

## Efeitos e Mecanismos da Denervação Simpática Renal por Radiofrequência na Anti-Hipertensão em Cães

*Effects and Mechanisms of Radiofrequency Ablation of Renal Sympathetic Nerve on Anti-Hypertension in Canine*

Wei Chen, Xiaohong Tang, Xiaofang Yang, Chunyan Weng, Kan Yang, Juan Wen, Hong Liu, Yang Wu

Department of Cardiology - the Third Xiangya Hospital - Central South University, Changsha - Hunan

### Resumo

**Fundamentos:** A denervação simpática renal por radiofrequência (DSR) mostra redução eficaz da pressão arterial (PA) de pacientes hipertensos, ainda que os mecanismos específicos permaneçam obscuros.

**Objetivo:** Fizemos a hipótese de que níveis alterados de noradrenalina (NA) e mudanças nas enzimas relacionadas à NA e enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), angiotensina (Ang)-(1-7) e receptor Mas são mediadores dos efeitos anti-hipertensivos da DSR.

**Métodos:** Foram avaliados os valores médios de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) no início e durante o seguimento. Foram medidas as concentrações plasmática e renal de noradrenalina (NA) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica, e os níveis de enzima relacionada à NA e ECA2-Ang-(1-7)-Mas através de PCR em tempo real, Western blot e imunohistoquímica ou Elisa em um modelo canino de hipertensão que recebeu ração rica em gordura e foi tratado com DSR. Os parâmetros também foram determinados em um grupo de cirurgia simulada submetido à arteriografia renal e em um grupo controle que recebeu dieta normal.

**Resultados:** DSR causou diminuição da PAS, PAD, PAM e das concentrações plasmática e renal de NA. Em comparação ao grupo placebo, a expressão da tirosina hidroxilase (TH) renal foi menor e a da renalase foi maior no grupo DSR. Em comparação ao grupo controle, os níveis de TH renal e de catecol-o-metil-transferase (COMT) foram maiores e os de renalase foram menores no grupo cirurgia simulada. Além disso, os níveis renais de ECA2, Ang-(1-7) e Mas foram maiores no grupo DSR do que no grupo cirurgia simulada, que, por sua vez, foram menores do que no grupo controle.

**Conclusões:** A DSR mostra efeitos anti-hipertensivos com redução da NA e ativação da ECA2-Ang-(1-7)-Mas, o que indica que pode contribuir com o efeito anti-hipertensivo da DSR. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):237-245)

**Palavras-chave:** Simpatectomia; Hipertensão; Insuficiência Renal; Ondas de Rádio; Cães.

### Abstract

**Background:** Radiofrequency ablation of renal sympathetic nerve (RDN) shows effective BP reduction in hypertensive patients while the specific mechanisms remain unclear.

**Objective:** We hypothesized that abnormal levels of norepinephrine (NE) and changes in NE-related enzymes and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin (Ang)-(1-7) and Mas receptor mediate the anti-hypertensive effects of RDN.

**Methods:** Mean values of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and mean arterial pressure (MAP) were assessed at baseline and follow-up. Plasma and renal norepinephrine (NE) concentrations were determined using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, and levels of NE-related enzyme and ACE2-Ang(1-7)-Mas were measured using real time PCR, Western blot and immunohistochemistry or Elisa in a hypertensive canine model fed with high-fat diet and treated with RDN. The parameters were also determined in a sham group treated with renal arteriography and a control group fed with normal diet.

**Results:** RDN decreased SBP, DBP, MAP, plasma and renal NE. Compared with the sham group, renal tyrosine hydroxylase (TH) expression was lower and renalase expression was higher in the RDN group. Compared with the control group, renal TH and catechol-o-methyl transferase (COMT) were higher and renalase was lower in the sham group. Moreover, renal ACE2, Ang-(1-7) and Mas levels of the RDN group were higher than those of the sham group, which were lower than those of the control group.

**Conclusion:** RDN shows anti-hypertensive effect with reduced NE and activation of ACE2-Ang(1-7)-Mas, indicating that it may contribute to the anti-hypertensive effect of RDN. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):237-245)

**Keywords:** Sympatectomy; Hypertension; Renal Insufficiency; Radio Waves; Dogs.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Xiaohong Tang •

The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, P.R. China, Departamento de Cardiologia

E-mail: xhtang007@126.com

Artigo recebido em 12/05/2016, revisado em 08/08/2016, aceito em 31/08/2016.

DOI: 10.5935/abc.20170014

## Introdução

A hipertensão é principal causa de doenças cardiovasculares no mundo todo,<sup>1</sup> resultando numa estimativa de 7,6 milhões de mortes por ano.<sup>2</sup> Globalmente, 40,8% da população sofre de hipertensão, com uma taxa de conhecimento da doença de 46,5% e taxa de controle de 32,5%.<sup>3</sup> O controle da hipertensão é um desafio devido aos efeitos colaterais, baixa aderência e eficácia limitada das drogas anti-hipertensivas.

Os efeitos anti-hipertensivos da denervação simpática renal por radiofrequência (DSR) foram descritos pela primeira vez por Krum et al.,<sup>4</sup> em 2009. Os estudos Symplicity HTN-1<sup>5</sup> e Symplicity HTN-2<sup>6</sup> mostraram efeitos anti-hipertensivos profundos durante um seguimento de 36 meses. Uma metanálise confirmou que o tratamento com DSR é eficaz para hipertensão resistente,<sup>7</sup> e se mostrou superior ao tratamento clínico otimizado na redução da pressão arterial (PA).<sup>8</sup> No entanto, o estudo Symplicity HTN-3 não mostrou redução eficaz da PA em pacientes portadores de hipertensão resistente,<sup>9</sup> indicando que apenas uma minoria dos pacientes era candidata a DSR.

