina e doses depressoras de nitroprussiato de sódio. Inclinação (*slope*) em bpm/mmHg obtida pela razão da variação da frequência cardíaca (FC) pela variação da pressão arterial média (PAM) com doses crescentes de fenilefrina (1, 2 e 3 µg/kg) e de nitroprussiato de sódio (2, 5 e 7 µg/kg) administrados em bolus. (B e C) Sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da atividade nervosa simpática renal (ANSr) e da atividade nervosa simpática lombar (ANSl), respectivamente. Gráfico de regressão linear contendo a resposta de: (i) aumento reflexo da ANS devido a redução da PAM produzida pela administração aguda de nitroprussiato de sódio (200 µg/kg) - resposta depressora e (ii) redução reflexa da ANS devido ao aumento da PAM produzido pela administração aguda de fenilefrina (100 µg/kg) - resposta pressora, nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs. CTR; #P<0,05 vs. DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

Tabela 3. Representação dos *slopes*, inclinação da reta através de regressão linear, por meio da razão da variação da FC pela variação da PAM ou por meio da razão da variação da ANS pela variação da PAM.

Resposta reflexa da frequência cardíaca (FC)		
Grupos	**Resposta pressora *Slope* (bpm/mmHg)**	**Resposta depressora *Slope* (bpm/mmHg)**
CTR	-2,17 ± 0,06	-2,55 ± 0,04
DM	-1,92 ± 0,04	-2,09 ± 0,03*
DM BRD	-2,09 ± 0,14	-3,13 ± 0,05#
Resposta reflexa da atividade nervosa simpática renal (ANSr)		
Grupos	**Resposta pressora *Slope* (pps/mmHg)**	**Resposta depressora *Slope* (pps/mmHg)**
CTR	-1,26 ± 0,06	-1,41 ± 0,09
DM	-0,93 ± 0,12*	-0,84 ± 0,05*
Resposta reflexa da atividade nervosa simpática lombar (ANSl)		
Grupos	**Resposta pressora *Slope* (pps/mmHg)**	**Resposta depressora *Slope* (pps/mmHg)**
CTR	-1,37 ± 0.11	-1,28 ± 0,05
DM	-0,83 ± 0.08*	-0,70 ± 0,03*
DM BRD	-1,46 ± 0.20#	-1,61 ± 0,16#
Resposta reflexa da atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe)		
Grupos	**Resposta pressora *Slope* (pps/mmHg)**	**Resposta depressora *Slope* (pps/mmHg)**
CTR	-1,45 ± 0,10	-0,37 ± 0,04
DM	-1,18 ± 0,09	-0,45 ± 0,10
DM BRD	-1,80 ± 0,12#	-0,76 ± 0,07*#

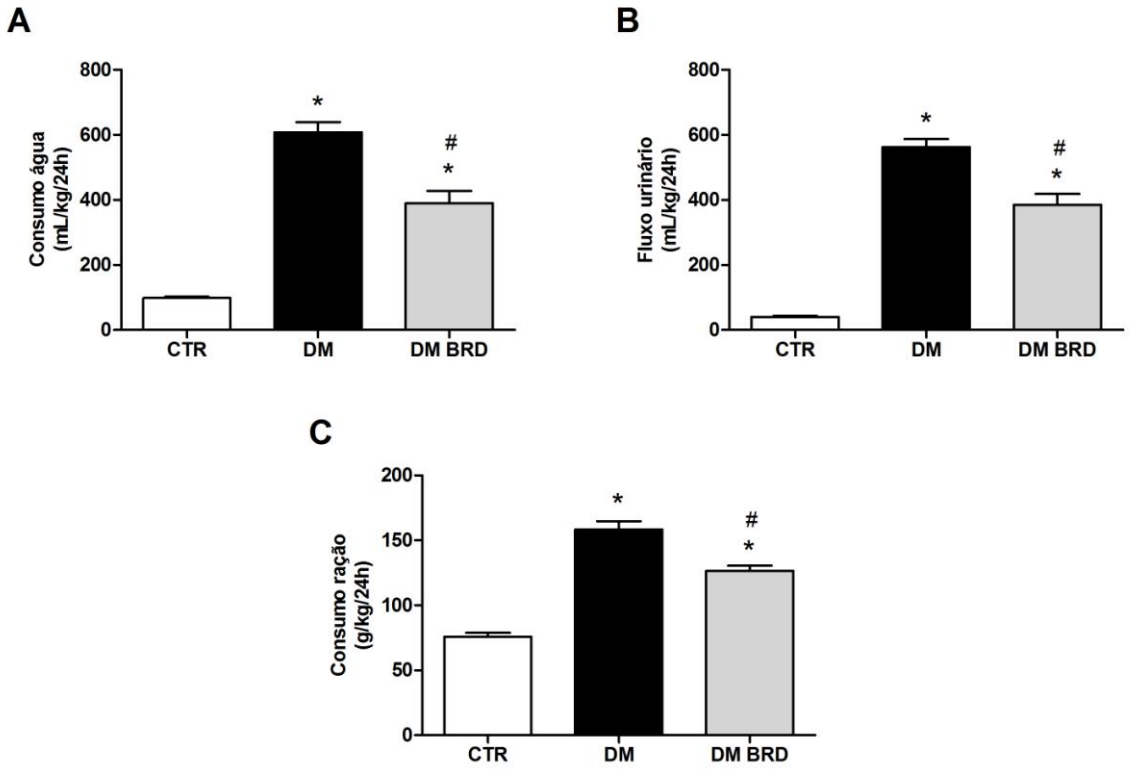
Representação dos *slopes*, inclinação da reta através de regressão linear, por meio da razão da variação da FC pela variação da PAM ou por meio da razão da variação da ANS pela variação da PAM. Os resultados foram representados em bpm/mmHg ou pps/mmHg, respectivamente. Grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3 Parâmetros metabólicos

5.3.1 Ingestão de água, fluxo urinário e consumo de ração

Os animais diabéticos apresentaram aumento do consumo de água, fluxo urinário e consumo de ração (608,0 ± 31,33 mL/kg/24h; 562,0 ± 25,1 mL/kg/24h e 158,3 ± 6,44 g/kg/24h) comparados aos animais controles (98,0 ± 4,29 mL/kg/24h; 40,0 ± 3,10 mL/kg/24h e 75,8 ± 3,02 g/kg/24h). Contudo, aparentemente, a BRD atenuou a progressão do diabetes ao passo que esses parâmetros metabólicos foram reduzidos (380, 4 ± 37,49 mL/kg/24h; 385,0 ± 33,3 mL/kg/24h e 126,6 ± 3,90 g/kg/24h) em relação ao grupo DM, como representado na Figura 16 A, B e C, respectivamente.

Figura 16. Parâmetros metabólicos de caracterização do DM.

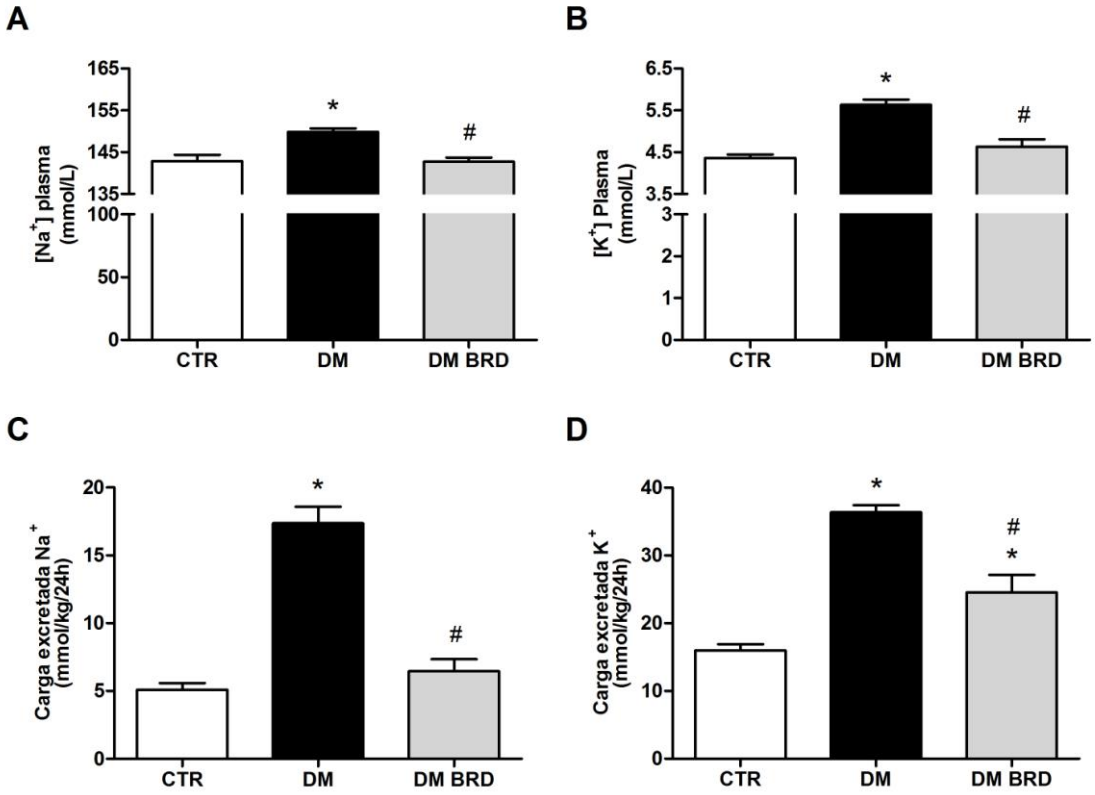


(A) Consumo de água, (B) Fluxo urinário e (C) Consumo de ração nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.2 Concentração plasmática e carga excretada de Na^+ e K^+

A concentração plasmática de Na^+ e K^+ encontrou-se aumentada no grupo DM (149,9 ± 0,83 e 5,64 ± 0,12 mmol/L, respectivamente) e a BRD promoveu redução e normalização destes parâmetros (142,7 ± 1,02 e 4,6 ± 0,18 mmol/L, respectivamente, Figura 17 A e B). Em relação à carga excretada de Na^+ de 24h foi aumentada no grupo diabético (17,3 ± 1,22 mmol/kg/24h) e significantemente reduzida pela BRD (6,4 ± 0,89 mmol/kg/24h, Figura 17 C). De modo semelhante, a carga excretada de K^+ foi aumentada no grupo diabético (DM 36,3 ± 1,03 mmol/kg/24h) e reduzida, porém não normalizada no grupo BRD (24,5 ± 2,57 mmol/kg/24h) quando comparada ao CTR (15,9 ± 0,91 mmol/kg/24h, Figura 17 D).

Figura 17. Concentrações plasmáticas e urinárias de Na^+ e K^+.



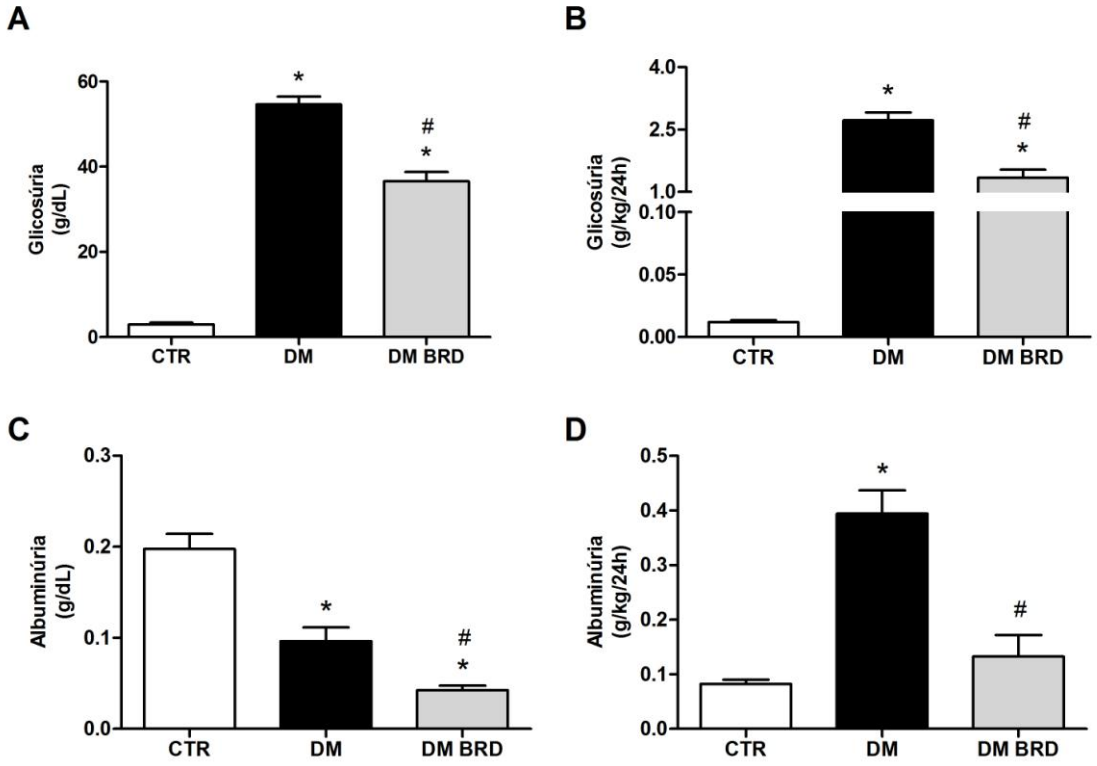
(A) Concentração plasmática de Na^+, (B) Concentração plasmática de K^+, (C) Carga excretada de Na^+ e (D) Carga excretada de K^+ nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.3 Concentração urinária e carga excretada de glicose e albumina

Como esperado, os animais diabéticos apresentaram um aumento da concentração e carga excretada de glicose na urina (54,5 ± 1,89 g/dL e; 2,7 ± 0,19 g/kg/24h, respectivamente) em comparação aos controles (2,9 ± 0,36 g/dL e 0,01 ± 0,001 g/kg/24h, Figura 18 A e B). Interessantemente, a BRD apesar de não normalizar esses parâmetros foi capaz de reduzir tanto a concentração urinária (36,6 ± 2,15 g/dL) quanto a carga excretada de glicose (1,3 ± 0,19 g/kg/24h) nos animais diabéticos.

Por outro lado, a concentração urinária de albumina encontrou-se diminuída nos grupos diabéticos submetidos ou não a BRD (DM: 0,09 ± 0,01 e DM BRD: 0,04 ± 0,004 g/dL, respectivamente) em relação ao grupo CTR (1,19 ± 0,01 g/dL, Figura 18 C). Entretanto, a carga excretada de albumina em 24h foi maior nos animais DM (0,39 ± 0,04 g/kg/24h), em relação ao grupo CTR (0,08 ± 0,008 g/kg/24h, Figura 17 D) e a BRD foi capaz de reduzir e normalizar este parâmetro nos animais diabéticos (0,13 ± 0,04 g/kg/24h, Figura 18 D). Indicando, assim, que a BRD foi capaz de impedir a lesão glomerular nos animais DM.

Figura 18. Indicadores de lesão glomerular.

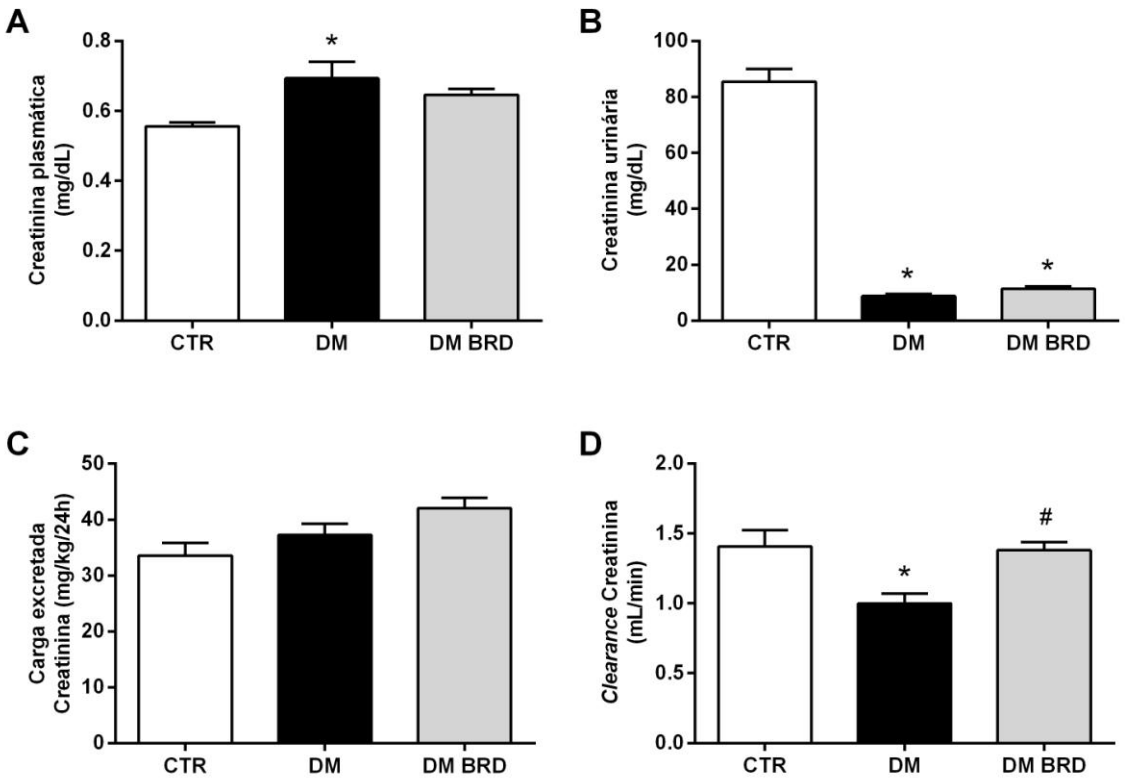


(A) Concentração urinária de glicose, (B) Carga excretada de glicose, (C) Concentração urinária de albumina e (D) Carga excretada de albumina nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.4 Concentração plasmática e urinária, carga excretada e *clearance* de creatinina

A concentração de creatinina plasmática encontrou-se aumentada no grupo DM (0,69 ± 0,04 mg/dL) quando comparada ao CTR (0,55 ± 0,01 mg/dL, Figura 19 A). Porém, a concentração de creatinina urinária foi reduzida nos grupos diabéticos (DM 8,78 ± 0,72 e DM BRD: 11,39 ± 0,83 mg/dL) comparados ao grupo CTR (85,5 ± 4,54 mg/dL, Figura 19 B). Quando a concentração de creatinina urinária foi normalizada pelo fluxo urinário (carga excretada), não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Figura 18 C). Entretanto, o *clearance* de creatinina, importante marcador de função renal, encontrou-se reduzido no grupo DM (0,99 ± 0,07 mL/min) em comparação ao grupo CTR (1,40 ± 0,11 mL/min) e, a BRD normalizou este parâmetro (1,38 ± 0,05 mL/min), como pode ser visto na Figura 19 D.

Figura 19. Marcador de função renal - creatinina.

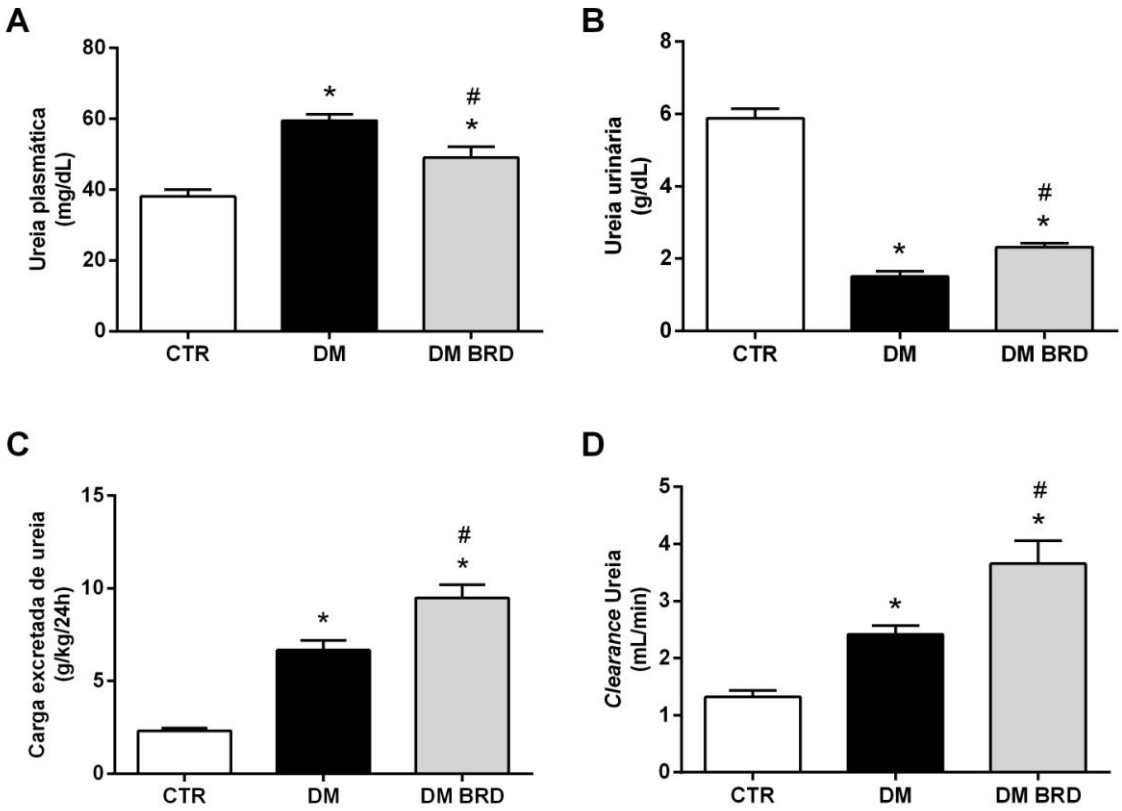


(A) Concentração plasmática de creatinina, (B) Concentração urinária de creatinina, (C) Carga excretada de creatinina e (D) *Clearance* de creatinina nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.5 Concentração plasmática e urinária, carga excretada e *clearance* de ureia

Os animais diabéticos apresentaram aumento da concentração de ureia plasmática (59,5 ± 1,72 mg/dL) em relação ao grupo CTR (38,1 ± 1,88 mg/dL) e, a BRD promoveu redução (49,0 ± 3,12 mg/dL) deste parâmetro quando comparada ao grupo DM (Figura 20 A). Já a concentração de ureia urinária, de modo semelhante à creatinina, esteve reduzida no grupo DM (1,5 ± 0,14 g/dL) em comparação com o CTR (5,9 ± 0,26 g/dL), enquanto a BRD promoveu aumento (2,3 ± 0,09 g/dL) deste marcador em comparação ao grupo DM (Figura 20 B). Quando a concentração de ureia foi normalizada pelo fluxo urinário (carga excretada), os animais diabéticos apresentaram aumento (DM 6,7 ± 0,52 g/kg/24h) em relação ao CTR (2,3 ± 0,15 g/kg/24h) e a BRD promoveu um aumento ainda maior (9,5 ± 0,69 g/kg/24h) deste marcador (Figura 20 C). Desta maneira, o *clearance* de ureia esteve aumentado nos animais diabéticos (DM 2,4 ± 0,15 mL/min) comparados ao CTR (1,3 ± 0,11 mL/min) e a BRD promoveu um aumento adicional (3,6 ± 0,39 mL/min) deste marcador (Figura 20 D).

Figura 20. Marcador de função renal - ureia.

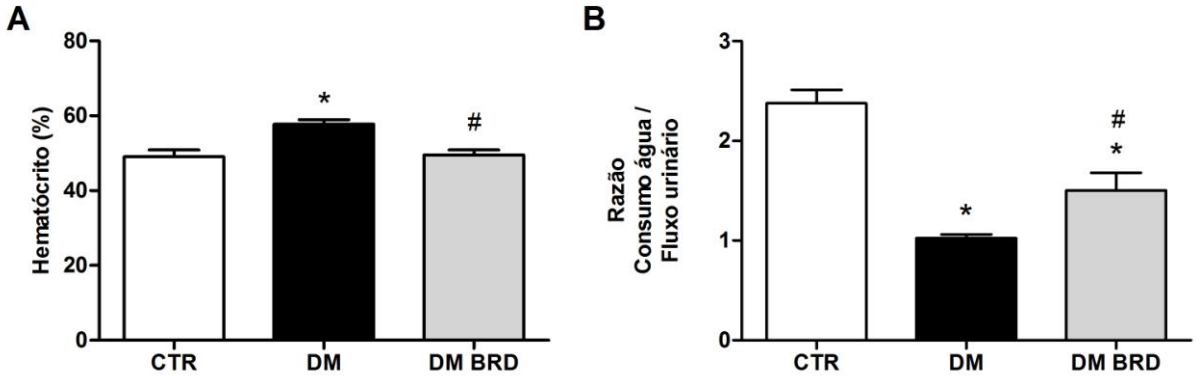


(A) Concentração plasmática de ureia, (B) Concentração urinária de ureia, (C) Carga excretada de ureia e (D) *Clearance* de ureia nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.6 Hematócrito e razão do consumo de água pelo fluxo urinário

O hematócrito do grupo DM encontrou-se aumentado (58%) em relação ao grupo CTR (49%). Porém, a BRD reduziu e normalizou (49%) este parâmetro (Figura 21 A). Quanto à razão entre o consumo de água e o fluxo urinário de 24h, os animais diabéticos apresentaram redução (DM 1,0 ± 0,03) comparados aos controles (2,4 ± 0,13) e a BRD aumentou esta razão (1,5 ± 0,17, Figura 21 B).

