

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Estudo da Actividade Eferente do Sistema Nervoso Autónomo  
na Nefrolitíase Recorrente**

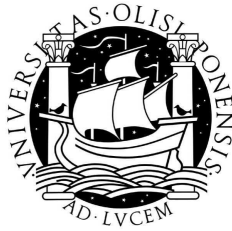
**Fernando Manuel Pinto Ferreira Domingos**

Dissertação de Doutoramento em Medicina  
Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  
(Fisiologia)

2012



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Estudo da Actividade Eferente do Sistema Nervoso Autónomo  
na Nefrolitíase Recorrente**

**Fernando Manuel Pinto Ferreira Domingos**

Tese orientada pelo Professor Doutor Alberto Albino Granado Escalda

Dissertação de Doutoramento em Medicina  
Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  
(Fisiologia)

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 28 de Fevereiro de 2012.**

Os trabalhos seguintes, efectuados durante a preparação desta dissertação, encontram-se publicados em revistas médicas internacionais indexadas:

*Domingos F, Serra A: Nephrolithiasis is associated with an increased prevalence of cardiovascular disease. Nephrol Dial Transplant 26:864-868, 2011.*

*Domingos F, Escalda A: Causes of autonomic dysfunction in idiopathic recurrent kidney stone formers. Int Urol Nephrol, 2011.*



Este projecto foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia por um fundo destinado a projectos de investigação clínica (PIC/IC/83243/2007).





## Acrónimos e abreviaturas

ANR	Actividade do nervo renal (refere-se à actividade integrada)
ARNA	<i>Aferent renal nerve activity</i>
BEI	Baroreceptor Effectiveness Index
Bpm	Batimentos por minuto
BSR	Baroreceptor Effectiveness Index
cpm	Ciclos por minuto
FC	Frequência cardíaca
HF	<i>High frequency</i> (componente da variabilidade cardiovascular)
HFCS	<i>High fructose corn syrup</i> (xarope de frutose utilizado como edulcorante industrial)
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HTA	Hipertensão arterial
IECA's	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IMC	Índice de massa corporal
JNC VII	<i>Joint National Committee for the Detection and Treatment of High Blood Pressure – VII report</i>
LEOC	Litotricia extracorporal por ondas de choque
LF	<i>Low frequency</i> (componente da variabilidade cardiovascular)
NS	Não significativo
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PTH <sub>i</sub>	Hormona paratiroideia intacta
rpm	Rotações por minuto
RNSA	<i>Renal nerve sympathetic activity</i>
RR	Intervalo R-R do electrocardiograma

SNA	Sistema nervoso autónomo
SNS	Sistema nervoso simpático
TAC	Tomografía axial computadorizada
VR	Rácio de Valsalva
vs.	<i>Versus</i>

## Resumo

A nefrolitíase é uma doença comum nas sociedades desenvolvidas. Demonstrou-se a associação da litíase renal com algumas doenças metabólicas e cardiovasculares, tais como a hipertensão, a obesidade e a diabetes *Mellitus*. Demonstrou-se que os indivíduos com cálculos renais apresentam maior probabilidade de sofrer enfartes do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. A ligação da nefrolitíase e o risco cardiovascular não se encontra completamente esclarecida mas aceita-se que, em muitos indivíduos, a nefrolitíase seja uma manifestação clínica precoce de um ambiente adverso mais generalizado, o que aumentaria a prevalência de comorbidades.

Neste trabalho realizámos uma extensa revisão bibliográfica das diferentes hipóteses explicativas para a maior prevalência de doença cardiovascular nos doentes com litíase renal, com maior incidência nas alterações metabólicas que têm sido sugeridas para explicar a maior prevalência de hipertensão, tais como a obesidade e a síndrome metabólica, bem como as possíveis relações entre a hipertensão e alguns factores de risco para a nefrolitíase, como a hipercalcúria e hiperuricosúria.

Estudámos uma hipótese inovadora na tentativa de explicar a associação de nefrolitíase com doença cardiovascular: a actividade do sistema nervoso autónomo, cuja influência no desenvolvimento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares tem sido referida nos últimos anos. Descreveram-se manifestações de disfunção autonómica em várias comorbidades frequentemente observadas em doentes com cálculos renais.

Efectuámos um conjunto de estudos originais para testar a hipótese de uma associação entre disfunção autonómica e nefrolitíase, incluindo um estudo clínico em doentes com nefrolitíase idiopática recorrente. Este teve um desenho caso-controlo e consistiu na realização dum conjunto de cinco provas autonómicas destinadas a avaliar a actividade autonómica eferente. Usaram-se métodos não invasivos baseados na análise da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial no domínio do tempo, com recurso a uma adaptação do protocolo de Ewing, e no domínio tempo-

frequência, com a transformada *wavelets* e a transformada de Hilbert-Huang. Este estudo documentou anomalias subtis da actividade autonómica em todos os doentes com nefrolitíase. A disfunção autonómica caracterizou-se por hiperactividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo em resposta a vários estímulos e por diminuição do cardiorreflexo simpático em resposta ao teste de ortostatismo passivo. A hiperactividade simpática foi responsável por um aumento da pressão arterial na maioria dos pacientes com nefrolitíase. A análise dos resultados no domínio do tempo não demonstrou alterações significativas da actividade parassimpática mas as análises efectuadas no domínio tempo-frequência permitiram identificar alterações subtis no controle vagal da frequência cardíaca.

Associámos a disfunção autonómica a algumas comorbilidades existentes no grupo de doentes, principalmente com a existência de antecedentes de hipertensão e obesidade. Além da obesidade, também associámos a diminuição do controle parassimpático da frequência cardíaca com o aumento da excreção urinária de ácido úrico, um dos principais factores de risco para a nefrolitíase recorrente. Não relacionámos a diminuição do cardiorreflexo simpático em resposta ao ortostatismo com qualquer factor independente.

No nosso estudo, verificámos que os ratos Zucker obesos não desenvolveram espontaneamente cálculos renais pelo que modelo animal de obesidade não foi utilizado nas restantes experiências. Realizámos três estudos em animais com base no modelo experimental de litíase renal induzida em ratos por tratamento com calcitriol e etileno glicol. Num destes, encontrámos um menor controlo simpático da frequência cardíaca e uma grande diminuição do baroreflexo nos ratos com nefrolitíase comparativamente com os ratos do grupo de controlo.

Noutro estudo, encontrámos um aumento significativo na actividade basal do nervo renal nos ratos com nefrolitíase quando comparados com ratos do grupo de controlo. Neste estudo, a obstrução urinária subaguda, obtida por 20 minutos de bloqueio do ureter, provocou uma diminuição significativa da actividade do nervo renal ipsilateral no grupo de ratos com nefrolitíase. Consideramos que a demonstração do aumento da actividade nervosa basal nos ratos com nefrolitíase seria um argumento favorável à hipótese de envolvimento da disfunção autonómica. Os resultados sugeriram que o aumento da actividade no nervo renal nos ratos com nefrolitíase não seria totalmente explicado pela obstrução provocada pelos cálculos renais.

Efectuámos um conjunto de experiências com um modelo de deservação renal unilateral em ratos com nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol. Neste modelo, seccionámos as fibras nervosas que enervam o rim esquerdo e mantivemos íntegra a enervação do rim contralateral que foi utilizado como controlo. Os ratos recuperaram completamente da cirurgia de deservação antes de iniciar o tratamento com medicamentos litogénicos. Após quatro semanas de tratamento, os animais foram sacrificados e os rins analisados com o objectivo de comparar as lesões histológicas nos rins desnervados e nos rins de controlo. Este estudo não demonstrou o efeito da deservação renal na litogénese ou nas lesões renais associadas à presença de cálculos renais. Descrevemos neste trabalho os aspectos histológicos dos rins enervados e desnervados.

Apesar das limitações inerentes à extrapolação dos resultados de estudos em animais para a nefrolitíase humana, os nossos resultados confirmam uma disfunção autonómica no modelo do rato de nefrolitíase e representam os primeiros estudos da função autonómica em modelos animais de nefrolitíase experimental.



## Summary

Nephrolithiasis is a common disease in developed societies. It has been shown that kidney stone disease is associated with a number of metabolic and cardiovascular diseases, including hypertension, obesity, and diabetes *mellitus*. It has also been shown that individuals with kidney stones are more likely to suffer acute myocardial infarction and stroke. The causal link between nephrolithiasis and cardiovascular risk is not completely understood but it is likely that in many individuals, kidney stone disease may be an early clinical manifestation of a more widespread adverse environment that increases the prevalence of the other comorbidities.

We carried out a thorough review of the various hypotheses that have been suggested to explain the higher prevalence of cardiovascular disease in individuals with kidney stone disease. Our review focused on the metabolic changes that have been suggested to explain the increased prevalence of hypertension in patients with nephrolithiasis, namely obesity and the metabolic syndrome. We also reviewed possible links between hypertension and some urinary risk factors for nephrolithiasis, namely hypercalciuria and hyperuricosuria.

We proposed an innovative hypothesis to explain the association of nephrolithiasis with cardiovascular disease: the activity of the autonomic nervous system. The influence of the autonomic nervous system in the development and maintenance of hypertension and cardiovascular diseases has been extensively documented in medical literature. Manifestations of autonomic dysfunction have also been reported by several authors in other co-morbidities commonly found in kidney stone formers.

We conducted a set of original studies to test the hypothesis that there is an association between autonomic dysfunction and recurrent nephrolithiasis. Our research included a clinical study on recurrent idiopathic kidney stone formers. This study had a case-control design and was based on a set of five autonomic tests to assess the efferent autonomic activity using non-invasive methods to analyse heart rate and blood pressure variability in the time domain, using an adaptation of the Ewing protocol; and in the time-frequency domain, using wavelet transform and the

Hilbert-Huang transform. This study allowed us to document subtle autonomic abnormalities in all kidney stone formers. The autonomic dysfunction was characterized by hyperactivity of the sympathetic branch of the autonomic nervous system in response to several stimuli, and by decreased cardio reflex in response to a passive tilt test. Sympathetic hyperactivity caused an exaggerated increase in blood pressure in most patients with nephrolithiasis. The analysis of the results in the time domain showed no severe abnormalities in parasympathetic activity, but the analyses made in the time-frequency domain allowed us to identify subtle changes in the vagal control of heart rate.

We associated the autonomic dysfunction with some existing co-morbidities in the patients' group, mainly the existence of a past history of hypertension or obesity. The decrease in the parasympathetic control of heart rate was also associated with hyperuricosuria, one of the main risk factors for nephrolithiasis. However, the decreased sympathetic cardio reflex in response to tilt was not associated with any independent factor.

In our study, we found that the Zucker obese rats did not develop kidney stones spontaneously and so this animal model of obesity has not been used in the remaining experiments. We conducted three studies in animal models using an experimental model of nephrolithiasis induced in rats by treatment with calcitriol and ethylene glycol. In one of these studies, we found a lower sympathetic control of heart rate and a striking decrease of the baroreflex in the rats with nephrolithiasis when compared with the rats in the control group.

In another study, we found a significant increase in the basal activity of the renal nerve in rats with nephrolithiasis when compared with the rats in the control group. In this study, sub-acute urinary obstruction, induced by a 20-minute blockage of the ureter, caused a significant decrease of the ipsilateral renal nerve activity in the rats with nephrolithiasis. We consider that the increased basal activity of the renal nerve in rats with nephrolithiasis is an important argument in favour of the hypothesis that autonomic dysfunction contributes to the risk for cardiovascular disease in nephrolithiasis. The results suggested that increased renal nerve activity in the rats with nephrolithiasis might not be fully explained by the obstruction caused by kidney stones.

We carried out a set of experiments using a model of unilateral kidney denervation in rats with nephrolithiasis. In this model, we sectioned the nerve fibres that innervate



the left kidney, and kept intact the innervation to the contralateral kidney, which was used as a control. The rats recovered from denervation surgery before starting the treatment with lithogenic drugs. After four weeks of treatment, the rats were sacrificed and the kidneys were analysed to compare the histological lesions in the denervated and control kidneys. This study failed to demonstrate an effect of renal denervation in the lithogenic process or in the kidney damage associated with the presence of kidney stones. We describe the histological aspects found in denervated and enervated kidneys.

Despite the limitations inherent to the inference of the results of animal studies to human nephrolithiasis, our results are consistent with an autonomic dysfunction in the rat model of nephrolithiasis. These were the first studies to report the results of autonomic evaluation in animal models of experimental nephrolithiasis.



# Índice geral

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. A Nefrolitíase e a doença cardiovascular: definição do problema.....</b>	<b>3</b>
2.1 A associação da nefrolitíase com a hipertensão arterial .....	3
2.1.1 Evidências epidemiológicas .....	3
2.1.2 Procura da relação causal entre a nefrolitíase e a hipertensão .....	6
2.2 Prevalência de algumas doenças cardiovasculares na população com nefrolitíase.....	23
<b>3. O Sistema Nervoso Autónomo: uma nova hipótese de trabalho.....</b>	<b>25</b>
3.1 A hipertensão como manifestação de disfunção autonómica.....	26
3.2 A nefrolitíase como indício de disfunção autonómica?.....	29
A nefrolitíase associada ao <i>stress</i> .....	29
A reduzida incidência de nefrolitíase nos rins transplantados.....	30
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>35</b>
4.1 Metodologia do estudo clínico.....	35
4.1.1 Doentes e métodos .....	35
4.1.2 Protocolo experimental .....	41
4.1.3 Metodologia de análise dos resultados.....	43
4.2 Metodologia do estudo em modelos animais .....	51
4.2.1 Materiais e métodos .....	51
<b>5. Resultados .....</b>	<b>61</b>
5.1 Resultados do estudo clínico .....	61
5.1.1 Testes de função autonómica .....	63
5.1.2 Análise da Sensibilidade dos Baroreceptores.....	91
5.2 Resultados das experiências em modelos animais.....	93
5.2.1 Modelo de ratos Zucker obesos.....	93
5.2.2 Resultados do modelo de nefrolitíase experimental induzida por calcitriol e etileno glicol .....	95

5.2.3	Resultados do estudo da actividade do nervo renal.....	101
5.2.4	Resultados do modelo de deservação unilateral do rim .....	104
<b>6.</b>	<b>Discussão e comentários.....</b>	<b>109</b>
6.1	Discussão dos resultados do estudo clínico .....	109
6.1.1	Interpretação dos resultados .....	110
6.1.2	Influência das comorbilidades nos resultados das provas .....	122
6.1.3	Considerações e discussões relacionadas com a metodologia utilizada .....	128
6.1.4	Dificuldades técnicas do estudo clínico .....	133
6.2	Discussão dos resultados das experiências em modelos animais .....	133
6.2.1	Experiências efectuadas com o modelo de ratos Zucker obesos.....	133
6.2.2	Modelo de nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol.....	134
6.2.3	Estudo da actividade do nervo renal .....	140
6.2.4	Modelo de deservação unilateral do rim .....	143
<b>7.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>145</b>
<b>8.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>147</b>