Uma vez que os mecanismos anti-hipertensivos específicos da DSR não são claros, as concentrações de noradrenalina (NA) são um índice da atividade neural simpática em humanos, a qual está positivamente correlacionada com a PA. A DSR pode reduzir a NA que contribui para baixar a PA, embora o efeito da DSR sobre a NA seja inconsistente.<sup>10,11</sup> Os níveis variáveis de NA após DSR podem ser decorrentes da atividade de tirosina hidroxilase (TH), renalase, catecol-o-metil transferase (COMT) e transportador de noradrenalina (TNA), que são as enzimas associadas à síntese e metabolismo da NA. Por outro lado, o eixo da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)/angiotensina (Ang)-(1-7)/Mas constitui uma alternativa ao sistema renina-angiotensina (SRA) e representa um mecanismo intrínseco na indução de ações vasoprotetoras através da contrarregulação do eixo ECA/AngII/AT1R, induzindo, assim, muitos efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares (DCVs), estando inversamente relacionado à PA,<sup>12</sup> e exibindo proteção cardiovascular e renal. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da DSR sobre a NA renal e as alterações nas enzimas relacionadas à NA (TH, renalase, COMT e TNA). Além disso, investigamos os níveis renais do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas após DSR e discutimos os mecanismos anti-hipertensivos potenciais da DSR.

## Métodos

### Preparo dos animais

Todos os procedimentos relativos ao uso e cuidados dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Central South University. Cães beagle (n=28, 10 a 12 meses de idade, pesando 11-12kg) foram divididos aleatoriamente em um grupo modelo de hipertensão (n = 22) e um grupo controle (n = 6). Ao longo do estudo, os cães foram alimentados com dieta rica em gordura (foram acrescentados 0,3 a 0,4 kg de toucinho à dieta normal de 250g/dia) no grupo modelo, e com dieta normal (250g/dia, incluindo 23% de proteína, 11% de gordura, 4,9% de fibras, 10% de água, 1-3% de cálcio, 0,8% de fósforo, 0,29% de metionina, 11000UI de vitamina A/kg, 1000UI de vitamina D3 / kg e 500 UI de vitamina E / kg) no grupo controle. Após 3 meses de dieta rica em gordura, 20 cães atingiram cerca de 50% de aumento no peso corporal, sendo a ingesta de gordura reduzida a um nível de

manutenção. Esse modelo de obesidade canina após dieta rica em gordura mimetiza de perto as alterações cardiovasculares, renais, hormonais e metabólicas observadas em indivíduos humanos obesos. O grupo hipertenso foi dividido em um grupo cirurgia (n = 10) e um grupo cirurgia simulada (n = 10). Três animais foram excluídos pelos seguintes motivos: hematoma retroperitoneal por punção da artéria femoral (n=1) e morte decorrente da anestesia (n=2). O grupo cirurgia (n = 9) foi tratado com denervação simpática renal por radiofrequência, enquanto que o grupo cirurgia simulada (n= 8) e o grupo controle (n = 6) foram tratados com arteriografia renal. Seis meses após DSR, sacrificamos os cães beagle sob anestesia profunda por injeção intramuscular de pentobarbital sódico (30-35 mg/kg).

### Denervação simpática renal por radiofrequência

A cirurgia foi realizada a temperatura ambiente, com jejum prévio de 24 horas e após anestesia com injeção intramuscular de pentobarbital sódico (30-35 mg/kg). Após a anestesia bem-sucedida, os cães eram colocados na posição supina sobre a mesa cirúrgica e, em seguida, era feita antisepsia de rotina da artéria femoral direita. Inseria-se um cateter através da artéria femoral para monitorar a PA e a arteriografia renal. O cateter de ablação por radiofrequência era inserido na artéria femoral até a artéria renal e conectado ao aparelho de ablação por radiofrequência (IBI, St. Jude Medical, Inc., St. Paul, MN, EUA). De 3 a 4 locais de ablação eram selecionados para cada local, sendo realizada ablação local em forma espiral (cateter de ablação por radiofrequência 5F IBI, St. Jude Medical). Cada ponto era submetido a ablação durante 120 segundos, com limite de energia de 8 W, até que a temperatura do tumor atingisse 55°C. Realizava-se arteriografia renal imediatamente após a cirurgia, pressão sobre o local de punção durante 15 a 30 minutos, curativo e fixação.

### Métodos analíticos

O peso corporal foi medido por balança eletrônica. Foi utilizado o BP-2010E (Softron, China), que é um aparelho de medida de pressão arterial de cauda, para medir PAS, PAD e PAM. Foram medidas a concentração plasmática e tecidual renal de NA através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (CLAE). Os níveis de ECA2 e mRNA Mas renais foram medidos através de PCR em tempo real. A Ang-(1-7) (Cusabio, China) renal foi estimada por ELISA. Os níveis de TH, renalase, COMT, TNA, ECA2 e expressão da proteína Mas no tecido renal foram medidos por Western blot e imuno-histoquímica.

### CLAE

Amostras de NA em meio de liberação acidificado, perfusato e superperfusato foram identificadas e quantificadas por CLAE. O sistema consiste de um sistema de liberação de solvente Varian Pro-Star e um auto-amostrador modelo 9090 (Varian, Walnut Creek, CA), acoplado a uma coluna C18 e a um detector ESA Coulochem II. As separações foram feitas forma isocrática através de uma fase móvel filtrada e desgaseificada consistindo de 12% de metanol, 0,1 M de fosfato sódico, 0,2 mM de octil sulfato sódico e 0,1 mM de EDTA, ajustada a um pH de 2.8 com ácido fosfórico. O sistema de cromatografia líquida de alta pressão é acoplado a um computador, onde os cromatogramas são gravados e analisados através do software de estação de trabalho Varian Star.

### Western blot

Tecidos congelados foram lisados com tampão de lise celular contendo inibidor de protease. A concentração proteica de cada amostra foi medida com base no método de Bradford através do kit de ensaio proteico Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) tendo a albumina sérica bovina (ASB) como padrão. Após procedimento de desnaturação proteica com tampão de carga, cada amostra (50 µg) foi separada em gel de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8-12% (PAGE) (Bio-Rad Laboratories) a temperatura ambiente e transferida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno a 4°C. Após bloqueio em leite magro a 5% por 1 hora a temperatura ambiente, a amostra foi incubada durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-TH(1:500 Abcam, EUA); anticorpo policlonal de cabra anti-renalase (1:500, biorbyt, EUA), anticorpo policlonal de cabra anti-COMT (1:500, LifeSpan BioSciences, EUA); anticorpo policlonal de coelho anti-TNA (1:500, Abcam, EUA); anticorpo policlonal de cabra anti-ECA2 (1:200, Santa Cruz, EUA); e anticorpo policlonal de coelho anti-Mas (1:200, Santa Cruz, EUA), tendo a β-actina (1 : 1000, Abcam, EUA) como controle positivo. Foi adicionado anticorpo secundário de coelho anti-cabra conjugado com HRP (1:2000) ou anticorpo de cabra anti-coelho (1:3000) sendo as membranas então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem, os sinais foram visualizados por reagentes luminol (Bio-Rad Laboratories) e a densitometria de cada blot foi analisada através da versão mais recente do Scion Image 4.0.3.2.