Figura 21. Marcadores de hidratação.

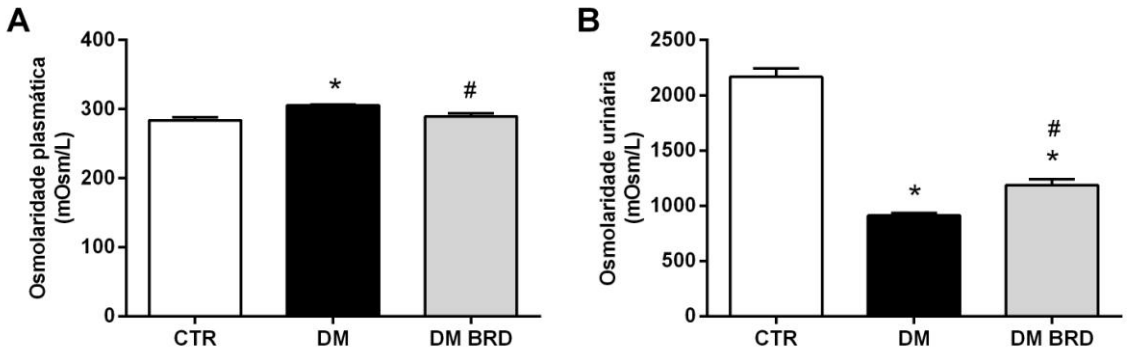


(A) Hematócrito e (B) Razão do consumo de água pelo fluxo urinário avaliados nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.7 Osmolaridade plasmática e urinária

A osmolaridade plasmática dos animais diabéticos encontrou-se aumentada (DM 305,6 ± 1,20 mOsm/L) em comparação ao grupo CTR (283,9 ± 4,27 mOsm/L). Contudo, a BRD promoveu redução e normalização (289,4 ± 4,68 mOsm/L) deste parâmetro (Figura 22 A). De modo contrário, a osmolaridade urinária esteve reduzida no grupo diabético (DM 914,5 ± 21,37 mOsm/L) em relação ao grupo CTR (2168 ± 77,22 mOsm/L) e a BRD promoveu aumento (1190 ± 52,71 mOsm/L) deste parâmetro (Figura 22 B).

Figura 22. Balanço hídrico.



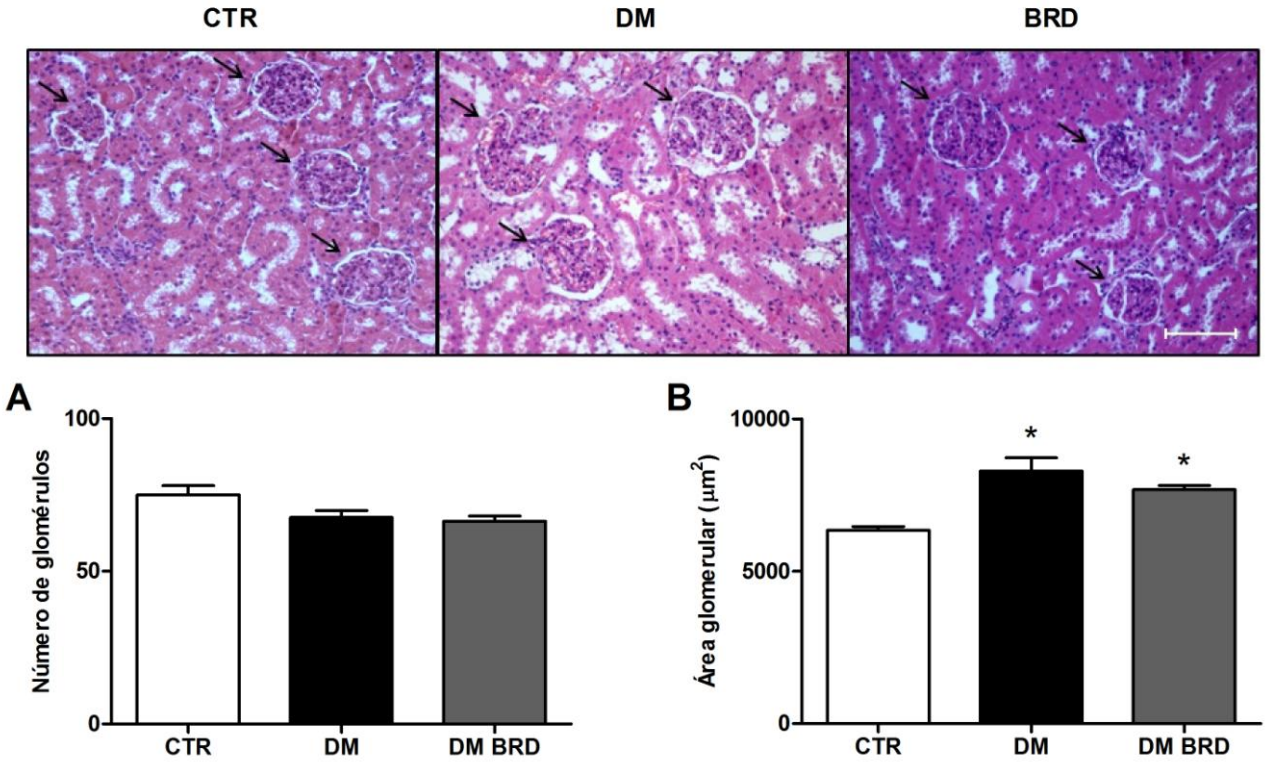
(A) Osmolaridade plasmática e (B) Osmolaridade urinária nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.8 Histologia renal

5.3.8.1 Morfologia renal

O número total de glomérulos não diferiu estatisticamente entre os grupos estudados, como pode ser observado nas fotomicrografias e gráficos representados na Figura 23 A. Diferentemente disso, a média da área glomerular dos campos histológicos estudados apresentou-se estatisticamente aumentada (hipertrofia glomerular) nos rins dos animais diabéticos e dos diabéticos denervados comparados aos animais controles (Figura 23 B).

Figura 23. Morfologia renal.

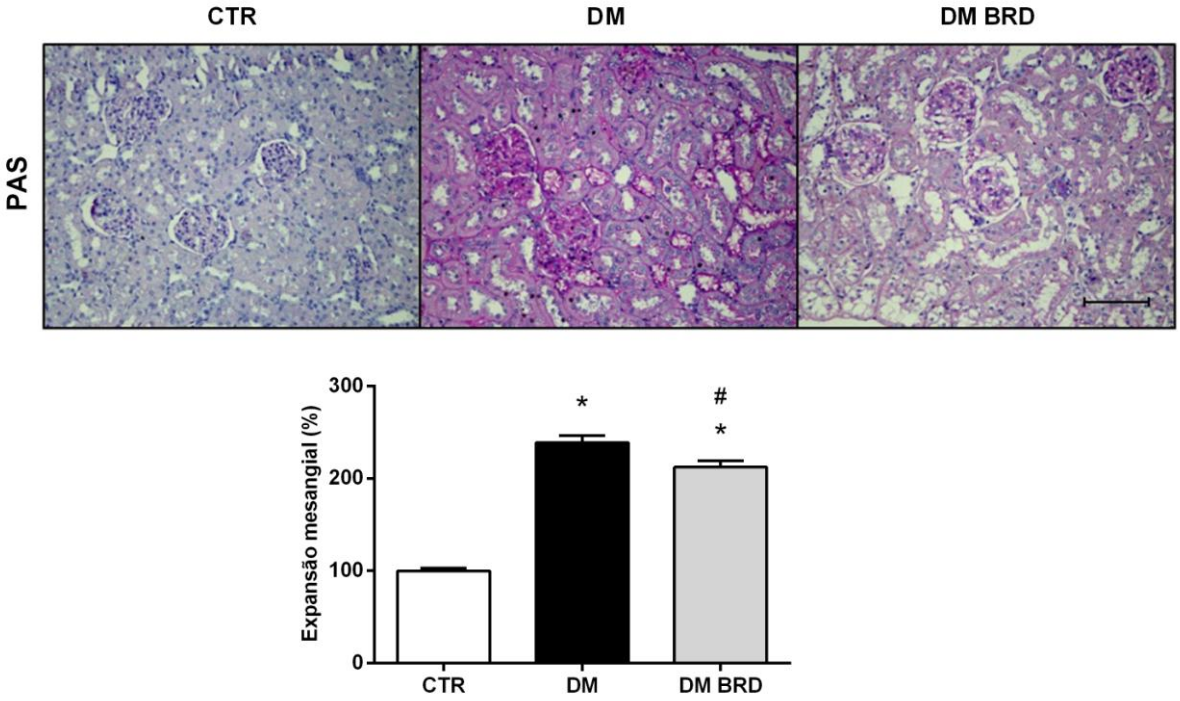


(A) Número de glomérulos e (B) Área glomerular dos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Fotomicrografias na objetiva de 20x; magnificação de 200x; escala de 50 μm.

5.3.8.2 Expansão mesangial

O grupo diabético apresentou um aumento significativo (238,9 ± 7,71 %) do quadro de expansão mesangial em comparação ao grupo CTR (100,0 ± 3,19 %). Curiosamente, a denervação renal reduziu significativamente a expansão mesangial (212,4 ± 6,67 %) em relação ao grupo DM, contudo não foi capaz de normalizar este achado histopatológico (Figura 24).

Figura 24. Expansão mesangial.

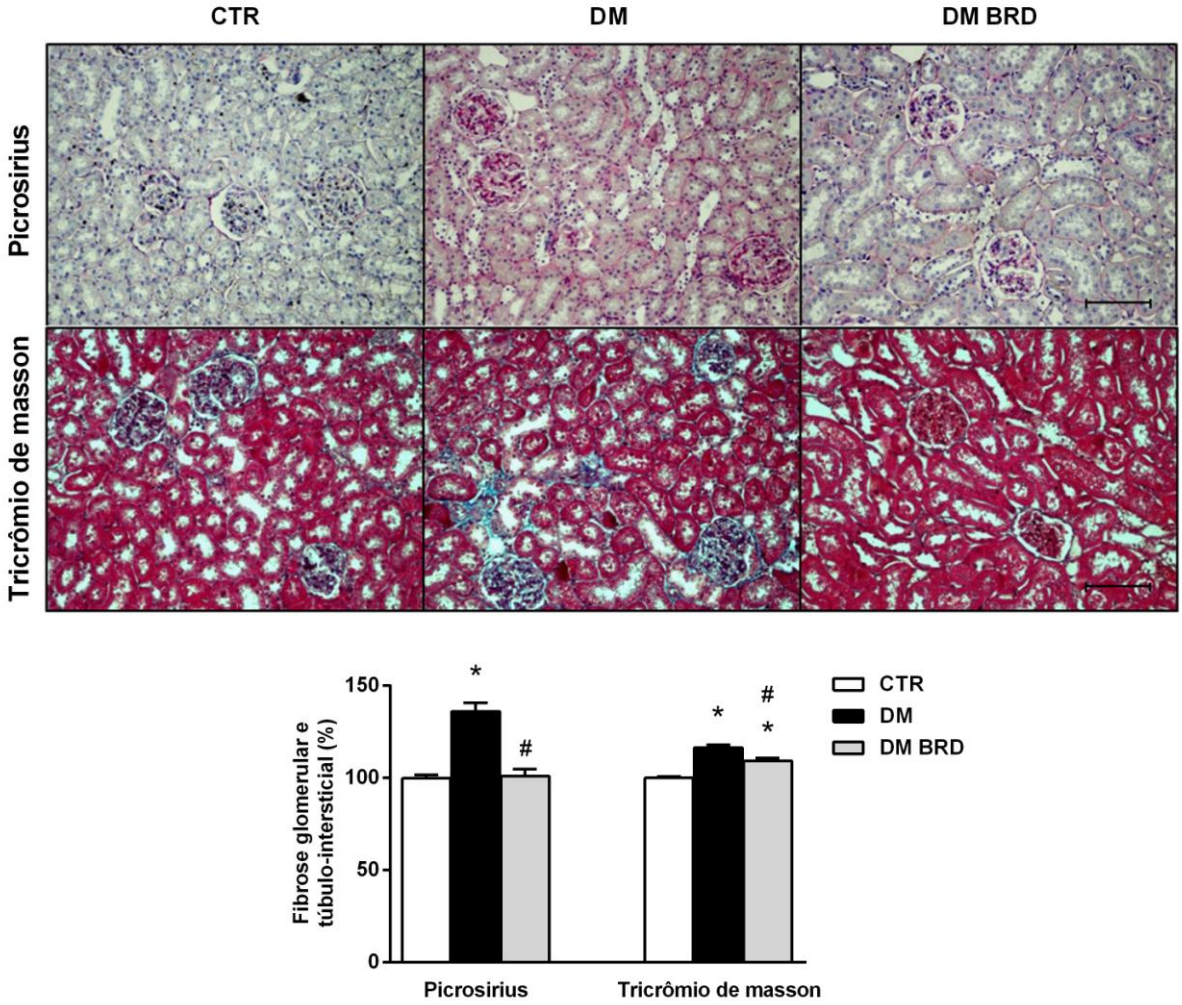


Expansão mesangial dos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Fotomicrografias na objetiva de 20x; magnificação de 200x; escala de 50 µm.

5.3.8.3 Fibrose glomerular e tubulointersticial.

De forma semelhante, o grupo DM apresentou um aumento significativo (136,0 ± 4,74 % e 116,4 ± 1,27 %) do quadro de fibrose glomerular e tubulo-intersticial em comparação ao grupo CTR (100,0 ± 1,84 % e 100,0 ± 0,81 %), avaliada pela coloração picrosírius e tricrômio de masson, respectivamente. Contudo, a denervação renal promoveu redução da fibrose glomerular e tubulointersticial (101,0 ± 3,77 % e 109,3 ± 1,16 %) em relação ao grupo DM, sendo capaz de normalizar este achado histopatológico segundo a coloração picrosírius (Figura 25).

Figura 25. Fibrose glomerular e túbulo-intersticial.



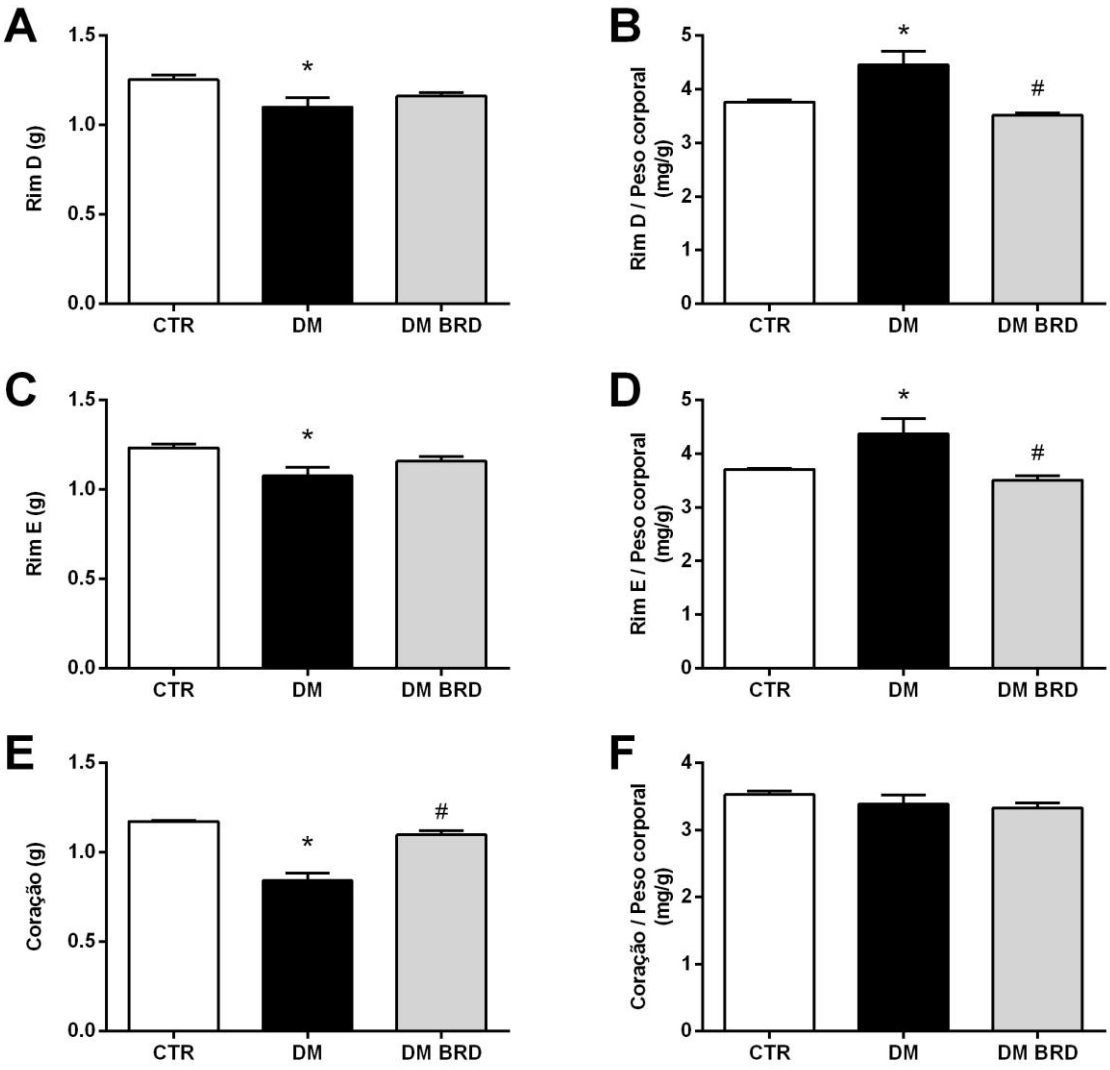
Fibrose glomerular e túbulo-intersticial dos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Fotomicrografias na objetiva de 20x; magnificação de 200x; escala de 50 µm.

5.3.9 Peso dos órgãos internos: rins e coração

Em relação ao peso absoluto (g) dos rins direito e esquerdo e do coração observou-se uma redução estatística dos animais diabéticos (1,10 ± 0,05; 1,07 ± 0,05 e 0,84 ± 0,04 g, respectivamente) em comparação ao grupo CTR (1,25 ± 0,03; 1,23 ± 0,02 e 1,17 ± 0,01 g, respectivamente) e, a denervação renal promoveu normalização do peso destes órgãos, não apresentando diferença estatística (1,16 ± 0,02; 1,15 ± 0,02 e 1,09 ± 0,02 g, respectivamente) em relação ao grupo CTR (Figura 26 A, C e E).

Quando avaliada a razão entre o peso dos órgãos e o peso corpóreo dos animais, evidenciou-se que os rins direito e esquerdo dos animais diabéticos apresentaram aumento significativo desta razão (4,45 ± 0,25 e 4,37 ± 0,28 mg/g, respectivamente) quando comparados ao grupo CTR (3,76 ± 0,03 e 3,70 ± 0,02 mg/g, respectivamente). De forma semelhante ao resultado do peso absoluto dos órgãos, a DRB promoveu normalização deste parâmetro (3,51 ± 0,04 e 3,51 ± 0,07 mg/g, respectivamente). A razão do peso do coração pelo peso corpóreo não apresentou diferença estatística (CTR: 3,52 ± 0,05; DM: 3,39 ± 0,13 e DM BRD: 3,32 ± 0,07 mg/g) entre os grupos estudados (Figura 26 B, D e F).

Figura 26. Peso dos órgãos internos: rins e coração.

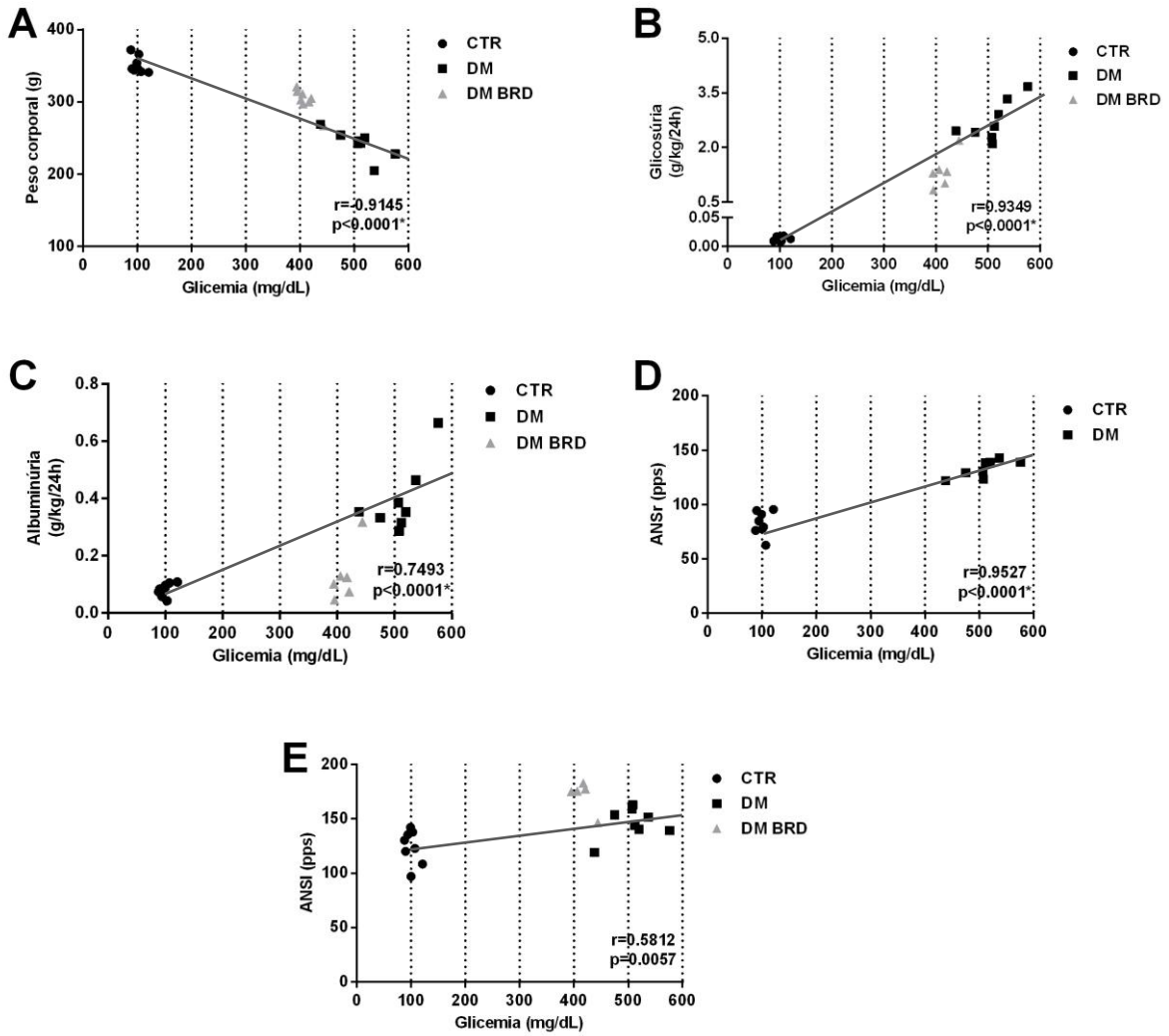


(A) Peso do rim direito (Rim D), (B) Peso do rim direito (Rim D) dividido pelo peso corporal dos animais, (C) Peso do rim esquerdo (Rim E), (D) Peso do rim esquerdo (Rim E) dividido pelo peso corporal dos animais, (E) Peso do coração e (F) Peso do coração dividido pelo peso corporal dos animais dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.10 Correlações de variáveis metabólicas, renais e autonômicas

A glicemia possui uma correlação linear positiva estatisticamente significativa quando comparada a glicosuria, albuminuria e ANSr dos grupos estudados (Figura 27 B, C e D). No sentido contrário, a glicemia possui uma correlação linear negativa, mas também estatisticamente significativa quando comparada ao peso corporal dos grupos estudados (Figura 27 A). Em relação a glicemia e a ANSl, não foi encontrada correlação significativa entre esses parâmetros (Figura 27 E).

Figura 27. Correlações metabólicas, renais e autonômicas.