# Índice de Figuras

Figura 1 – Variação das $LF_{RR}$ durante a prova de ortostatismo passivo.....	66
Figura 2 – Correlação dos deltas da $LF_{PAS}$ e $LF_{RR}$ entre o registo basal e o primeiro minuto de adaptação ao ortostatismo. ....	67
Figura 3 – Prova de <i>tilt</i> dum doente com nefrolitíase com 5 minutos de duração.....	70
Figura 4 – Análise de <i>Wavelets</i> da prova de <i>tilt</i> dum doente com nefrolitíase.....	70
Figura 5 – Variação das $HF_{RR}$ durante a prova de <i>tilt</i> nos controlos e nos doentes com e sem hiperuricosúria.. ....	71
Figura 6 – Exemplo de hipotensão ao 3º minuto de <i>handgrip</i> que obrigou a suspender a prova num doente com nefrolitíase. ....	73
Figura 7 – Evolução das $LF_{RR}$ e $LF_{PAS}$ durante a prova de <i>handgrip</i> .....	75
Figura 8 – Prova de <i>handgrip</i> característica dum doente com nefrolitíase.....	78
Figura 9 – Aumento da PAS e da FC durante a prova de aritmética mental . ....	79
Figura 10 – <i>Wavelets</i> da prova de aritmética mental num doente com nefrolitíase....	82
Figura 11 – Variação da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) durante a manobra de Valsalva com identificação das suas diferentes fases num doente com litíase renal.....	83
Figura 12 – Comparação da frequência cardíaca nas fases II e IV da manobra de Valsalva entre doentes e controlos. ....	84
Figura 13 – Relação LF/HF durante a manobra de Valsalva nos controlos com e sem antecedentes de hipertensão. ....	86
Figura 14 – Córtex renal de um rato Zucker obeso. ....	94
Figura 15 – Medula renal de um rato obeso demonstrando a ausência de cálculos ou cristais .....	94
Figura 16 – Histologia dos rins dos ratos de controlo e com litíase renal. ....	98
Figura 17 – Exemplos das análises espectrais da frequência cardíaca obtidas com a transformada rápida de Fourier. ....	100
Figura 18 – Ganho do baroreflexo após injeção endovenosa de fenilefrina. ....	101
Figura 19 – Actividade no nervo renal nos ratos com litíase renal e nos controlos ..	103

Figura 20 – Actividade do nervo renal em condições basais e durante obstrução ureteral.....	104
Figura 21 – Rim desnervado dilatado e com sinais macroscópicos de necrose.....	104
Figura 22 – Córtex do rim direito com inúmeros cristais e agregados de cristais nos tubos renais lesões glomerulares significativas.....	105
Figura 23 – Cálculos da papila com rotura do urotélio e libertação dos cálculos .....	106
Figura 24 – A coloração de von Kossa confirma a presença de cálcio nos cristais presentes na região medular .....	106
Figura 25 – Arteríola do córtex mostra a inexistência de alterações das paredes dos vasos .....	107
Figura 26 – Fibrose intensa evidenciada pela cor azul da zona da medula .....	107

# Índice de quadros

Quadro I – Medicação crónica e medicamentos mantidos na semana que antecedeu o estudo autonómico .....	40
Quadro II - Resumo das características do grupo de doentes e de controlos.....	61
Quadro III - Comparação das características dos doentes com e sem hipertensão arterial .....	62
Quadro IV – Resultados dos testes destinados a pesquisar a associação de vários factores independentes com a HTA .....	63
Quadro V – Valores da frequência cardíaca e pressão arterial durante a prova de <i>tilt</i> ....	64
Quadro VI – FC e PA em decúbito e em ortostatismo passivo nos subgrupos de casos com e sem antecedentes de HTA .....	65
Quadro VII — Variabilidade da frequência cardíaca e da PA sistólica obtidos com a transformada discreta de <i>wavelets</i> durante o teste de ortostatismo passivo.....	68
Quadro VIII – Análise de variabilidade da frequência cardíaca e PA sistólica durante o teste de ortostatismo passivo de acordo com a transformada de Hilbert-Huang .....	69
Quadro IX - Parâmetros hemodinâmicos na prova de <i>handgrip</i> .....	74
Quadro X – Resultados da prova de <i>handgrip</i> obtidos com a transformada discreta de <i>wavelets</i> .....	76
Quadro XI - Resultados da prova de <i>handgrip</i> obtidos com a transformada de Hilbert-Huang .....	77
Quadro XII – Variação dos parâmetros hemodinâmicos durante a prova de aritmética mental.....	80
Quadro XIII – Variabilidade cardiovascular durante a prova da aritmética mental de acordo com a transformada de <i>wavelets</i> .....	81
Quadro XIV -- Variabilidade cardiovascular na prova de aritmética mental de acordo com a transformada de Hilbert-Huang.....	81

Quadro XV – Resultados da análise da manobra de Valsalva utilizando a análise de <i>wavelets</i> .....	85
Quadro XVI – Resultados da transformada <i>wavelets</i> na prova de respiração profunda .....	88
Quadro XVII – Resultados da prova de respiração profunda analisados pela transformada de Hilbert-Huang.....	89
Quadro XVIII – Resultados da análise da sensibilidade dos baroreceptores pelo método sequencial .....	92
Quadro XIX – Características dos ratos Zucker .....	93
Quadro XX – Características dos dois grupos de ratos.....	95
Quadro XXI – Resultados laboratoriais dos ratos dos grupos de controlo e de nefrolitíase .....	96
Quadro XXII – Catecolaminas urinárias.....	96
Quadro XXIII – Análises de variabilidade cardiovascular obtidos com a transformada de Fourier .....	99
Quadro XXIV – Características gerais dos grupos de ratos incluídos no estudo da actividade do nervo renal .....	102
Quadro XXV – Resultados das análises bioquímicas dos dois grupos de ratos .....	102
Quadro XXVI – Comparação das alterações histológicas nos rins deservados e nos rins de controlo.....	108



# Agradecimentos

Ao longo dos últimos seis anos, várias pessoas contribuíram para a realização deste projecto. Sem esquecer ninguém, pretendo deixar um agradecimento especial às seguintes pessoas:

Ao Professor Doutor Alberto Escalda, que foi o orientador desta tese e que me apoiou na realização deste trabalho com as suas sugestões oportunas, participou directamente na realização dos testes autonómicos da maioria dos doentes com nefrolitíase e cuja amizade me ajudou a ultrapassar alguns momentos mais difíceis destes anos;

Ao Professor Doutor Luís Silva Carvalho que colaborou na elaboração deste projecto e foi seu co-investigador desde a primeira hora, e cuja participação foi tragicamente interrompida em consequência do seu falecimento;

À Professora Doutora Maria Isabel de Sousa Rocha que foi a orientadora inicial desta tese e que é a investigadora responsável pelo projecto perante a Fundação para a Ciência e Tecnologia;

À Mestre Maria Adelaide de Lima Serra, co-investigadora e responsável pela parte da investigação histológica efectuada no Departamento de Histologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e que, para além disso, enquanto nefrologista responsável pela Consulta de Litíase Renal do Hospital Fernando Fonseca, deu uma ajuda inestimável no recrutamento de doentes que participaram no estudo clínico;

Aos restantes co-investigadores que participaram no projecto ao longo dos anos, nomeadamente à Dr.<sup>a</sup> Rita Xavier que realizou os primeiros estudos dos doentes com nefrolitíase, e à Dr.<sup>a</sup> Fernanda Amaral que realizou comigo a maior parte da experimentação animal;

Ao aluno de Medicina João Carlos Fernandes Serôdio, pela sua colaboração na selecção dos indivíduos que constituíram o grupo de controlos saudáveis;

Ao Mestre em Engenharia Biomédica Cristiano Tavares da Unidade de Processamento de Sinal do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina de

Lisboa (FML) e Instituto de Medicina Molecular (IMM) de Lisboa, que desenvolveu o software Fisiosinal utilizado em vários estudos clínicos e animais incluídos nesta tese e que acompanhou as análises dos sinais recolhidos;

Ao Professor Doutor Francisco Enguita do Instituto de Medicina Molecular de Lisboa, pelo seu apoio na metodologia de preparação dos tecidos para doseamento da noradrenalina e que preparou a solução utilizada na sua extracção;

Aos investigadores da Unidade de Sistema Nervoso Autónomo da Faculdade de Medicina de Lisboa que efectuaram as medições da actividade no nervo renal nos ratos com nefrolitíase, nomeadamente à Dr.<sup>a</sup> Vera Geraldês e ao Dr. Nataniel Rosa;

A todos os que com o seu trabalho e amizade me apoiaram ao longo destes anos.

# 1. Introdução

A nefrolitíase é uma patologia relativamente frequente nas civilizações desenvolvidas, nas quais 8 – 10% dos adultos apresentará pelo menos um episódio de cólica renal ao longo da vida. Nas últimas décadas verificou-se um aumento da incidência da litíase renal nos países em vias de desenvolvimento e em algumas civilizações onde a doença era pouco frequente. Concomitantemente, verificou-se um aumento significativo da prevalência de outras situações mórbidas como a obesidade, a diabetes *Mellitus* e as doenças cardiovasculares, que em alguns casos atinge proporções pandémicas.

A nefrolitíase tem sido associada ao diagnóstico de hipertensão arterial. Vários estudos epidemiológicos e clínicos mostraram que a prevalência da hipertensão é mais elevada nos doentes com litíase renal quando comparada com a população geral da mesma faixa etária, ultrapassando os 50%. Foi documentado que a litíase renal está associada a uma prevalência maior de doenças cardiovasculares, como revela um estudo epidemiológico de grande dimensão efectuado na população portuguesa que refere aumento da prevalência de enfartes do miocárdio e de acidentes cerebrovasculares em indivíduos com história de cólicas renais.

As causas para a associação da nefrolitíase e doenças cardiovasculares não estão inteiramente esclarecidas. De acordo com alguns autores, essa associação podia ser devida à existência de alterações metabólicas comuns a essas patologias, por aumento da massa corporal em doentes com litíase renal ou pela existência de factores hereditários. No entanto, a nefrolitíase é uma doença polimorfa para a qual contribui uma diversidade de factores de risco e não existe na literatura uma explicação abrangente que permita justificar o aumento de risco cardiovascular. Que factores seriam identificados em comum entre a litíase fosfocálcica de uma mulher jovem, a litíase de oxalato de cálcio da meia-idade e a litíase úrica de um homem de sessenta anos, apesar de todos eles poderem desenvolver hipertensão?

Por outro lado, é do conhecimento geral que o sistema nervoso autónomo possui uma importante função integradora de vários aspectos do metabolismo e de controlo do sistema cardiovascular. A disfunção autonómica existe em algumas das comorbilidades frequentes nos doentes com nefrolitíase, nomeadamente nas

acompanhadas de aumento da resistência à acção da insulina e hiperinsulinismo, e encontra-se bem documentada a disfunção do sistema nervoso simpático na hipertensão arterial. Estudos prospectivos demonstraram que a incidência de cálculos renais aumenta em doentes com antecedentes de hipertensão. Estudos clínicos controlados demonstraram que indivíduos expostos a situações de *stress* emocional apresentavam um aumento do risco de formação de cálculos renais. Por outro lado, a incidência de nefrolitíase é muito reduzida nos receptores de transplantes renais, constituindo estes doentes um modelo clínico de ausência de enervação renal. Estes factos demonstram um provável envolvimento do sistema nervoso autónomo na nefrolitíase.

Os métodos não invasivos desenvolvidos nos últimos anos são baseados em modelos matemáticos para análise da variabilidade hemodinâmica e permitem quantificar com razoável acuidade os efeitos moduladores que a actividade autonómica exerce sobre o sistema cardiovascular. Estes métodos são utilizados no estudo clínico em diversas patologias.

Não encontramos referências na literatura sobre o estudo da actividade do sistema nervoso autónomo em doentes com litíase renal.

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo da actividade do eferente do sistema nervoso autónomo na presença de litíase renal. A investigação compreendeu o estudo não invasivo da actividade do sistema nervoso autónomo em doentes com litíase renal recorrente, comparando os resultados obtidos com os de um grupo de controlo saudável.

Para testar a possibilidade de estudar a relação entre a obesidade e nefrolitíase em modelo animal, pesquisámos a presença de cristais e/ou cálculos renais em ratos Zucker obesos. Realizámos três estudos em modelos experimentais de nefrolitíase induzida farmacologicamente em ratos Wistar. Num, analisámos a variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial para estudar a função autonómica. Noutro, medimos directamente a actividade do nervo renal na presença de nefrolitíase e de obstrução. No último, avaliámos a influência da enervação renal no processo da litogénese e no desenvolvimento de lesões renais relacionadas com a nefrolitíase.

## **2. A Nefrolitíase e a doença cardiovascular: definição do problema**

Nesta dissertação pretendemos contribuir para formar uma ideia global sobre a associação da nefrolitíase com o aumento do risco de doenças cardiovasculares, em virtude desse estudo ter sido feito por diversos autores de forma dispersa, abrangendo muito insuficientemente alguns aspectos e apresentando por vezes resultados contraditórios. No presente capítulo apresentamos de forma sucinta os trabalhos que contribuíram para o reconhecimento da maior prevalência de hipertensão arterial nos indivíduos com litíase renal e documentaram a maior probabilidade de resultados cardiovasculares adversos nesta população.

### **2.1 A associação da nefrolitíase com a hipertensão arterial**

Diversos trabalhos clínicos [1;2] e epidemiológicos [3;4] revelaram uma prevalência elevada de hipertensão arterial (HTA) nos doentes com nefrolitíase em relação à população geral, por vezes superior a 50% [2;5], mas sem esclarecer os motivos para esta associação.

#### **2.1.1 Evidências epidemiológicas**

Em termos epidemiológicos, tanto a nefrolitíase como a HTA são doenças relativamente frequentes na população geral. Esse facto permitiria admitir uma simples coincidência na sua associação. Contudo, existem dois argumentos que contrariam tal possibilidade: 1) estudos epidemiológicos transversais mostraram um aumento significativo do *odds ratio* (OR) para nefrolitíase nos doentes hipertensos, aproximadamente duas vezes mais elevado do que em controlos normotensos [6]; 2) a prevalência de hipertensão não é igual nas diversas formas de litíase, apresentando valores mais elevados em doentes com cálculos de ácido úrico [7]. Estas observações sugerem a possível existência de factores etiopatogénicos comuns à nefrolitíase e à HTA.

A procura da relação causal entre a litíase renal e a HTA transcende a simples curiosidade científica. Na actualidade, o aumento da expectativa de vida e o aumento progressivo do índice de massa corporal (IMC) contribuem para que uma elevada percentagem de indivíduos desenvolva hipertensão [8]. Embora não existam evidências de que a prevalência da HTA esteja efectivamente a aumentar, nas últimas décadas verificou-se que esta patologia foi diagnosticada a uma percentagem progressivamente maior de da população, com correspondente aumento do número de indivíduos tratados com hipotensores nas civilizações mais desenvolvidas [9]. Além disso, verificou-se um aumento significativo da HTA e das doenças cardiovasculares em algumas civilizações ancestrais onde aquelas doenças eram praticamente desconhecidas até à adopção de hábitos alimentares e estilos de vida ocidentais [10]. São exemplos dramáticos deste novo paradigma, o aparecimento de HTA, doenças cardiovasculares, gota e elevada incidência de insuficiência renal crónica nas populações aborígenes da Austrália [11;12], o aumento da incidência de HTA, obesidade e gota úrica nas populações negras da África do Sul que migraram dos ambientes rurais para os ambientes urbanos [13-15] e o aparecimento *de novo* de HTA [16;17] e gota no povo Maori [18]. Paralelamente, verificou-se um aumento progressivo da prevalência de nefrolitíase nos países da Europa ocidental e da América do norte, onde aquela já era relativamente elevada, bem como nos países em vias de desenvolvimento e sociedades onde a prevalência de cálculos no aparelho urinário superior era habitualmente reduzida [19].