### Imuno-histoquímica

O procedimento de marcação foi realizado em cortes de tecido renal colocado em parafina (5 µm). O antígeno foi recuperado de todos os cortes através de fervura com tampão de citrato de sódio (pH 6) e incubação com anticorpo policlonal de coelho anti-TH (1:150, Abcam, EUA); anticorpo policlonal de cabra anti-renalase (1:150, biorbyt, EUA); anticorpo policlonal de cabra anti-COMT (1:150, LifeSpan BioSciences, EUA); anticorpo policlonal de coelho anti-TNA (1:150, Abcam, EUA); anticorpo policlonal de cabra anti- ECA2 (1:100, Santa Cruz, EUA); e anticorpo policlonal de coelho anti-Mas (1:100, Santa Cruz, EUA) durante a noite, a 4°C. Após a marcação, todas as amostras foram desidratadas e seladas para observação ao microscópio. Foram observadas a ocorrência e distribuição de proteína em cortes de tecido marcados por anticorpo através do microscópio Nikon eclipse E400 e da vídeo-câmara digital colorida HyperHAD (Sony), através do software Easy Image Analysis (NIS-Elements BR v3.0) para avaliação da imunomarcação.

### Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão das médias, e todos os dados passaram por teste de normalidade. As comparações entre o grupo modelo de hipertensão e o grupo controle foram feitas através do teste t de Student não pareado assumindo-se variância desigual, ao passo que as análises entre 3 grupos foram feitas através do teste de ANOVA unidirecional com análise post-hoc de Neuman-Keuls. Foi usado teste t de Student pareado para comparar antes e depois de se estabelecer o modelo hipertensivo, e antes e depois de DSR. Foi usada correlação linear para avaliar a associação entre PAS e o nível dos fatores acima mencionados.

Todos os dados foram analisados por SPSS 22.0. Valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

## Resultados

### Modelo canino de hipertensão e resposta à DSR

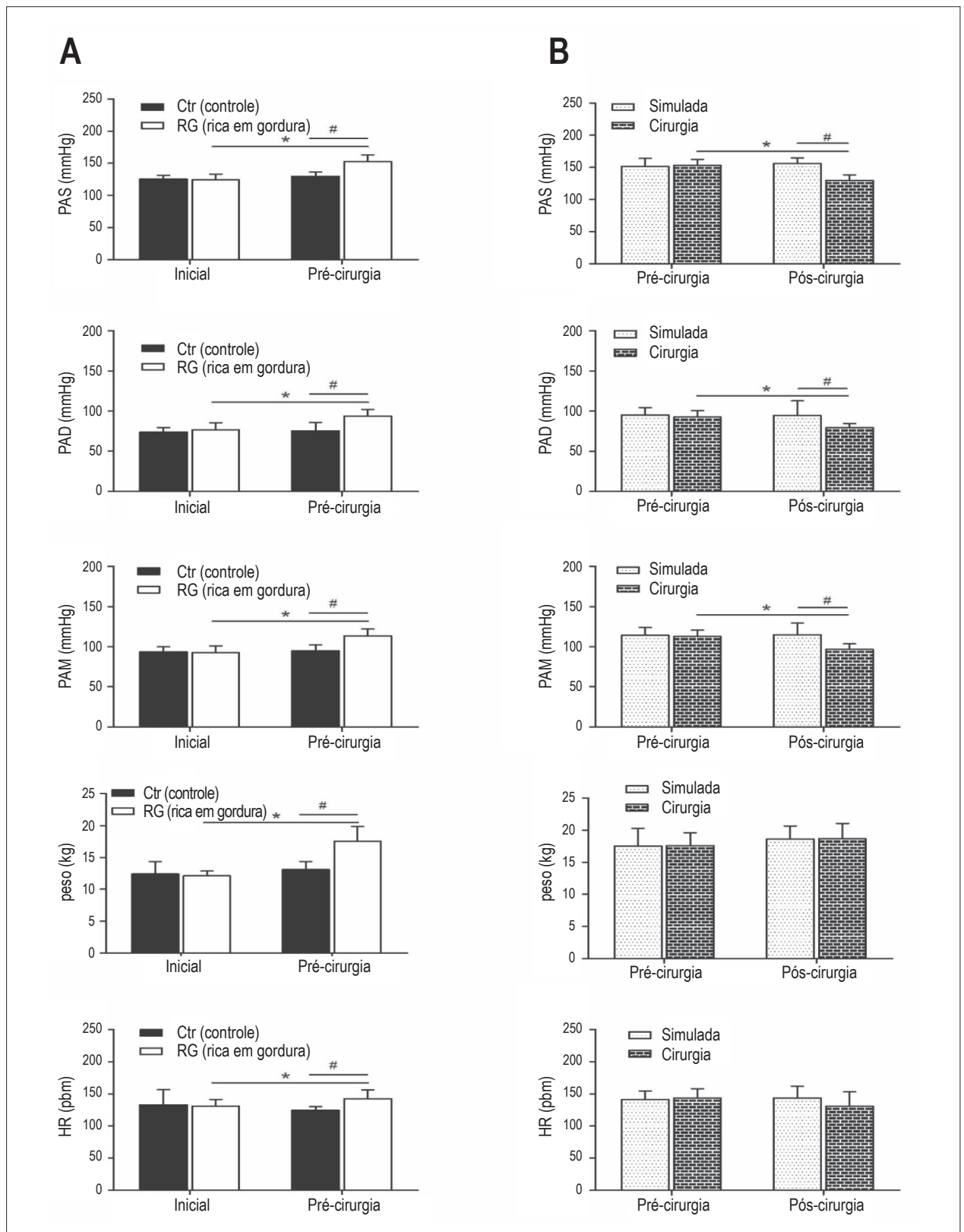
Após 3 meses sob dieta rica em gordura, houve importante aumento do peso corporal, FC, PAS, PAD e PAM no grupo hipertenso (\*p < 0,05 vs. início, # p < 0,05 vs. grupo controle). Houve aumento da PAS, PAD e PAM no grupo hipertenso de aproximadamente 28±10mmHg, 17±8mmHg e 21±8mmHg, respectivamente, junto a um ganho de peso almejado de 45,2%. Além disso, houve aumento importante de NA plasmática no grupo hipertenso após 3 meses de dieta rica em gordura (\*p < 0,05 vs. início, # p < 0,05 vs. grupo controle). (Figura 1). Houve redução importante de aproximadamente 24±9mmHg, 13±6mmHg and 16±7mmHg da PAS, PAD e PAM, respectivamente, no grupo cirurgia 6 meses após a cirurgia. Quando comparados com os valores do grupo cirurgia simulada, a PAS, PAD e PAM do grupo cirurgia também caíram significativamente (Figura 2A). Seis meses após DSR, os níveis plasmáticos de NA no grupo cirurgia mostraram-se significativamente reduzidos (\*p < 0,05 vs. pré-cirurgia no grupo cirurgia, # p < 0,05 vs. grupo cirurgia simulada). Além disso, a NA renal no grupo cirurgia também se mostrou mais baixa do que no grupo cirurgia simulada (p < 0,05) (Figura 2B).