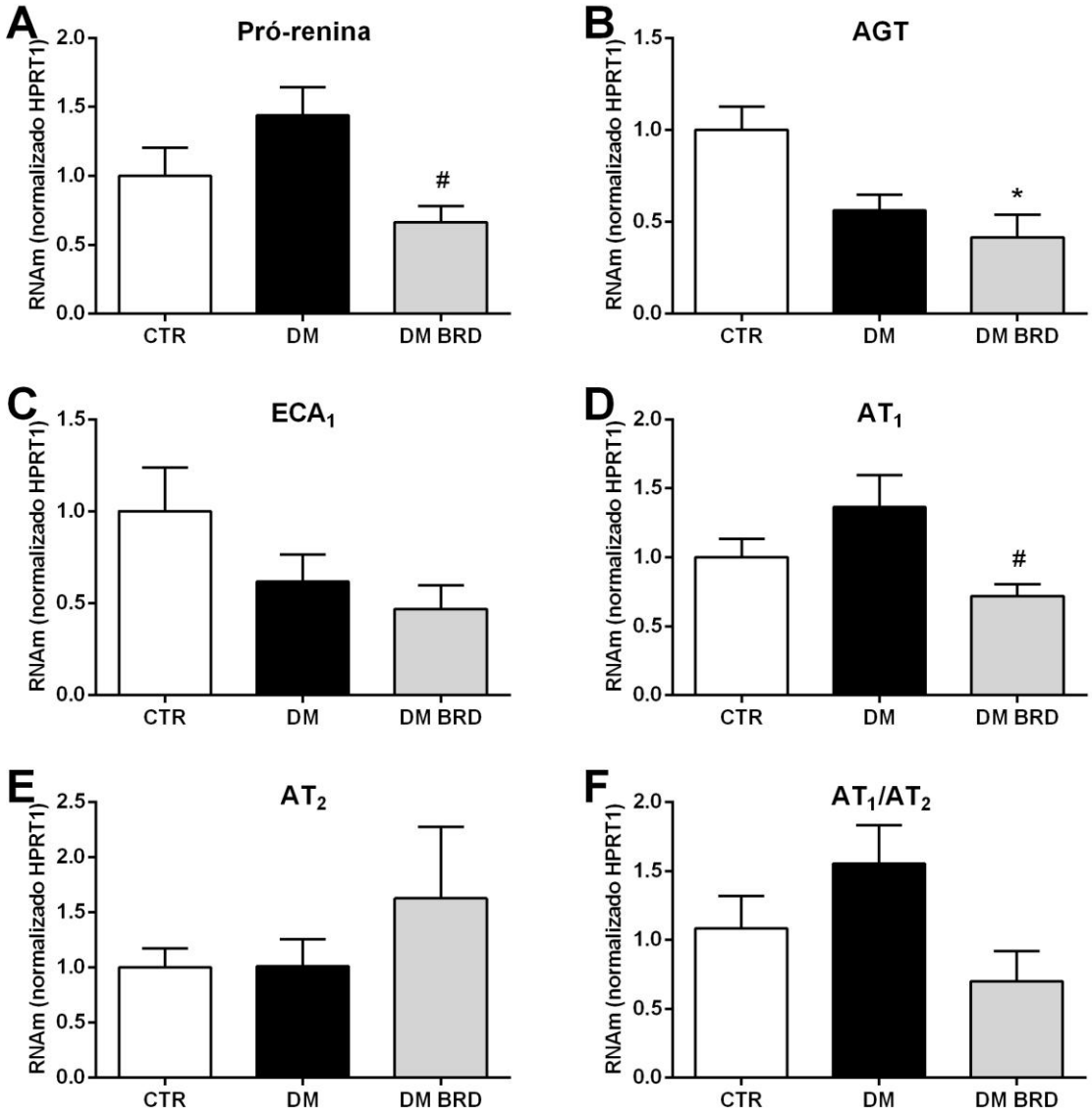


Correlação entre glicemia e peso corporal (A), glicosuria (B), albuminuria (C), ANSr (D) e ANSI (E) dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais). *P<0,05; Teste de Correlação de *Pearson*.

5.3.11 Expressão gênica de componentes do SRAA nos rins

A expressão gênica de alguns componentes do SRAA, tais como pró-renina, angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina tipo I (ECA_1), receptores de Ang II tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), foi avaliada neste estudo. Os animais diabéticos denervados apresentaram redução estatística do AGT (0,41 ± 0,12) em relação aos animais controles (1,00 ± 0,12), como também apresentaram redução estatística da pró-renina (0,66 ± 0,11) e do receptor AT1 (0,72 ± 0,08) em relação aos animais diabéticos (1,44 ± 0,20 e 1,36 ± 0,23, respectivamente), normalizando os valores quando comparados ao grupo controle, como pode ser evidenciado na Figura 28 A, B, C, D e E.

Figura 28. Expressão gênica dos componentes do SRAA nos rins.

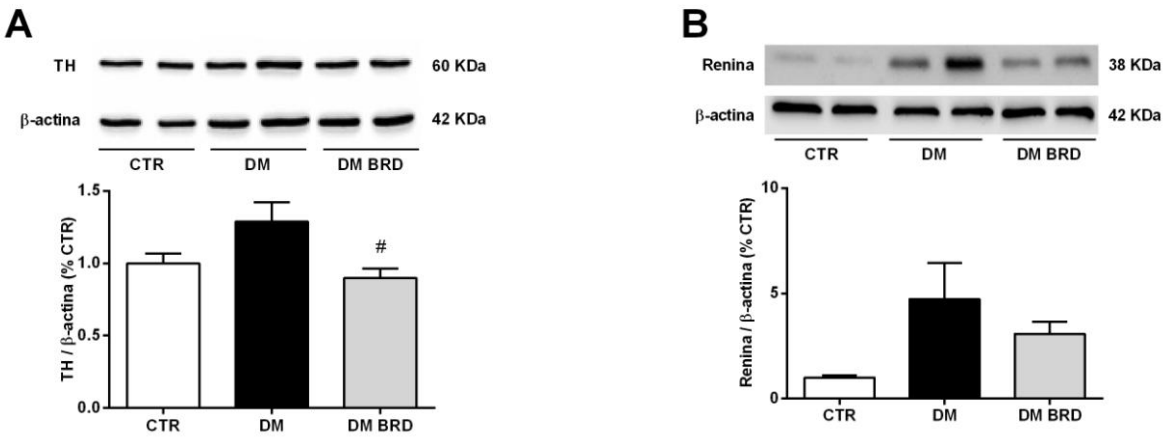


(A) Pró-renina, (B) Angiotensinogênio (AGT), (C) Enzima conversora de angiotensina 1 (ECA_1), (D) Receptor de angiotensina I (AT_1), (E) Receptor de angiotensina II (AT_2) e (F) Relação entre AT_1 e AT_2 (AT_1/AT_2) nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.12 Conteúdo proteico de tirosina hidroxila (TH) e renina nos rins.

Ao avaliar o conteúdo proteico de tirosina hidroxilase (TH) e renina nos rins dos grupos estudados, observou-se um aumento do TH no grupo DM (1,3 ± 0,13) quando comparado ao grupo CTR (1,00 ± 0,06). A denervação renal promoveu normalização do TH (0,90 ± 0,06), não apresentando diferença estatística em relação ao grupo CTR (Figura 29 A). Quanto ao conteúdo de renina, não foram encontradas alterações estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (CTR: 1,00 ± 0,10; DM: 4,73 ± 1,71 e DM BRD: 3,08 ± 0,57), provavelmente devido a grande variação intragrupo, contudo, o grupo DM apresentou uma tendência de aumento (Figura 29 B).

Figura 29. Conteúdo proteico de tirosina hidroxila (TH) e renina nos rins.

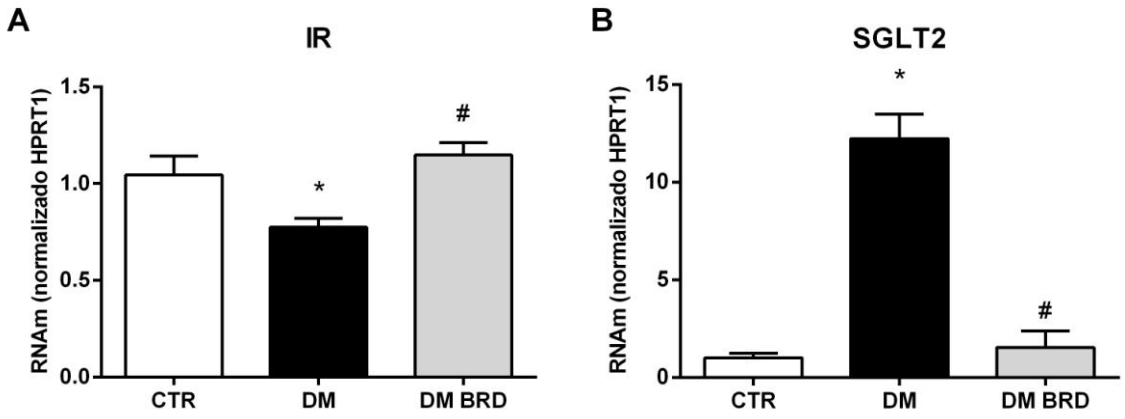


(A) Tirosina hidroxilase (TH) e (B) Renina nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.13 Expressão gênica de receptores de insulina (RI) e do cotransportador de Na^+/Glicose (SGLT2) nos rins

A expressão gênica dos receptores de insulina (RI) foi reduzida no grupo DM (0,77 ± 0,09) em comparação ao grupo CTR (1,0 ± 0,09), contudo, interessantemente, a denervação renal normalizou a expressão gênica desses receptores nos animais DM (1,1 ± 0,06, Figura 30 A). De forma contrária, a expressão gênica dos cotransportadores de Na+/glicose (SGLT2) foi aumentada no grupo DM (12,3 ± 1,25) em comparação ao grupo CTR (1,0 ± 0,24), entretanto, curiosamente a denervação renal também promoveu normalização deste cotransportador (1,5 ± 0,85, Figura 30 B).

Figura 30. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) e do cotransportador de Na^+/Glicose (SGLT2) nos rins.

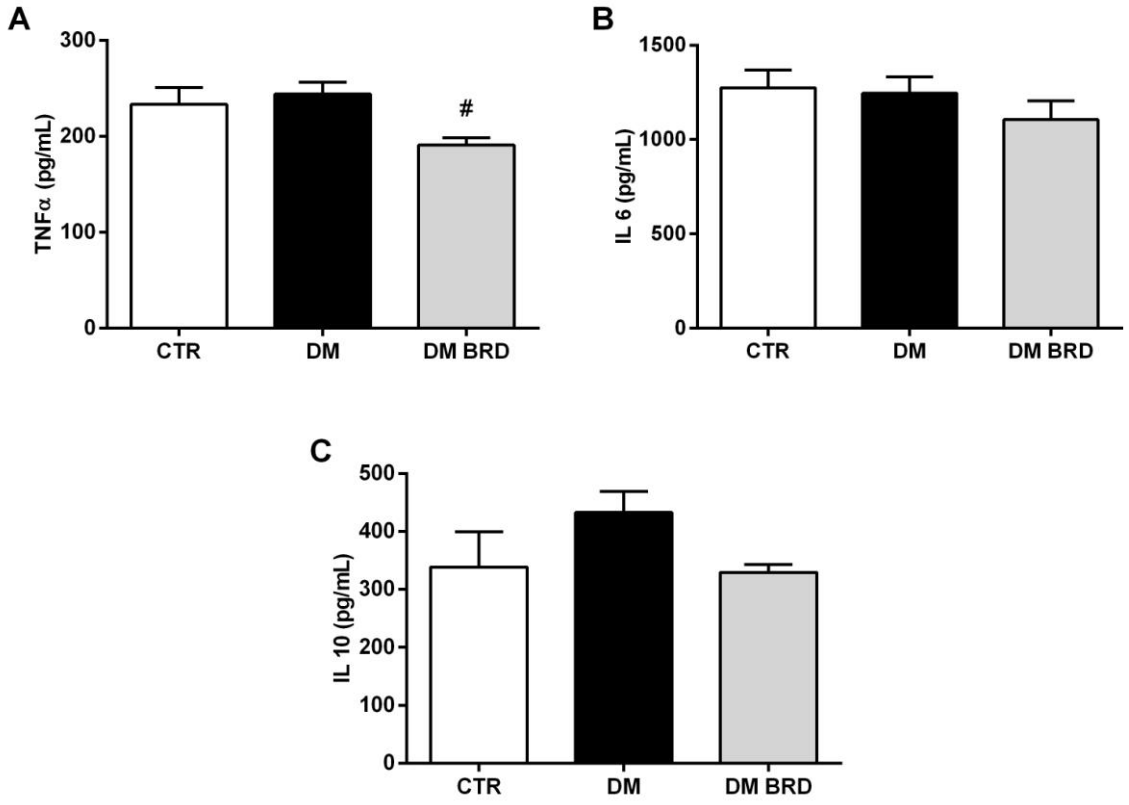


Receptores de Insulina (RI) e cotransportadores de Na^+/Glicose (SGLT2) nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.14 Perfil inflamatório nos rins

A concentração de algumas importantes citocinas foi avaliada nos rins, tais como: TNFα, interleucinas 6 e 10. A partir desta análise, verificamos que a denervação renal foi capaz de reduzir significativamente o TNFα (190,9 ± 7,53 pg/mL) em relação ao grupo DM (244,1 ± 12,19, Figura 31 A). Já o conteúdo proteico das interleucinas 6 e 10, não apresentaram alterações estatisticamente significantes entre os grupos experimentais avaliados (Figura 31 B e C, respectivamente).

Figura 31. Concentração de citocinas nos rins.

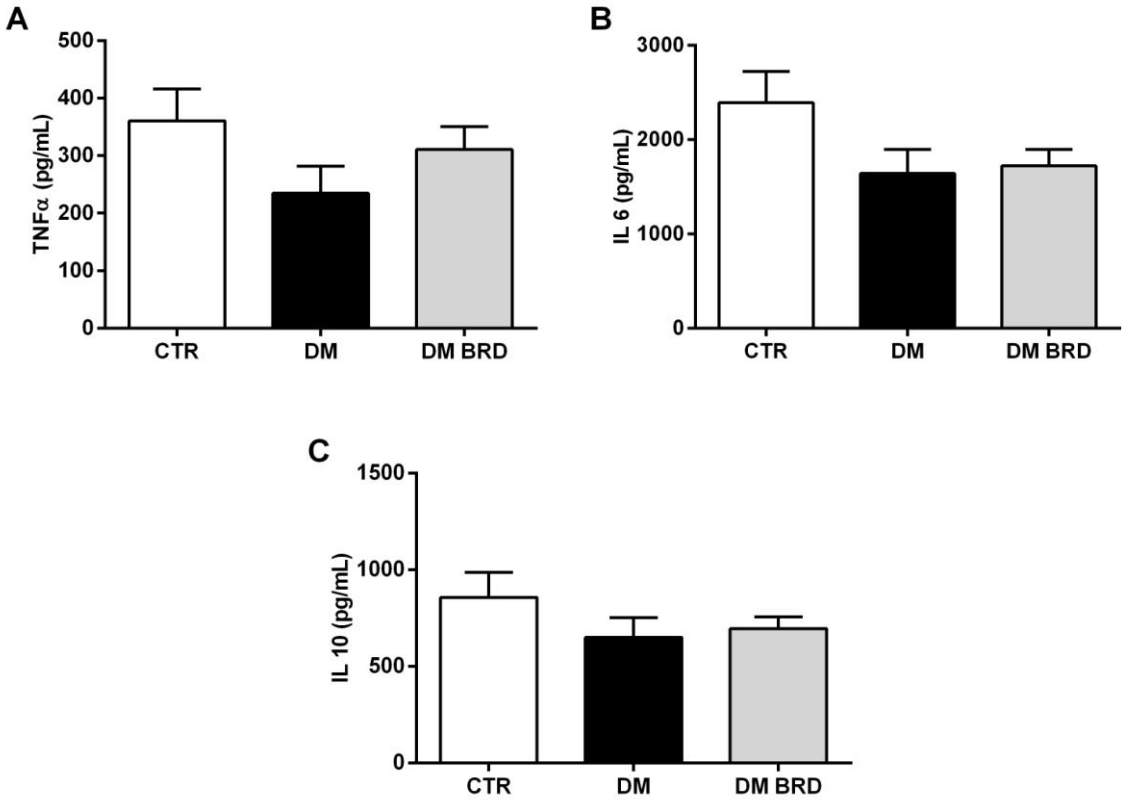


(A) Fator de necrose tumoral alfa (TNFα), (B) Interleucina 6 (IL 6) e (C) Interleucina 10 (IL 10) nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.15 perfil inflamatório no coração

A concentração das citocinas TNFα, IL 6 e IL 10 no coração, não diferiu estatisticamente entre os grupos experimentais avaliados (Figura 32 A, B e C).

Figura 32. Concentração de citocinas no coração.

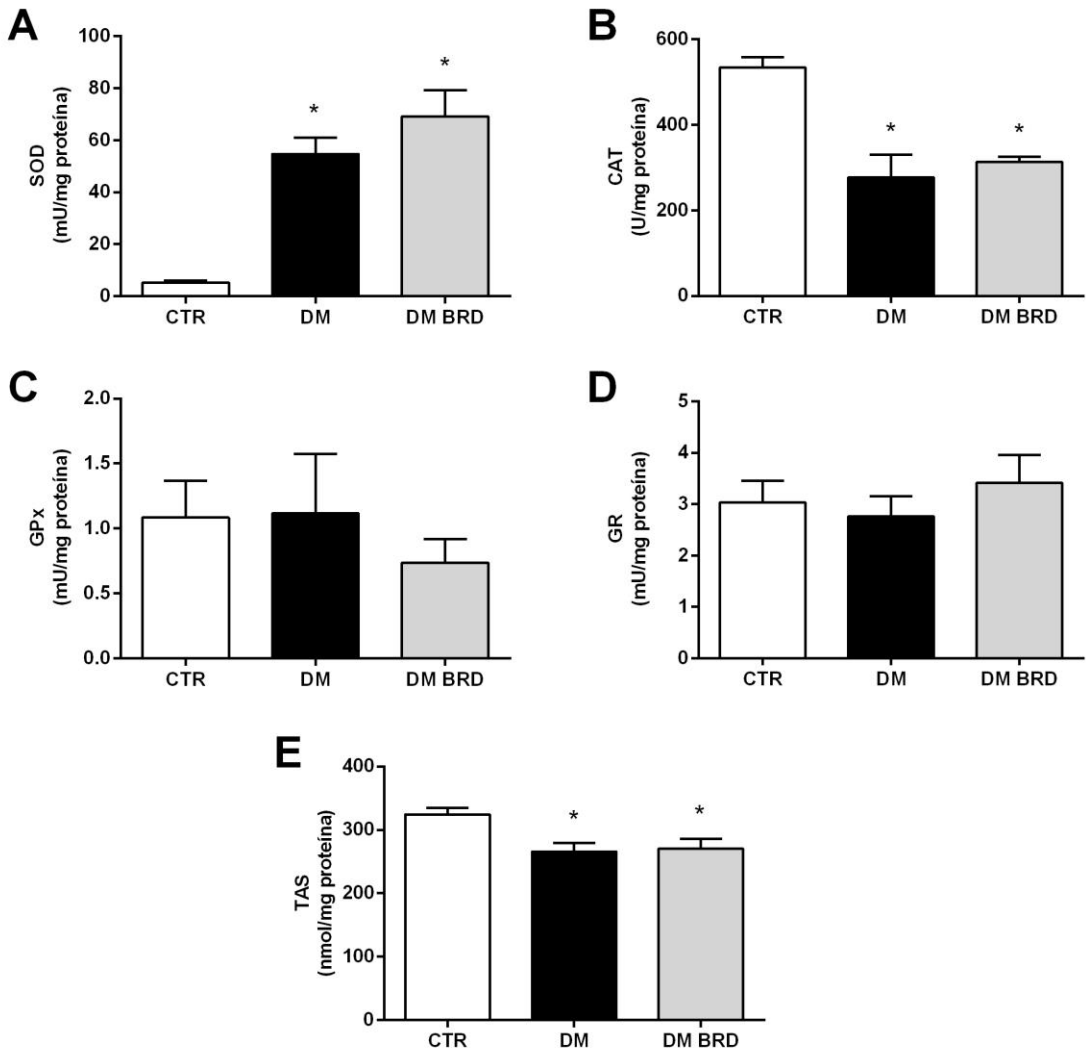


(A) Fator de necrose tumoral alfa (TNFα), (B) Interleucina 6 (IL 6) e (C) Interleucina 10 (IL 10) nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.16 Perfil oxidativo nos rins

O perfil oxidativo nos rins foi avaliado pela atividade de importantes enzimas envolvidas no balanço oxidativo do organismo. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) mostrou-se aumentada nos grupos diabéticos (DM: 54,7 ± 6,26 e DM BRD: 69,2 ± 10,02 mU/mg) em relação ao grupo CTR (5,2 ± 0,83 mU/mg, Figura 33 A). De forma contrária, a atividade da enzima catalase (CAT) e o total antioxidante (TAS) apresentaram-se reduzidos nos grupos diabéticos (DM: 277,5 ± 52,5 U/mg e 265,8 ± 13,54 nmol/mg; DM BRD: 313,1 ± 12,53 U/mg e 270,5 ± 15,38 nmol/mg, respectivamente) em comparação ao grupo CTR (534,0 ± 24,92 U/mg e 324,7 ± 10,66 nmol/mg, Figura 33 B e E). Quanto a atividade das enzimas glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais avaliados (Figura 33 C e D, respectivamente).

Figura 33. Perfil oxidativo nos rins.

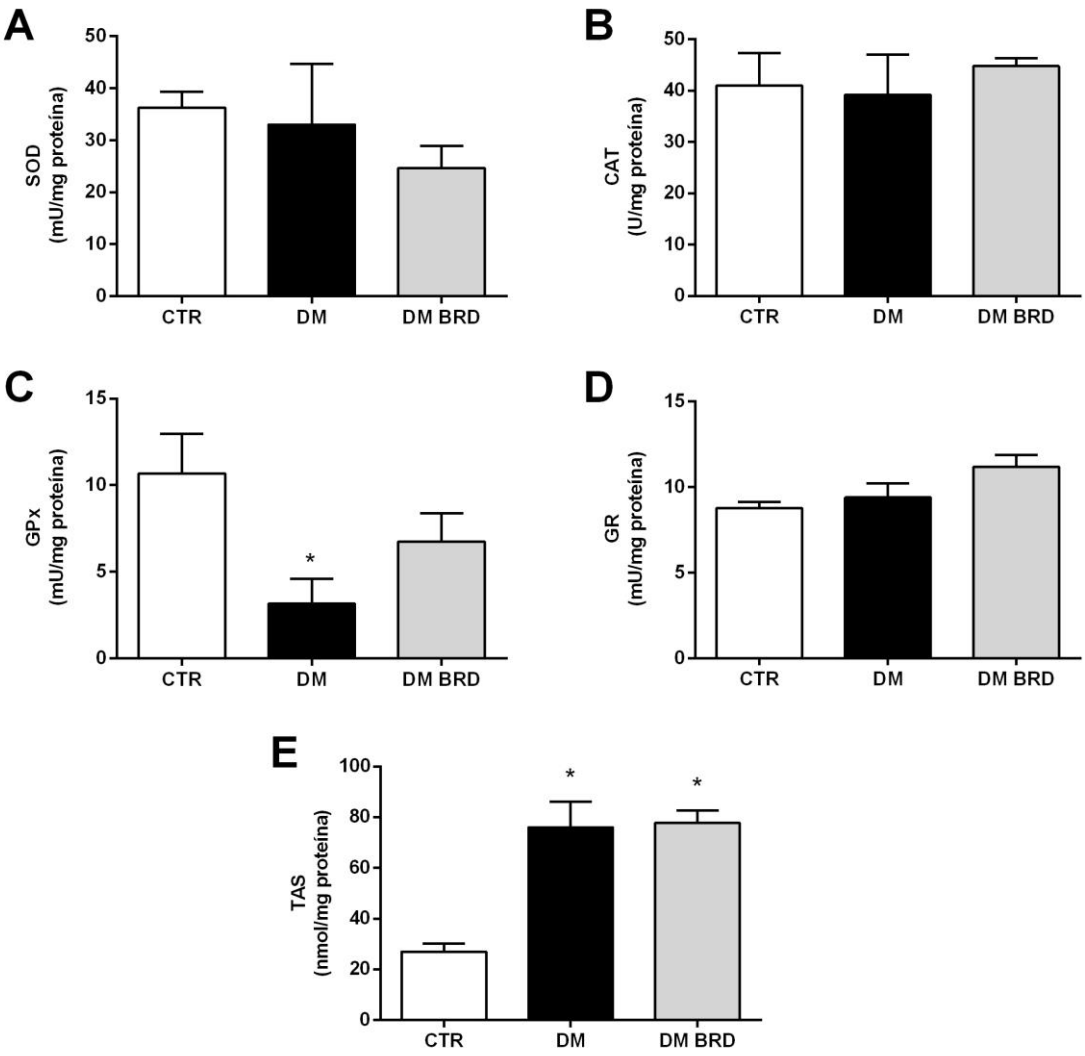


Atividade das enzimas (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Glutationa peroxidase (GPx), (D) Glutationa redutase (GR) e (E) Total antioxidante (TAS) nos rins dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.17 Perfil oxidativo no coração

A atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) foi reduzida no grupo DM (3,2 ± 1,92 mU/mg) em relação ao grupo CTR (10,7 ± 2,27 mU/mg), contudo, a denervação renal normalizou a atividade desta enzima (6,7 mU/mg 1,63 mU/mg, Figura 34 C). O total antioxidante (TAS) apresentou-se aumentado nos grupos diabéticos (DM: 76,0 ± 10,19 e DM BRD: 77,7 ± 4,96 nmol/mg) comparados ao grupo CTR (27,0 ± 3,16 nmol/mg, Figura 34 E). Quanto à atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa redutase (GR), não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais avaliados (Figura 34 A, B e D, respectivamente).