O papel da HTA no aumento da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares está exaustivamente documentado [20;21]. No entanto, em relação à nefrolitíase, com excepção de algumas formas hereditárias mais raras, existe um conceito quase generalizado de que a doença é uma condição benigna e quase exclusivamente limitada ao desconforto provocado pelos episódios de cólica renal. Encontra-se frequentemente subvalorizado o potencial de recorrência da litíase renal ou o facto de que, na ausência de medidas preventivas, a evolução da nefrolitíase pode conduzir a deterioração da função renal [22;23]. Esta atitude traduz-se em custos socioeconómicos mais elevados, incluindo custos directos relacionados com o tratamento da litíase renal e das comorbilidades associadas, bem como custos indirectos relacionados com a perda de produtividade [24-26].

A associação entre a nefrolitíase e a HTA promove alguns argumentos preocupantes à forma como a litíase renal deve ser entendida: 1) o risco de litíase renal nos indivíduos hipertensos pode triplicar em relação ao valor observado na população com valores normais de pressão arterial [6]; 2) nos doentes com litíase de oxalato de cálcio, a hipertensão quadruplicou a probabilidade de desenvolver doença coronária em comparação com os doentes normotensos (OR: 4,24; IC 95% 2,61 – 6,91) [27]; 3) de acordo com resultados recentes, a nefrolitíase constitui uma causa frequente de insuficiência renal crónica [22;23]. A presença de litíase renal aumenta em cerca de 90% a probabilidade de insuficiência renal crónica terminal (OR: 1,9; IC 95% 1,1 – 3,3) mesmo nas formas mais comuns e potencialmente tratáveis [28].

Na década de noventa foram publicados vários estudos prospectivos com o objectivo de esclarecer a associação entre a HTA e a nefrolitíase. Num deles, com oito anos de duração, foram seguidos 51.529 indivíduos do sexo masculino e verificou-se que a existência de uma história prévia de nefrolitíase aumentava em cerca de 20% a probabilidade de desenvolver HTA (OR: 1,31; IC 95% 1,30 – 1,32) [29]. Neste estudo, o diagnóstico de nefrolitíase precedeu ou ocorreu em simultâneo com o diagnóstico de HTA em 79,5% dos doentes que apresentavam ambos os diagnósticos. A existência de antecedentes de HTA no início do estudo não influenciou significativamente a probabilidade de desenvolver nefrolitíase (OR: 0,99; IC 95% 0,82 – 1,21). Num estudo realizado entre 1976 e 1992 em 89.376 mulheres que participaram no *Nurses's Health Study* demonstrou-se que a existência prévia de nefrolitíase aumentou em 36% o risco de HTA (RR: 1,36; IC 95% 1,20 – 1,43) [30].

No entanto, dois estudos Italianos demonstraram que a HTA também aumentava o risco de nefrolitíase. No primeiro, foram seguidos prospectivamente 140 doentes com HTA essencial e 140 controlos normotensos entre 1984 e 1991. Não havia antecedentes de nefrolitíase no início do estudo, mas demonstrou-se que os doentes hipertensos apresentavam um risco 5,5 vezes maior de desenvolver litíase renal em relação ao grupo de controlo (OR: 5,5; IC 95% 1,82 – 16,66) [31]. No segundo trabalho, integrado no *Olivetti Prospective Heart Study*, para avaliar os factores de risco cardiovascular dos funcionários de duas fábricas daquela empresa situadas no sul de Itália, documentou-se que os funcionários do sexo masculino com antecedentes de HTA tinham um risco de desenvolver litíase renal de aproximadamente duas vezes

superior em relação ao grupo controlo durante um período de *follow-up* de oito anos (RR: 1,96; IC 95% 1,16 – 3,32) [32]. Noutro estudo, a reavaliação dos resultados do *Olivetti Prospective Heart Study* mostrou que os indivíduos que no início do estudo possuíam antecedentes de litíase renal apresentaram um risco significativamente maior de desenvolver HTA durante os oito anos de seguimento, em relação aos indivíduos sem antecedentes de nefrolitíase (RR: 1,96; IC 95% 1,25 – 3,07) [33].

## **2.1.2 Procura da relação causal entre a nefrolitíase e a hipertensão**

### **Forma de tratamento da litíase renal**

Uma causa provável de HTA nos doentes com litíase renal poderia relacionar-se com a forma de tratamento dos cálculos renais. Desde a sua introdução, em 1982, a litotricia extracorporal por ondas de choque (LEOC) tornou-se a forma mais frequente de tratamento da litíase renal. Alguns estudos sobre a utilização da LEOC sugeriram que este tratamento aumentava os valores da pressão arterial devido a lesões do parênquima renal [34;35], como consequência das ondas de alta energia que atingiam zonas saudáveis de tecido adjacentes aos cálculos, com reduções localizadas do fluxo plasmático renal [36]. Esta redução ocorre após as sessões de LEOC mas é habitualmente transitória e vários estudos prospectivos não confirmaram o aumento da incidência de HTA em doentes submetidos a LEOC em relação aos doentes com litíase tratados com outras terapêuticas [37-39]. No entanto, o período médio de *follow-up* destes estudos foi apenas de cerca de dois anos. Recentemente, um grupo de investigadores da Clínica Mayo relatou um aumento significativo da prevalência de HTA (OR 1,47; IC 95% 1,03 – 2,1) e de diabetes *Mellitus* (OR: 3,23; IC 95% 1,73 – 6,02) após 19 anos da realização de LEOC [40].

No entanto, a elevada prevalência de HTA em doentes com nefrolitíase não pode ser justificada apenas por intervenções urológicas para destruição e/ou remoção dos cálculos. A prevalência de HTA num grupo de doentes da população Portuguesa com litíase cálcica idiopática recorrente foi de 55,4% [2]; contudo, 72,6% dos doentes incluídos no estudo não efectuaram qualquer tratamento prévio e só 29 dos 186 doentes estudados (15,6%) realizaram tratamentos com LEOC. Estes resultados sugerem a possibilidade da nefrolitíase ser a principal causa da hipertensão, e não o seu tratamento.



Outra provável causa de HTA nos doentes com nefrolitíase, na ausência de tratamento, poderia ser a deterioração da função renal. É do conhecimento geral que algumas formas recorrentes de litíase renal provocam alterações da função renal por um conjunto de vários mecanismos: episódios obstrutivos, necessidade frequente de procedimentos urológicos, infecção e outras comorbilidades. A nefrolitíase é uma das causas de insuficiência renal crónica terminal, por omissão de medidas preventivas adequadas [22]. De acordo com os dados estatísticos existentes, a percentagem de casos que evolui para a insuficiência renal terminal não excede 4% dos doentes que iniciam técnicas de substituição renal, mas cerca de 27% dos doentes com litíase úrica (cálculos puros de ácido úrico ou cálculos mistos) e 16% dos doentes com litíase cálcica idiopática apresentam algum grau de insuficiência renal [23]. Devido papel fundamental do rim no controlo da pressão arterial, admite-se que pequenas alterações da função renal possam determinar o desenvolvimento de hipertensão [41].

#### **Hipóteses para associar a hipertensão com as alterações metabólicas da nefrolitíase**

A litíase renal está frequentemente associada a alterações metabólicas que se expressam na composição da urina. Este facto tem motivado a pesquisa de eventuais fenótipos urinários característicos dos doentes com nefrolitíase e HTA.

Os cálculos renais podem apresentar diversas composições químicas e diversos factores de risco contribuem para a sua formação [42-44]. Com excepção dos casos de nefrolitíase secundária a infecção ou a alterações congénitas do metabolismo, a sua etiologia é desconhecida e, provavelmente, multifactorial, contribuindo simultaneamente alguma predisposição genética e exposição a factores ambientais e/ou nutricionais [45]. A influência dos diversos factores traduz-se em alterações na composição da urina, com aumento na excreção de promotores (cálcio, oxalato, fosfato e ácido úrico) e/ou diminuição da excreção de inibidores da litogénese (citrato, magnésio, pirofosfato, etc.). As alterações da urina podem incluir desvio do pH (o que altera a solubilidade das substâncias em solução) e diminuição do volume (o que aumenta a concentração dos promotores da litogénese) [46]. Estas alterações aumentam a supersaturação urinária em oxalato de cálcio, fosfato de cálcio ou ácido úrico.

Actualmente são conhecidas as alterações bioquímicas mais evidentes para a maioria dos casos de nefrolitíase, ou seja, aquelas que são possíveis de identificar em estudos clínicos, embora seja reconhecido que existem outros factores de risco ainda não identificados, nomeadamente as macromoléculas existentes na urina humana e que podem actuar como inibidores ou promotores da litogénese [47-49]. De facto, as alterações urinárias identificadas como factores de risco nos doentes com nefrolitíase também podem ser encontradas na população não afectada por esta patologia [50].

As alterações urinárias e o tipo de cálculos dependem de várias características individuais, nomeadamente a idade e o sexo. Os cálculos de fosfato de cálcio, por exemplo, são mais frequentes no sexo feminino e ocorrem em idades jovens, verificando-se que o pico da incidência deste tipo de cálculos ocorre habitualmente nas mulheres até à terceira década. No entanto, os cálculos de ácido úrico são mais frequentes nos homens, principalmente a partir da quinta década de vida [51]. Alterações urinárias semelhantes podem provocar cálculos com composições diferentes e alterações urinárias diferentes podem resultar na formação de cálculos com composições semelhantes [52]. A incidência da litíase fosfocálcica tem diminuído progressivamente nos anos mais recentes, verificando-se que o oxalato de cálcio é a composição dos cálculos mais frequentemente observada nos jovens adultos de ambos os sexos [53]. A litíase cálcica idiopática é a forma mais frequente nos adultos jovens, embora a sua prevalência se reduza de modo progressivo com a idade. Por motivos não completamente esclarecidos, esta diminuição ocorre mais rápida e precocemente no sexo masculino (cerca de 5% por década após os 30 anos) do que no sexo feminino (cerca de 3% por década após os 50 anos) [51]. A partir dos 50 anos de idade verifica-se um aumento progressivo dos cálculos de ácido úrico, principalmente no sexo masculino. O aumento da frequência da litíase úrica com a idade pode ser consequência de uma redução do pH urinário [54], devido à capacidade de produzir amónia que diminui progressivamente com a idade, o que determina que a eliminação das cargas ácidas na urina seja efectuada por aumento da excreção de ácido titulável [55].

Assim, seguidamente iremos resumir as várias teorias que procuram relacionar as alterações urinárias com o desenvolvimento de HTA.

### ***Metabolismo do cálcio***

Alguns estudos sugerem que as alterações do metabolismo fosfo-cálcico seriam um potencial elo patogénico entre a litíase renal e a hipertensão arterial. Esta hipótese é baseada no facto de serem observados valores mais elevados de cálcio urinário em doentes com nefrolitíase que desenvolveram hipertensão [33] e em observações que mostraram que os doentes com hipertensão essencial e hipercalciúria apresentaram maior supersaturação urinária em oxalato de cálcio, com risco mais elevado de formação de cálculos renais [31].

A hipercalciúria ocorre frequentemente na hipertensão [56]. Demonstrou-se em estudos prospectivos que a prevalência de hipercalciúria é mais elevada em doentes com hipertensão essencial do que em controlos saudáveis (35% vs. 2%, respectivamente) e mais elevada nos hipertensos não tratados do que nos hipertensos tratados (35% vs. 20%, respectivamente) [57].

Vários estudos epidemiológicos revistos por McCarron e Morris [58], sugerem que a diminuição da ingestão alimentar de cálcio pode estar envolvida na patogénese da hipertensão. De acordo com esta hipótese, o mecanismo patogénico que desencadeia o aumento da pressão arterial envolveria uma diminuição do cálcio ionizado ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Esta hipótese foi apoiada pela demonstração experimental de que as estirpes de ratos espontaneamente hipertensos apresentam diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  no soro (embora o cálcio sérico total tenha permanecido dentro dos limites normais) em consequência dum aumento da excreção urinária de cálcio [59]. Foi sugerido que a hipercalciúria poderia ser uma consequência da diminuição da actividade da ATPase do  $\text{Ca}^{2+}$  nas membranas das células do tubo contornado distal, que controlam o efluxo celular de  $\text{Ca}^{2+}$  [60].

Alguns estudos contrariam a influência do metabolismo do cálcio na HTA associada à litíase renal: 1) num estudo clínico em 167 doentes com litíase cálcica, a prevalência de HTA foi semelhante nos grupos de doentes com ou sem hipercalciúria. Neste estudo não foram observadas diferenças do metabolismo fosfocálcico entre os dois grupos de doentes [61]. 2) A prevalência da HTA nos doentes com litíase cálcica idiopática excedeu largamente a prevalência de hipercalciúria [2]. É sabido que as alterações do cálcio são relativamente frequentes nos doentes com HTA e nos doentes

com nefrolitíase. A litíase cálcica é a forma mais comum de nefrolitíase observada actualmente e corresponde a 50 – 70% de todos os casos de litíase renal [23]. A excreção urinária de cálcio é mais elevada nos doentes com litíase cálcica, com cerca de 25 a 38% destes doentes a apresentarem hipercalciúria [50]. A prevalência de hipercalciúria é mais elevada nos doentes com HTA essencial. Por estes motivos, não é estatisticamente improvável que a maioria dos doentes com HTA e nefrolitíase apresentem simultaneamente aumento da excreção de cálcio, sem que esse facto traduza necessariamente uma relação causal.

### ***Metabolismo do ácido úrico***

As alterações metabolismo do ácido úrico constituem outra hipótese de explicação para o aumento de prevalência da HTA nos doentes com nefrolitíase. Consideram-se duas alterações do metabolismo do ácido úrico nos doentes com litíase renal: a hiperuricosúria e a hiperuricemia. Foi documentado que os doentes com litíase renal hipertensos apresentavam excreção urinária de ácido úrico significativamente mais elevada em relação aos controlos com nefrolitíase e normotensos (707 vs. 586 mg/dia, respectivamente) [31].

Na actualidade, as litíases cálcica e úrica constituem a maioria dos casos de litíase renal diagnosticados e são as formas de nefrolitíase mais frequentemente associadas à hipertensão essencial. A hiperuricosúria representa uma alteração frequente e um factor importante de risco para ambas, principalmente para a litíase cálcica [62;63]. A hiperuricosúria foi diagnosticada em aproximadamente 26% dos doentes com litíase cálcica; 39% dos doentes hiperuricosúricos do sexo masculino e 22% do sexo feminino apresentam concomitantemente hiperuricemia [64].

O aumento da excreção de uratos correlaciona-se directamente com a supersaturação urinária em oxalato de cálcio [52]. Demonstrou-se que existe boa correspondência entre a supersaturação urinária em sais litogénicos e a composição dos cálculos renais [65]. Além de aumentar a supersaturação urinária em oxalato de cálcio, o que promove a cristalização, o aumento da excreção de uratos está envolvido na patogénese da litíase cálcica por outros mecanismos: 1) demonstrou-se *in vitro* que os cristais de urato de sódio facilitam a agregação dos cristais de oxalato de cálcio pré-existent e o crescimento dos agregados, promovendo a formação de cálculos,

provavelmente por os uratos interagirem com os inibidores da agregação e do crescimento dos cristais de oxalato de cálcio; 2) estudos epidemiológicos demonstraram que a evolução da litíase cálcica em doentes hiperuricosúricos é relativamente atípica, caracterizada por número elevado de recidivas e maior morbidade que os doentes normouricosúricos com litíase cálcica; 3) vários autores mostraram que a administração de alopurinol nos doentes hiperuricosúricos com litíase cálcica recorrente reduzia significativamente o número de novos episódios [52;64], embora não esteja esclarecido se a redução é consequência da diminuição do ácido úrico na urina ou de outro efeito do alopurinol ainda desconhecido.