### Níveis renais de TH, renalase, COMT e resposta do TNA à DSR

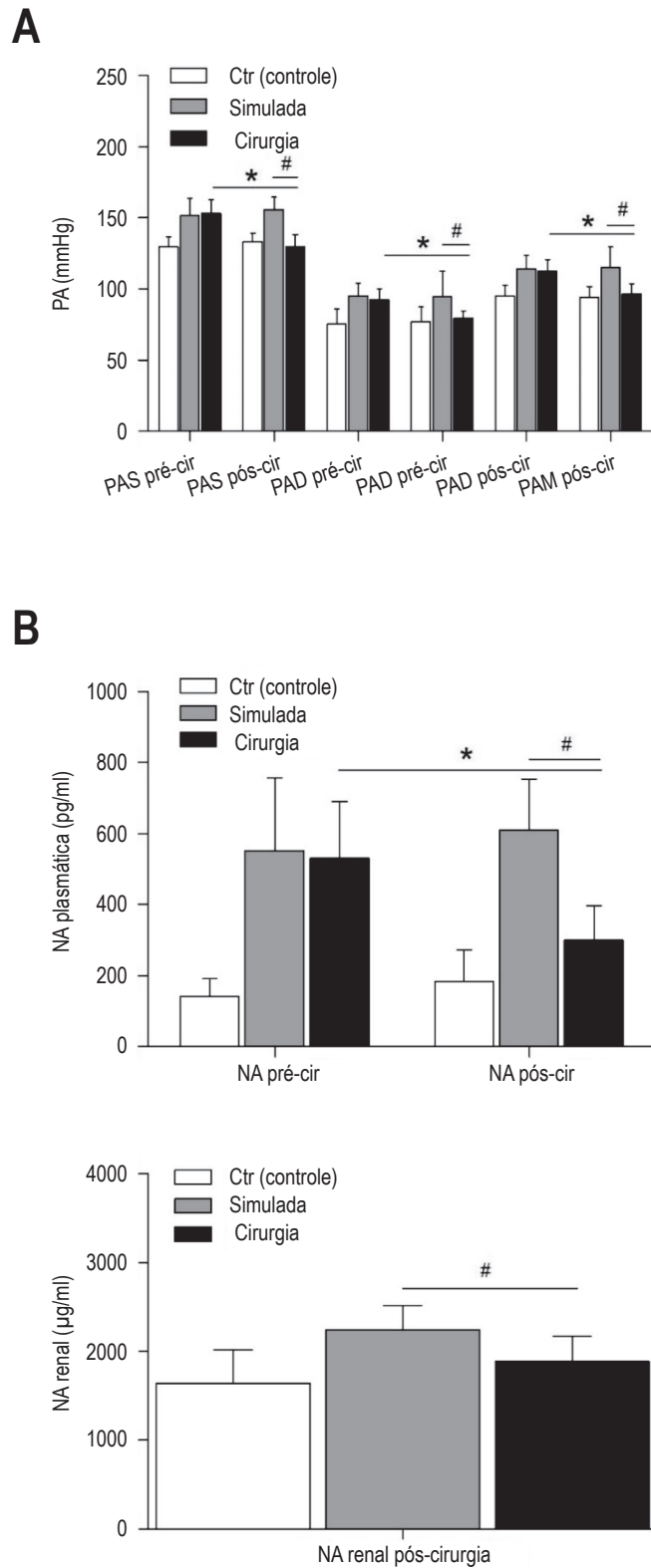
Seis meses após a cirurgia, a expressão da proteína TH renal no grupo cirurgia foi menor do que no grupo cirurgia simulada (p < 0,05). A marcação imuno-histoquímica da TH (marrom) mostrou-se localizada no citoplasma dos túbulos renais dos cães beagle (Figura 3A). Os níveis renais de renalase no grupo cirurgia foram significativamente maiores do que no grupo cirurgia simulada (p < 0,05). Os resultados imuno-histoquímicos mostraram que a proteína renalase estava expressa no citoplasma das células epiteliais do túbulo renal (Figura 3B). A expressão da proteína COMT renal no grupo cirurgia simulada foi menor do que no grupo controle (p < 0,05). No estudo imuno-histoquímico, a COMT estava localizada no citoplasma dos túbulos renais dos cães beagle (Figura 3C). TNA estava localizado no citoplasma dos túbulos renais dos cães beagle. No entanto, não houve diferença estatística do TNA renal entre os 3 grupos (Figura 3D).