Figura 34. Perfil oxidativo no coração.

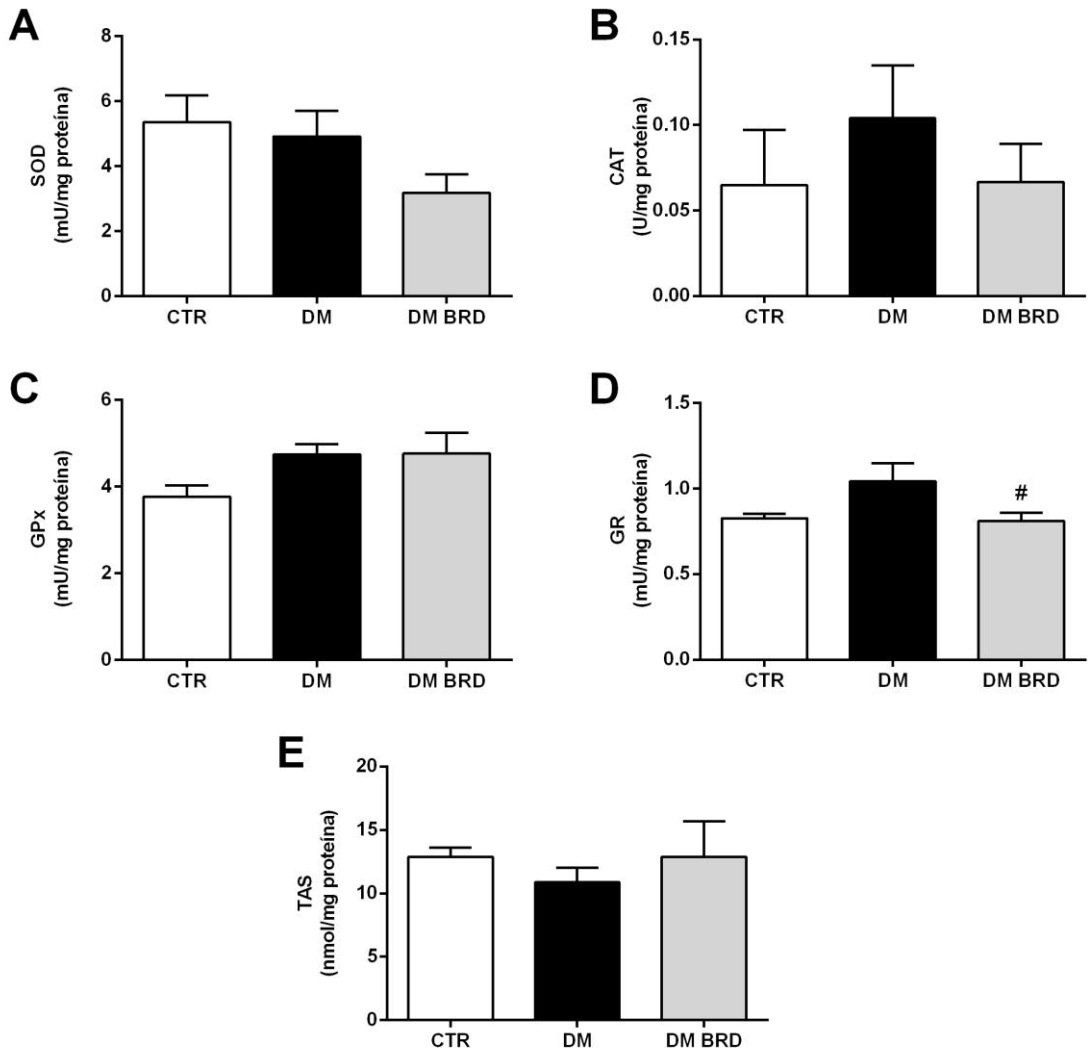


Atividade das enzimas (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Glutationa peroxidase (GPx), (D) Glutationa redutase (GR) e (E) Total antioxidante (TAS) no coração dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.3.18 Perfil oxidativo no soro

A atividade da enzima glutationa redutase (GR) foi reduzida no grupo DM BRD (0,8 ± 0,04 mU/mg) comparado ao grupo DM (1,0 ± 0,10 mU/mg), contudo, apresentou-se semelhante ao grupo CTR (0,8 ± 0,02 mU/mg, Figura 33 D). Em relação às atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e o total antioxidante (TAS), não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais avaliados (Figura 35 A, B, C e E, respectivamente).

Figura 35. Perfil oxidativo no soro.



Atividade das enzimas (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Glutationa peroxidase (GPx), (D) Glutationa redutase (GR) e (E) Total antioxidante (TAS) no soro dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); *P<0,05 vs CTR; #P<0,05 vs DM; one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

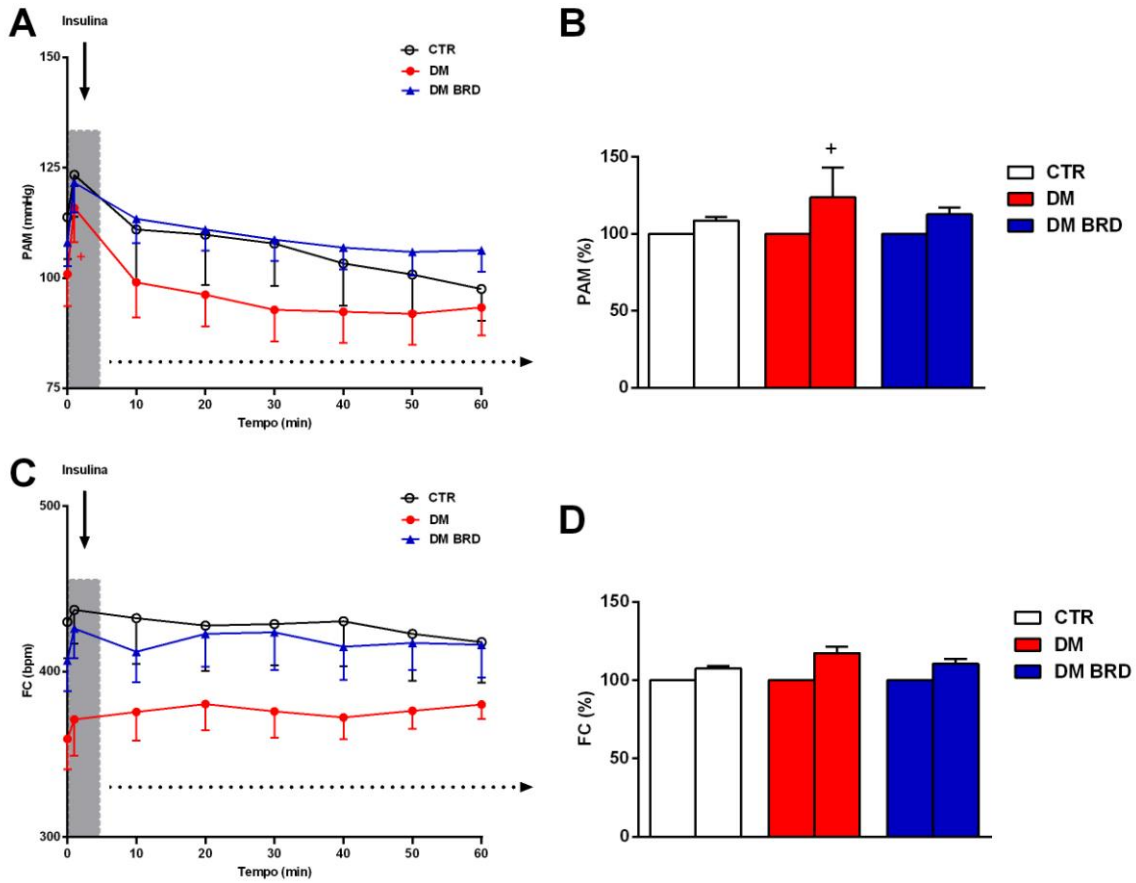
5.4 Análises funcionais e moleculares em regiões centrais importantes para o controle cardiovascular (NTS, PVN e RVLM)

5.4.1 Microinjeções na região RVLM: parâmetros cardiovasculares

Imediatamente após a microinjeção de insulina na região RVLM, foi observado um aumento significativo ($P<0,05$) da PAM apenas no grupo diabético em relação ao seu respectivo tempo basal. Porém, decorridos 10 min da microinjeção de insulina, houve retorno da PAM a valores semelhantes ao basal no grupo diabético. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos tempos avaliados (Figura 36 A).

Em relação à FC, pode-se observar um aumento sutil e fugaz, sem significância estatística, em todos os grupos experimentais. Tal comportamento perdurou até o final da curva temporal de 60 min, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos estudados (Figura 36 C). Os gráficos B e D da Figura 36 melhor representam a PAM e FC, respectivamente, no momento logo após a infusão aguda de insulina na região RVLM quando comparado aos valores basais, assim, os resultados foram expressos em porcentagem admitindo 100% como a média basal de cada grupo experimental, respectivamente.

Figura 36. Parâmetros cardiovasculares após infusão de insulina na região RVLM.



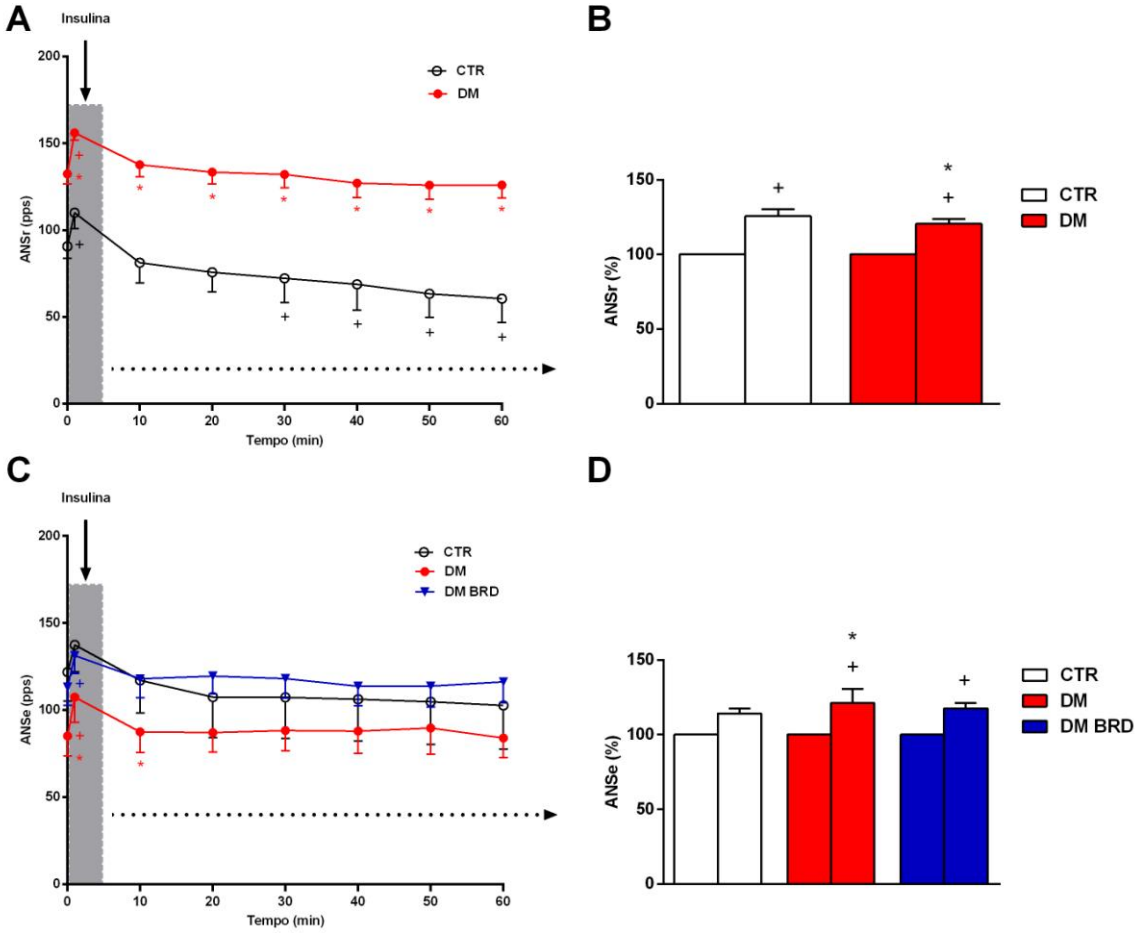
(A) Pressão arterial média (PAM), (B) Porcentagem de variação da PAM logo após infusão aguda de insulina, (C) Frequência cardíaca (FC) e (D) Porcentagem de variação da FC logo após infusão aguda de insulina avaliadas nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); +P<0,05 vs Basal; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*.

5.4.2 Microinjeções na região RVLM: parâmetros autonômicos

Quanto a ANSr e a ANSe logo após a microinjeção de insulina na região RVLM, também foi observado um aumento (P<0,05) da ANS para estes dois territórios simpáticos em todos os grupos experimentais, exceto para a ANSe do grupo CTR. A ANSr do grupo diabético apresentou diferença estatística (P<0,05) em todos os tempos avaliados em comparação ao grupo CTR, contudo, não apresentou diferença nos tempos avaliados em relação ao seu basal. Enquanto que o grupo CTR apresentou diferença estatística nos tempos 30, 40, 50 e 60 min em relação ao basal, como pode ser observado na Figura 37 A.

A ANSe do grupo diabético apresentou diferença estatística (P<0,05) logo após a infusão de insulina e no tempo 10 min em comparação ao grupo CTR. Entretanto, os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante no decorrer do tempo quando comparados aos seus respectivos valores basais, como pode ser evidenciado na Figura 37 C. Os gráficos B e D da Figura 37, melhor representam a ANS renal e esplâncnica, respectivamente, no momento logo após a infusão aguda de insulina na região RVLM quando comparado aos valores basais, assim, os resultados foram expressos em porcentagem admitindo 100% como a média basal de cada grupo experimental, respectivamente.

Figura 37. Atividade nervosa simpática renal (ANSr) e esplâncnica (ANSe) após infusão de insulina na região RVLM.

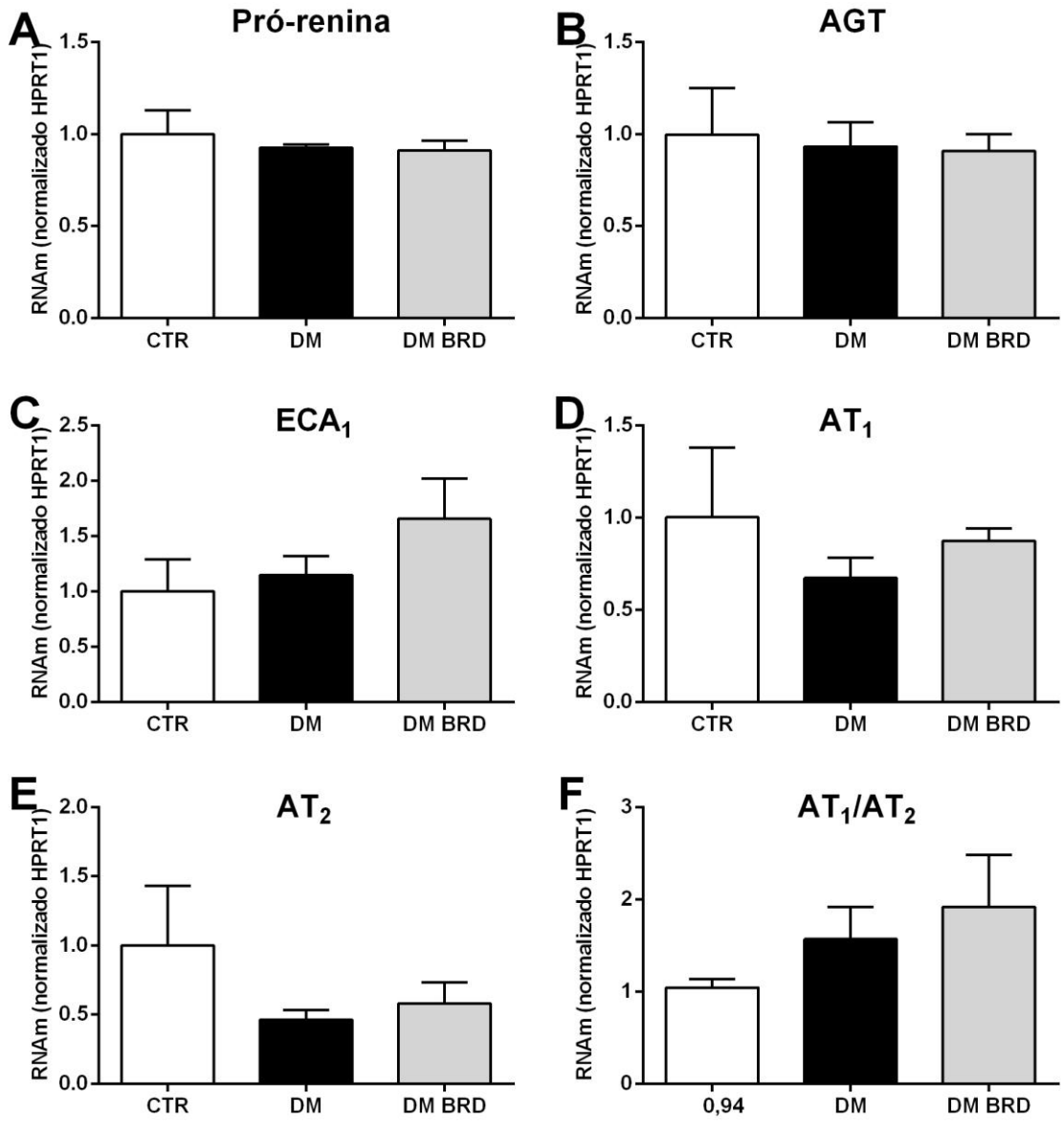


(A) Valores absolutos da atividade nervosa simpática renal (ANSr), (B) Porcentagem de variação da atividade nervosa simpática renal (ANSr), (C) Valores absolutos da atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe) e (D) Porcentagem de variação da atividade nervosa simpática esplâncnica (ANSe) nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); $^{+}$P<0,05 vs Basal; *P<0,05 vs CTR; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*.

5.4.3 Expressão gênica de componentes do SRAA no NTS

Em relação à expressão gênica de componentes do SRAA (pró-renina, angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina tipo 1 (ECA_1), receptor de Ang II tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2) e a relação entre AT_1/AT_2) no NTS, não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais avaliados (Figura 38 A, B, C, D e E, respectivamente).

Figura 38. Expressão gênica dos componentes do SRAA no NTS.

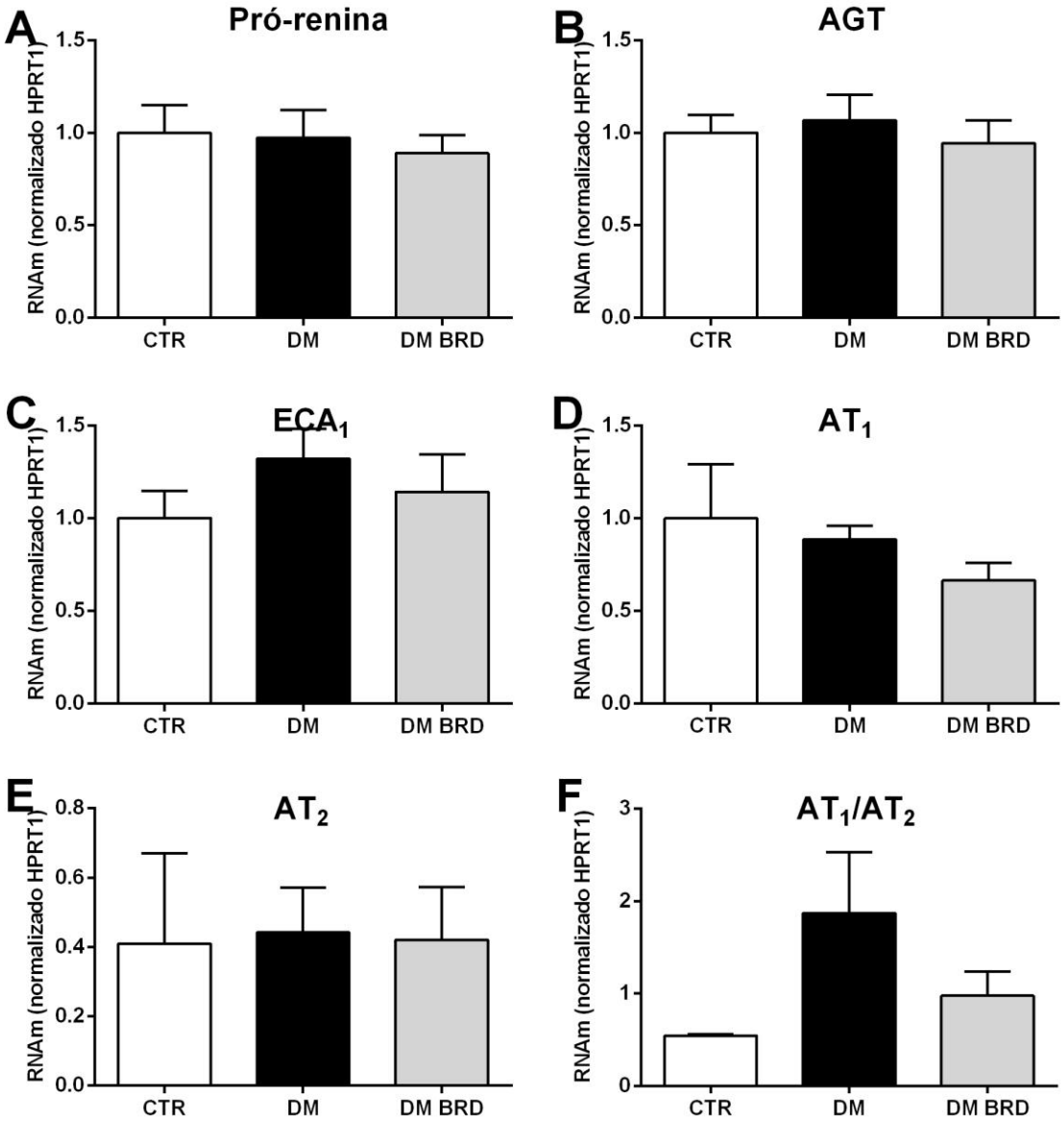


(A) Pró-renina, (B) Angiotensinogênio (AGT), (C) Enzima conversora de angiotensina 1 (ECA_1), (D) Receptor de angiotensina I (AT_1), (E) Receptor de angiotensina II (AT_2) e (F) Relação entre AT_1 e AT_2 (AT_1/AT_2) no Núcleo do Trato Solitário (NTS) dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.4.4 Expressão gênica de componentes do SRAA no PVN

Assim como observado na região do NTS, a expressão gênica de componentes do SRAA (pró-renina, angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina tipo 1 (ECA_1), receptor de Ang II tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2) e a relação entre AT_1/AT_2) não foram significativamente diferentes na região do PVN entre os grupos experimentais avaliados (Figura 39 A, B, C, D e E, respectivamente).

Figura 39. Expressão gênica dos componentes do SRAA no PVN.