Os doentes que formam exclusivamente cálculos de ácido úrico também podem apresentar alterações do metabolismo dos uratos. O aumento da excreção urinária de uratos tem uma influência menor na fisiopatologia da litíase úrica. Comparativamente com os doentes com litíase cálcica ou com cálculos mistos, a hiperuricosúria foi diagnosticada numa minoria dos doentes que formam cálculos de ácido úrico, na maioria dos casos relacionada a aumento do consumo de purinas e proteínas animais [66]. Foram descritas formas de litíase úrica com hiperuricosúria e diminuição da reabsorção tubular de uratos relacionadas com factores hereditários, conforme demonstrado pela elevada prevalência cálculos de ácido úrico na aldeia de Talana, na Sardenha, caracterizada por uma grande homogeneidade genética (80% da população desta aldeia isolada era originária de 11 linhagens ancestrais maternas e 8 de linhagens ancestrais paternas) [67]. O estudo desta população identificou uma proteína com forte associação à litíase úrica, a Talanina, identificada nos indivíduos homozigóticos para uma das variantes do gene ZNF365, que determina um aumento do risco da formação de cálculos de ácido úrico [68]. Recentemente foi clonado no Homem um transportador de aniões codificado pelo gene SLC22A12, o URAT-1 [69]. Algumas mutações deste gene são responsáveis por hiperuricosúria e hipouricemia por diminuição da reabsorção tubular de uratos [70].

A alteração mais frequente do metabolismo dos uratos nos doentes com litíase úrica caracteriza-se por redução da fracção excrecional de uratos e aumento dos níveis séricos de ácido úrico [54;66;71]. Esta alteração é semelhante às manifestações presentes na gota primária [72;73], onde aproximadamente 20% dos doentes apresentam simultaneamente cálculos renais, com a litíase renal a preceder as

manifestações articulares em cerca de 40% dos casos de gota [74]. Devido às semelhanças bioquímicas, Pak *et al.* [54] sugeriram que a litíase úrica pode ser uma forma de apresentação da gota primária.

Existem estudos contraditórios sobre a influência das alterações do metabolismo do ácido úrico na patogénese da HTA. Alguns autores referiram que a prevalência de hiperuricemia nos doentes hipertensos atinge 50% dos casos [8]. No entanto, o aumento dos níveis de uricemia não foi considerado como factor de risco independente para HTA nos primeiros estudos epidemiológicos de grande dimensão [75] e durante vários anos a associação da HTA com a hiperuricemia foi considerada um fenómeno secundário, sem relação causal com a HTA. Um estudo prospectivo do final da década de 1990 relacionou o aumento do ácido úrico sérico como uma consequência do aumento dos valores da pressão arterial, com um aumento de 7% do risco relativo de hiperuricemia por cada 5 mmHg de incremento da pressão arterial média [76]. Este estudo relacionou o risco de hiperuricemia a aumentos do IMC e dos triglicéridos, à ingestão de álcool e a hábitos tabágicos.

Observações experimentais e estudos epidemiológicos mais recentes sugeriram que o aumento da uricemia representaria um factor de risco independente na etiopatogenia da HTA [77]. A indução de hiperuricemia em ratos provocou aumentos da pressão arterial sistólica e da creatinina sérica, com aparecimento de proteinúria [78]. Estas alterações foram relacionadas com o desenvolvimento de hipertrofia renal e de várias lesões histológicas do rim, nomeadamente glomerulosclerose, fibrose intersticial e proliferação das células musculares lisas das arteríolas pré-glomerulares [78]. As lesões das artérias renais foram relacionadas directamente com hiperuricemia, e não com a hipertensão, dado que as lesões se desenvolveram em animais hiperuricémicos apesar da pressão arterial ter sido mantida dentro de valores normais pela administração concomitante de hidroclorotiazida [79]. Outro estudo referiu a possibilidade da patogénese das lesões renais e vasculares envolver a activação do sistema renina-angiotensina, por os efeitos da hiperuricemia serem menos evidentes com administração concomitante de enalapril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina (IECA) [79]. Esta hipótese foi confirmada em trabalhos posteriores que documentaram a activação intra-renal do sistema renina-angiotensina [80].

Estudos *in vitro* demonstraram que a hiperuricemia estimula directamente a proliferação de células musculares lisas da parede vascular e que esse efeito pode ser inibido pelo losartan, um inibidor dos receptores AT-1 da angiotensina II [79]. Os autores desse estudo interpretaram que a lesão vascular podia ser mediada pela acção da angiotensina II. Recentemente, demonstrou-se que as células musculares lisas da parede vascular expressam o ARNm do gene SLC22A12 e identificaram a presença de URAT-1 na sua membrana celular [81]. Estes resultados demonstraram a existência de transporte de uratos através da membrana celular das células musculares lisas das paredes vasculares e que o ácido úrico participaria na patogénese da hipertensão [82].

Recentemente, foi demonstrado que a hiperuricemia pode prognosticar aumentos do peso e da tensão arterial [83]. Numa população com 5.926 indivíduos do *National Health and Nutrition Survey* (NHANES I) verificou-se que o aumento da uricemia constituiu um factor de risco independente para aumento da mortalidade cardiovascular [84]. O estudo LIFE observou uma redução de 29% do risco de eventos cardiovasculares provocados pela hipertensão que podia estar relacionada com a diminuição da uricemia resultante do efeito uricosúrico do losartan [85]. Um estudo prospectivo durante cinco anos relacionou os níveis de ácido úrico  $\geq 5,2$  mg/dl (valor actualmente considerado dentro dos limites normais) com um aumento de 3,5 vezes do risco de eventos cardiovasculares graves (enfarte agudo miocárdio, acidente vascular cerebral, necessidade de amputação ou insuficiência renal) e da mortalidade cardiovascular (OR: 3,5; IC 95% 1,0 – 11,9) [82;86]. Na HTA associada à hiperuricemia, as lesões dos órgãos alvo relacionaram-se com aumento do risco de perda de função renal [87]. Apesar de ainda não estar esclarecido o motivo, foi demonstrado que o risco de insuficiência renal crónica associado à hiperuricemia era significativamente mais elevado no sexo feminino [88].

### ***Obesidade e resistência à acção da insulina***

O aumento da resistência à acção periférica da insulina e/ou aumento da insulinémia representam outra possível relação entre a nefrolitíase e a HTA. O aumento do IMC constitui uma característica comum na maior parte dos estudos que analisaram a associação entre a litíase renal e a HTA [1;7;30;31;89]. O aumento do IMC encontra-

se associado a várias alterações metabólicas referidas como factores de risco da nefrolitíase.

É do conhecimento geral que a prevalência e a incidência da nefrolitíase são maiores em doentes com aumento do peso e do IMC [63;90] e estes estão associados a resistência à acção periférica da insulina [91]. A resistência à insulina manifesta-se, entre outras alterações, por diminuição do pH urinário. Esta diminuição é maior nos doentes com obesidade quando comparada com não obesos [92]. Um estudo clínico que analisou mais de 4.800 doentes com nefrolitíase demonstrou uma correlação negativa entre o peso e o pH urinário [93].

A diminuição do pH urinário em doentes com resistência à insulina não se encontra completamente esclarecida. Uma das hipóteses relaciona a redução do pH com deficiente produção de amónia (ou duma deficiência da capacidade para reter a amónia no interior do túbulo na forma de  $\text{NH}_4^+$ ) e, conseqüentemente, aumento proporcional da excreção de ácido titulável. Em condições fisiológicas, a insulina estimula a amoniagénesse utilizando a L-glutamina como substrato [94] e promove a actividade do permutador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NAE) do tubo proximal [95]. Estes efeitos são importantes para a retenção do  $\text{NH}_4^+$  no lúmen tubular. A acção da insulina foi comprovada com indução simultânea de hiperinsulinemia e euglicemia (*hyperinsulinemic euglycemic clamp*) em indivíduos saudáveis, nos quais induziu aumentos significativos da produção de amónia e do pH urinário [96]. Estes aumentos não se observaram em doentes com litíase úrica que apresentaram resistência à acção euglicémica da insulina [96].

Os ácidos gordos livres estão aumentados na insulino-resistência [97]. Demonstrou-se que os ácidos gordos livres podem competir com a glutamina na síntese de ATP nas células do tubo contornado proximal [98]. Estes resultados sugerem que a resistência à actividade da insulina no rim pode conduzir a uma menor utilização da glutamina na amoniagénesse, o que está de acordo com a maior prevalência da litíase úrica na diabetes Mellitus, cerca de 21%, valor muito superior aos 8% observados na população não diabética [99].

A prevalência da litíase úrica é variável, com valores que oscilam entre 4 – 14,6% conforme a área geográfica [25], mas habitualmente não excedia 10% dos casos nefrolitíase observados nos países ocidentais. Os resultados das análises de mais de



43.000 cálculos renais do Hospital Necker, em Paris, mostraram que 28,5% dos cálculos renais formados em doentes diabéticos eram constituídos exclusivamente por ácido úrico, tendo sido detectada a presença de ácido úrico em 35,4% de todos cálculos formados por doentes diabéticos. Estes resultados foram significativamente mais elevados do que os cálculos formados em indivíduos não diabéticos, cuja percentagem de cálculos puros de ácido úrico e de mistos correspondeu a 13,2% e 16,8%, respectivamente [100]. Estes resultados demonstraram a importância das alterações provocadas pela insulina na patogénese da litíase úrica.

É do conhecimento geral que a resistência à insulina e hiperinsulinismo estão a aumentar, o que se reflecte na prevalência da litíase úrica. Durante as décadas de 1980 e 1990 observou-se uma ligeira diminuição da percentagem de cálculos de ácido úrico em vários países europeus, nomeadamente na Alemanha, Itália e Portugal [25]. No entanto, estudos recentes referem um aumento da prevalência da litíase úrica em várias regiões do globo [101], na ordem dos 15% [23;102].

A influência da resistência à insulina e/ou hiperinsulinismo na HTA tem sido objecto de investigação intensa. No entanto, esta relação ainda não está completamente esclarecida [103]. Alguns estudos demonstraram a existência de factores humorais produzidos pelo tecido adiposo com propriedades para desencadear um aumento da resistência periférica à acção da insulina [104]. Esses factores poderiam contribuir para explicar a etiopatogenia da HTA associada à obesidade [105]. Contudo, observou-se aumento de resistência à acção insulina em indivíduos com valores de pressão arterial nos limites superiores do normal, mesmo na ausência de obesidade [106].

Com a resistência à insulina, ocorre frequentemente aumento desta em circulação (hiperinsulinismo) pelo que permanece em aberto se a hipertensão é consequência do aumento da resistência à acção da insulina ou do hiperinsulinismo. Demonstrou-se, em cães, que o hiperinsulinismo apresenta um efeito vasodilatador e provoca hipotensão [107]. Este efeito foi observado em animais com sensibilidade normal e nos que apresentavam resistência à acção da insulina [107]. Estes resultados sugerem que o aumento da insulina não é responsável (pelo menos directamente) pelo aumento da pressão arterial.

Outra possibilidade seria a do aumento da pressão arterial ser uma consequência indirecta do aumento da insulina circulante, nomeadamente através da retenção de sódio. Observou-se que a indução aguda de hiperinsulinismo em indivíduos saudáveis aumentava a reabsorção tubular de sódio [108]. No entanto, na ausência de insulino-resistência este aumento não justificaria a manutenção de HTA porque o aumento da reabsorção de sódio seria compensado por um aumento da taxa de filtração glomerular e diminuição da reabsorção de sódio nos segmentos mais proximais do túbulo, mantendo-se a homeostase do sódio [108]. Contudo, neste estudo, observou-se que os indivíduos com maior insulino-resistência quando expostos a hiperinsulinismo não aumentaram a taxa de filtração glomerular nem diminuíram a reabsorção do sódio no segmento proximal do túbulo renal [108].

Em condições fisiológicas a excreção renal de sódio está dependente da ingestão alimentar de sal, de um conjunto de factores hormonais e dos valores de pressão arterial sistémica, o que resulta, pela curva de pressão-natriurese, na manutenção do volume extracelular e da pressão arterial dentro da normalidade [109]. Nos indivíduos com aumento da sensibilidade ao sódio verifica-se uma redução da inclinação da curva de pressão-natriurese, o que sugere uma disfunção dos mecanismos de reabsorção tubular do sódio [110]. É sabido que o aumento da sensibilidade ao sódio [111] e a sua consequente retenção podem estar implicados na etiopatogenia da HTA [112]. Alguns autores referem que a insulino-resistência promove o aumento da sensibilidade ao sódio [113;114] e a relação pressão-natriurese não é normal na HTA associada à obesidade [115].

Existem resultados que referem que o aumento da sensibilidade ao sódio nos doentes obesos não é exclusivamente atribuível aos efeitos renais da insulina. Assim, num estudo clínico que envolveu 555 indivíduos demonstrou-se que os doentes obesos, principalmente com adiposidade do tipo visceral, apresentaram resistência à insulina, aumentos da reabsorção de sódio e de ácido úrico e maior risco de desenvolver HTA [116]. Contudo, neste estudo, o aumento da reabsorção tubular de sódio ocorreu predominantemente no tubo proximal (demonstrado pelo aumento da reabsorção de lítio) e foi independente dos níveis de insulina em jejum. Estes resultados contrariam a hipótese de que a retenção de sódio seria consequência da acção directa da insulina.

Uma justificação para estes resultados seria que a associação entre o aumento da sensibilidade ao sódio e a resistência à insulina ocorria de forma indirecta.

Outros autores demonstraram que a fracção excrecional do ácido úrico estava directamente correlacionada com a fracção excrecional de sódio [117], pelo que o ácido úrico poderia fazer a ligação entre a resistência à insulina e a sensibilidade ao sódio, conduzindo ao aumento da pressão arterial. Vários investigadores consideram que o ácido úrico apresentou um papel importante na evolução da espécie humana, sugerindo que o aumento dos seus níveis séricos poderia ter ocorrido pela necessidade de aumentar a sensibilidade ao sódio e a pressão arterial nos períodos de maior calor, após a última época glaciária [118]. Demonstrou-se experimentalmente que a administração exógena de insulina aumenta a reabsorção tubular de ácido úrico em indivíduos saudáveis [117] e em estudos clínicos e epidemiológicos observou-se uma associação entre a diminuição da sensibilidade à insulina/hiperinsulinismo e o desenvolvimento de hiperuricemia [119-123].

### ***O aumento do consumo de frutose: uma hipótese unificadora das alterações do metabolismo do ácido úrico e da síndrome metabólica***

Taylor e Curhan [124] publicaram um estudo prospectivo efectuado em três grandes grupos populacionais que incluíram 93.730 mulheres com idade avançada pertencentes ao *Nurses' Health Study I* (NHS I), 101.824 mulheres mais jovens pertencentes ao *Nurses's Health Study II* (NHS II) e 45.984 homens pertencentes ao *Health Professionals Follow-up Study* (HPFS), totalizando 241.538 indivíduos seguidos durante um período de *follow-up* de 48 anos. A metodologia incluiu a resposta a questionários de frequência alimentar e a consulta dos registos clínicos para confirmação dos episódios sintomáticos de litíase renal. O estudo demonstrou que o aumento do consumo de frutose constituía um factor de risco independente para o desenvolvimento de nefrolitíase: os indivíduos pertencentes ao quintil mais elevado de consumo total de frutose (ingerida na forma de frutose livre ou como componente de outros açúcares alimentares) obtiveram aumentos do risco relativos de nefrolitíase em 37% (NHS I), 35% (NHS II) e 27% (HPFS). Quando consideraram apenas o consumo de frutose livre, o risco relativo para novos episódios sintomáticos de litíase renal foi de 1,29 (NHS I), 1,22 (NHS II) e 1,28 (HPFS), respectivamente [124].