### Níveis renais de ECA2, Ang-(1-7) e resposta do Mas à DSR

O nível de ECA2 mRNA renal e a expressão proteica no grupo cirurgia foi significativamente maior do que no grupo cirurgia simulada (p < 0,05). A marcação imuno-histoquímica da ECA2 (marrom) estava localizada no citoplasma e na membrana de túbulos renais dos cães beagle. Seis meses após a cirurgia, valores com densidade de área positivos no grupo cirurgia foram significativamente mais fortes do que no grupo simulação (p < 0,05) (Figura 4A). À semelhança da ECA2, a concentração de Ang-(1-7) no tecido renal no grupo cirurgia simulada foi o mais baixo, muito menor do que no grupo cirurgia e no grupo controle (p < 0,005) (Figura 4B). O nível de Mas renal também foi mais alto no grupo cirurgia e no grupo controle do que no grupo cirurgia simulada. A marcação imuno-histoquímica (marrom) do Mas

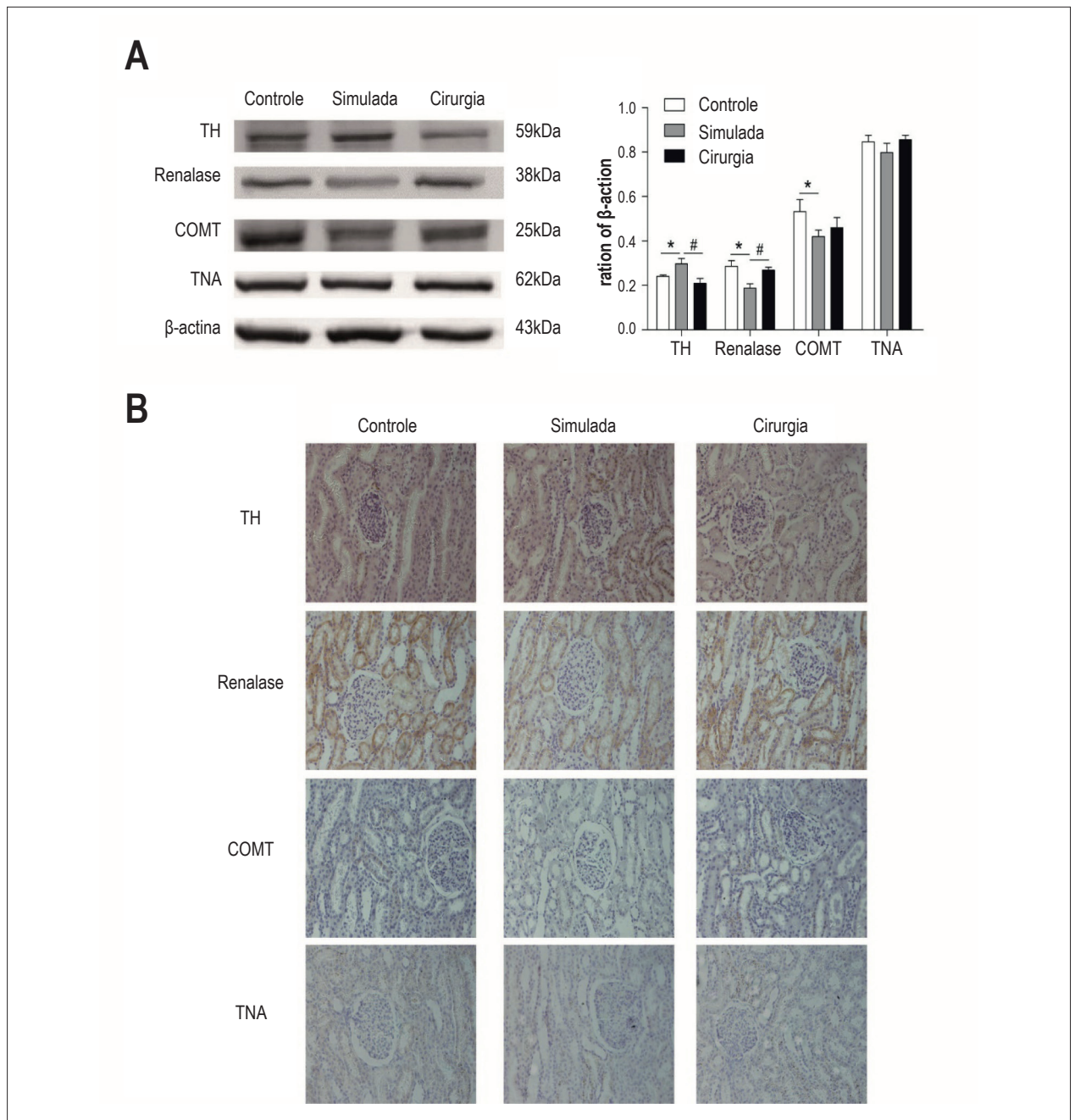


**Figura 1** - Efeitos da dieta rica em gordura sobre o peso corporal, FC e PA (PAS, PAD e PAM) em cães beagle (A). Respostas do peso corporal, FC e PA (PAS, PAD e PAM) à DSR (B). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus valores iniciais, #  $p < 0,05$  versus grupo controle na figura 2A. \* $p < 0,05$  versus pré-cirurgia do grupo cirurgia, #  $p < 0,05$  versus grupo cirurgia simulada na figura 2B. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca.



**Figura 2** - PA (PAS, PAD e PAM) (A) e NA (plasmática e renal) (B) em resposta à DSR. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus pré-cirurgia do grupo cirurgia, #  $p < 0,05$  versus grupo cirurgia simulada na figura 2. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; NA: noradrenalina.