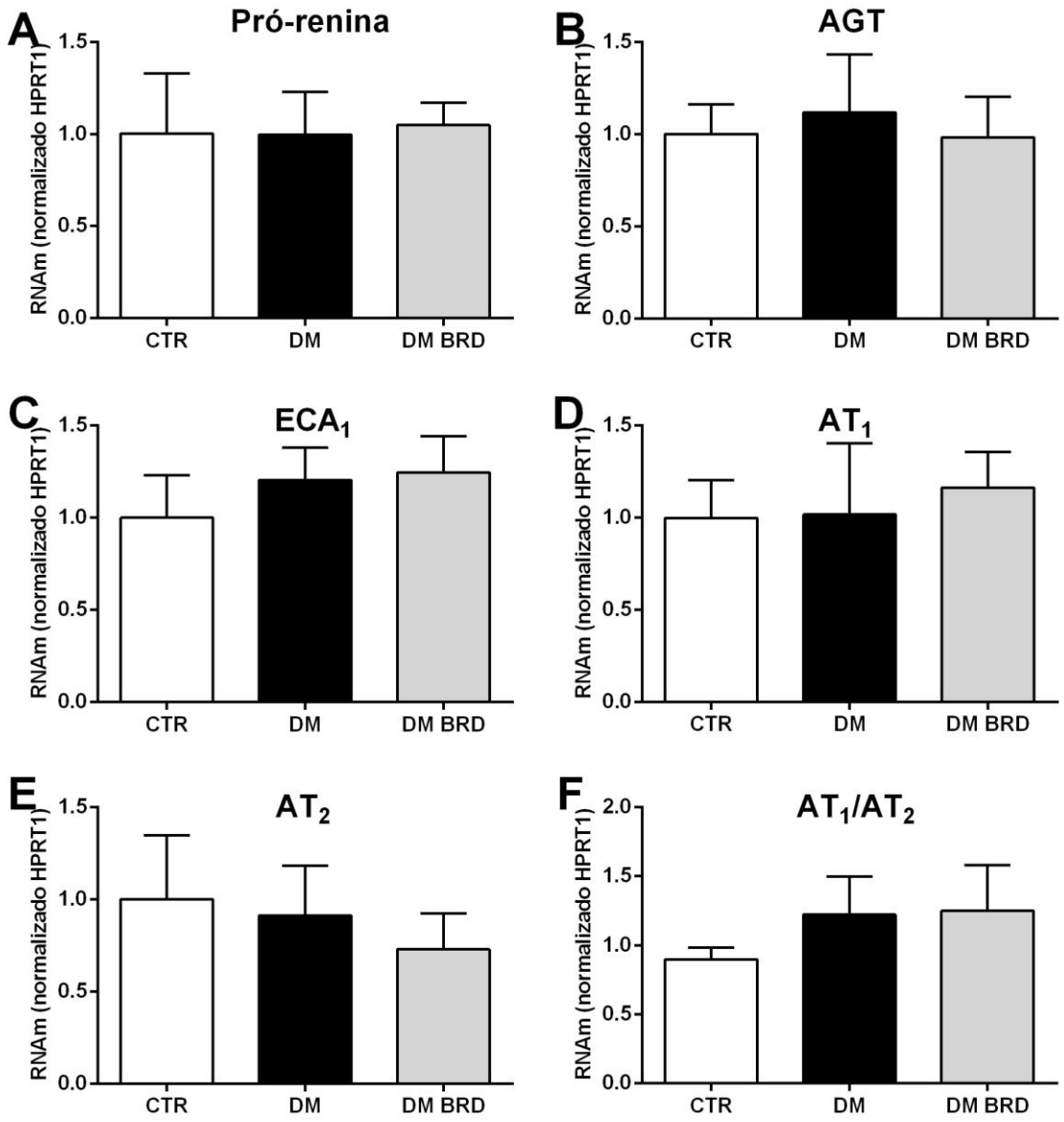


(A) Pró-renina, (B) Angiotensinogênio (AGT), (C) Enzima conversora de angiotensina 1 (ECA_1), (D) Receptor de angiotensina I (AT_1), (E) Receptor de angiotensina II (AT_2) e (F) Relação entre AT_1 e AT_2 (AT_1/AT_2) no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.4.5 Expressão gênica de componentes do SRAA na região RVLM

Assim como observado na região do NTS e PVN, a expressão gênica de componentes do SRAA (pró-renina, angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina tipo 1 (ECA_1), receptor de Ang II tipo 1 (AT_1) e tipo 2 (AT_2) e a relação entre AT_1/AT_2) não foram significativamente diferentes na região RVLM entre os grupos experimentais avaliados (Figura 40 A, B, C, D e E, respectivamente).

Figura 40. Expressão gênica dos componentes do SRAA na região RVLM.

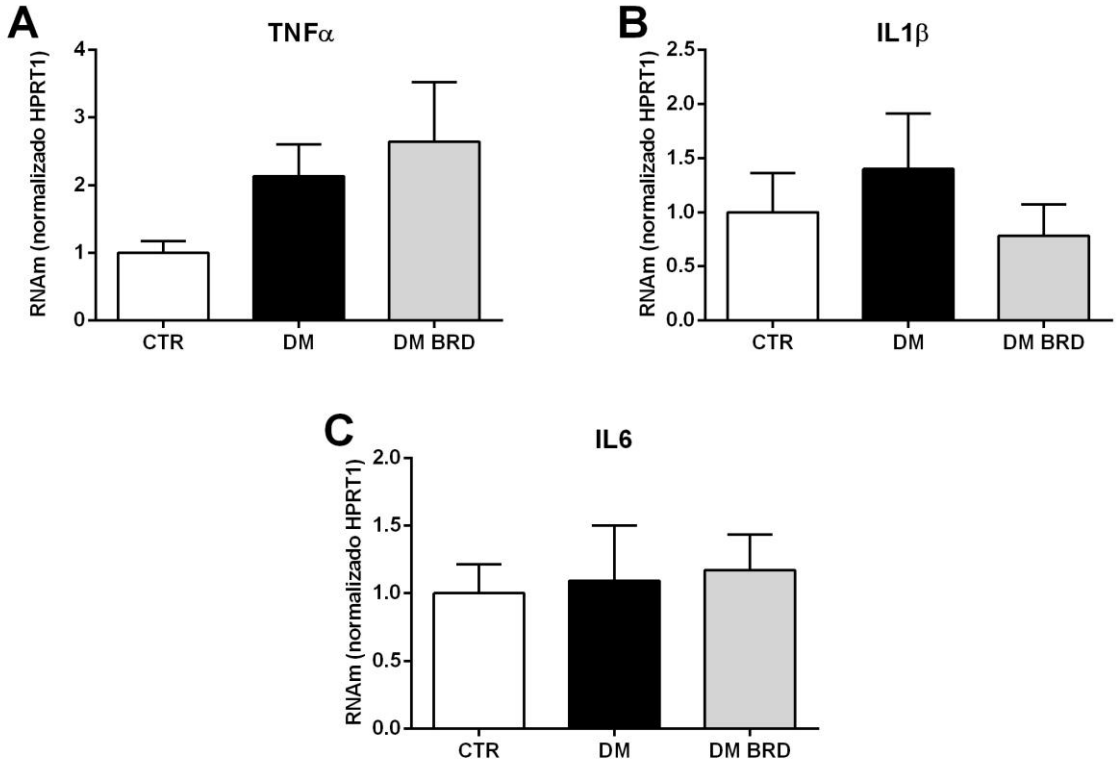


(A) Pró-renina, (B) Angiotensinogênio (AGT), (C) Enzima conversora de angiotensina 1 (ECA_1), (D) Receptor de angiotensina I (AT_1), (E) Receptor de angiotensina II (AT_2) e (F) Relação entre AT_1 e AT_2 (AT_1/AT_2) na Região Rostroventrolateral do Bulbo (RVLM) dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.4.6 Expressão gênica de interleucinas na região RVLM

A expressão gênica das interleucinas 1β e 6 e do fator de necrose tumoral alfa (TNFα) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 41 A, B e C, respectivamente). Vale destacar que a expressão gênica da interleucina 10 também foi avaliada na região RVLM, contudo, a IL 10 não foi expressa nesta região nos grupos experimentais estudados.

Figura 41. Expressão gênica de interleucinas na região RVLM.

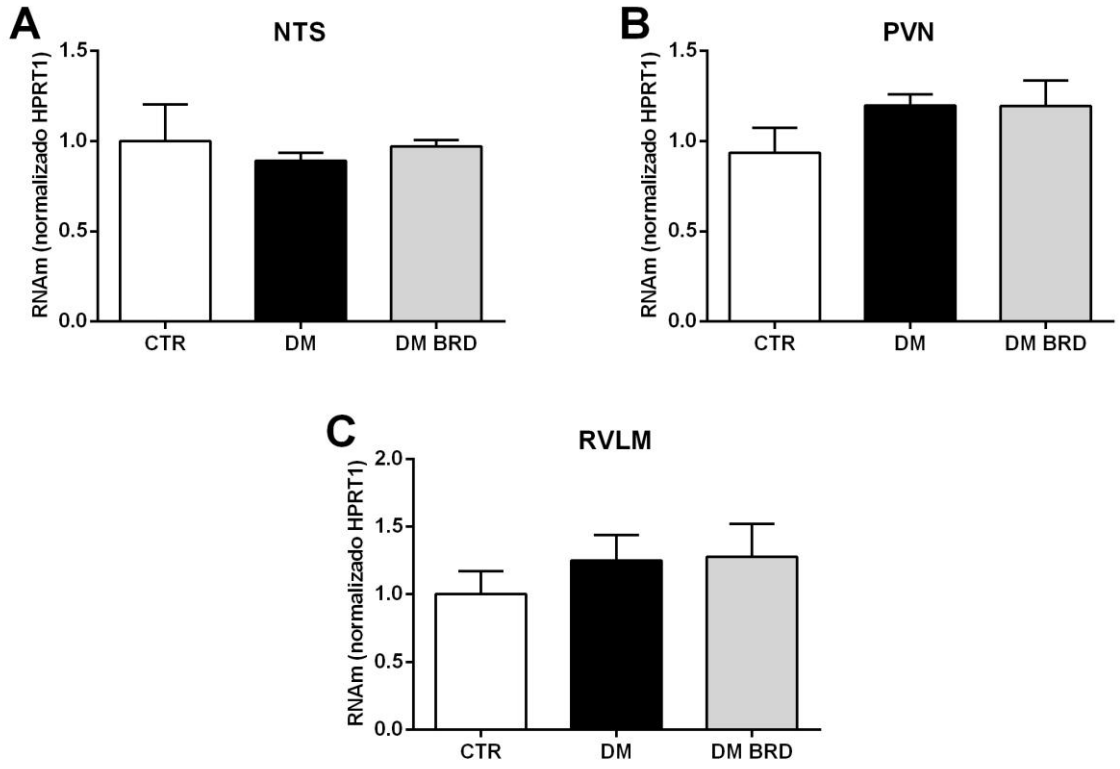


A) Fator de necrose tumoral alfa (TNFα), (B) Interleucina 1 beta (IL 1β) e (C) Interleucina 6 (IL 6) na região RVLM dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.4.7 Expressão gênica de receptores de insulina (RI) no NTS, PVN e RVLM.

A expressão gênica de receptores de insulina (RI) em regiões importantes para o controle cardiovascular e autonômico do SNC (NTS, PVN e RVLM) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados (Figura 42 A, B e C, respectivamente).

Figura 42. Expressão gênica de receptores de insulina (RI) no NTS, PVN e RVLM.



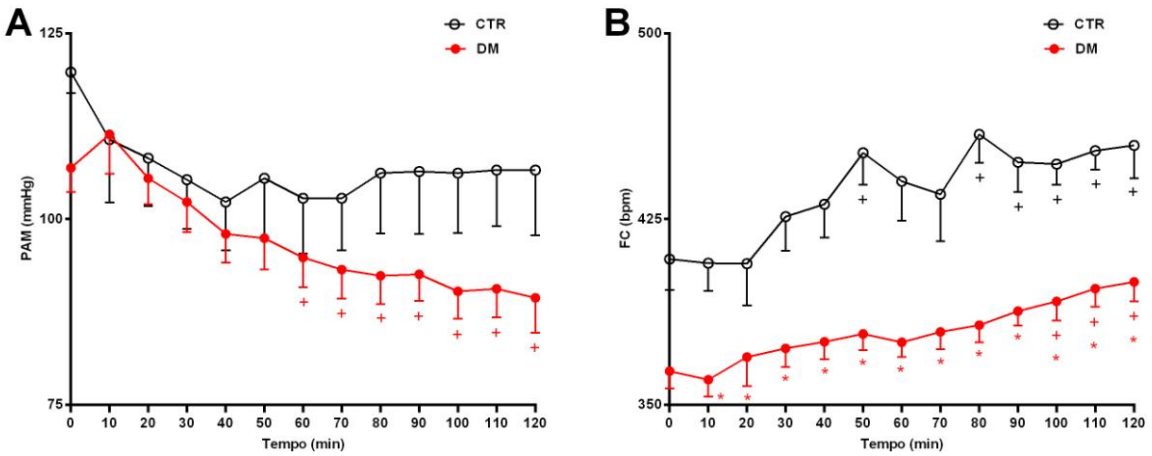
Expressão de receptores de insulina (RI) no (A) Núcleo do Trato Solitário (NTS), (B) Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e (C) Região Rostroventrolateral do Bulbo (RVLM) dos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

5.5 Infusão endovenosa de insulina

5.5.1 Parâmetros cardiovasculares

Após 60 min da infusão endovenosa de insulina, foi observada uma redução (P<0,05) da PAM apenas no grupo diabético em relação à sua média basal. Tal comportamento perdurou até o final da curva temporal de 120 min. Vale destacar que o gruo CTR não apresentou diferenças estatísticas da PAM em comparação a sua média basal nos pontos avaliados da curva temporal (Figura 43 A). Em relação à FC, foi observado um aumento estatístico (P<0,05) tanto no grupo CTR (no intervalo de tempo de 40, 80, 90, 100, 110 e 120 min) quanto no grupo DM (nos tempos 100, 110 e 120 min) em relação às suas médias basais. É importante frisar que a FC do grupo DM apresentou-se reduzida (P<0,05) em todos os tempos avaliados em comparação ao grupo CTR, inclusive em relação a sua média basal (Figura 43 B).

Figura 43. Parâmetros cardiovasculares após infusão endovenosa de insulina.

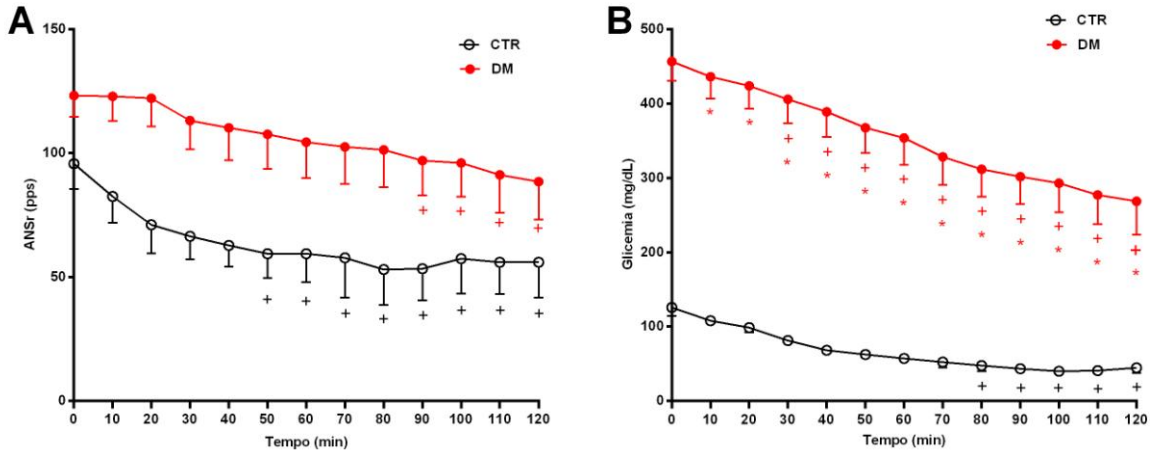


(A) Pressão arterial média (PAM) e (B) Frequência cardíaca (FC) após infusão endovenosa de insulina nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); $^{+}$P<0,05 vs Basal; *P<0,05 vs CTR; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*.

5.5.2 Parâmetros autonômicos e glicêmicos

Em relação à ANSr, foi observada uma diminuição estatística tanto no grupo CTR (nos tempos 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 min) quanto no grupo DM (nos tempos 90, 100, 110 e 120 min) em relação às suas médias basais. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos tempos avaliados (Figura 44 A). Quanto à glicemia, também foi observada uma diminuição ($P<0,05$) tanto no grupo CTR (nos tempos 80, 90, 100, 110 e 120 min) quanto no grupo DM (nos tempos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 min) em relação às suas médias basais. É importante frisar que a glicemia do grupo DM apresentou-se aumentada ($P<0,05$) em todos os tempos avaliados em comparação ao grupo CTR (Figura 44 B).

Figura 44. Parâmetros autonômicos e glicêmicos após infusão endovenosa de insulina.



(A) Atividade nervosa simpática renal (ANSr) e (B) Glicemia após infusão endovenosa de insulina nos grupos controle (CTR), diabético (DM) e diabético submetido à denervação renal bilateral (DM BRD). Resultados expressos em média ± SEM (n=6-8 animais); $^{+}$P<0,05 vs Basal; *P<0,05 vs CTR; two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*.

6. DISCUSSÃO

Estudos vêm demonstrando que a BRD pode promover efeitos benéficos sobre a função autonômica, metabólica, cardiovascular e renal em patologias que cursam com hiperatividade do SNS, sobretudo na hipertensão arterial resistente. Entretanto, até o momento existem poucas evidências acerca do papel da BRD sobre a progressão do DM, patologia que possui estreita relação com o aumento da ANSr. Desta forma, acreditamos que os achados da presente tese podem contribuir de forma importante para o entendimento da disfunção autonômica no DM. Neste contexto, os principais achados da presente tese foram:

1. O peso corporal dos animais diabéticos encontrou-se diminuído, porém a BRD atenuou este parâmetro;
2. A glicemia dos animais diabéticos denervados foi diminuída em relação aos animais diabéticos não denervados;
3. A frequência cardíaca encontrou-se reduzida nos animais diabéticos e a BRD promoveu normalização deste parâmetro;
4. A glicosuria e a albuminuria estiveram aumentadas no DM, contudo a BRD promoveu redução da glicosuria e normalização da albuminuria;
5. A ANSr basal encontrou-se hiperativada, contrariamente a ANSe basal que foi reduzida no DM e, a BRD promoveu normalização da ANSe;
6. A sensibilidade do reflexo barorreceptor arterial para o controle da frequência cardíaca e da atividade simpática para o território renal e lombar encontrou-se prejudicada no DM e a BRD reverteu este prejuízo;

7. A glicemia dos grupos estudados possui correlação positiva quando comparada a glicosuria, albuminuria, ANSr e ANSe, enquanto que negativa comparada ao peso corporal;

8. Os achados histopatológicos, tais como expansão mesangial, fibrose glomerular e tubulointersticial foram acentuadamente reduzidos após a BRD, em comparação ao grupo DM.

9. A expressão do RNAm da pró-renina e do receptor AT1 nos rins foi reduzida após a BRD em relação ao grupo DM;

10. A concentração do TNFα nos rins foi diminuída após a BRD em relação ao grupo DM;

11. O cotransportador de Na^+/glicose (SGLT2) foi aumentado, enquanto que o receptor de insulina (RI) esteve reduzido nos rins do DM, porém interessantemente, a BRD normalizou esses moduladores da glicose;

12. A insulina administrada na região RVLM produziu agudamente aumento da PA somente no grupo diabético, sem, contudo, promover modificações na expressão gênica do receptor de insulina nesta região;

13. Diferentemente das ações centrais, a insulina administrada endovenosamente, reduziu a PA de modo mais intenso no grupo diabético, sugerindo ações diferencias da insulina quando atuante no SNC ou perifericamente.

6.1 Balanço autonômico e cardiovascular

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, os animais diabéticos apresentaram manutenção da PAM quando comparados aos animais normoglicêmicos corroborando achados de outros estudos (De Angelis *et al.*, 2000;

Salman *et al.*, 2011). Porém, trabalhos anteriores utilizando modelos de DM encontraram redução significante da PAM, o que pode ser explicado devido à hiperglicemia não controlada ter provocado uma intensa diurese osmótica, ou seja, ter ocasionado uma importante depleção de volume, situação que pode contribuir para a redução da PAM destes animais (Maeda *et al.*, 1995; Dall'ago *et al.*, 2007). No entanto, acreditamos que a severidade e o tempo de evolução do DM utilizado na presente tese caracterizaram-se como uma fase pré-hipotensiva.

Quanto à FC, os animais diabéticos apresentaram diminuição da FC de repouso quando comparados aos normoglicêmicos, fato observado em outros estudos que atribuíram esta alteração a modificações no nodo sinusal, indicando uma baixa atividade espontânea do marcapasso cardíaco (Senges *et al.*, 1980; Akiyama *et al.*, 1989; De Angelis *et al.*, 2002). Outra hipótese descrita na literatura a respeito da diminuição da FC em ratos diabéticos relaciona-se à redução da quantidade de sítios de ligação de receptores β-adrenérgicos (Savarese e Berkowitz, 1979), como também à diminuição na expressão de receptores β_1 e ao aumento na expressão de receptores β_3-adrenérgicos encontrados no miocárdio destes animais (Lahaye *et al.*, 2010), sugerindo uma redução da via simpática para o coração.

Contudo, de forma contrária a estas evidências, Dall'ago e colaboradores (2007) demonstraram que animais diabéticos apresentam manutenção do tônus simpático ao coração, porém associada a uma redução do tônus vagal cardíaco, sugerindo um comprometimento do arco reflexo cardíaco. O referido estudo realizou tanto a estimulação direta do nervo vago para o coração quanto o estímulo farmacológico de receptores colinérgicos cardíacos por meio de injeção de metacolina, agonista muscarínico, o que produziu um aumento da resposta

bradicárdica nos ratos diabéticos em relação aos normoglicêmicos (Dall'ago *et al.*, 2007). Esta disfunção parassimpática provocada pelo DM pode estar relacionada ao aumento da quantidade ou da afinidade dos receptores muscarínicos do tipo M_2 cardíacos (Carrier e Aronstam, 1987; Dall'ago *et al.*, 1997). Assim, a partir desses resultados podemos inferir que o DM é capaz de promover hipersensibilização dos receptores muscarínicos cardíacos que provavelmente está relacionada à redução da atividade vagal para o coração.

De forma interessante, a BRD promoveu aumento e, consequentemente, normalização da FC nos animais diabéticos. Este resultado desperta interesse em relação à compreensão dos efeitos à distância promovidos pela BRD. Assim, tendo em vista que a BRD aboliu a hiperatividade nervosa simpática renal nos animais diabéticos, sugere-se que mecanismos neurais responsáveis pelo controle da atividade nervosa autônoma estejam modulando de forma seletiva ou preferencial a atividade simpática para o coração nesta condição, promovendo aumento da FC.

Sabe-se que o DM está associado a um prejuízo da função cardiovascular, sobretudo devido à lesão endotelial, fibrose, miocardiopatia e disfunção barorreflexa, que aumentam sobremaneira o risco para o desenvolvimento de coronariopatias, falência cardíaca, infarto do miocárdio e morte (Holwerda *et al.*, 2016). Em modelos de DM, já foi observado que após 15 dias da indução por STZ existe prejuízo no controle reflexo da PA, tanto para a resposta taquicárdica à queda da PA, quanto para a resposta bradicárdica ao aumento da PA, comprometendo, assim, os dois eixos do barorreflexo (De Angelis *et al.*, 2002; Harthmann *et al.*, 2007). A disfunção barorreflexa ocasionada pelo DM tem sido atribuída principalmente a alterações na atividade parassimpática cardíaca (Dall'ago *et al.*, 1997), comprovada pelo aumento

compensatório na quantidade de receptores muscarínicos no coração devido à diminuição da função vagal (Maeda *et al.*, 1995), o que poderia explicar a redução da resposta taquicárdica provocada por quedas da PA, como pode ser evidenciado na presente tese. Entretanto, alterações na expressão de outros receptores cardíacos, vias aferentes ou mesmo na integração neural do barorreflexo não podem ser excluídas como possíveis hipóteses para elucidar a disfunção do controle reflexo cardíaco na condição de DM.

Outro aspecto que não podemos deixar de considerar é a instalação da neuropatia diabética, que afeta tanto o sistema nervoso somático, principalmente os nervos sensitivos, quanto o SNA. Vale frisar que as vias aferentes responsáveis por conduzir as informações dos barorreceptores arteriais são constituídas por fibras mielinizadas, atuantes em situações de hipotensão, e por fibras amielinizadas, atuantes em situações de hipertensão, e ambas estão alteradas na condição de DM (Charkoudian *et al.*, 2005; Rowaiye *et al.*, 2013). Curiosamente, a denervação renal promoveu tanto aumento da FC quanto melhora do reflexo barorreceptor nos animais diabéticos, sugerindo a existência de uma e conexão entre os rins e o SNC para o controle da função cardiovascular neste modelo.

Seguindo este mesmo racional, quando a ANS basal foi avaliada em três territórios distintos, observou-se um ajuste seletivo, pois a ANSI não alterou, enquanto que a ANSe reduziu e a ANSr aumentou na condição de diabetes. A redução da ANSe está de acordo com estudos recentes que demonstraram que os nervos autonômicos de animais diabéticos apresentam: 1) poucas fibras mielinizadas e com sinais de desmielinização; 2) presença de microaxônios; 3) aumento de fibras sem mielina e com sinais de edema e degeneração; 4) processos

de reparação envolvendo células de Schwann; 5) prejuízo na formação de colágeno; 6) intensa lesão mitocondrial e, 7) espessamento do espaço endoneural devido a uma maior densidade de fibras de colágeno (Sato *et al.*, 2014). Em nosso modelo ainda não podemos afirmar se a redução da ANSe deve-se às alterações acima descritas ou a redução de mecanismos neurais geradores da atividade vasomotora simpática.

É importante destacar que quadros de ativação da ANSe promovem redução da liberação de insulina pelas células β-pancreáticas e aumento da gliconeogênese, que é a produção hepática de glicose por meio de compostos aglicanos (não-carboidratos) (Schlaich *et al.*, 2015). Assim, de forma contrária, sugerimos que a redução da ANSe na condição de DM encontrada na presente tese esteja relacionada a um mecanismo compensatório do organismo na tentativa de aumentar a liberação de insulina e reduzir o processo de gliconeogênese, promovendo uma maior absorção de glicose pelas células e, consequentemente, redução da hiperglicemia. Entretanto, faz-se necessário um maior conjunto de evidências para elucidarmos se de fato ocorreu algum ajuste compensatório e quais seus mecanismos de regulação, assim, somente novos estudos poderão responder esta questão.