A circunstância do aumento do consumo de frutose ser um factor de risco para nefrolitíase em seres humanos pode ser um facto importante para entender o aumento do risco cardiovascular nos doentes com litíase renal. As dietas ricas em frutose aumentam a excreção urinária de cálcio, oxalato e ácido úrico. Estes efeitos foram inicialmente descritos em ratos, nos quais o elevado teor de frutose na dieta demonstrou ter efeito sinérgico com o baixo teor de magnésio no desenvolvimento de nefrocalcinose [125]. Demonstrou-se em modelos animais que as dietas com elevado conteúdo em frutose provocavam aumento da excreção urinária de cálcio e o aparecimento de cristais de fosfato de cálcio na região cortico-medular do rim [126]. O aumento da excreção de cálcio provocado pelo consumo de frutose foi observado em humanos saudáveis, particularmente quando o aumento da ingestão de frutose acompanhava uma reduzida ingestão de magnésio [127]. Num estudo em que foi administrada frutose por via endovenosa a sete voluntários saudáveis verificou-se aumentos da calciúria em 64% e da excreção urinária de oxalato em ~60% [128]. Estudos em modelos animais observaram que a deficiência no aporte de vitamina B6 potenciava a hiperoxalúria associada ao aumento do consumo de frutose [129].

Apesar dos dados epidemiológicos e experimentais sugerirem que o consumo de frutose aumenta o risco de nefrolitíase, ainda não foram estudadas as alterações urinárias em doentes com nefrolitíase. Na realidade, o aumento do risco de nefrolitíase no Homem poderá ser consequência de outras alterações provocadas pelo consumo excessivo de frutose, nomeadamente disfunção das macromoléculas que funcionariam como inibidores da adesão celular e da retenção dos cristais nos túbulos renais [130].

O interesse do aumento do risco de litíase renal em consequência do consumo de frutose no conhecimento das causas de HTA na nefrolitíase resulta do facto deste açúcar também estar associado a aumento de incidência da síndrome metabólica no Homem [131;132]. Esse efeito foi comprovado em modelos animais, nos quais o consumo elevado de frutose provocou resistência à acção da insulina, hiperinsulinismo, dislipidemia e hipertensão [133;134].

A frutose é um açúcar simples presente na fruta e no mel e um dos componentes da sacarose, utilizada no vulgar açúcar de mesa (constituída por frutose e dextrose em partes iguais). Por possuir uma acção adoçante e estabilidade superior ao açúcar de

mesa, a frutose passou a ser utilizada como edulcorante industrial desde a década de 60 em inúmeros alimentos e bebidas [135], principalmente na forma de xarope de milho rico em frutose (HFCS). Em consequência da utilização industrial, o consumo de frutose aumentou nos últimos anos cerca de 2000% nos países ocidentais; só nos EUA, o consumo de HFCS aumentou de valores próximos de zero para 29 Kg/pessoa/ano desde 1966 a 2001 [136], estimando-se que a frutose contribua para ~30% do total de açúcares consumidos diariamente.

Do ponto de vista bioquímico, a diferença da frutose em relação aos restantes açúcares reside na capacidade para aumentar rapidamente os níveis séricos de ácido úrico, o que ocorre 30 – 60 minutos após a ingestão. Este facto foi confirmado em vários estudos humanos. Numa amostra de 4.073 indivíduos incluídos no *National Health and Nutrition Survey 2001 – 2002*, nos EUA, verificou-se um aumento dos níveis séricos de ácido úrico no quintil mais elevado da ingestão de bebidas contendo frutose em indivíduos do sexo masculino [137]. Num estudo de coortes em que foram incluídos 46.393 homens seguidos prospectivamente durante 12 anos, verificou-se que o consumo de frutose aumentava significativamente o risco de gota úrica, que duplicou no quintil superior do consumo de bebidas com frutose [138].

Demonstrou-se em animais que uma dieta com excesso de frutose acelerava a perda de função renal. Com o modelo de nefrectomia subtotal de cinco sextos em ratos Sprague-Dawley, demonstrou-se que os animais que consumiram uma dieta com 60% de frutose apresentavam alterações histológicas e bioquímicas mais graves do que os ratos a quem foram administradas dietas com 60% de dextrose ou ração normal [139]. Noutro estudo em ratos, a adição de suplementos de frutose à ração ou à água durante um período de oito semanas provocou hiperuricemia e síndrome metabólica, com diversas lesões renais, nomeadamente hipertrofia renal, vasoconstrição da região cortical, aumento da pressão intra-glomerular e lesão das arteríolas pré-glomerulares [140].

Os mecanismos pelos quais a hiperuricemia provocada pela frutose contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica não estão totalmente esclarecidos. Observou-se, em ratos, que a prevenção da hiperuricemia com alopurinol ou agentes uricosúricos apresentou um efeito preventivo no desenvolvimento de hiperinsulinemia, hipertrigliceridémia, hipertensão sistólica e aumento de peso

provocados pelo aumento da ingestão de frutose [135]. Verificou-se que a frutose diminuía a resposta vasodilatadora e a actividade do endotélio vascular [135]. Estudos *in vitro* permitiram demonstrar que a frutose, em concentrações fisiológicas, aumentava a expressão de moléculas inflamatórias e reduzia a concentração de óxido nítrico nas células endoteliais da aorta humana [141]. Como o óxido nítrico é um importante mediador para a acção da insulina, uma das possíveis explicações para a resistência à insulina e a síndrome metabólica resultantes do aumento consumo de frutose seria a redução dos níveis de óxido nítrico como consequência do aumento dos níveis séricos de ácido úrico [136].

A hipótese do aumento de incidência da síndrome metabólica ser consequência da hiperuricemia foi corroborada por observações que demonstraram que os níveis séricos de ácido úrico > 5,5 mg/dl precederam em cerca de 6 a 12 meses o desenvolvimento da síndrome metabólica [136].

Alguns resultados contrariam a influência do ácido úrico na hipertensão desencadeada pelo consumo excessivo de frutose. Singh *et al.* [142] demonstraram que o aumento da pressão arterial sistólica provocado pela frutose era independente do efeito hiperuricémico, referindo que a HTA induzida em ratos Sprague-Dawley por reforço de frutose na dieta era consequência do aumento da expressão dos transportadores Slc26a6 (transportador apical de cloreto presente no intestino e no rim) e Slc26a5 (transportador de frutose presente no intestino delgado). O aumento destes transportadores originaria maior absorção de cloreto de sódio no intestino delgado e no rim, que explicaria a hipertensão pela expansão do volume extracelular uma vez que pode ser prevenida pela remoção do NaCl da dieta [142]. Neste contexto, a hiperuricemia seria um epifenómeno, sem relação causal com o aumento da pressão arterial. Os uratos são transportados pelo SLC2A9, um transportador recentemente identificado no tubo renal proximal humano que também está envolvido no transporte facilitado de glicose e frutose [143]. Assim, as funções do SLC2A9 justificariam a presença de hiperuricemia em situações de consumo de frutose mais elevado pelo mesmo mecanismo que produziria o aumento da pressão arterial [144].

### ***A hipótese de uma base genética para explicar a associação entre a nefrolitíase e a HTA***

Alguns trabalhos sugeriram que a relação entre a hipertensão e a litíase renal apresentaria uma base genética. Essa hipótese seria suportada pelo facto de existir uma prevalência mais elevada HTA em alguns agregados familiares de doentes com nefrolitíase. Descreveram-se três fenótipos de doentes cujos agregados familiares apresentam maior prevalência de HTA: doentes com hipercalciúria [145], doentes com hiperuricosúria [146] e doentes com hipercalciúria e hiperuricosúria [89].

A simples existência de agrupamentos familiares com HTA e nefrolitíase não implicaria a existência de factores genéticos, pelo facto de frequentemente partilharem os mesmos hábitos dietéticos e condições ambientais, factores que influenciam a expressão de qualquer das duas doenças. Contudo, o facto do aumento da prevalência da HTA ser observada nos irmãos dos doentes com nefrolitíase, e não nos cônjuges ou restantes familiares, sugeriu a existência de uma base genética na associação entre a litíase renal e a HTA.

Aceita-se presentemente que factores genéticos podem estar envolvidos na etiopatogenia nefrolitíase, independentemente do desenvolvimento de HTA. No entanto, com excepção de algumas doenças raras, nomeadamente da hipercalciúria familiar [147], das hiperoxalúrias primárias [148] e dos raros casos de hiperuricosúria relacionados com as mutações do gene ZNF365 [68], não foram ainda identificadas alterações genéticas responsáveis por qualquer das múltiplas alterações urinárias identificadas como factores de risco para litíase renal idiopática. Por este motivo, se existir uma base hereditária para a nefrolitíase, a sua transmissão deveria ser efectuada de forma poligénica e ainda não é conhecida. Os trabalhos que procuraram identificar uma base genética para a associação entre a nefrolitíase e a HTA obtiveram resultados discordantes e diferentes conclusões ao longo do tempo. Tisler *et al.* [146] referiram que a probabilidade de existir uma história de HTA nos irmãos dos doentes com nefrolitíase e hiperuricosúria seria 3,8 vezes superior comparativamente com os doentes com litíase renal e excreção normal de ácido úrico (OR: 3,8; IC 95% 1,22 – 11,66). Neste estudo, a presença de hipertensão no agregado familiar não foi associada a nenhum outro factor de risco. Posteriormente, os mesmos autores publicaram outro estudo em que o fenótipo que caracterizava melhor o risco de HTA

familiar correspondia à nefrolitíase associada à presença simultânea de hiperuricosúria e hipercalcúria (OR: 3,4; IC 95% 1,97 – 5,91) e referiram que o fenótipo caracterizado por hiperuricosúria isolada não apresentava qualquer aumento de risco [89]. Num estudo mais recente, a presença de história de hipertensão arterial nos irmãos dos doentes com nefrolitíase foi associada ao fenótipo caracterizado por hipercalcúria isolada (OR: 2,9; IC 95% 1,4 – 6,2) [145].

#### **Dificuldades na interpretação das alterações metabólicas**

Os estudos existentes sobre a relação da nefrolitíase com a HTA basearam-se na comprovação epidemiológica e na pesquisa de eventuais alterações metabólicas envolvidas simultaneamente na etiopatogenia das duas doenças. No entanto, com excepção do IMC, que todos os estudos revelaram ser mais elevado nos doentes hipertensos com nefrolitíase, os resultados não identificaram, de forma conclusiva e reproduzível, alterações metabólicas para explicarem aquela associação.

Uma possível causa para a escassez de resultados na identificação de distúrbios metabólicos que expliquem a maior prevalência de HTA nos doentes com nefrolitíase deve-se às diferentes formas desta doença e à multiplicidade das alterações urinárias envolvidas na sua etiopatogenia, que por vezes não é considerada. Os trabalhos epidemiológicos de grande dimensão que mostraram o aumento da prevalência de HTA em doentes com nefrolitíase foram baseados em inquéritos e não mediram parâmetros biológicos. Num estudo clínico em que observaram aumento de risco de hipertensão em doentes com história prévia de nefrolitíase, o número de parâmetros urinários foi escasso e não elucidaram a composição dos cálculos formados [33]. Um estudo prospectivo onde observaram aumento da incidência de litíase renal em doentes hipertensos, foram referidos alguns parâmetros urinários mas foi pequeno o número de doentes que desenvolveram litíase renal e os critérios para a classificação do tipo de cálculos formados foram insuficientes. Neste estudo, os autores referiram que 19 de 132 doentes formaram novos cálculos e a sua maioria era constituída por cálcio ( $n = 12$ ) ou ácido úrico ( $n = 5$ ), mas a composição química só foi efectivamente analisada em 12 doentes e nos restantes utilizaram uma classificação baseada no critério da opacidade radiológica [31].



Nos doentes com nefrolitíase, a associação do aumento do IMC com o risco de HTA é relevante porque implica uma interpretação muito cautelosa de eventuais ligações entre os fenótipos urinários relacionados com a litíase renal com o risco de HTA, por os parâmetros urinários não serem independentes do peso nem do IMC. O estudo metabólico de 5.942 doentes com litíase renal revelou que a excreção urinária de cálcio, magnésio, citrato, sulfato, fosfato, oxalato, ácido úrico e cistina foi significativamente mais elevada nos doentes com obesidade acentuada ( $> 120$  kg no sexo masculino ou  $> 100$  kg no sexo feminino), em relação aos doentes não obesos ( $< 100$  Kg para os homens e  $< 85$  kg para o sexo feminino) [92]. Outra análise retrospectiva de 1.021 doentes com nefrolitíase, 83 dos quais eram obesos (IMC  $> 30$  Kg/m<sup>2</sup>), demonstrou uma distribuição diferente das alterações metabólicas identificadas nos doentes com e sem obesidade. No grupo dos obesos as percentagens de doentes com hipercalcúria, hiperuricosúria, hiperoxalúria e aumento da excreção urinária de sulfato foram significativamente mais elevadas do que no grupo dos não obesos [149]. Além das diferenças das alterações urinárias relacionados com a obesidade, é necessário considerar que os doentes com litíase e aumento do peso corporal podem apresentar alterações significativas dos parâmetros séricos, como elevações da glicemia, do ácido úrico sérico e da hormona paratormona intacta (PTHi) Powell *et al.* [92].

## **2.2 Prevalência de algumas doenças cardiovasculares na população com nefrolitíase**

Um estudo epidemiológico publicado em 1973 documentou um aumento da prevalência de cardiopatia isquémica em doentes litíase renal [150], não confirmado por outros autores [151]. Durante várias décadas não se realizaram trabalhos idênticos. Numa análise de 23.349 questionários a indivíduos com mais de 15 anos de idade que participaram no IV Inquérito Nacional de Saúde, realizado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e pelo Instituto Nacional de Estatística, observaram um aumento significativo da prevalência de algumas doenças crónicas associadas a maior risco de eventos cardiovasculares nos doentes com nefrolitíase em relação à população geral, incluindo HTA (50,4% vs. 28,6%;  $P < 0,001$ ), obesidade (22,7% vs. 16,9%;  $P < 0,001$ ), diabetes *Mellitus* (16,6% vs. 9,4%;  $P < 0,001$ ), enfarte

do miocárdio (3,3% vs. 1,8%;  $P < 0,001$ ) e acidentes cérebro-vasculares (3,8% vs. 2,1%;  $P < 0,001$ ) [152].

O estudo das doenças cardiovasculares na população Portuguesa com nefrolitíase revelou outros resultados interessantes: o primeiro destes resultados foi que a média das idades em que ocorreram os primeiros sintomas precedeu em vários anos os restantes diagnósticos. Esta diferença foi relevante, mesmo considerando que o início da diabetes tipo 2 pode preceder o seu diagnóstico em sete anos [153], e foi particularmente surpreendente devido à maioria dos doentes nunca ter efectuado qualquer tratamento da nefrolitíase, incluindo os tratamentos que têm sido associados a um aumento do risco de diabetes, nomeadamente os diuréticos tiazídicos [154] e a LEOC [40].

A associação da nefrolitíase com a HTA e a diabetes observou-se mesmo após o ajustamento dos resultados para a idade e IMC. A HTA e a diabetes justificaram o aumento da prevalência de enfartes do miocárdio no sexo masculino. No sexo feminino, a litíase renal foi um factor de risco independente para enfarte do miocárdio após ajustamento para a presença simultânea de HTA e diabetes [152].