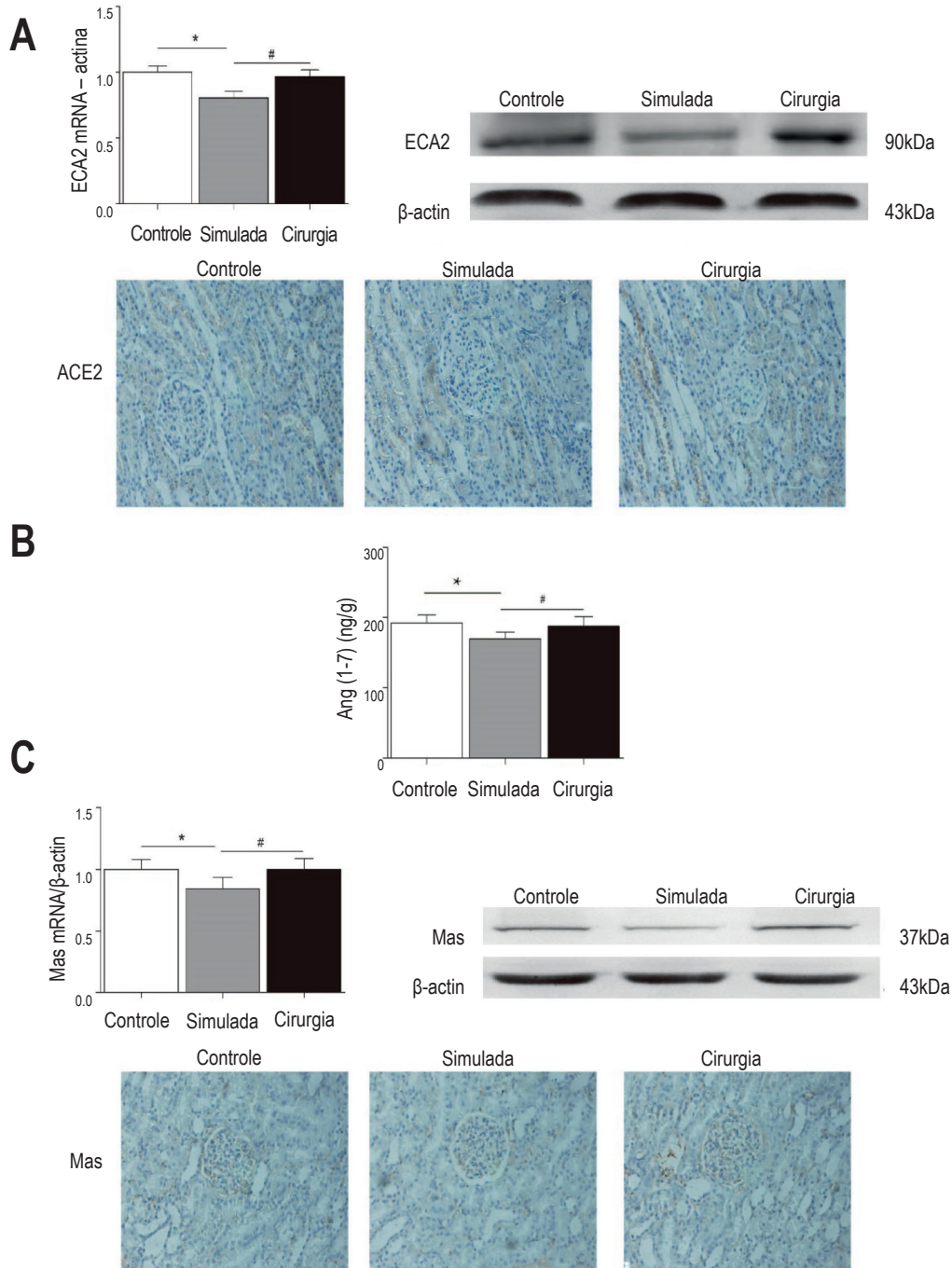
**Figura 3** – Efeitos da DSR sobre os níveis renais de TH, renalase, COMT e expressão da proteína TNA em cães beagle. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus grupo controle, #  $p < 0,05$  versus grupo cirurgia simulada. TH: tirosina hidroxilase; COMT: catecol-o-metil transferase; NET: norepinephrine transporter.

mostrou-se localizada no citoplasma das células dos glomérulos renais e túbulo proximal e na membrana celular dos cães beagle (Figura 4C).

## Discussão

Em nosso estudo, a hipertensão relacionada à obesidade induzida por dieta rica em gordura mostrou-se associada ao aumento de peso corporal, FC, PAS, PAD e PAM, o que corrobora

os resultados de estudos anteriores.<sup>13</sup> A DSR reduziu efetivamente a PA para PAS, PAD e PAM em aproximadamente  $24 \pm 9$  mmHg,  $13 \pm 6$  mmHg e  $16 \pm 7$  mmHg, respectivamente, no grupo cirurgia após 6 meses de cirurgia. A PAS, PAD e PAM no grupo cirurgia também caíram significativamente quando comparadas ao grupo cirurgia simulada, o que foi semelhante aos achados de estudos clínicos anteriores<sup>5,6</sup> e experimentos em animais.<sup>14</sup> O estudo Symplicity HTN-1 incluiu 153 pacientes com hipertensão resistente, dos quais 111 consentiram em ser acompanhados por



**Figura 4** – Efeitos da DSR sobre a ECA2 mRNA renal e expressão proteica (A), concentração de Ang-(1-7) (B) e Mas mRNA e expressão proteica (C) de cães beagle. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus grupo controle, #  $p < 0,05$  versus grupo cirurgia simulada. ECA2: enzima conversora de angiotensina 2

36 meses. A PAS (-32,0mmHg) e PAD (-14,4mmHg) caíram significativamente.<sup>5</sup> O estudo Symplicity HTN-2 randomizou 106 indivíduos portadores de hipertensão resistente, cuja PAS e PAD foram reduzidas em 33 mmHg e 14 mmHg, respectivamente, em 36 meses.<sup>6</sup> No entanto, o estudo Symplicity HTN-3 não mostrou redução eficaz da PA em

pacientes com hipertensão resistente,<sup>9</sup> indicando que apenas uma minoria de pacientes era candidata a DSR.

A NA é um importante indicador da atividade neural simpática, estando elevada em doenças com alta atividade simpática. Tiroch et al.<sup>10</sup> relataram que a DSR resultou em

redução importante da taxa de liberação de NA, ao passo que Machino et al.<sup>11</sup> não observaram nenhuma diferença significativa na NA sistêmica de ratos espontaneamente hipertensos (REH) após DSR. Observamos que a NA plasmática aumentou significativamente em um modelo canino de hipertensão relacionada a obesidade, diminuindo aproximadamente 44% através de DSR. Além disso, a DSR foi eficaz na redução da concentração de NA renal, o que corrobora os resultados de Rimoldi et al.<sup>15</sup> Como relatado, a DSR mostrou-se associada a benefícios adicionais<sup>16</sup> e à melhoria das funções cardíaca e renal.<sup>17,18</sup> Foi, ainda, proposta como tratamento promissor em doenças que cursam com hiperativação simpática.<sup>19,20</sup> Neste estudo, determinamos o valor anti-hipertensivo da DSR usando um modelo canino de hipertensão relacionada à obesidade com altos níveis de NA.