Contudo, de forma território-dependente, observamos hiperatividade do nervo renal, corroborando os achados de outros trabalhos (Patel *et al.*, 2011; Rafiq *et al.*, 2015). A hiperatividade do nervo renal geralmente é atribuída à instalação da nefropatia diabética, em que os rins por meio de aferentes sensoriais informam o SNC sobre sua atual condição, desta maneira, o SNC processa esta informação e envia uma resposta de hiperativação simpática. Entretanto, à medida que a

nefropatia diabética se estabelece, um ciclo-vicioso se perpetua, promovendo aumento da atividade nervosa aferente e, em contrapartida, uma resposta simpática exacerbada. Recentemente, foi demonstrado um fenótipo anormal (alteração da estrutura morfológica e funcional) das mitocôndrias de neurônios sensoriais, de células de Schwann e de gânglios simpáticos em doenças metabólicas, sobretudo no DM. Esta evidência sugere que a função mitocondrial desempenha um papel importante no estabelecimento e progressão da neuropatia diabética, com potencial importancia do desbalanço oxidativo.

6.2. Balanço metabólico e função renal

Os resultados da presente tese mostraram uma atenuação da glicemia e aumento do peso corporal após denervação renal nos animais diabéticos. Os mecanismos pelos quais a BRD afeta o equilíbrio glicêmico permanecem incertos, contudo, discute-se na literatura algumas possibilidades, tais como: 1) diminuição das eferências do SNA, o que também pode sugerir uma alteração na via sensorial aferente; 2) redução do SRAA; 3) diminuição do tônus α-adrenérgico vascular, resultando em vasodilatação das arteríolas músculo esqueléticas; 4) maior sensibilidade dos RI aos efeitos da insulina e, 5) melhora da captação de glicose pelos músculos (Santulli *et al.*, 2012; Grassi, 2013; Pan *et al.*, 2015). Embasando-se nestes argumentos, os resultados da presente tese sugerem que a BRD propiciou aumento da sensibilidade dos RI, ocasionando uma maior captação de glicose pelas células, consequentemente reduzindo a glicemia dos animais. Seguindo esse racional, nossa hipótese é que devido a maior captação de glicose celular tem-se uma atenuação na perda de peso corporal e posterior aumento da sinalização ao

centro de saciedade, no hipotálamo, promovendo redução do estímulo para a polifagia.

Estas evidências confirmam que existe uma complexa e importante comunicação entre o SNA e o equilíbrio metabólico do organismo, especialmente sobre a atuação da insulina, como pôde ser demonstrado em um estudo clássico realizado por Cannon e colaboradores (1929). Este estudo realizado em gatos promoveu a remoção total da cadeia nervosa simpática do gânglio pélvico estrelado, mostrando que os animais não simpatectomizados tiveram um aumento médio da glicemia em 34,1% em comparação a uma redução média de 0,02% nos animais simpatectomizados (Cannon et al., 1929). Infelizmente, a simpatectomia total da cadeia nervosa simpática do gânglio pélvico estrelado promove efeitos secundários desfavoráveis e alta mortalidade, por isso essa abordagem ainda não foi utilizada na prática clínica. Por outro lado, a simpatectomia quando realizada de forma seletiva pode melhorar o controle glicêmico (Straznicky *et al.*, 2011), o que corrobora os resultados da presente tese. Desta forma, parece razoável propor a denervação renal como uma intervenção útil e efetiva para abolir a hiperatividade nervosa renal e melhorar a glicemia em situações de DM refratárias ao tratamento farmacológico. O entendimento de como este mecanismo se processa poderá ser importante para o desenvolvimento de um novo alvo terapêutico.

Além disso, também avaliamos a função renal dos animais diabéticos e monstramos que o fluxo urinário destes animais foi significativamente aumentado, fato observado em outros trabalhos (Hostetter *et al.*, 1981; Luippold *et al.*, 2004). Entretanto, em particular a BRD atenuou a hiperfiltração glomerular ao reduzir o fluxo urinário dos animais diabéticos corroborando achados de outro estudo (Salman

et al., 2011). A partir desta evidência podemos inferir que os nervos renais possuem um papel fundamental neste contexto. Os mecanismos subjacentes envolvidos na redução do fluxo urinário no DM após BRD pode ter associação com a liberação do principal neurotransmissor periférico nas terminações nervosas simpáticas, a noradrenalina, que é controlada pela frequência de disparos (*burts*) dos nervos renais. A quantidade de noradrenalina na junção neuroefetora também pode ser modulada por receptores localizados pré-sinapticamente (Starke, 1977).

Por exemplo, o estímulo de receptores pré-sinápticos de dopamina da família D_2 inibe a liberação de noradrenalina intrarrenal (Rump *et al.*, 1993). Desta forma, a ativação de receptores pré-sinápticos D_2, pela via dopaminérgica endógena, pode inibir funcionalmente os efeitos vasoconstritores renais induzidos pela noradrenalina e, assim, aumentar o ritmo de filtração glomerular (RFG) e o fluxo plasmátio renal (FPR). No que diz respeito à redução da resistência vascular renal no DM comprovada pela poliuria, a administração subcrônica de um antagonista de receptores D_2, a domperidona, aboliu a hiperfiltração glomerular induzida pela doença (Luippold *et al.*, 2001). Fato indicativo que a hiperfiltração glomerular presente no diabetes possue estreita relação com o aumento da atividade do sistema dopaminérgico por meio de receptores pré-sinápticos presentes na junção neuroefetora. Desta forma, a interrupção da hiperativação dopaminérgica por meio da denervação renal pode ter contribuído para a redução do fluxo urinário que se encontrava significativamente aumentado nos animais diabéticos.

Interessantemente, outro trabalho realizado em cães demonstrou que a concentração de dopamina no tecido renal está significativamente reduzida após a denervação renal, sugerindo que os nervos renais são a principal fonte do conteúdo

intrarrenal de dopamina (Petrovic *et al.*, 1986). Considerando que a ANSr está aumentada no DM, mais uma hipótese para justificar o quadro de hiperfiltração glomerular seria o aumento da liberação de dopamina intrarrenal, o que poderia induzir um efeito vasodilatador renal, promovendo aumento da RFG nos animais diabéticos. A partir deste racional, a denervação renal evitaria a liberação de dopamina intrarrenal e atenuaria a hiperfiltração glomerular induzida pelo diabetes. Contudo, pode-se argumentar sobre a necessidade de mensuração da excreção urinária de dopamina como metodologia para comprovar a hiperatividade dopaminérgica no tecido renal, porém, vale salientar que esse tipo de metodologia não é sensível para detectar possíveis diferenças sutis na concentração intrarrenal de dopamina (Luippold *et al.*, 2004).

Ainda em consideração aos efeitos da BRD sobre a vasculatura dos rins, a questão da hipersensibilidade dos receptores das catecolaminas tem que ser mencionada. Um estudo comparativo acerca dos efeitos das catecolaminas sobre a hemodinâmica renal em rins inervados e denervados demonstrou que os rins denervados (7-10 dias) apresentam hipersensibilidade para noradrenalina (Krayacich *et al.*, 1987). Inversamente, outro estudo demonstrou que os rins denervados não se tornam hipersensíveis a níveis fisiológicos de noradrenalina (Ramchandra *et al.*, 2002). Alguns mecanismos contribuem para a hipersensibilidade tanto pré quanto pós-sinapticamente. O mecanismo pré-sináptico é representado pela redução da reabsorção de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos renais, desta forma, a noradrenalina permanece um maior período na fenda sináptica atuando em seus receptores. Em relação ao mecanismo pós-sináptico, refere-se ao aumento da sensibilidade dos adrenorreceptores renais, que

consequentemente poderá promover uma resposta exarcerbada (Langer, 1973). Neste contexto, baseando-se em nosso estudo ainda não temos resultados conclusivos para inferir que após a BRD ocorreu redução do fluxo urinário nos animais diabéticos devido a uma maior responsividade da vasculatura renal à ação das catecolaminas circulantes, assim, esta hipótese continuará em aberto necessitando de estudos adicionais para sua confirmação.

Vale destacar também que outros mecanismos fisiológicos podem atuar nessa modulação sináptica, por exemplo, mais recentemente a cotransmissão noradrenalina-ATP tem sido considerada, sobretudo no controle autonômico da função renal (Illes e Verkhratsky, 2016). Além disso, a interação intrarrenal entre noradrenalina e receptores AT1 de Ang II também pode estar envolvida, considerando que recentemente nosso grupo demonstrou que a estimulação elétrica do nervo simpático renal, em frequencias que não produzem alteração do ritmo de filtração glomerular, leva à ativação do SRAA intrarrenal e consequentemente aumento na atividade do trocador Na^+/H^+ (NHE_3) (Pontes *et al.*, 2015).

Uma hipótese complementar acerca do aumento do fluxo urinário na condição de DM, relaciona-se a presença da proteinúria, sugerindo que tais alterações possuem estreita associação com fatores hemodinâmicos renais e bioquímicos da matriz extracelular (ME) e do parênquima renal (Kolset *et al.*, 2012). Quanto aos fatores hemodinâmicos renais ocasionados pelo DM, já foi observado em humanos aumento no RFG e no FPR nas fases inciais do DM, sugerindo que estas alterações sejam responsáveis pela proteinúria e pelas alterações histopatológicas renais (Anderson e Vora, 1995; Kawada, 2017). Em modelos de DM, também têm sido relatada na fase inicial do diabetes a presença de hiperfiltração renal relacionada à

instalação do quadro de hipertrofia glomerular (Wolf e Ziyadeh, 1999; Yao *et al.*, 2014), como observado na presente tese. Apesar da PAM estar dentro de valores de normalidade, sua transmissão aos capilares glomerulares é facilitada em consequência da redução mais acentuada na resistência da arteríola aferente que na arteríola eferente, por esta razão, aumenta-se a pressão hidrostática dos capilares glomerulares (Zatz *et al.*, 1985; Awad *et al.*, 2007). Desta forma, o aumento da pressão intraglomerular promove estresse mecânico e pode danificar o endotélio dos capilares glomerulares, alterando a estrutura anatômica da barreira glomerular. Há evidências de que estas alterações na hemodinâmica glomerular podem contribuir diretamente para o desenvolvimento e a progressão da nefropatia diabética (Awad *et al.*, 2007).

Em relação às alterações do parênquima renal na condição de diabetes, podemos destacar o acúmulo de ME e expansão mesangial, como também observado no presente estudo, caracterizando a instalação do quadro de glomerulopatia diabética (Kriz *et al.*, 2017). Um componente não-colágeno que é essencial para a membrana basal glomerular (MBG) é chamado glicosaminoglicano, que contribui com cerca de 90% do total de carboidratos desta membrana. O principal tipo de glicosaminoglican é denominado sulfato de heparan que, junto ao ácido siálico, contribui para a eletronegatividade da parede do capilar glomerular e, consequentemente, para a seletividade da barreira de filtração dependente de carga (Kanwar *et al.*, 1983). O DM promove uma redução na síntese glomerular do sulfato de heparan e no conteúdo total de glicosaminoglican, tanto no glomérulo quanto na MBG, comprovada em estudos com humanos (Shimomura e Spiro, 1987; Lepedda

et al., 2017), como também promove diminuição do ácido siálico em modelos animais (Raats *et al.*, 2000).

Em relação a BRD, um ponto que merece destaque refere-se a redução da albuminuria nos animais diabéticos. É possível que esta redução no DM esteja associada a perda de moléculas estruturais dos glomérulos, sobretudo dos podócitos (Yao *et al.*, 2014). No mesmo sentido, estudos realizados em ratos diabéticos após tratamento com nebivolol, antagonista adrenérgico β1-seletivo e vasodilatador, obtiveram aumento significativo no percentual de podocinas (Toblli *et al.*, 2011). Os podócitos são células do epitélio glomerular renal que formam uma importante barreira no processo de filtração glomerular, sendo sua principal função restringir a passagem de proteínas do sangue para a urina (Kerjaschki *et al.*, 1984). A hiperatividade nervosa simpática renal acarreta alterações no glomérulo que podem ocasionar a apoptose dos podócitos e o afastamento de proteínas estruturais, como integrinas e nefrinas (Trimarchi, 2017). Neste sentido, a denervação renal parece-nos benéfica ao promover atenuação das alterações estruturais glomerulares devido a uma provável diminuição das lacunas intercelulares e, consequente, redução da condição de albuminuria nos animais diabéticos.

Os resultados da presente tese estão de acordo com outros trabalhos que também encontraram efeitos benéficos da BRD na redução da albuminuria na condição de DM (Luippold *et al.*, 2004). Seguindo esta linha de raciocínio, alguns estudos demonstraram que o bloqueio farmacológico de receptores β-adrenérgicos periféricos ou o uso de fármacos simpatolíticos centrais também possuem efeito anti-albuminúrico (Strojek *et al.*, 2001; Jawa *et al.*, 2008), reforçando a hipótese de que a

redução da hiperatividade simpática promove atenuação da albuminuria. É importante deixar claro que o processo de reinervação em ratos ocorre após 3 semanas da BRD, havendo retorno completo de sua função após 8 semanas (Kline e Mercer, 1980). Ou seja, consideramos que a melhora nos indicadores de função renal avaliados no presente estudo não sofreu provavelmente interferência do processo de neuroplasticidade levando à reinervação renal, já que os animais foram avaliados após 2 semanas do procedimento de BRD. Entretanto, deve-se considerar que a estratégia terapeutica utilizando a denervação renal tem como um fator limitante possíveis reinervações.

Animais diabéticos também apresentaram alterações no balanço hidroeletrolítico, o que pôde ser evidenciado pelo aumento da concentração de Na^+ e K^+ plasmático e urinário associado ao aumento da osmolaridade plasmática e redução da osmolaridade urinária. Vale frisar que as concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ encontradas nos animais diabéticos neste estudo ainda não configuram quadros de hipernatremia ou de hipercalemia, pois os valores obtidos não excederam seus escores limites (155 mEq/L e 5,5 mEq/L, respectivamente) (Sotirakopoulos *et al.*, 2012). O aumento da concentração plasmática de Na^+ é comum em quadros de diabetes sem tratamento, em que a perda de volume é maior do que a perda de Na^+. Quanto aumento da concentração plasmática de K^+, o mesmo pode se desenvolver após o deslocamento do K^+ do líquido intracelular (LIC) para o líquido extracelular (LEC). O efluxo de K^+ do LIC para o LEC geralmente ocorre na cetoacidose diabética (CAD), que é uma complicação do DM determinada pela presença de hiperglicemia, acidose metabólica, desidratação e cetose, associada a uma intensa deficiência na produção de insulina. A CAD provoca

deslocamento de K^+ para fora das células em troca de íons hidrogênio que entram na célula a ser tamponada. Assim, é importante frisar que a deficiência de insulina associada à hiperosmolalidade plasmática contribui para a condição de hipercalemia no DM (Liamis *et al.*, 2013).

A hiperosmolaridade plasmática nos animais diabéticos tem estreita relação com a condição de hiperglicemia crônica presente neste modelo de DM. A hiperglicemia promove aumento da expressão, bem como a saturação dos cotransportadores de Na^+/glicose presentes no túbulo proximal dos néfrons (SGLT1 e SGLT2), especialmente do SGLT2, responsável por 90% da reabsorção de glicose, como observado na presente tese. (Thomas *et al.*, 2014). Devido à saturação do SGLT2 no túbulo proximal, haverá aumento da excreção renal de glicose, glicosuria, que consequentemente predispõe a poliuria, pois a glicose é uma molécula polar altamente hidrofílica. Em resumo, a hiperglicemia gerada pelo DM não tratado promove glicosuria e poliuria, com redução da osmolaridade urinária, ocasionando um estado de desidratação comprovado pelo aumento da osmolaridade plasmática e do hematócrito, como observado na presente tese. Desta forma, a hiperosmolaridade plasmática estimula de forma compensatória o centro da sede, localizado no hipotálamo, que em resposta ocasiona polidipsia na tentativa do organismo controlar a poliuria e, prevenir um colapso cardiovascular, como pode ser observado na presente tese pelo aumento da ingestão de água pelos animais DM (Rahmoune *et al.*, 2005).

Interessantemente, a BRD promoveu redução da glicosuria e da osmolaridade plasmática e aumento da osmolaridade urinária. Os mecanismos fisiológicos envolvidos nestas alterações ainda são incertos, porém, existem evidências que

comprovam melhora da glicemia após denervação renal, o que explicaria a atenuação do ciclo vicioso hiperglicemia-glicosuria-poliuria-desidratação-polidipsia (Birkeland *et al.*, 2017). Outra questão que merece detalhamento é a relação existente entre o SNS e os SGLTs presentes no túbulo proximal dos néfrons. Os SGLTs são estimulados pelo sistema adrenérgico e pela presença de glicose na urina, assim, a condição de hiperativação simpática renal e glicosuria promovem a translocação dos SGLTs para a membrana luminal do túbulo proximal, tornando-os funcionais, o que ocasiona aumento da reabsorção de glicose e, consequentemente, aumento da glicemia (Vallon *et al.*, 2011; Schlaich *et al.*, 2015). Desta forma, a inibição do SGLT2 renal tem sido recentemente alvo de várias intervenções farmacológicas, como exemplo a empagliflozina, dapagliflozina, canagliflozina e luseogliflozina, com o objetivo de reduzir a glicemia ao impedir a reabsorção de glicose no túbulo proximal do néfron (Birkeland *et al.*, 2017; Wanner *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018).

Desde as publicações dos *trials* EMPA-REG e CANVAS, que testaram a eficácia e segurança da empagliflozina e da canagliflozina, respectivamente, outros grandes estudos de coorte prospectivos multinacionais também mostraram efeitos adicionais dos iSGLT2, que além de reduzirem a glicemia possuem efeitos cardioprotetores, sobretudo impacto na redução de importantes variáveis, tais como: 1) albuminuria; 2) ácido úrico; 3) inflamação; e, 4) aterosclerose, em indivíduos diabéticos (Jia *et al.*, 2018). Embora mais dados sejam necessários para substanciar a segurança e a eficácia dos iSGLT2, os mesmos devem ser considerados como uma terapia valiosa para ajudar a reduzir o risco cardiovascular em pacientes com diabetes (Birkeland *et al.*, 2017).

A denervação renal possui o mesmo princípio da inibição farmacológica dos iSGLT2 renais, pois a retirada do SNS para os rins promove diminuição da via adrenérgica de estímulo para a translocação dos SGLTs, reduzindo sua translocação para a membrana plasmática apical das células epiteliais do túbulo proximal, promovendo redução da reabsorção de glicose, aumento da glicosuria e, consequentemente, redução da glicemia (Mahfoud *et al.*, 2011). Os resultados desta tese corroboram a redução da glicemia após a BRD, contudo, contrariamente aos achados da literatura também observou-se uma redução da glicosuria. Desta forma, acreditamos que ocorreu um aumento da glicosuria nos primeiros dias imediatamente após a BRD, porém como os animais foram avaliados depois de duas semanas, não foi possível observar esta condição. Contudo, é possível que o tempo utilizado para a recuperação dos animais após a BRD foi capaz de permitir uma melhora da captação de glicose pelas células devido ao aumento da sensibilidade à insulina, promovendo aumento da glicosuria apenas de forma transitória, assim, tais eventos garantiram uma melhor condição glicêmica dos animais e, consequentemente, redução sustentada da glicosuria.

É importante destacar que a espera de duas semanas após a BRD para avaliação dos animais foi de extrema importância metodológica, pois pretendíamos avaliar os efeitos crônicos da denervação renal, atentando para o tempo limite de início do processo de reinervação e garantia de uma boa recuperação pós-cirúrgica dos animais, tendo em vista que o procedimento de BRD é extenso e muito invasivo por ser bilateral. Ainda neste mesmo contexto, vale salientar que a redução da hiperatividade simpática e da superexpressão do SGLT2 renais favorece a redução de algumas citocinas inflamatórias, como o TNFα e a IL 6 (Takase *et al.*, 2005;

Maldonado-Cervantes *et al.*, 2012). O TNFα é visto como um vilão na instalação do quadro de nefropatia diabética, pois promove a apoptose das células tubulares renais e, consequente, fibrose tubulointersticial (Satoh *et al.*, 2001). Desta forma, baseando-se em nossos resultados, podemos inferir que a BRD ao promover abolição da ANSr e redução da expressão do SGLT2, propiciou a redução da concentração de TNFα no tecido renal, o que provavelmente contribuiu para a redução da fibrose glomerular e tubulointersticial encontrada nos animais diabéticos.

6.3 Efeitos da insulina sobre o SNC

Os resultados deste estudo mostraram um aumento da PAM e da ANS para diferentes territórios imediatamente após a aplicação de insulina na região RVLM, contudo, sem efeitos duradouros nos grupos estudados. Interessantemente, um estudo feito por Bardgett e colaboradores (2010) não encontrou alteração significativa na ANS lombar após infusão bilateral de diferentes concentrações de insulina na região RVLM (5; 0,5; 0,05 ou 0,0005 μU/nL), usando um volume de 60 nL, em animais normoglicêmicos avaliados durante 60 min (Bardgett *et al.*, 2010). Este mesmo estudo também utilizou a técnica de infusão intracerebroventricular (ICV) de insulina, em que foi administrada a dose de 100 mU/2μL no terceiro ventrículo, assim, os autores encontraram um aumento significativo da ANS lombar, porém, sem alteração da PAM.

Desta forma, considerando a atuação da insulina no SNC, o presente estudo investigou os efeitos da insulina na região RVLM sobre a ANS de outros territórios simpáticos (renal e esplâncnico) de animais diabéticos e diabéticos submetidos à BRD. Para isto foi escolhida a maior dose da insulina (5 μU/nL) utilizada previamente

por Bardgett e colaboradores (2010), contudo, no volume de 100 nL, valor utilizado frequentemente em outros estudos no qual garante boa dispersão da substância na região RVLM (Bergamaschi *et al.*, 1999; Dugaich *et al.*, 2011). O resultado deste experimento obtido em nosso estudo mostrou hiperexcitação simpática do nervo renal e esplâcnico e aumento da PAM imediatamente após a administração de insulina na região RVLM, entretanto sem efeitos após 10 minutos da análise. Interessantemente, a ANSr do grupo controle comportou-se de forma não uniforme apresentando decaimento após 30 min, fato que não ocorreu no grupo diabético, que apresentou comportamento uniforme no decorrer do tempo, sem diferir dos valores basais. A ANSe comportou-se de forma semelhante em todos os grupos experimentais e sem diferenças estatísticas dos seus respectivos valores basais. É sabido que a região RVLM apresenta baixa densidade de RI, o que pode explicar seu efeito sutil e fugaz sobre o sistema autonômico e cardiovascular após aplicação de insulina exógena (Bardgett *et al.*, 2010). Porém, esperávamos obter alterações significativas nos grupos diabéticos, fato não observado neste estudo. Portanto, aparentemente, o aumento da ANSr observado nestes animais não é consequente à redução dos níveis de insulina sistêmicos na condição de DM tipo 1, considerando que a administração de insulina na região RVLM não reduziu os níveis da ANSr. Entretanto, não descartamos o papel da insulina em outras regiões centrais que não foram avaliadas neste estudo.