Li *et al.* [155], num estudo prospectivo com seis anos de duração observaram uma elevada prevalência de cálculos renais em doentes normotensos que apresentaram acidentes vasculares cerebrais, mas a diferença não foi significativa após ajustamento para os restantes factores de risco. Os resultados do IV inquérito Nacional de Saúde Português confirmaram que a prevalência de acidentes cérebro-vasculares era mais elevada nos doentes com cálculos renais, e justificaram a associação com a maior prevalência de HTA e diabetes nos indivíduos com cálculos renais.

Os estudos conhecidos sugerem que a nefrolitíase seria uma doença sistémica, provavelmente reveladora de um ambiente metabólico adverso [156;157]. No entanto, não esclareceram o modo como os factores metabólicos contribuiriam para a patogénese da HTA e afectariam o risco cardiovascular nos doentes com litíase renal.

### **3. O Sistema Nervoso Autónomo: uma nova hipótese de trabalho**

Os dados referidos na literatura sobre o aumento do risco cardiovascular na litíase renal baseiam-se em estudos clínicos e epidemiológicos efectuados com o objectivo de identificar possíveis associações da HTA com a nefrolitíase. A maioria refere alterações bioquímicas.

O sistema nervoso autónomo apresenta várias funções integradoras, nomeadamente no metabolismo e na regulação da actividade do sistema cardiovascular. Estudos efectuados na população demonstraram alterações do SNA em doentes com hipertensão e em algumas doenças cardiovasculares. Em relação à HTA, a disfunção autonómica ocorre precocemente e pode mesmo preceder o reconhecimento clínico da doença. Foram observadas manifestações de disfunção autonómica em doentes com obesidade e outras situações clínicas acompanhadas de aumento de resistência à acção da insulina, frequentemente observadas em doentes com litíase renal. Estes factos admitem a existência de possíveis alterações do SNA em doentes com nefrolitíase e que permitiriam justificar o aumento de risco cardiovascular na população com litíase renal.

Consideramos três, os principais motivos para a hipótese de disfunção autonómica em doentes com nefrolitíase: o primeiro, a elevada prevalência de HTA observada neste grupo de doentes; o segundo, a associação de manifestações clínicas da litíase renal com situações de *stress* psicológico, documentada em alguns estudos; por último, a reduzida incidência de litíase observada em rins humanos transplantados, que constitui um argumento a favor de um eventual envolvimento da actividade nervosa na etiopatogenia da nefrolitíase por o transplante renal constituir um modelo clínico de deservação renal.

### **3.1 A hipertensão como manifestação de disfunção autonómica**

A influência do SNA no desenvolvimento e na manutenção da HTA foi amplamente demonstrada em diversos estudos. Nas fases iniciais de desenvolvimento da HTA, as manifestações cardíacas do aumento da actividade simpática (e diminuição da actividade vagal) incluem o aumento da frequência e do débito cardíaco. A hiperactividade simpática provoca vasoconstrição periférica. Os aumentos do débito cardíaco e da vasoconstrição periférica conduzem ao aumento da pressão arterial [158-160]. A manutenção da estimulação simpática conduz à intervenção de mecanismos renais, nomeadamente a retenção de sódio e água, que contribuem, numa fase mais avançada, para a manutenção da HTA [161]. Na fase de manutenção da HTA, a persistência da hiperactividade simpática promove a proliferação e hipertrofia das células musculares lisas, que promovem a remodelação das paredes vasculares e o aumento permanente da resistência vascular periférica que caracteriza as fases mais avançadas da doença hipertensiva [162;163].

Vários estudos demonstraram que doentes com nefrolitíase apresentavam aumento do IMC. Não são conhecidos estudos da actividade autonómica efectuados em doentes com nefrolitíase, mas foi documentado que os doentes com aumento do IMC apresentam maior actividade simpática. Montani *et al.* [164] referiram, numa revisão dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão associada à obesidade, o papel da hiperactividade simpática. Segundo estes autores, a leptina, os ácidos gordos livres e a insulina actuavam sinergicamente na estimulação do SNS potenciando os efeitos da disfunção endotelial existente na obesidade. Além dos efeitos directos sobre o sistema cardiovascular, o aumento da estimulação simpática e a insulina actuavam no túbulo renal aumentando a reabsorção tubular de sódio, induzindo um aumento maior da pressão arterial sistémica [116;164].

Nas últimas décadas, o conhecimento dos mecanismos de activação do sistema nervoso simpático pela alimentação foi desenvolvido através do estudo da hipertensão associada à obesidade. Sabe-se que muitos desses mecanismos também são válidos para o estudo da hiperactividade simpática em indivíduos não obesos [165].

A leptina, uma hormona produzida pelas células adiposas em resultado da expressão do gene *ob*, é considerada um dos factores responsáveis pelo aumento da pressão arterial na obesidade [166]. Esta hormona inibe o apetite e aumenta o consumo de

energia através da termogénese [167]. O aumento da temperatura corporal pela leptina é provocado pela estimulação do SNS. A administração de leptina nos ventrículos cerebrais em ratos Sprague-Dawley anestesiados demonstrou que a activação do SNS é originada no hipotálamo e sugere a mediação dos receptores da melanocortina [168]. Além do aumento do consumo energético, demonstrou-se experimentalmente que a sua infusão aumenta significativamente a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos [169].

Os animais com mutações dos genes que codificam os receptores para a leptina são resistentes à sua acção, produzem a hormona em quantidades superiores ao normal e desenvolvem obesidade [170]. Considine *et al.* [171] demonstraram que os níveis séricos de leptina são, em média, cerca de quatro vezes superiores em humanos obesos do que em indivíduos saudáveis com peso normal, existindo uma forte correlação positiva entre os níveis séricos de leptina e a percentagem de massa gorda ( $r = 0,85; p < 0,001$ ). Estes autores demonstraram ainda que o conteúdo em ARNm *ob* das células adiposas dos indivíduos obesos é aproximadamente o dobro do observado em controlos não obesos [171]. O aumento da actividade simpática provocado pela leptina deve-se ao facto dos centros nervosos que controlam a actividade do SNS continuarem a ser estimulados, apesar da diminuição da sensibilidade aos efeitos metabólicos da hormona nos indivíduos obesos [172].

As alterações dos lípidos circulantes, principalmente o aumento dos ácidos gordos livres, constituem outra causa potencial para o aumento da actividade simpática na obesidade [173]. Esta hipótese é apoiada pela demonstração de aumentos significativos do fluxo de sangue no antebraço de indivíduos obesos, comparativamente com controlos de peso normal, em repouso e como resposta à administração regional de fentolamina [174]. Demonstrou-se que o aumento regional de ácidos gordos livres no antebraço de indivíduos normotensos provocado pela administração intravenosa de *Intralipid* e heparina (esta última administrada para activar a lipase das lipoproteínas) reduzia a dose de fenilnefrina necessária para obtenção de um efeito venoconstritor máximo [175]. Um trabalho experimental realizado em indivíduos normotensos demonstrou que o aumento dos níveis séricos de ácidos gordos não esterificados e de triglicéridos, provocado pela administração de *Intralipid* e de heparina, potenciava o aumento da pressão arterial como resposta à infusão intravenosa de fenilnefrina [176]. Este resultado sugeriu a hipótese duma

maior reactividade vascular provocada por alterações lipídicas mediada pela estimulação dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ .

A associação dos ácidos gordos livres com a HTA relacionada com a obesidade conduziria a um ciclo vicioso porque o aumento da actividade simpática resultante da estimulação  $\beta$ -adrenérgica estimula a lipólise e a produção de ácidos gordos livres [177;178]. Se estes estimularem directamente a actividade simpática, contribuiriam para a manutenção da HTA nos doentes obesos.

A influência da insulina na actividade do SNA encontra-se bem documentada: a ingestão calórica aumenta a produção de insulina e estimula a actividade simpática [165]. O aumento da actividade simpática referido em condições fisiopatológicas caracterizadas por aumento da resistência à insulina e hiperinsulinismo, incluindo a obesidade, a síndrome metabólica e a diabetes *Mellitus* tipo 2, parece determinar o aumento da actividade do SNS [179]. No entanto, o mecanismo pelo qual a insulina estimula a actividade simpática não está ainda esclarecido. Alguns estudos sugeriram que este aumento seria consequência da acção directa da insulina nos centros hipotalâmicos do sistema nervoso central [180-182], mas a hipótese da estimulação directa do SNS pela insulina permanece controversa [159;183]. Hausberg *et al.* [184] demonstraram que a insulina apresenta uma acção vasodilatadora directa, mais evidente em jovens saudáveis do que em indivíduos de idade mais avançada [185]. O aumento da actividade simpática observa-se simultaneamente com o efeito vasodilatador, não sendo possível afirmar se é um reflexo provocado pela vasodilatação ou uma consequência dos efeitos directos da insulina sobre os centros nervosos [185]. Para dificultar a compreensão deste fenómeno, questionou-se a possibilidade do aumento da frequência cardíaca provocado pela administração de insulina ser consequência de diminuição regional do tónus vagal, em virtude da diminuição do intervalo RR provocada pela insulina não desaparecer com a administração de propanolol [186].

Em condições fisiológicas existe uma relação directa entre a produção de insulina e a actividade simpática. No entanto, em condições fisiopatológicas, a hiperactividade simpática pode determinar uma diminuição da sensibilidade à insulina. Este efeito foi demonstrado no Homem, no qual a administração de adrenalina aumentou a resistência periférica à insulina por activação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos [187]. A influência do aumento da actividade simpática na patogénese da resistência à acção

periférica à insulina foi demonstrada em trabalhos que observaram um aumento da sensibilidade à insulina após a inibição da libertação de catecolaminas e inibição dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. A clonidina, um hipotensor de acção central que inibe a libertação de catecolaminas nas terminações simpáticas periféricas, quando administrada em cães preveniu o aparecimento de resistência à acção periférica da insulina [188]. Em estudos humanos controlados, verificou-se que a administração transdérmica de clonidina aumentava a sensibilidade periférica à insulina em doentes com diabetes *Mellitus* tipo 2 [189] e que existia um aumento da sensibilidade à insulina após administração de carvedilol, um agente  $\beta$ -bloqueante de terceira geração [190;191].

### **3.2 A nefrolitíase como indício de disfunção autonómica?**

O aumento do IMC poderia justificar a hiperactividade simpática e a maior prevalência de HTA no subgrupo de doentes com nefrolitíase e obesidade mas, neste caso, a disfunção autonómica seria um simples epifenómeno da obesidade. No entanto, muitos doentes que formam cálculos renais não são obesos e desenvolvem HTA, e o aumento do risco cardiovascular na população com litíase renal não era totalmente explicado pela presença de obesidade [152]. Existem dois argumentos que sugerem um envolvimento mais abrangente do SNA na litíase renal, e, eventualmente, na sua patogénese: 1) a associação da nefrolitíase com situações de hiperactividade simpática, nomeadamente a ansiedade e o *stress* psicológico prolongado; 2) a reduzida incidência de cálculos renais em doentes receptores de transplante renal.

#### **A nefrolitíase associada ao *stress***

A associação de episódios sintomáticos de litíase renal com estados de ansiedade e situações de *stress* psicológico foi referida em diversos estudos clínicos controlados [192-194] e constitui um argumento favorável ao envolvimento autonómico na etiopatogenia da nefrolitíase. Najem *et al.* [192] observaram um aumento do risco de litíase renal após situações de *stress* psicológico prolongado. Estes autores verificaram que o risco de formação de cálculos renais era significativamente maior quando existiam acontecimentos prejudiciais ao rendimento familiar e/ou acontecimentos traumáticos emocionais, tais como divórcios, morte de familiares ou preocupações com a saúde.

É do conhecimento geral a influência do *stress* na actividade simpática eferente e que as situações que provocam *stress* e ansiedade induzem um aumento da actividade do SNS [195], como foi demonstrado no efeito da ‘bata branca’ em indivíduos com HTA ligeira: quando a TA era medida por médicos com quem os doentes não estavam familiarizados verificou-se um aumento significativo da actividade adrenérgica e consequente aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, em comparação aos valores basais dos mesmos indivíduos (obtidos antes da presença do médico), que se mantiveram elevados durante alguns minutos após a saída da “bata branca” da sala [196]. O registo simultâneo da actividade nervosa medida na pele confirmou o aumento da actividade simpática eferente, que também foi relacionado com a presença do médico na sala, tendo a actividade simpática diminuído quase instantaneamente após a sua saída [196].

O aumento da actividade simpática eferente em consequência do *stress* foi comprovado em jovens normotensos com antecedentes familiares de hipertensão que apresentaram respostas vasoconstritoras mais intensas nos testes pressores de função autonómica (teste do frio, exercício isométrico e teste de aritmética mental) e maior probabilidade de desenvolver HTA em termos prospectivos [162].

Os mecanismos fisiopatológicos que relacionam a exposição prolongada ao *stress* com o aumento da actividade litogénica não estão esclarecidos. É do conhecimento geral que o aumento da concentração urinária de uratos é um factor importante na supersaturação urinária em sais litogénicos. Sumi *et al.* [197] demonstraram que a estimulação simpática com catecolaminas interfere com a produção endógena de ácido úrico, aumentando a sua produção e provocando hiperuricemia em modelo experimental de rato. Alguns autores observaram que a exposição prolongada ao *stress* provocado por estímulos sensoriais repetitivos aumentava significativamente a concentração urinária de ácido úrico [198].

### **A reduzida incidência de nefrolitíase nos rins transplantados**

Outro argumento importante a favor dum eventual papel do SNA na etiopatogenia da nefrolitíase seria a reduzida incidência de cálculos renais nos doentes receptores de transplantes renais em comparação com a população em geral.

O transplante renal constitui um modelo paradigmático de deservação clínica, no qual existe exclusão do controlo directo do SNA na função renal. Os trabalhos existentes mostraram que a incidência de nefrolitíase é muito reduzida nos receptores



de transplantes renais [199]. A incidência de litíase renal não excedeu 1% dos transplantes numa série de 2085 doentes transplantados nos Hospitais londrinos de Guy's e St Thomas entre 1877 e 2003 [200]. Em 42.096 receptores de transplante renal incluídos no USA Renal Data System, observou-se que a incidência anual de internamentos por nefrolitíase foi muito reduzida, cerca de 0,11% nos homens e de 0,15% nas mulheres [201]. Além disso, nem todos os cálculos identificados nos receptores de transplantes renais corresponderiam a cálculos formados *de novo*. Observou-se que parte dos cálculos renais identificados nos doentes transplantados correspondia a cálculos formados pelos dadores e que foram inadvertidamente transplantados com os enxertos [202]. Um estudo realizado pelo Departamento de Urologia da Universidade de Viena demonstrou que 47% dos cálculos renais identificados em doentes com transplante renal seriam provenientes do dador [203].

Um aspecto que caracteriza a nefrolitíase pós transplante é a elevada percentagem de causas secundárias para o seu desenvolvimento, tais como complicações infecciosas recorrentes, obstrução [200], alterações metabólicas relacionadas com o hiperparatiroidismo terciário, hipercalcúria e hipocitraturia [204]. A frequência destas alterações contribuiria para que o tipo de cálculos identificados no período pós-transplante fosse diferente da população em geral, apresentando uma elevada percentagem de cálculos compostos por fosfato de cálcio, incluindo a estruvite [204]. Seria expectável que a existência de novos factores de risco para litíase conduzisse a aumento da incidência de nefrolitíase após o transplante, uma vez que as alterações relacionadas com a transplantação se adicionariam aos factores de risco existentes na população geral. O facto de a incidência de cálculos renais não aumentar sugere que a influência dos factores de risco para litíase renal identificados nos rins nativos diminui nos enxertos renais.