O nível de TH renal também se mostrou aumentado na hipertensão relacionada à obesidade neste estudo. Além disso, a DSR reduziu a expressão da proteína TH renal no modelo hipertensivo, o que é substancialmente semelhante a estudos anteriores. A regulação negativa da TH na medula adrenal de REH mostrou-se acompanhada de uma queda importante da NA e da PAS,<sup>21</sup> sugerindo que a DSR pode influenciar as concentrações de NA por afetar o nível renal de TH. Por outro lado, neste estudo, os níveis de reninase foram muito menores no modelo canino de hipertensão relacionada à obesidade, sugerindo uma relação inversa com hipertensão semelhante ao observado em estudos anteriores.<sup>22</sup> Desir GV observou que a reninase recombinante *in vitro* ou *in vivo* reduz a pressão arterial através da degradação da adrenalina plasmática com seu efeito anti-hipertensivo diretamente relacionado à sua atividade enzimática.<sup>23</sup> Os níveis plasmático e renal de reninase em REH aumentaram intensamente após DSR em comparação aos dados iniciais e aos dos grupos cirurgia simulada e controle, com redução significativa da PAM,<sup>24</sup> o que corrobora este estudo, sugerindo que a DSR pode reduzir as concentrações de NA através da elevação da expressão da reninase renal. A COMT e o TNA são as principais enzimas envolvidas na degradação das catecolaminas, o que está inversamente relacionado à hipertensão. Como foi mostrado em nosso estudo, o nível renal de COMT reduziu significativamente a hipertensão relacionada à obesidade em comparação com o controle grupo, enquanto que a DSR foi ineficaz contra a expressão da COMT e TNA renais. Uma vez que são expressas principalmente nas terminações nervosas, esse dado sugeriu que a COMT e TNA renais podem não ter tido nenhuma alteração significativa após DSR.

O eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas está envolvido na hipertensão. Camundongos transgênicos com superexpressão de hormônio do crescimento mostraram aumento do PAS, alto grau de fibrose cardíaca e renal, e redução acentuada do nível de ECA2-Ang-(1-7)-Mas, sendo que a administração de Ang-(1-7) reduziu a PAS.<sup>25</sup> A ativação da via ECA2-Ang-(1-7)-Mas reduz o edema tecidual induzido por privação de oxigênio-glicose. A ativação da via ACE2-Ang-(1-7)-Mas reduz o edema tecidual induzido por privação de oxigênio-glicose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a morte celular em cérebro de camundongo associada a superprodução de angiotensina II.<sup>26</sup> Corroborando o estudo anterior, além da redução da ECA2, também observamos que

a concentração renal de Ang-(1-7) e Mas mRNA e a expressão proteica diminuíram na hipertensão relacionada à obesidade. Verificamos primeiramente que a DSR aumentava o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas renal num modelo canino de hipertensão relacionado à obesidade.

A DSR mostra efeito anti-hipertensivo com redução de NA e ativação do ECA2-Ang-(1-7)-Mas, indicando que isso pode contribuir para o efeito anti-hipertensivo da DSR. No entanto, a relação entre essas duas vias não ficou clara neste estudo. A Ang-(1-7) induz um efeito pré-sináptico facilitatório na neurotransmissão noradrenérgica periférica,<sup>27,28</sup> além de ser inibitória no sistema nervoso central através do receptor Mas.<sup>29,30</sup> Sugere-se que ECA2-Ang-(1-7)-Mas possa reduzir a concentração de NA para alcançar seu efeito anti-hipertensivo, o que requer a confirmação de estudos futuros.

Porém, este estudo tem limitações. Em primeiro lugar, o número de cães é pequeno, o que pode levar a um viés de resultados. Em segundo lugar, foram detectadas mudanças na NA, enzimas relacionadas à NA e ECA2-Ang-(1-7)-Mas durante o processo, enquanto que a relação entre essas mudanças não está clara. A variação da TH, reninase e ECA2-Ang-(1-7)-Mas renais pode ter afetado o nível de NA para contribuir com o efeito anti-hipertensivo da DSR. Essas limitações deverão ser mais estudadas para esclarecer os possíveis mecanismos da DSR, assim contribuindo para desenvolver e melhorar este novo método de tratamento.

## Conclusões

A questão inicial que motivou nosso estudo foi determinar se seria confirmada a participação da NA e ECA2-Ang-(1-7)-Mas no efeito anti-hipertensivo da DSR. Nosso estudo confirmou que a DSR mostra efeitos anti-hipertensivos com níveis plasmáticos e renais de NA reduzidos, o que pode estar relacionado à redução de TH e aumento de reninase no rim. Além disso, a DSR ativa a via da ECA2-Ang-(1-7)-Mas, o que pode contribuir para o efeito anti-hipertensivo da DSR. Embora a aplicação da DSR não esteja clara devido à sua eficácia variável, nossos dados sugerem que pode ser uma excelente escolha em pacientes portadores de hipertensão relacionada à obesidade com altos níveis de NA e hiperativação do sistema renina-angiotensina.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Chen W, Tang X, Yang K. Obtenção de dados: Chen W, Yang X. Análise e interpretação dos dados: Chen W, Yang X.

Análise estatística: Chen W, Yang X. Obtenção de financiamento: Chen W, Tang X, Yang K. Redação do manuscrito: Chen W. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Tang X, Weng C, Wen J, Liu H, Wu Y, Yang K. Supervisão / como investigador principal: Tang X, Weng C, Wen J, Yang K.

## Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.



### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi patrocinado pela Fundação da Ciência Natural da Província de Hunan, China (10JJ3048), e por Fundos De Pesquisas Fundamentais para as Universidades Centrais da Universidade Centro-Sul (2015zzts123).

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Wei Chen pela Central South University, Changsha - Hunan.