Por outro lado, as ações simpatoexcitatórias induzidas pela insulina na região RVLM ainda não foram completamente compreendidas. Estudos prévios indicam estreita interação entre RI e receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) (Jayanarayanan *et al.*, 2013; Marquard *et al.*, 2015). Esta interação foi

comprovada por meio do bloqueio de receptores glutamatérgicos na região RVLM, através da aplicação local de ácido quinurênico, antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, ou AP5, antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Em seguida, foi administrada insulina nesta mesma região, o que promoveu abolição dos efeitos simpatoexcitatórios esperados. Este mesmo protocolo foi repetido na vigência de outros antagonistas, tais como losartana (antagonista de receptores de Ang II tipo 1, AT1), NBQX (antagonista de receptores glutamatérgicos não-NMDA) e SHU9119 (antagonista do receptor de melanocortina 3 e 4), os quais não impediram os efeitos da insulina sobre a PAM e ANSl (Bardgett *et al.*, 2010). A partir disso, sugere-se que a insulina exerce ações simpatoexcitatórias por meio da interação entre RI e receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

6.4 Efeitos da insulina periférica sobre a ANSr

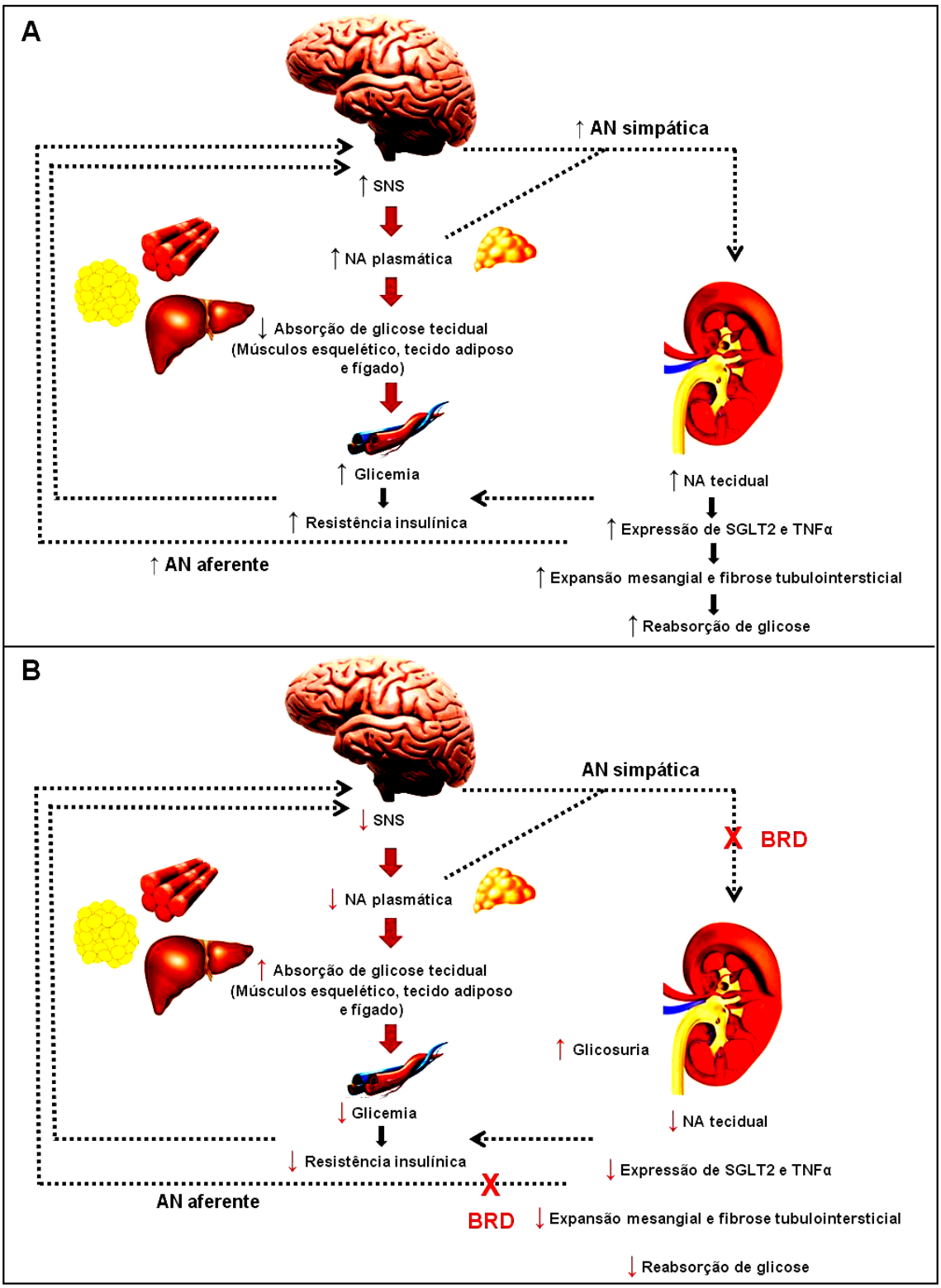
Existem vários estudos na literatura em relação à atuação da administração periférica de insulina sobre a ANS. É sabido que tanto a hiperinsulinemia quanto a hiperglicemia promovem aumento da ANS, PA e FC, de forma dose/tempo-dependente, em humanos saudáveis (Anderson *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1999). Contudo, vale ressaltar que este assunto é controverso, pois alguns estudos clínicos encontraram apenas aumento da ANS muscular (ANSm), sem alterações na PA, fato atribuído a possíveis ações da insulina: 1) aumentando a resposta barorreflexa e consequentemente reduzindo a resistência vascular periférica e PA e, 2) modulando regiões neurais de controle cardiovascular (Creager *et al.*, 1985; Natali *et al.*, 1990). De forma semelhante, um estudo experimental observou que a infusão periférica de

insulina pode promover ajustes seletivos sobre a ANS para o território lombar, em animais normotensos, e para o território adrenal, em animais espontaneamente hipertensos (SHR), sem alterar a ANSr (Morgan *et al.*, 1993).

De uma forma geral, estes estudos sugerem que possíveis aumentos na concentração plasmática de insulina produzem tanto ações pressoras, com aumento da ANS e liberação de noradrenalina, quanto depressoras, com vasodilatação. Desta forma, aumentos agudos na concentração de insulina plasmática que estejam dentro de um intervalo fisiológico pós-prandial, promovem ações sistêmicas relativamente equilibradas para que a PA não aumente, mas sim diminua sutilmente (Sanders *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1990). A maioria dos artigos que mostram aumento da ANS e PA utilizam infusões contínuas ou intermitentes de insulina, garantindo uma condição de hiperinulinemia sustentada.

Em relação aos efeitos da insulina exógena infundida de forma aguda em animais com DM e o registro da PAM e da ANSr, existem poucas evidências na literatura. É sabido que no modelo de hipertensão associado ao DM tipo 1, a administração de insulina periférica promove a redução da ANSr sem promover alterações na PA e FC (Takimoto *et al.*, 2008), resultado semelhante ao encontrado na presente tese. Assim, baseando-se nos principais resultados obtidos no presente estudo, a Figura 45 demonstra de forma comparativa as alterações ocasionadas pela instalação do quadro de diabetes (Figura 45 A) e os efeitos benéficos promovidos pela denervação renal (Figura 45 B).

Figura 45. Representação esquemática dos principais resultados e possíveis hipóteses da presente tese.



(A) Alterações ocasionadas pela instalação do quadro de diabetes e (B) Efeitos benéficos promovidos pela denervação renal nesta condição. Descrição: atividade nervosa (AN); sistema nervoso simpático (SNS); noradrenalina (NA); transportadores de glicose (GLUTs); cotransportadores de glicose (SGLTs); denervação renal bilateral (BRD). Modificado de (Rafiq *et al.*, 2015).

7. CONCLUSÃO

Os achados da presente tese apontam que os nervos renais estão envolvidos de forma significante no balanço autonômico, cardiovascular, metabólico e renal no modelo de DM. É possível que os mecanismos envolvidos na melhora destes parâmetros por meio da BRD sejam mediados pela redução do SGLT2, TNFα e SRAA renais, como também a atuação da insulina na região RVLM. Além disso, vale destacar que as ações centrais e periféricas da insulina sobre a PA são distintas entre os grupos DM e CTR, uma vez que a insulina produziu aumento ou queda da PA somente no grupo DM, quando administrada central ou periféricamente, respectivamente. Desta forma, consideramos que os resultados obtidos no desenvolvimento desta tese são bastante promissores e trazem subsídios importantes sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no DM, sobretudo em relação aos mecanismos de comunicação entre o SNC e os rins, o que contribui para o avanço de novas estratégias terapêuticas e, idealmente, para a execução de futuros estudos translacionais.

REFERÊNCIAS

ADROGUÉ, H. J. Glucose homeostasis and the kidney. **Kidney Int,** v. 42, n. 5, p. 1266-82, Nov 1992.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol,** v. 105, p. 121-6, 1984.

AHRÉN, B.; LUNDQUIST, I. Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. **Eur J Pharmacol,** v. 71, n. 1, p. 93-104, Apr 1981. ISSN 0014-2999.

AIRAKSINEN, K. E.; KOISTINEN, M. J. Association between silent coronary artery disease, diabetes, and autonomic neuropathy. Fact of fallacy? **Diabetes Care,** v. 15, n. 2, p. 288-92, Feb 1992.

AKIYAMA, N. et al. Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. **Diabetes,** v. 38, n. 2, p. 231-6, Feb 1989.

ANDERSON, E. A. et al. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. **J Clin Invest,** v. 87, n. 6, p. 2246-52, Jun 1991.

ANDERSON, S.; VORA, J. P. Current concepts of renal hemodynamics in diabetes. **J Diabetes Complications,** v. 9, n. 4, p. 304-7, 1995 Oct-Dec 1995.

ARGERI, R. et al. Sleep restriction during pregnancy and its effects on blood pressure and renal function among female offspring. **Physiol Rep,** v. 4, n. 16, 08 2016.

ARGOFF, C. E. et al. Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. **Mayo Clin Proc,** v. 81, n. 4 Suppl, p. S3-11, Apr 2006.

ASSOCIATION, A. D. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care,** v. 37 Suppl 1, p. S14-80, Jan 2014.

AWAD, A. R.; DKHIL, M. A.; DANFOUR, M. A. Structural alterations of the glomerular wall and vessels in early stages of diabetes mellitus: (light and transmission electron microscopic study). **Libyan J Med,** v. 2, n. 3, p. 135-8, Sep 2007.

BAKER, W. L. et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J Am Soc Hypertens,** v. 8, n. 4, p. 262-75.e9, Apr 2014.

BANKI, E. et al. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. **Peptides,** v. 42, p. 125-30, Apr 2013.

BARDGETT, M. E.; MCCARTHY, J. J.; STOCKER, S. D. Glutamatergic receptor activation in the rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoexcitatory response to hyperinsulinemia. **Hypertension,** v. 55, n. 2, p. 284-90, Feb 2010.

BAURA, G. D. et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. **J Clin Invest,** v. 92, n. 4, p. 1824-30, Oct 1993.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes,** v. 40, n. 4, p. 405-12, Apr 1991.

BELL, P. M.; FIRTH, R. G.; RIZZA, R. A. Assessment of the postprandial pattern of glucose metabolism in nondiabetic subjects and patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus using a simultaneous infusion of [2(3)H] and [3(3)H] glucose. **Metabolism,** v. 38, n. 1, p. 38-45, Jan 1989.

BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R.; LOPES, O. U. Rostral ventrolateral medulla: A source of sympathetic activation in rats subjected to long-term treatment with L-NAME. **Hypertension,** v. 34, n. 4 Pt 2, p. 744-7, Oct 1999.

BERNE, C. et al. The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. **Diabetologia,** v. 35, n. 9, p. 873-9, Sep 1992.

BIRKELAND, K. I. et al. Cardiovascular mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes following initiation of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors versus other glucose-lowering drugs (CVD-REAL Nordic): a multinational observational analysis. **Lancet Diabetes Endocrinol,** v. 5, n. 9, p. 709-717, Sep 2017.

BLOOM, S. R.; EDWARDS, A. V. Pancreatic endocrine responses to stimulation via the sympathetic innervation. **J Physiol,** v. 245, n. 2, p. 120P-121P, Feb 1975.

BLOOM, S. R.; EDWARDS, A. V. Characteristics of the neuroendocrine responses to stimulation of the splanchnic nerves in bursts in the conscious calf. **J Physiol,** v. 346, p. 533-45, Jan 1984.

BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat Res,** v. 512, n. 2-3, p. 121-34, Dec 2002.

BONNET, F. et al. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. **J Hypertens,** v. 20, n. 8, p. 1615-24, Aug 2002.

BOYCHUK, C. R.; HALMOS, K. C.; SMITH, B. N. Diabetes induces GABA receptor plasticity in murine vagal motor neurons. **J Neurophysiol,** v. 114, n. 1, p. 698-706, Jul 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 1976.

CALLAGHAN, B. C. et al. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurol,** v. 11, n. 6, p. 521-34, Jun 2012.

CARRIER, G. O.; ARONSTAM, R. S. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 242, n. 2, p. 531-5, Aug 1987.

CERSOSIMO, E.; GARLICK, P.; FERRETTI, J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. **Am J Physiol,** v. 276, n. 1 Pt 1, p. E78-84, Jan 1999.

CERSOSIMO, E.; JUDD, R. L.; MILES, J. M. Insulin regulation of renal glucose metabolism in conscious dogs. **J Clin Invest,** v. 93, n. 6, p. 2584-9, Jun 1994.

CERSOSIMO, E.; ZAITSEVA, I. N.; AJMAL, M. Effects of beta-adrenergic blockade on hepatic and renal glucose production during hypoglycemia in conscious dogs. **Am J Physiol,** v. 275, n. 5 Pt 1, p. E792-7, Nov 1998.

CHARKOUDIAN, N. et al. Balance between cardiac output and sympathetic nerve activity in resting humans: role in arterial pressure regulation. **J Physiol,** v. 568, n. Pt 1, p. 315-21, Oct 2005.

CHIN, E. et al. Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. **Endocrinology,** v. 138, n. 3, p. 1267-75, Mar 1997.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 138, p. 271-281, Apr 2018.

CHOI, K. C. et al. Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin-induced diabetic rats. **Kidney Int Suppl,** v. 60, p. S23-7, Sep 1997.

CHON, K. H. et al. A novel quantitative method for diabetic cardiac autonomic neuropathy assessment in type 1 diabetic mice. **J Diabetes Sci Technol,** v. 8, n. 6, p. 1157-67, Nov 2014.

COOPER, M. E. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. **Lancet,** v. 352, n. 9123, p. 213-9, Jul 1998.

CREAGER, M. A.; LIANG, C. S.; COFFMAN, J. D. Beta adrenergic-mediated vasodilator response to insulin in the human forearm. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 235, n. 3, p. 709-14, Dec 1985.

DALL'AGO, P. et al. Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Auton Neurosci,** v. 131, n. 1-2, p. 28-35, Jan 2007.

DALL'AGO, P. et al. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res,** v. 30, n. 1, p. 119-24, Jan 1997.

DE ANGELIS, K. et al. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Braz J Med Biol Res,** v. 35, n. 9, p. 1091-100, Sep 2002.

DE ANGELIS, K. L. et al. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res,** v. 33, n. 6, p. 635-41, Jun 2000.

DE FERRANTI, S. D. et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. **Circulation,** v. 130, n. 13, p. 1110-30, Sep 2014.

DE JAGER, R. L. et al. Impact of Medication Adherence on the Effect of Renal Denervation: The SYMPATHY Trial. **Hypertension,** v. 69, n. 4, p. 678-684, Apr 2017.

DEFRONZO, R. A. et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers,** v. 1, p. 15019, 07 2015.

DOU, J. T. et al. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. **Learn Mem,** v. 12, n. 6, p. 646-55, 2005 Nov-Dec 2005.

DUGAICH, A. P. et al. Role of the rostral ventrolateral medulla in the arterial hypertension in chronic renal failure. **Int J Hypertens,** v. 2010, p. 219358, Jan 2011.

ESLER, M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. **J Appl Physiol (1985),** v. 108, n. 2, p. 227-37, Feb 2010.

ESLER, M.; LAMBERT, E.; SCHLAICH, M. Rebuttal from Esler, Lambert, and Schlaich. **J Appl Physiol (1985),** v. 109, n. 6, p. 2000-1, Dec 2010.

ESTRELA, H. F. et al. Differential Sympathetic Vasomotor Activation Induced by Liver Cirrhosis in Rats. **PLoS One,** v. 11, n. 4, p. e0152512, 2016.

EWING, D. J. Diabetic autonomic neuropathy and the heart. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 30 Suppl, p. 31-6, Feb 1996.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. **Q J Med,** v. 49, n. 193, p. 95-108, 1980.

FAGIUS, J.; BERNE, C. Increase in muscle nerve sympathetic activity in humans after food intake. **Clin Sci (Lond),** v. 86, n. 2, p. 159-67, Feb 1994.

FAGIUS, J.; BERNE, C. The increase in sympathetic nerve activity after glucose ingestion is reduced in type I diabetes. **Clin Sci (Lond),** v. 98, n. 5, p. 627-32, May 2000.

FARAH, V. M. et al. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz J Med Biol Res,** v. 32, n. 3, p. 361-9, Mar 1999.

FAZAN, R. et al. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. **Hypertension,** v. 30, n. 3 Pt 2, p. 632-5, Sep 1997.

FELDMAN-BILLARD, S. et al. Hypoglycemia-induced blood pressure elevation in patients with diabetes. **Arch Intern Med,** v. 170, n. 9, p. 829-31, May 2010.

FENG, Q. et al. Effects of renal denervation on cardiac oxidative stress and local activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system in acute myocardial infracted dogs. **BMC Cardiovasc Disord,** v. 17, n. 1, p. 65, Feb 2017.

FERNANDEZ, A. M.; TORRES-ALEMÁN, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. **Nat Rev Neurosci,** v. 13, n. 4, p. 225-39, Mar 2012.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, B. et al. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS. **Nat Rev Nephrol,** v. 10, n. 6, p. 325-46, Jun 2014.

FILIPPI, B. M. et al. Insulin and glucagon signaling in the central nervous system. **Rev Endocr Metab Disord,** v. 14, n. 4, p. 365-75, Dec 2013.

FONG, D. et al. Renal cellular hypoxia in adenine-induced chronic kidney disease. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 43, n. 10, p. 896-905, Oct 2016.

FROHMAN, L. A.; EZDINLI, E. Z.; JAVID, R. Effect of vagotomy and vagal stimulation on insulin secretion. **Diabetes,** v. 16, n. 7, p. 443-8, Jul 1967.

GARVEY, W. Modified elastic tissue-Masson trichrome stain. **Stain Technol,** v. 59, n. 4, p. 213-6, Jul 1984.

GEROZISSIS, K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. **Eur J Pharmacol,** v. 490, n. 1-3, p. 59-70, Apr 2004.

GHARIBI, F. et al. The Protective Effect of L-arginine in Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Adv Biomed Res,** v. 6, p. 100, 2017.

GHOLAMI, K. et al. Selection of suitable endogenous reference genes for qPCR in kidney and hypothalamus of rats under testosterone influence. **PLoS One,** v. 12, n. 6, p. e0176368, 2017.

GIACCHETTI, G. et al. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. **Trends Endocrinol Metab,** v. 16, n. 3, p. 120-6, Apr 2005.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? **Metabolism,** v. 44, n. 3, p. 363-8, Mar 1995.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. **Ann Intern Med,** v. 137, n. 9, p. 753-63, Nov 2002.

GRASSI, G. Renal denervation in cardiometabolic disease: concepts, achievements and perspectives. **Nutr Metab Cardiovasc Dis,** v. 23, n. 2, p. 77-83, Feb 2013.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J Physiol,** v. 242, n. 2, p. 489-503, Oct 1974.

HALL, J. E. et al. Chronic hyperinsulinemia and blood pressure regulation. **Am J Physiol,** v. 258, n. 3 Pt 2, p. F722-31, Mar 1990.

HARTHMANN, A. D. et al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. **Auton Neurosci,** v. 133, n. 2, p. 115-20, May 2007.

HOFFMAN, B. B.; ZIYADEH, F. N. Facilitative glucose transport proteins and sodium-glucose co-transporters in the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 4, n. 5, p. 406-11, Sep 1995.

HOFFMAN, R. P. et al. Hyperglycemia without hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. **J Diabetes Complications,** v. 13, n. 1, p. 17-22, 1999 Jan-Feb 1999.

HOFFMAN, R. P.; SINKEY, C. A.; ANDERSON, E. A. Hypoglycemia increases muscle sympathetic nerve activity in IDDM and control subjects. **Diabetes Care,** v. 17, n. 7, p. 673-80, Jul 1994.

HOLWERDA, S. W. et al. Arterial baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate in patients with type 2 diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 311, n. 5, p. H1170-H1179, Nov 2016.

HOSTETTER, T. H.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. **Kidney Int,** v. 19, n. 3, p. 410-5, Mar 1981.

HOYER, S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **Eur J Pharmacol,** v. 490, n. 1-3, p. 115-25, Apr 2004.

HUANG, H. S. et al. Ischemia- and reperfusion-sensitive cardiac sympathetic afferents: influence of H2O2 and hydroxyl radicals. **Am J Physiol,** v. 269, n. 3 Pt 2, p. H888-901, Sep 1995.

IEDA, M. et al. Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. **Circulation,** v. 114, n. 22, p. 2351-63, Nov 2006.

ILLES, P.; VERKHRATSKY, A. Purinergic neurone-glia signalling in cognitive-related pathologies. **Neuropharmacology,** v. 104, p. 62-75, May 2016.

IYNGKARAN, P. et al. The role and management of sympathetic overactivity in cardiovascular and renal complications of diabetes. **Diabetes Metab,** v. 39, n. 4, p. 290-8, Sep 2013.

JAWA, A. et al. Beta-blockers have a beneficial effect upon endothelial function and microalbuminuria in African-American subjects with diabetes and hypertension. **J Diabetes Complications,** v. 22, n. 5, p. 303-8, 2008 Sep-Oct 2008.

JAYANARAYANAN, S. et al. NMDA and AMPA receptor mediated excitotoxicity in cerebral cortex of streptozotocin induced diabetic rat: ameliorating effects of curcumin. **Chem Biol Interact,** v. 201, n. 1-3, p. 39-48, Jan 2013.

JIA, X. et al. SGLT2 Inhibitors and Cardiovascular Outcomes: Current Perspectives and Future Potentials. **Curr Diab Rep,** v. 18, n. 9, p. 63, Jul 2018.

JOOST, H. G.; WANDEL, S.; SCHÜRMANN, A. Structure-function relationship of glucose transporters catalyzing facilitated diffusion. **Exp Clin Endocrinol,** v. 102, n. 6, p. 434-8, 1994.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn,** v. 41, n. 3, p. 267-74, Jun 1978.

JORGENSEN, M. E. et al. New diagnostic criteria for diabetes: is the change from glucose to HbA1c possible in all populations? **J Clin Endocrinol Metab,** v. 95, n. 11, p. E333-6, Nov 2010.

KAKKAR, R. et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Mol Cell Biochem,** v. 151, n. 2, p. 113-9, Oct 1995.

KANETO, A.; MIKI, E.; KOSAKA, K. Effects of vagal stimulation on glucagon and insulin secretion. **Endocrinology,** v. 95, n. 4, p. 1005-10, Oct 1974.

KANWAR, Y. S. et al. Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: biochemical and autoradiographic evidence. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 80, n. 8, p. 2272-5, Apr 1983.

KARIO, K. et al. Effect of Catheter-Based Renal Denervation on Morning and Nocturnal Blood Pressure: Insights From SYMPLICITY HTN-3 and SYMPLICITY HTN-Japan. **Hypertension,** v. 66, n. 6, p. 1130-7, Dec 2015.

KARLSSON, S.; AHRÉN, B. Insulin and glucagon secretion by ganglionic nicotinic activation in adrenalectomized mice. **Eur J Pharmacol,** v. 342, n. 2-3, p. 291-5, Jan 1998.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science,** v. 215, n. 4529, p. 185-7, Jan 1982.

KATAYAMA, T. et al. Long-term renal denervation normalizes disrupted blood pressure circadian rhythm and ameliorates cardiovascular injury in a rat model of metabolic syndrome. **J Am Heart Assoc,** v. 2, n. 4, p. e000197, Aug 2013.

KAWADA, T. Prognostic value of glomerular filtration rate and proteinuria in patients with diabetes mellitus and advanced chronic kidney disease. **Clin Exp Nephrol**, Aug 2017.

KELANY, M. E. et al. Combination of Sitagliptin and Insulin against Type 2 Diabetes Mellitus with Neuropathy in Rats: Neuroprotection and Role of Oxidative and Inflammation Stress. **Pharmacology,** v. 98, n. 5-6, p. 242-250, 2016.

KERJASCHKI, D.; SHARKEY, D. J.; FARQUHAR, M. G. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. **J Cell Biol,** v. 98, n. 4, p. 1591-6, Apr 1984.

KLEINRIDDERS, A. et al. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. **Diabetes,** v. 63, n. 7, p. 2232-43, Jul 2014.

KLEINRIDDERS, A. et al. Leptin regulation of Hsp60 impacts hypothalamic insulin signaling. **J Clin Invest,** v. 123, n. 11, p. 4667-80, Nov 2013.

KLINE, R. L.; MERCER, P. F. Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation in rats. **Am J Physiol,** v. 238, n. 5, p. R353-8, May 1980.

KOLSET, S. O.; REINHOLT, F. P.; JENSSEN, T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. **J Histochem Cytochem,** v. 60, n. 12, p. 976-86, Dec 2012.

KOULIS, C. et al. AT2R agonist, compound 21, is reno-protective against type 1 diabetic nephropathy. **Hypertension,** v. 65, n. 5, p. 1073-81, May 2015.

KRAYACICH, J.; KLINE, R. L.; MERCER, P. F. Supersensitivity to NE alters renal function of chronically denervated rat kidneys. **Am J Physiol,** v. 252, n. 5 Pt 2, p. F856-64, May 1987.

KREBS, H. A.; HEMS, R.; GASCOYNE, T. RENAL GLUCONEOGENESIS. IV. GLUCONEOGENESIS FROM SUBSTRATE COMBINATIONS. **Acta Biol Med Ger,** v. 11, p. 607-15, 1963.

KRIZ, W. et al. Accumulation of worn-out GBM material substantially contributes to mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 312, n. 6, p. F1101-F1111, Jun 2017.

KUEHL, M.; STEVENS, M. J. Cardiovascular autonomic neuropathies as complications of diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol,** v. 8, n. 7, p. 405-16, Feb 2012.

KUMAGAI, H. et al. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. **Hypertens Res,** v. 35, n. 2, p. 132-41, Feb 2012.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 17, n. 2, p. 168-73, Mar 2008.

KUWABARA, T. et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. **EMBO Mol Med,** v. 3, n. 12, p. 742-54, Dec 2011.

LA ROVERE, M. T. et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet,** v. 351, n. 9101, p. 478-84, Feb 1998.

LAHAYE, S. E. D. et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β-adrenoceptors in diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol,** v. 9, p. 72, Nov 2010.

LAKHI, S.; SNOW, W.; FRY, M. Insulin modulates the electrical activity of subfornical organ neurons. **Neuroreport,** v. 24, n. 6, p. 329-34, Apr 2013.

LANGER, S. Z. Proceedings: Pre and postsynaptic components of supersensitivity induced by surgical sympathetic denervation. **Acta Physiol Lat Am,** v. 23, n. 6, p. 604-6, 1973.