Os motivos para a diminuição da incidência de nefrolitíase nos enxertos renais não se encontram ainda esclarecidos. Com excepção da deservação, consequência da própria técnica cirúrgica, não se demonstraram quaisquer características que diferenciasses os rins transplantados dos rins nativos para justificar a diminuição do risco litogénico. Existirão motivos para que a diminuição da actividade nervosa no rim dificulte a formação de cálculos?

### **Modulação autonómica na função renal**

Como é do conhecimento geral, o rim é um órgão importante na homeostase do meio interno e diversos aspectos da função renal são controlados directamente pelo SNA. O controlo autonómico do rim é efectuado fundamentalmente pela actividade simpática eferente [205]. Estudos electrofisiológicos efectuados com estimulação directa do nervo renal e/ou com aumento reflexo da actividade do SNS mostraram que o controlo simpático da função renal depende directamente da frequência dos estímulos do nervo renal. DiBonna [206] descreveu três níveis de regulação simpática da função renal: 1) no primeiro nível observava-se com frequências  $<0,5$  Hz e permitia controlar a produção de renina pelo aparelho justa-glomerular; 2) o nível seguinte de activação verificava-se com frequências de estímulos próximas de 1 Hz e, nesta gama de frequências, além da produção de renina, aumentava a reabsorção tubular de água e solutos; 3) no último nível de activação, com valores entre 1 e 2,5 Hz, existia estimulação dos receptores  $\alpha_1$  das células musculares lisas da parede das principais artérias intra-renais por acção da noradrenalina, que determinava vasoconstrição renal [205;207].

A influência autonómica no processo da litogénese poderia depender do controlo simpático da função do túbulo renal que ocorreria com a estimulação nervosa nas frequências  $\sim 1$  Hz. Com esta gama de frequências, o efeito da actividade nervosa sobre a função renal dependeria dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos existentes nas células epiteliais, principalmente dos receptores  $\alpha_{1B}$  das células do tubo contornado proximal e dos receptores  $\alpha_2$  das células epiteliais do tubo contornado distal, ramo ascendente da ansa de Henle e tubo colector medular. O aumento do estímulo simpático no tubo proximal originaria maior reabsorção de água e vários solutos, incluindo o sódio, cloro e bicarbonato, fosfato, glicose e ácido úrico [208;209].

Alguns autores também observaram que o aumento da estimulação simpática intensificava a reabsorção de água, sódio, potássio e bicarbonato nos segmentos mais distais do tubo renal mas o tipo de receptores adrenérgicos que mediará a actividade simpática nas células epiteliais deste segmento do tubo não se encontra inteiramente esclarecido [206;210].

Na hiperactividade simpática observa-se uma deslocação da curva pressão/natriurese para a direita, o que implica que o controlo da excreção de sódio e água seriam mantidos em valores mais elevados de pressão arterial, ou seja, continuaria a existir retenção de água e sódio apesar dos valores mais elevados de pressão arterial [211].

Observou-se que a deservação renal diminuía a reabsorção tubular de água e solutos a curto [208] e a longo prazo [212], e que a deservação retardava o desenvolvimento de hipertensão [213].

Em resumo, relativamente ao risco para nefrolitíase somos de opinião que, hipoteticamente o aumento da actividade simpática renal eferente poderia influenciar o processo litogénico, por diminuir a diurese e aumentar a reabsorção tubular de bicarbonato. O aumento da reabsorção de bicarbonato contribuiria para reduzir o pH da urina. Tanto a redução da diurese como o pH ácido contribuiriam para aumentar a supersaturação urinária em sais de cálcio e em ácido úrico, precisamente os dois tipos de cálculos mais frequentes na população em geral.



## 4. Metodologia

Neste capítulo descrevemos o material e métodos utilizados na elaboração desta dissertação de doutoramento. Por comodidade, dividimos este capítulo em duas partes. Na primeira descrevemos a metodologia utilizada no estudo clínico e na última a utilizada nas experiências em animais. Assim:

### 4.1 Metodologia do estudo clínico

#### 4.1.1 Doentes e métodos

A actividade eferente do SNA foi estudada em doentes com litíase renal recorrente, com o auxílio de cinco testes padronizados baseados na análise da variabilidade da FC e da PAS em resposta a vários estímulos autonómicos. Os testes foram efectuados de forma padronizada e não invasiva, em ambiente laboratorial.

#### Seleção dos participantes

Estudámos 60 indivíduos de ambos os sexos, 30 controlos e 30 doentes com antecedentes documentados de litíase renal idiopática recorrente recrutados em consultas da especialidade de Nefrologia. Os critérios para estudo foram os seguintes:

- i. Antecedentes pessoais de nefrolitíase, manifestados por dois ou mais episódios sintomáticos caracterizados por cólica renal, hematúria macroscópica e/ou emissão de cálculos urinários, associados a identificação de cálculos renais em pelo menos um dos exames imagiológicos utilizados (ecografia renal, radiografia simples do abdómen ou tomografia axial computadorizada);
- ii. Idade compreendida entre os 18 e os 70 anos, inclusive;
- iii. Função renal preservada, definida por *clearance* da creatinina  $\geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, segundo as recomendações da *National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification* [214], calculada pela fórmula de Cockcroft e Gault [215]:

$$Clearance_{Cr} = \frac{(140 - Idade \times Peso)}{72 \times S_{Cr}} (\times 0,85 \text{ se sexo feminino})$$

- iv. Ausência de causas prováveis de nefrolitíase secundária, nomeadamente litíase infecciosa, nefrocalcinose, acidose tubular renal, rim esponjoso medular, litíase associada a síndrome de má-absorção intestinal, sarcoidose, neoplasia e cálculos renais de origem medicamentosa.
- v. Participação voluntária no estudo.

Os doentes que cumpriram estes critérios foram incluídos no estudo sem selecção prévia, independentemente do tipo de cálculos formados, forma de apresentação da doença ou factores de risco para litíase urinária anteriormente documentados. Não efectuámos selecção baseada na presença ou ausência de antecedentes de HTA. Esta característica foi registada de forma a permitir uma ulterior análise dos resultados baseada na presença ou ausência de vários factores independentes.

O grupo de controlo foi constituído por 30 voluntários saudáveis de ambos os sexos e da mesma idade.

#### **Recolha de dados**

No dia dos testes autonómicos os doentes compareciam de manhã no Instituto de Fisiologia da FML. Antes das provas, realizámos uma entrevista com a duração de 15 – 30 minutos para explicar em que consistia a sua realização e para obtenção do consentimento informado. Nesta entrevista registámos os seguintes elementos:

- i. Dados demográficos: data de nascimento, idade e sexo;
- ii. Comorbilidades existentes. Inquirimos os doentes especificamente sobre antecedentes de diabetes *Mellitus*, HTA, insuficiência cardíaca, doença hepática crónica, alterações da função tiroideia e epilepsia;
- iii. Pesquisámos sistematicamente a terapêutica em curso, nomeadamente a utilização de medicamentos hipotensores, antiarrítmicos, antidepressivos, ansiolíticos, antiparkinsónicos e diuréticos;
- iv. Dados relativos à história da doença renal, incluindo: idade em que ocorreram os primeiros sintomas de litíase, número e o intervalo de tempo médio entre episódios sintomáticos, métodos utilizados no tratamento da litíase, eventuais complicações e existência de antecedentes familiares de nefrolitíase.
- v. Dados antropométricos: medimos o peso e altura e calculámos o IMC utilizando a fórmula:

$$IMC_{(Kg/m^2)} = \frac{Peso_{(Kg)}}{(Altura_{(m)})^2}$$

Não realizámos colheitas de sangue ou urina nesta investigação. Os parâmetros bioquímicos registados corresponderam aos resultados que constavam nos processos clínicos e foram fornecidos pelos respectivos médicos. A classificação dos fenótipos urinários baseou-se em pelo menos duas amostras de sangue e de urina das 24 horas colhidas em condições basais, após um intervalo de pelo menos oito semanas sem episódios sintomáticos ou intervenções urológicas e na ausência de terapêutica que alterasse os resultados laboratoriais.

#### **Definições utilizadas na identificação de factores independentes**

No grupo de doentes, a comparação dos resultados dos testes de função autonómica foi efectuada entre subgrupos de casos baseados na presença ou ausência dos seguintes factores independentes: 1) hipertensão arterial, definida de acordo com os critérios elaborados pelo JNC VII [20]; 2) obesidade, definida de acordo com os critérios da OMS como  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$  [216]; 3) hipercalciúria, definida como doseamento de cálcio urinário  $> 300 \text{ mg/dia}$  em indivíduos do sexo masculino,  $> 250 \text{ mg/dia}$  em indivíduos do sexo feminino ou  $> 4 \text{ mg/kg/dia}$  independentemente do sexo; 4) hiperuricosúria, definida como excreção urinária de ácido úrico  $> 800 \text{ mg/dia}$  em indivíduos do sexo masculino ou  $> 700 \text{ mg/dia}$  em indivíduos do sexo feminino; 5) antecedentes de complicações graves de nefrolitíase; 6) realização prévia de intervenções ou manipulações urológicas; 7) antecedentes familiares de nefrolitíase (existência de pelo menos um episódio de litíase renal em irmãos ou em duas gerações de antecedentes em 1º grau).

Considerámos como complicações graves da litíase renal a necessidade de internamento hospitalar, a obstrução urinária prolongada com necessidade de intervenção urológica para desobstrução, a presença de complicações infecciosas graves (pionefrose), a documentação de alteração transitória da função renal, com aumento da creatinina sérica duas vezes superior ao valor basal do mesmo doente ou necessidade temporária de hemodiálise e a necessidade de nefrectomia por complicações resultantes da litíase renal. Considerámos intervenções urológicas a realização de intervenções cirúrgicas (convencionais e/ou endoscópicas) para remoção de cálculos existentes no aparelho urinário, a realização de sessões de LEOC ou a colocação de dispositivos ureterais (cateteres e/ou *stents*) para desobstrução urinária.

Pesquisámos outras alterações urinárias associadas a aumento do risco de desenvolvimento de nefrolitíase, como a presença de hiperoxalúria ( $> 0,50 \text{ mmol/dia}$

no sexo masculino ou  $> 0,45$  mmol/dia no sexo feminino), a hipocitratúria ( $< 1,6$  mmol/dia), a hipomagnesiúria ( $< 60$  mg/dia) e o baixo volume de urina ( $< 1200$  ml/dia). No entanto, o número de casos com estas alterações foi insuficiente para a análise estatística pelo que a descrição da sua distribuição foi efectuada com o objectivo de ajudar a caracterizar a população estudada.

### **Características do grupo de doentes**

#### *Características gerais*

Estudámos 30 doentes com nefrolitíase recorrente (17 homens e 13 mulheres) com uma média de idades de 45,6 anos (20 – 63) e 30 controlos saudáveis (13 homens e 17 mulheres) com uma média de idades de 42,0 anos (21 – 66).

À data do estudo todos os doentes tinham cálculos renais identificados em pelo menos um dos exames de imagem (ecografia renal, radiografia simples do abdómen ou TAC).

#### *Alterações metabólicas e factores de risco para litíase renal*

Nos doentes estudados, a função renal estava preservada com valores de *clearance* da creatinina calculada pela fórmula de Cockcroft e Gault  $113,2 \pm 34,8$  ml/min.

A litíase cálcica representava a forma mais comum nos casos estudados e foi diagnosticada em 17 doentes (oxalato de cálcio em 14 casos e fosfato de cálcio em 3), apresentando 5 casos litíase úrica. Não foi possível identificar a composição química dos cálculos em 8 doentes (26,7%).

O estudo metabólico identificou alterações relacionadas com o metabolismo do cálcio e/ou do ácido úrico em 23 dos 30 doentes com nefrolitíase: no total, 17 indivíduos (56,7%) apresentavam hiperuricosúria e 13 (43,3%) apresentavam hipercalcúria. O fenótipo ‘hiperuricosúria isolada’ foi identificado em 10 doentes (33,3%) e o fenótipo ‘hipercalcúria isolada’ em 6 (20%). No entanto, 7 doentes (23,3%) apresentavam o fenótipo caracterizado pela presença simultânea de hiperuricosúria e hipercalcúria. Diagnosticaram-se ainda as seguintes alterações: hipocitratúria em 11 doentes, hiperoxalúria em 9, hipomagnesiúria em 4 e baixo volume de urina em 4.

Considerámos neste estudo como hiperuricémicos 14 doentes (46,7%) que tinham ácido úrico sérico  $> 5,5$  mg/dl. A mediana dos valores séricos de ácido úrico no grupo de doentes com nefrolitíase era 5,4 mg/dl. Não observámos associação entre a



presença de hiperuricémia e de hiperuricosúria pelo que as duas alterações bioquímicas foram consideradas separadamente na análise dos testes autonómicos.

### ***Tratamentos efectuados***

Dezasseis doentes (53,3%) faziam tratamento médico para prevenção da nefrolitíase e nunca se submeteram a intervenções urológicas; 10 (33,3%), além do tratamento preventivo apresentaram antecedentes de intervenções urológicas e um doente foi submetido a uma intervenção urológica sem tratamento preventivo. Nove dos 11 doentes submetidos a intervenções urológicas foram tratados com LEOC. Três doentes (10%) foram tratados exclusivamente com medicação sintomática durante os episódios de cólica renal.

### ***Comorbilidades***

De acordo com os critérios definidos pelo JNC VII, treze doentes (43,3%) tinham critérios para o diagnóstico de HTA: quatro apresentavam HTA no estadio 1 e nove no estadio 2 (com medicação hipotensora). À data do estudo autonómico, todos os doentes apresentavam pressão arterial controlada.

Existiam três doentes com diabetes *Mellitus* tipo 2 sem insulinoaterapia. Oito doentes (26,7%) tinham excesso de peso ( $25 < \text{IMC} \leq 30 \text{ Kg/m}^2$ ) e 12 (40%) apresentavam obesidade ( $\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$ ). Nenhum doente apresentava antecedentes de epilepsia, alterações da função tiroideia, doença hepática crónica ou insuficiência cardíaca.

Nenhum doente apresentava alterações prévias do electrocardiograma.

### ***História medicamentosa***

Sempre que possível, e com o acordo dos médicos assistentes, toda a medicação passível de ser interrompida sem risco foi suspensa pelo menos uma semana antes da realização das provas autonómicas para permitir a eliminação do seu efeito. À data da realização dos testes nenhum doente tomava  $\beta$ -bloqueantes, antiparkinsónicos, antidepressivos ou terapêutica de hiper ou hipotiroidismo. No entanto, alguns doentes hipertensos mantiveram alguns hipotensores por segurança clínica. Os doentes medicados cronicamente com ansiolíticos mantiveram a terapêutica para não introduzir factores de *stress* adicionais. A medicação crónica e os medicamentos permitidos na semana que precedeu o estudo autonómico estão descritos no Quadro I.

**Quadro I** – Medicação crónica e medicamentos mantidos na semana que antecedeu o estudo autónomico

<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Medicamentos crónicos</b>	<b>Doentes (n)</b>	<b>Mantidos <sup>a)</sup> (n)</b>	
<b>Alcalinizantes urinários</b>				
	Citrato de potássio	7	7	
	Bicarbonato de sódio	1	1	
<b>Inibidores da xantina-oxidase</b>				
	Alopurinol	7	7	
<b>Antidiabéticos orais</b>				
	Metformina	2	2	
<b>Anti-hipertensores</b>				
• <i>IECA's</i>	Enalapril, Coversil, Ramipril	3	1	
• <i>Inibidores angiotensina II</i>	Valsaltran, Losartan	5	3	
• <i>β-bloqueantes</i>	Atenolol, Bisoprolol, Carvedilol, Metoprolol, Acebutolol	5	0	
• <i>Diuréticos</i>	Tiazidas <sup>b)</sup>	9	0	
	Furosemida	1	0	
<b>Hipolipemiantes</b>				
<b>Estatinas</b>		Simvastatina, Pravastatina	7	6
• <b>Fibratos</b>	Gemfibrozil	1	1	
<b>Ouros</b>				
• <i>Benzodiazepinas</i>	Diazepam, Bromazepam, Alprazolam	3	0	
• <i>Sais de Magnésio</i>	Várias associações	6	3	
• <i>Anti-histaminicos</i>	Cetirizina	1	1	
• <i>Inibidores bomba protões</i>	Omeprazol	2	2	

a) Doentes que continuaram a medicação nos 7 dias que precederam a avaliação autónomica por decisão clínica; b) prescritos em alguns doentes normotensos para tratamento da nefrolitíase.