### Referências

1. Chowdhury EK, Owen A, Krum H, Wing LM, Nelson MR, Reid CM; Second Australian National Blood Pressure Study Management Committee. Systolic blood pressure variability is an important predictor of cardiovascular outcomes in elderly hypertensive patients. *J Hypertens*. 2014;32(3):525-33.
2. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008;371(9623):1513-8.
3. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, et al; PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology) Study investigators. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA*. 2013;310(9):959-68.
4. Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, Sobotka PA, Sadowski J, Bartus K, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet*. 2009;373(9671):1275-81.
5. Krum H, Schlaich MP, Sobotka PA, Bohm M, Mahfoud F, Rocha-Singh K, et al. Percutaneous renal denervation in patients with treatment-resistant hypertension: final 3-year report of the Symplicity HTN-1 study. *Lancet*. 2014;383(9917):622-9. Erratum in: *Lancet*. 2014;383(9917):602.
6. Esler MD, Bohm M, Sievert H, Rump CL, Schmieder RE, Krum H, et al. Catheter-based renal denervation for treatment of patients with treatment-resistant hypertension: 36 month results from the SYMPPLICITY HTN-2 randomized clinical trial. *Eur Heart J*. 2014;35(26):1752-9.
7. Davis MI, Filion KB, Zhang D, Eisenberg MJ, Afilalo J, Schiffrin EL, et al. Effectiveness of renal denervation therapy for resistant hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(3):231-41.
8. Pancholy SB, Shantha GP, Patel TM, Sobotka PA, Kandzari DE. Meta-analysis of the effect of renal denervation on blood pressure and pulse pressure in patients with resistant systemic hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2014;114(6):856-61.
9. Bakris GL, Townsend RR, Liu M, Cohen SA, D'Agostino R, Flack JM, et al; SYMPPLICITY HTN-3 Investigators. Impact of renal denervation on 24-hour ambulatory blood pressure: results from SYMPPLICITY HTN-3. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(11):1071-8.
10. Tiroch K, Schmitz I, Seyfarth M, Szymanski J. TCT-210 Decrease of the norepinephrine release from sympathetic nerves during renal denervation. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(Suppl):B61-2.
11. Machino T, Murakoshi N, Sato A, Xu D, Hoshi T, Kimura T, et al. Anti-hypertensive effect of radiofrequency renal denervation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2014;110(2):86-92.
12. Uri K, Fagyas M, Manyine Siket I, Kertesz A, Csanadi Z, Sandorfi G, et al. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure. *PLoS One*. 2014;9(4):e87845.
13. Polonia JJ, Martins L, Pinto F, Nazare J. Estimation of the predictive value for hypertension of different indices of obesity in the scope of a national representative survey of hypertension (PHYSA). *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(4 Suppl):e83.
14. Henegar JR, Zhang Y, De Rama R, Hata C, Hall ME, Hall JE. Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs. *Am J Hypertens*. 2014;27(10):1285-92.
15. Rimoldi SF, Scheidegger N, Scherrer U, Farese S, Rexhaj E, Moschovitis A, et al. Anatomical eligibility of the renal vasculature for catheter-based renal denervation in hypertensive patients. *JACC Cardiovasc Interv*. 2014;7(2):187-92.
16. Brandt MC, Reda S, Mahfoud F, Lenski M, Bohm M, Hoppe UC. Effects of renal sympathetic denervation on arterial stiffness and central hemodynamics in patients with resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(19):1956-65.
17. Schirmer SH, Sayed MM, Reil JC, Ukena C, Linz D, Kindermann M, et al. Improvements in left ventricular hypertrophy and diastolic function following renal denervation: effects beyond blood pressure and heart rate reduction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(18):1916-23.
18. Ott C, Mahfoud F, Schmid A, Ditting T, Veelken R, Ewen S, et al. Improvement of albuminuria after renal denervation. *Int J Cardiol*. 2014;173(2):311-5.
19. Scherlag MA, Scherlag BJ. A randomized comparison of pulmonary vein isolation with versus without concomitant renal artery denervation in patients with refractory symptomatic atrial fibrillation and resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(12):1129-30.
20. Davies JE, Manisty CH, Petraco R, Barron AJ, Unsworth B, Mayet J, et al. First-in-man safety evaluation of renal denervation for chronic systolic heart failure: primary outcome from REACH-Pilot study. *Int J Cardiol*. 2013;162(3):189-92.
21. Kumai T, Tateishi T, Tanaka M, Watanabe M, Shimizu H, Kobayashi S. Tyrosine hydroxylase antisense gene therapy causes hypotensive effects in the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19(10):1769-73.
22. Wybraniec MT, Mizia-Stec K, Trojnarska O, Chudek J, Czerwienska B, Wikarek M, et al. Low plasma renalase concentration in hypertensive patients after surgical repair of coarctation of aorta. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(7):464-74.
23. Desir GV, Tang L, Wang P, Li G, Sampaio-Maia B, Quelhas-Santos J, et al. Renalase lowers ambulatory blood pressure by metabolizing circulating adrenaline. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(4):e002634.
24. Jiang W, Guo Y, Tan L, Tang X, Yang Q, Yang K. Impact of renal denervation on renalase expression in adult rats with spontaneous hypertension. *Exp Ther Med*. 2012;4(3):493-6.
25. Munoz MC, Burghi V, Miquet JG, Giani JF, Banegas RD, Toblli JE, et al. Downregulation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis in transgenic mice overexpressing GH. *J Endocrinol*. 2014;221(2):215-27.
26. Zheng J, Li G, Chen S, Bihl J, Buck J, Zhu Y, et al. Activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas pathway reduces oxygen-glucose deprivation-induced tissue swelling, ROS production, and cell death in mouse brain with angiotensin II overproduction. *Neuroscience*. 2014;273:39-51.
27. Stegbauer J, Oberhauser V, Vonend O, Rump LC. Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):352-9.
28. Byku M, Macarthur H, Westfall TC. Inhibitory effects of angiotensin-(1-7) on the nerve stimulation-induced release of norepinephrine and neuropeptide Y from the mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H457-65.
29. Gironacci MM, Valera MS, Yujnovsky I, Peña C. Angiotensin-(1-7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;44(5):783-7.
30. Lopez Verrilli MA, Rodriguez Fermepin M, Longo Carbajosa N, Landa S, Cerrato BD, Garcia S, et al. Angiotensin-(1-7) through Mas receptor up-regulates neuronal norepinephrine transporter via Akt and Erk1/2-dependent pathways. *J Neurochem*. 2012;120(1):46-55.