LEE, Y. P. et al. Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. **Am J Clin Nutr,** v. 89, n. 3, p. 766-72, Mar 2009.

LEFRANDT, J. D. et al. Autonomic dysfunction in diabetes: a consequence of cardiovascular damage. **Curr Diabetes Rev,** v. 6, n. 6, p. 348-58, Nov 2010.

LEPEDDA, A. J. et al. Significance of urinary glycosaminoglycans/proteoglycans in the evaluation of type 1 and type 2 diabetes complications. **J Diabetes Complications,** v. 31, n. 1, p. 149-155, Jan 2017.

LIAMIS, G. et al. Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors. **Am J Med,** v. 126, n. 3, p. 256-63, Mar 2013.

LINCEVICIUS, G. S. et al. Differential effects of renal denervation on arterial baroreceptor function in Goldblatt hypertension model. **Auton Neurosci**, Jun 2017.

LINDBERG, K. et al. The kidney is the principal organ mediating klotho effects. **J Am Soc Nephrol,** v. 25, n. 10, p. 2169-75, Oct 2014.

LIU, C. W. et al. Temporal expression profiling of plasma proteins reveals oxidative stress in early stages of Type 1 Diabetes progression. **J Proteomics**, Oct 2017.

LONGHURST, J. C. Cardiac receptors: their function in health and disease. **Prog Cardiovasc Dis,** v. 27, n. 3, p. 201-22, 1984 Nov-Dec 1984.

LUIPPOLD, G.; BEILHARZ, M.; MÜHLBAUER, B. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D(2)-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. **Nephrol Dial Transplant,** v. 16, n. 7, p. 1350-6, Jul 2001.

LUIPPOLD, G.; BEILHARZ, M.; MÜHLBAUER, B. Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. **Nephrol Dial Transplant,** v. 19, n. 2, p. 342-7, Feb 2004.

MA, J. et al. Requirement for TLR2 in the development of albuminuria, inflammation and fibrosis in experimental diabetic nephropathy. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 7, n. 2, p. 481-95, 2014.

MAEDA, C. Y. et al. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. **Hypertension,** v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1100-4, Dec 1995.

MAHFOUD, F. et al. Effect of renal sympathetic denervation on glucose metabolism in patients with resistant hypertension: a pilot study. **Circulation,** v. 123, n. 18, p. 1940-6, May 2011.

MALDONADO-CERVANTES, M. I. et al. Autocrine modulation of glucose transporter SGLT2 by IL-6 and TNF-α in LLC-PK(1) cells. **J Physiol Biochem,** v. 68, n. 3, p. 411-20, Sep 2012.

MARGOLIS, R. U.; ALTSZULER, N. Insulin in the cerebrospinal fluid. **Nature,** v. 215, n. 5108, p. 1375-6, Sep 1967.

MARQUARD, J. et al. Characterization of pancreatic NMDA receptors as possible drug targets for diabetes treatment. **Nat Med,** v. 21, n. 4, p. 363-72, Apr 2015.

MCALLEN, R. M.; MAY, C. N.; CAMPOS, R. R. The supply of vasomotor drive to individual classes of sympathetic neuron. **Clin Exp Hypertens,** v. 19, n. 5-6, p. 607-18, 1997 Jul-Aug 1997.

MCDOWELL, T. S. et al. Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. **Am J Physiol,** v. 266, n. 1 Pt 2, p. H235-43, Jan 1994.

MCEWEN, L. N. et al. Temporal trends in recording of diabetes on death certificates: results from Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD). **Diabetes Care,** v. 34, n. 7, p. 1529-33, Jul 2011.

MELISSINOS, K. G. et al. Serum and erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal failure. **Nephron,** v. 28, n. 2, p. 76-9, 1981.

MEYER, C. et al. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. **J Clin Invest,** v. 102, n. 3, p. 619-24, Aug 1998.

MILANEZ, M. I. O. et al. Control of renal sympathetic nerve activity by neurotransmitters in the spinal cord in goldblatt hypertension. **Brain Res**, Jun 2018.

MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci (Lond),** v. 84, n. 4, p. 407-12, Apr 1993.

MOORE, M. C. et al. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. **Adv Nutr,** v. 3, n. 3, p. 286-94, May 2012.

MORGAN, D. A. et al. Nonuniform regional sympathetic nerve responses to hyperinsulinemia in rats. **Am J Physiol,** v. 264, n. 2 Pt 2, p. R423-7, Feb 1993.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Mol Aspects Med,** v. 34, n. 2-3, p. 121-38, 2013 Apr-Jun 2013.

MUNTZEL, M. et al. Anteroventral third ventricle lesions abolish lumbar sympathetic responses to insulin. **Hypertension,** v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1059-62, Jun 1994.

MUNTZEL, M. S. et al. Cafeteria diet increases fat mass and chronically elevates lumbar sympathetic nerve activity in rats. **Hypertension,** v. 60, n. 6, p. 1498-502, Dec 2012.

MUNTZEL, M. S. et al. Mechanisms of insulin action on sympathetic nerve activity. **Clin Exp Hypertens,** v. 17, n. 1-2, p. 39-50, 1995 Jan-Feb 1995.

MURIS, D. M. et al. Microvascular dysfunction: an emerging pathway in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Rev Endocr Metab Disord,** v. 14, n. 1, p. 29-38, Mar 2013.

NATALI, A. et al. Effects of insulin on hemodynamics and metabolism in human forearm. **Diabetes,** v. 39, n. 4, p. 490-500, Apr 1990.

NATHAN, D. M. et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 329, n. 14, p. 977-86, 09 1993.

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.

NIU, H. S. et al. Erythropoietin ameliorates hyperglycemia in type 1-like diabetic rats. **Drug Des Devel Ther,** v. 10, p. 1877-84, 2016.

NORDLANDER, M. et al. Renal and cardiovascular effects of acute and chronic administration of felodipine to SHR. **Eur J Pharmacol,** v. 113, n. 1, p. 25-36, Jul 1985.

OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 128, p. 40-50, Jun 2017.

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.

OSHIMA, N. et al. Direct effects of glucose, insulin, GLP-1, and GIP on bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla in neonatal wistar rats. **Neuroscience,** v. 344, p. 74-88, Mar 2017.

OWEN, O. E. et al. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. **J Clin Invest,** v. 48, n. 3, p. 574-83, Mar 1969.

OZDEMIRLER, G. et al. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. **Horm Metab Res,** v. 27, n. 4, p. 194-6, Apr 1995.

PAGE, M. M.; WATKINS, P. J. Cardiorespiratory arrest and diabetic autonomic neuropathy. **Lancet,** v. 1, n. 8054, p. 14-6, Jan 1978.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med,** v. 70, n. 1, p. 158-69, Jul 1967.

PAN, T.; GUO, J. H.; TENG, G. J. Renal Denervation: A Potential Novel Treatment for Type 2 Diabetes Mellitus? **Medicine (Baltimore),** v. 94, n. 44, p. e1932, Nov 2015.

PATARRÃO, R. S.; LAUTT, W. W.; MACEDO, M. P. Acute glucagon induces postprandial peripheral insulin resistance. **PLoS One,** v. 10, n. 5, p. e0127221, 2015.

PATEL, K. P. et al. Enhanced angiotensin II-mediated central sympathoexcitation in streptozotocin-induced diabetes: role of superoxide anion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 300, n. 2, p. R311-20, Feb 2011.

PATEL, K. P.; ZHANG, P. L. Baroreflex function in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 27, n. 1, p. 1-9, Jan 1995.

PELELI, M. et al. Renal denervation attenuates NADPH oxidase-mediated oxidative stress and hypertension in rats with hydronephrosis. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 310, n. 1, p. F43-56, Jan 2016.

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, Oct 2017.

PERSEGHIN, G. et al. Regulation of glucose homeostasis in humans with denervated livers. **J Clin Invest,** v. 100, n. 4, p. 931-41, Aug 1997.

PETROVIC, T.; ANDERSON, W. P.; BELL, C. Neuronal and nonneuronal contributions to renal catecholamine content in the dog. **J Neurochem,** v. 47, n. 2, p. 423-5, Aug 1986.

PHILLIPS, J. K.; CAMPOS, R. R. Role of renal nerves in normal and pathophysiological conditions. **Auton Neurosci,** v. 204, p. 1-3, May 2017.

PILOWSKY, P. M.; GOODCHILD, A. K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. **J Hypertens,** v. 20, n. 9, p. 1675-88, Sep 2002.

PONTES, R. B. et al. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na+/H+ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 308, n. 8, p. F848-56, Apr 2015.

PÁLSSON, R.; PATEL, U. D. Cardiovascular complications of diabetic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis,** v. 21, n. 3, p. 273-80, May 2014.

RAATS, C. J.; VAN DEN BORN, J.; BERDEN, J. H. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. **Kidney Int,** v. 57, n. 2, p. 385-400, Feb 2000.

RAFIQ, K. et al. Role of the renal sympathetic nerve in renal glucose metabolism during the development of type 2 diabetes in rats. **Diabetologia,** v. 58, n. 12, p. 2885-98, Dec 2015.

RAHMOUNE, H. et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes,** v. 54, n. 12, p. 3427-34, Dec 2005.

RAHMOUNI, K. et al. Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. **J Clin Invest,** v. 114, n. 5, p. 652-8, Sep 2004.

RAMCHANDRA, R. et al. Is the chronically denervated kidney supersensitive to catecholamines? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 282, n. 2, p. R603-10, Feb 2002.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 32, n. 9, p. 2052-9, Sep 2012.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med,** v. 22, n. 4, p. 359-70, Apr 2005.

RIBEIRO, I. M.; FERREIRA-NETO, H. C.; ANTUNES, V. R. Subdiaphragmatic vagus nerve activity and hepatic venous glucose are differentially regulated by the central actions of insulin in Wistar and SHR. **Physiol Rep,** v. 3, n. 5, May 2015.

ROBERTSON, R. P.; HARMON, J. S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. **Free Radic Biol Med,** v. 41, n. 2, p. 177-84, Jul 2006.

ROSENSTOCK, J. et al. Effects of dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on HbA(1c), body weight, and hypoglycemia risk in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on pioglitazone monotherapy. **Diabetes Care,** v. 35, n. 7, p. 1473-8, Jul 2012.

ROWAIYE, O. O.; JANKOWSKA, E. A.; PONIKOWSKA, B. Baroreceptor sensitivity and diabetes mellitus. **Cardiol J,** v. 20, n. 5, p. 453-63, 2013.

RUMP, L. C. et al. Dopamine DA2-receptor activation inhibits noradrenaline release in human kidney slices. **Kidney Int,** v. 43, n. 1, p. 197-204, Jan 1993.

RÖSEN, P. et al. Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic rat heart: influence of tocopherol as antioxidant. **Diabetologia,** v. 38, n. 10, p. 1157-68, Oct 1995.

SALMAN, I. M. et al. Renal sympathetic nervous system hyperactivity in early streptozotocin-induced diabetic kidney disease. **Neurourol Urodyn,** v. 30, n. 3, p. 438-46, Mar 2011.

SANDERS, J. S.; MARK, A. L.; FERGUSON, D. W. Evidence for cholinergically mediated vasodilation at the beginning of isometric exercise in humans. **Circulation,** v. 79, n. 4, p. 815-24, Apr 1989.

SANTULLI, G. et al. Age-related impairment in insulin release: the essential role of β(2)-adrenergic receptor. **Diabetes,** v. 61, n. 3, p. 692-701, Mar 2012.

SARTORIUS, T. et al. The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? **PLoS One,** v. 10, n. 5, p. e0126804, 2015.

SATO, K. L. et al. Renal nerve ultrastructural alterations in short term and long term experimental diabetes. **BMC Neurosci,** v. 15, p. 5, Jan 2014.

SATOH, M. et al. Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. **J Am Soc Nephrol,** v. 12, n. 2, p. 317-25, Feb 2001.

SAVARESE, J. J.; BERKOWITZ, B. A. beta-Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. **Life Sci,** v. 25, n. 24-25, p. 2075-8, 1979 Dec 10-17 1979.

SCHAAN, B. D. et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Braz J Med Biol Res,** v. 37, n. 12, p. 1895-902, Dec 2004.

SCHLAICH, M. et al. Metabolic syndrome: a sympathetic disease? **Lancet Diabetes Endocrinol,** v. 3, n. 2, p. 148-57, Feb 2015.

SCHLAICH, M. P. Renal Sympathetic Denervation: A Viable Option for Treating Resistant Hypertension. **Am J Hypertens,** v. 30, n. 9, p. 847-856, Sep 2017.

SCHMIEDER, R. E. et al. ESH position paper: renal denervation - an interventional therapy of resistant hypertension. **J Hypertens,** v. 30, n. 5, p. 837-41, May 2012.

SELBY, J. V. et al. The natural history and epidemiology of diabetic nephropathy. Implications for prevention and control. **JAMA,** v. 263, n. 14, p. 1954-60, Apr 1990.

SENGES, J. et al. Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. **J Mol Cell Cardiol,** v. 12, n. 12, p. 1341-51, Dec 1980.

SHARMA, M. D.; GARBER, A. J.; FARMER, J. A. Role of insulin signaling in maintaining energy homeostasis. **Endocr Pract,** v. 14, n. 3, p. 373-80, Apr 2008.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N Engl J Med,** v. 341, n. 4, p. 248-57, Jul 1999.

SHIMOMURA, H.; SPIRO, R. G. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. **Diabetes,** v. 36, n. 3, p. 374-81, Mar 1987.

SIMÕES, A. E. et al. Efficient recovery of proteins from multiple source samples after TRIzol(®) or TRIzol(®)LS RNA extraction and long-term storage. **BMC Genomics,** v. 14, p. 181, Mar 2013.

SINGH, R. et al. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. **Diabetes,** v. 48, n. 10, p. 2066-73, Oct 1999.

SKOGLUND, G.; LUNDQUIST, I.; AHRÉN, B. Selective alpha 2-adrenoceptor activation by clonidine: effects on 45Ca2+ efflux and insulin secretion from isolated rat islets. **Acta Physiol Scand,** v. 132, n. 3, p. 289-96, Mar 1988.

SKRAPARI, I.; TENTOLOURIS, N.; KATSILAMBROS, N. Baroreflex function: determinants in healthy subjects and disturbances in diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Curr Diabetes Rev,** v. 2, n. 3, p. 329-38, Aug 2006.

SOTIRAKOPOULOS, N. et al. Acid-base and electrolyte disorders in patients with diabetes mellitus. **Saudi J Kidney Dis Transpl,** v. 23, n. 1, p. 58-62, Jan 2012.

STARKE, K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. **Rev Physiol Biochem Pharmacol,** v. 77, p. 1-124, 1977.

STOCKER, S. D.; MUNTZEL, M. S. Recording sympathetic nerve activity chronically in rats: surgery techniques, assessment of nerve activity, and quantification. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 305, n. 10, p. H1407-16, Nov 2013.

STRAZNICKY, N. E. et al. The effects of weight loss versus weight loss maintenance on sympathetic nervous system activity and metabolic syndrome components. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 96, n. 3, p. E503-8, Mar 2011.

STREEFLAND, C.; MAES, F. W.; BOHUS, B. Autonomic brainstem projections to the pancreas: a retrograde transneuronal viral tracing study in the rat. **J Auton Nerv Syst,** v. 74, n. 2-3, p. 71-81, Dec 1998.

STROJEK, K. et al. Lowering of microalbuminuria in diabetic patients by a sympathicoplegic agent: novel approach to prevent progression of diabetic nephropathy? **J Am Soc Nephrol,** v. 12, n. 3, p. 602-5, Mar 2001.

STUMVOLL, M. et al. Uptake and release of glucose by the human kidney. Postabsorptive rates and responses to epinephrine. **J Clin Invest,** v. 96, n. 5, p. 2528-33, Nov 1995.

TAKASE, O. et al. NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. **Kidney Int,** v. 68, n. 2, p. 464-73, Aug 2005.

TAKIMOTO, C. et al. Candesartan and insulin reduce renal sympathetic nerve activity in hypertensive type 1 diabetic rats. **Hypertens Res,** v. 31, n. 10, p. 1941-51, Oct 2008.

TAN, H. K.; HEPTINSTALL, R. H. Experimental pyelonephritis. A light and electron microscopic study of the periodic acid-Schiff positive interstitial cell. **Lab Invest,** v. 20, n. 1, p. 62-9, Jan 1969.

THOMAS, M. C.; JANDELEIT-DAHM, K.; BONNET, F. Beyond Glycosuria: Exploring the intrarenal effects of $SGLT_{-2}$ inhibition in diabetes. **Diabetes Metab,** v. 40, n. 6 Suppl 1, p. S17-22, Dec 2014.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 298, n. 2, p. E141-5, Feb 2010.

TOBLLI, J. E. et al. Long-term treatment with nebivolol attenuates renal damage in Zucker diabetic fatty rats. **J Hypertens,** v. 29, n. 8, p. 1613-23, Aug 2011.

TOMINAGA, M. et al. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. **Diabetes Care,** v. 22, n. 6, p. 920-4, Jun 1999.

TRIMARCHI, H. Podocyturia: Potential applications and current limitations. **World J Nephrol,** v. 6, n. 5, p. 221-228, Sep 2017.

USTINOVA, E. E.; SCHULTZ, H. D. Renal sympathetic nerve activity during cardiac ischemia and reperfusion in rats. **Am J Physiol,** v. 271, n. 4 Pt 2, p. R1033-40, Oct 1996.

VALLON, V. et al. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. **J Am Soc Nephrol,** v. 22, n. 1, p. 104-12, Jan 2011.

VERBERNE, A. J.; SARTOR, D. M. Rostroventrolateral medullary neurons modulate glucose homeostasis in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 299, n. 5, p. E802-7, Nov 2010.

VESTRI, S. et al. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. **J Membr Biol,** v. 182, n. 2, p. 105-12, Jul 2001.

VINIK, A. I. et al. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Care,** v. 26, n. 5, p. 1553-79, May 2003.

WANG, K. et al. Renal Denervation Attenuates Multi-Organ Fibrosis and Improves Vascular Remodeling in Rats with Transverse Aortic Constriction Induced Cardiomyopathy. **Cell Physiol Biochem,** v. 40, n. 3-4, p. 465-476, 2016.

WANNER, C. et al. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. **N Engl J Med,** v. 375, n. 4, p. 323-34, Jul 2016.

WANNER, C. et al. Empagliflozin and Clinical Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes, Established Cardiovascular Disease and Chronic Kidney Disease. **Circulation**, Sep 2017.

WILKINSON-BERKA, J. L. et al. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2)27 rat. **Diabetes,** v. 51, n. 11, p. 3283-9, Nov 2002.

WITKOWSKI, A. et al. Effects of renal sympathetic denervation on blood pressure, sleep apnea course, and glycemic control in patients with resistant hypertension and sleep apnea. **Hypertension,** v. 58, n. 4, p. 559-65, Oct 2011.

WOLF, G.; ZIYADEH, F. N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney Int,** v. 56, n. 2, p. 393-405, Aug 1999.

WOOLLIAMS, J. A. et al. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Res Vet Sci,** v. 34, n. 3, p. 253-6, May 1983.

WRIGHT, E. M. Glucose transport families SLC5 and SLC50. **Mol Aspects Med,** v. 34, n. 2-3, p. 183-96, 2013 Apr-Jun 2013.

WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B. A.; LOO, D. F. Active sugar transport in health and disease. **J Intern Med,** v. 261, n. 1, p. 32-43, Jan 2007.

WRIGHT, E. M.; LOO, D. D.; HIRAYAMA, B. A. Biology of human sodium glucose transporters. **Physiol Rev,** v. 91, n. 2, p. 733-94, Apr 2011.

XUE, B. et al. Sensitization of slow pressor angiotensin II (Ang II)-initiated hypertension: induction of sensitization by prior Ang II treatment. **Hypertension,** v. 59, n. 2, p. 459-66, Feb 2012.

YAO, Y. et al. Renal functional responses in diabetic nephropathy following chronic bilateral renal denervation. **Auton Neurosci,** v. 204, p. 98-104, May 2017.

YAO, Y. et al. Chronic bilateral renal denervation attenuates renal injury in a transgenic rat model of diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 307, n. 3, p. F251-62, Aug 2014.

ZATZ, R. et al. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 82, n. 17, p. 5963-7, Sep 1985.

ZHANG, X.; ZHENG, X.; YUAN, Y. Treatment of insulin resistance: straight from the gut. **Drug Discov Today,** v. 21, n. 8, p. 1284-90, Aug 2016.

ZIEGLER, D.; GRIES, F. A. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. **Diabetes,** v. 46 Suppl 2, p. S62-6, Sep 1997.

ZINMAN, B. et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. **N Engl J Med,** v. 373, n. 22, p. 2117-28, 11 2015.

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

, 29 de setembro de 2014
CEUA N 1787250714

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Tales Lyra De Oliveira
Depto/Disc: Disciplina De Fisiologia Cardiovascular E Respiratória
Prof. Dr. Ruy Ribeiro De Campos Junior (orientador)

Título do projeto: "Papel dos nervos renais no diabetes mellitus experimental".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

No modelo experimental de DM, tem sido demonstrado que a ANSr está aumentada paradoxalmente em relação a outros territórios do organismo. Sabe-se também que este modelo apresenta estresse oxidativo e aumento da ativação do RAS e que tais fatores podem estar envolvidos na patofisiologia do DM. Portanto, o presente projeto pretende avaliar o nível basal tônico e reflexo dos nervos renais e de outros dois territórios do SNS (nervo lombar e frênico), por meio do registro direto dos nervos, com a finalidade de avaliar se há ajustes topográficos da atividade nervosa simpática nesta condição. Além disso, serão avaliados os mecanismos de controle da PA por meio de análise espectral. Concomitantemente, estudaremos as ações intrarrenais, centrais e sistêmicas do estresse oxidativo e do RAS através de análises moleculares. Em outra etapa do estudo, buscaremos avaliar o papel da RD no balanço simpático, cardiovascular e nos parâmetros de controle glicêmico do DM. Assim, pretendemos melhorar a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção do diabetes.

ANIMAIS:
Serão utilizados:
- 100 Ratos heterogênicos Wistar, Machos, idade: 10 semanas
Procedência: Biotério/CEDEME da UNIFESP
Manutenção: Biotério 24 da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da UNIFESP

VIGÊNCIA DO ESTUDO:
início previsto para: Outubro/2014 com término previsto para: Outubro/2018

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 19/09/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572, 1º andar conjunto 14 CEP 04023-061 São Paulo - tel: 55 (11) 5571-1062 / fax: 55 (11) 5539-7162
: e-mail:secretaria.cepunifesp@gmail.com
CEUA N: 1787250714

APÊNDICE I – Manuscrito submetido para publicação com parte dos resultados da presente tese

1. Oliveira TL, Lincevicius GS, Shimoura CG, Simões-Sato AY, Bergamaschi CT, Campos RR. **"Renal denervation improves the cardiovascular, metabolic and renal functions in streptozotocin-induced diabetic rats"**. Diabetes and Vascular Disease Research. 2018.

APÊNDICE II – Manuscritos em Colaboração Publicados

1. Lincevicius GS, Shimoura CG, Nishi EM, Oliveira TL, Cespedes JG, Bergamaschi CT, Campos RR. **"Differential effects of renal denervation on arterial baroreceptor function in Goldblatt hypertension model"**. Auton Neurosci. 2017 Jun 21. pii: S1566-0702(17)30158-3. doi: 10.1016/j.autneu.2017.06.002.

2. Oliveira, TL, Zambrano, L. **"Transporte de glucosa y agua en el pulmón de diabéticos. El Co transportador SGLT1: un nuevo albo terapéutico para reducir el riesgo de neumonías en diabéticos"**. *Revista Hispanoamericana De Ciencias De La Salud*, *3*(4), 111-114. 2018.

APÊNDICE III – Manuscritos em Colaboração Submetidos para Publicação

1. Cavalcante-Araujo PM, Oliveira TL, Agra LC, Vieira LFA, Melo IS, Medeiros NC, Smaniotto S, Barreto EO, Sabino-Silva R. **"Gold nanoparticles exposition and ovalbumin-induced asthma promotes salivary hypofunction in mice"**. Oral Diseases. 2017.

2. Igor Santana Melo, Návylla Candeia Medeiros, Jamylle Ferro, Polliane M. Cavalcante-Araújo, Tales Oliveira, Cássio Santos, Léia Cardoso-Sousa, Emilia Maria Aguiar, Olagide Castro, Renata Alves-Balvedi, Luciano Rodrigues, Jandir Hickmann, Angelo Pipi, Luiz Goulart, Emiliano Barreto, Robinson Sabino-Silva. **"Restoration of morphine- and cyclo-Gly-Pro-induced salivary hyposecretion by naloxone in mice".** Scientific Reports (*Nature*). 2017.

3. Léia Cardoso-Sousa, Emilia Maria Gomes Aguiar, Douglas Carvalho Caixeta, Danielle Diniz Vilela, Thúlio Marquez Cunha, Paulo Rogério Faria, Foued Salmen Espindola, Alexandre Antônio Vieira, Tales Lyra Oliveira, Luiz Ricardo Goulart, Robinson Sabino-Silva. "**Salbutamol and Phlorizin promote a key role in acute lung inflammation and disease severity in experimental sepsis**". Scientific Reports (*Nature*). 2018.