Sete doentes (23% dos casos) apresentaram complicações da litíase renal: cinco com episódios prolongados de obstrução urinária e dois com insuficiência renal aguda e necessidade temporária de hemodiálise. Nestes dois casos documentou-se a recuperação completa da insuficiência renal após alívio da obstrução. Outros dois doentes foram submetidos a nefrectomia unilateral por complicações da nefrolitíase.

#### **4.1.2 Protocolo experimental**

O estudo da função autonómica foi realizado no laboratório do Instituto de Fisiologia da FML, em ambiente calmo, com temperatura e humidade controladas. Efectuámos os testes no período da manhã, após o pequeno-almoço. Solicitámos aos doentes que na véspera evitassem o consumo de tabaco, café e xantinas, e que no dia do exame tomassem um pequeno-almoço ligeiro sem toma de café.

Na adaptação às condições ambientais, após a colocação dos eléctrodos e antes do início dos testes, os doentes cumpriram um período de repouso de 15 minutos em decúbito dorsal. Os exames foram efectuados por um técnico treinado para a sua realização e na presença de um médico.

Utilizámos um sistema Task Force® Monitor (CNSystems Medizintechnik AG, Austria) para efectuar os registos contínuos do electrocardiograma (ECG) e da pressão arterial (PA) de forma não invasiva, utilizando um sistema de medição digital (*Finapres*) colocado nos dedos da mão esquerda, a qual foi mantida numa posição fixa ao nível do coração com o auxílio de uma braçadeira adequada. Os valores da PA contínua foram calibrados colocando a braçadeira dum esfigmomanómetro ao nível da artéria braquial direita. As calibrações da PA foram efectuadas imediatamente antes do início dos testes, a intervalos de tempo regulares durante a realização dos mesmos e quando o técnico considerava necessário. Os resultados destas medições foram automaticamente utilizados pelo sistema para calibração da PA contínua.

A aquisição de dados foi efectuada a 1 KHz, utilizando o software fornecido com o Task Force® Monitor.

#### **Provas incluídas no protocolo**

Foram incluídos no protocolo de investigação as seguintes provas: ortostatismo passivo, prova da respiração profunda compassada, manobra de Valsalva, prova de *handgrip* e prova de aritmética mental. Assim:

***Prova de ortostatismo passivo (head-up tilt test):*** Utilizámos este teste para avaliar a actividade do SNA em resposta aos estímulos baroreceptores. Preferimos o teste de *tilt* em relação ao teste de ortostatismo activo por provocar menor desconforto e apresentar maior segurança para os doentes e fornecer informações semelhantes sobre o estado do SNA [217].

A prova de ortostatismo passivo incluiu um período de registo com cinco minutos de duração efectuado em decúbito dorsal (Basal). Após este período, inclinámos gradualmente a mesa de *tilt* até 70° e mantivemos nesta posição durante cinco minutos. Considerámos 60 segundos iniciais para adaptação ao ortostatismo (TUa) e 4 minutos de manutenção em *tilt* (TU). Após este período, reposicionámos a mesa de *tilt* na posição horizontal. As manobras de elevação (TUs) e de descida (TUd) foram efectuadas a velocidade constante controlada por um sistema eléctrico (*Electric tilt table model 900-00*, CNSystems Medizintechnik AG, Austria) e duraram 15 segundos. Assinalámos cada uma das fases da prova de ortostatismo passivo no registo informático para posterior identificação e análise.

***Prova de respiração profunda compassada:*** Avaliámos a influência da actividade vagal no controlo da frequência cardíaca com o auxílio da prova de respiração profunda compassada. Imediatamente antes de iniciar a respiração profunda, efectuámos um novo registo basal com um minuto de duração, em posição sentada (Basal). Em seguida, instruímos os indivíduos para respirar profundamente, a uma cadência aproximada de seis ciclos por minuto (~10 segundos por cada ciclo respiratório), com a velocidade de inspiração e expiração comandadas por orientações verbais do técnico que acompanhava a prova. A duração total desta fase foi de um minuto.

***Manobra de Valsalva:*** A manobra de Valsalva consiste num esforço expiratório mantido com a glote fechada, o que desencadeia uma sequência característica de alterações na FC e na PA [218]. Na realização desta prova, instruímos os participantes para efectuar uma inspiração seguida de uma expiração forçada com 15 segundos de duração contra uma resistência constante. A resistência foi mantida pedindo aos participantes para soprarem para um bocal conectado a um esfigmomanómetro de mercúrio, de forma a manter uma pressão expiratória constante de ~40 mmHg. Para que a manutenção da expiração fosse constante, construímos no bucal uma pequena fuga de ar.

Considerámos três períodos distintos de registo: 1) registo basal, efectuado imediatamente antes da manobra de Valsalva e com a duração de 60 segundos; 2) Valsalva, correspondente aos 15 segundos em expiração; 3) período pós-Valsalva, os trinta segundos seguintes ao final do esforço expiratório.

***Prova de preensão manual (handgrip):*** Avaliámos com esta prova a actividade autonómica eferente resultante da integração central dos estímulos aferentes musculares e que resultam em aumentos da FC e da PA durante o exercício isométrico [217].

Instruímos os participantes para manterem um esforço constante de preensão manual durante um período de 5 minutos. Este consistia em apertar a manga de um esfigmomanómetro (com a válvula da pêra de borracha fechada) de forma a manter a coluna de mercúrio num valor aproximadamente constante que correspondia a 1/3 do valor observado em cada indivíduo quando pedido o aperto da manga com a força máxima, antes do início do teste.

Considerámos nesta prova dois períodos de registo: 1) registo basal, com a duração de dois minutos, efectuado imediatamente antes do início da manobra de preensão manual; 2) período de *handgrip* com a duração total de cinco minutos, correspondente a todo o período de esforço isométrico.

***Prova de aritmética mental:*** Utilizámos a prova de aritmética mental para avaliar as modificações da actividade autonómica em resposta ao *stress* mental, que normalmente resultam no aumento da FC [219;220].

Neste estudo, desencadeámos o *stress* mental com o pedido de realização de uma sucessão rápida de operações aritméticas, que consistiam na subtracção mental do valor 7 a uma série de valores mencionados pelo técnico que acompanhava a prova. O período de *stress* mental durou, no total, um minuto. Avaliámos dois períodos de registo: 1) registo basal, correspondente aos dois minutos que precediam o início da realização das contas; 2) um registo correspondente aos 60 segundos da duração dos cálculos mentais.

#### **4.1.3 Metodologia de análise dos resultados**

Após visualização das curvas da FC (tacograma) e da PA para identificação dos vários períodos de cada teste e de eventuais artefactos, seleccionámos os períodos para a recolha de dados. Os parâmetros estudados foram obtidos directamente das fichas de texto (fichas TXT) produzidos pelo software do TaskForce® Monitor.

A análise dos resultados dos testes autonómicos foi efectuada no domínio do tempo e no domínio do tempo-frequência. Assim:

### **Análises no domínio do tempo**

Em cada teste, na análise no domínio do tempo avaliámos as variações da FC e da PA em relação ao respectivo período basal. O conjunto dos testes foi avaliado de acordo com uma adaptação do protocolo de Ewing. Para efeitos da atribuição de uma pontuação no protocolo de Ewing, cada prova foi classificada como normal, duvidosa (*borderline*) ou anormal, com atribuição da pontuação de 0, 1 ou 2, respectivamente, o que no conjunto da totalidade dos testes variava a pontuação de cada indivíduo entre 0 e 10.

Para cada teste, calculámos os seguintes parâmetros:

- i. Na prova de *tilt*, a diferença entre os valores médios da FC, PAS e PAD em decúbito e valores máximos durante o período de ortostatismo passivo, excluindo os 15 segundos de subida;
- ii. Na prova da respiração profunda compassada, a diferença entre a frequência cardíaca máxima durante a inspiração (I) e a frequência cardíaca mínima durante a expiração (E). Considerámos a média de seis ciclos respiratórios (R6);
- iii. Na manobra de Valsalva, calculámos a razão entre a FC máxima, observada durante o período de Valsalva, e a FC mínima observada nos 30 segundos do período pós-Valsalva (rácio de Valsalva - VR);
- iv. Na manobra de *handgrip* calculámos a diferença média entre a PAD registada durante o registo basal e a PAD máxima durante a manobra de *handgrip*;
- v. Na prova de aritmética mental observámos as diferenças entre as médias da FC e PA sistólica (PAS) registadas durante o registo basal e os valores máximos da FC e da PAS medidos durante o *stress* mental.

Efectuámos adaptações ao protocolo de Ewing de forma a identificar alterações sugestivas de aumento da actividade simpática, devido a este protocolo original estar orientado preferencialmente para a identificação de manifestações de hipofunção simpática e/ou parassimpática [221].

No teste de *tilt*, definimos como taquicardia postural um aumento da FC  $> 25$  bpm em relação ao valor em decúbito ou um valor da FC  $> 120$  bpm durante o ortostatismo (com o pressuposto de que a FC em decúbito era  $< 100$  bpm). Definimos como hipertensão ortostática um aumento da PAS  $\geq 20$  mmHg em comparação com o

registo basal, ou um aumento da PA diastólica (PAD)  $> 10$  mmHg, desde que a PAD em decúbito fosse  $< 90$  mmHg e aumentasse para valores  $\geq 90$  mmHg durante o ortostatismo.

Os limites normais do R6 e do VR foram os referidos na literatura, ajustados ao grupo etário [222].

Na ausência de critérios de consenso na avaliação das respostas nas provas de *handgrip* e de aritmética mental, utilizámos os valores de referência publicados na literatura internacional, ajustados para a idade [222], aos quais adicionámos um valor de 10% do valor máximo para acomodar possíveis diferenças populacionais.

### **Análises no domínio do tempo-frequência**

A variabilidade da FC e da PAS foi analisada no domínio do tempo-frequência utilizando a transformada discreta de *wavelets*. Adicionalmente, os resultados foram analisados com o auxílio da transformada de Hilbert-Huang. Os algoritmos informáticos utilizados nas análises no domínio do tempo-frequência foram escolhidos devido às alterações hemodinâmicas provocadas pelas manobras de estimulação autonómica serem transitórias e perdurarem por períodos de tempo relativamente curtos, retornando habitualmente à linha de base cerca de dois minutos após o final de cada prova [223]. Esse facto não permitia a utilização de métodos de análise espectral baseados na análise autoregressiva ou na transformação rápida de Fourier, que pressupõem registos estacionários e relativamente prolongados ( $> 5$  minutos) [224].

A transformada discreta de *wavelets* é um método de análise baseado num algoritmo matemático que permite a análise de registos com apenas alguns segundos de duração (mínimo 10 – 15 segundos), considerado útil no estudo de variações transitórias do intervalo RR [225-227] e da PAS [228]. Este método foi recentemente utilizado para estudar a variabilidade autonómica num grupo de indivíduos saudáveis no laboratório onde este estudo autonómico decorreu, e os resultados foram validados na identificação das alterações relativamente rápidas da actividade simpática e parassimpática em várias provas autonómicas [229].

Neste estudo, utilizámos também a transformada de Hilbert-Huang (baseada num algoritmo ligeiramente diferente e mais recente) para analisar os resultados das provas com tempos de registo  $\geq 1$  minuto.

Definimos os componentes da variabilidade do intervalo RR em três gamas de frequências: muito baixa frequência (VLF:  $\leq 0,04$  Hz), baixa frequência (LF: 0,04 – 0,15 Hz) e alta frequência (HF: 0,15 – 0,4 Hz). De acordo com as recomendações emitidas pela *Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology* [224], a interpretação fisiológica e clínica do componente de muito baixa frequência não está definida e por isso não foi analisado. As variações das LF do intervalo RR ( $LF_{RR}$ ) e das HF do intervalo RR ( $HF_{RR}$ ) foram utilizadas para avaliar a modulação simpática e vagal, respectivamente, sobre o nódulo sino-auricular. Utilizámos a relação entre os componentes de baixa e de alta frequência do intervalo RR (LF/HF) para avaliar o equilíbrio instantâneo entre a actividade simpática e parassimpática [230].

Como indicador da actividade simpática, utilizámos o componente de baixa frequência da variabilidade da PAS ( $LF_{PAS}$ ). Não analisámos o componente de alta frequência da PAS por traduzir principalmente as variações da PA produzidas mecanicamente pela actividade respiratória, resultantes nomeadamente da pressão intratorácica e nos grandes vasos, o que revelaria indicações pouco relevantes da actividade autonómica [231].

Em todas as provas, comparámos períodos de igual duração do registo basal (efectuado imediatamente antes do respectivo estímulo) com os períodos de estímulo.

Assim:

- a) Na prova de *tilt* seleccionámos o último minuto do registo basal (Basal), o primeiro minuto em *tilt*, correspondente ao período de adaptação (TUa) e cada minuto do tempo de manutenção em *tilt* (TU), que dividimos em quatro períodos iguais com duração de 60 segundos.
- b) Na prova de respiração profunda utilizámos os últimos 60 segundos do registo basal e os 60 segundos da respiração profunda compassada.
- c) Na prova de *handgrip* avaliámos o último minuto do registo basal (Basal) e o tempo da manobra de *handgrip* que, por comodidade de análise, dividimos em cinco intervalos de tempo idênticos com duração de 60 segundos. Devido ao facto de alguns doentes não concluírem os cinco minutos previstos para a prova de *handgrip*, por impossibilidade física, analisámos no domínio do tempo-frequência as provas com duração  $\geq 3$  minutos (30 doentes e 29 controlos).



- d) Na prova de aritmética mental avaliámos o último minuto do registo basal e os 60 segundos de duração do cálculo mental.
- e) Devido à manobra de Valsalva durar cerca de 15 segundos, dividimos os registos correspondentes ao período basal e ao período pós-Valsalva de modo a obter períodos de 15 segundos para as comparações. Deste modo, dividimos os últimos 60 segundos anteriores à manobra de Valsalva em quatro períodos de igual duração com 15 segundos e seleccionámos o período em que a potência das LF foi mais elevada para representar o período basal (Basal). De igual modo, dividimos os 30 segundos do período pós-Valsalva em dois intervalos de tempo iguais com 15 segundos de duração e seleccionámos o período em que a potência das LF foi mais elevada para representar o período pós-Valsalva. Utilizámos como período correspondente à manobra de Valsalva os 15 segundos desde o início da manobra até ao final da fase III.

Com excepção da manobra de Valsalva, em que não usámos a transformada de Hilbert-Huang, utilizámos os mesmos intervalos de tempo nas análises efectuadas com a transformada discreta de *wavelets* e a transformada de Hilbert-Huang.

As análises de *wavelets* e de Hilbert-Huang foram realizadas com o auxílio do software FisioSinal, versão 0.99, programa informático desenvolvido especificamente para a análise da actividade do SNA no Instituto de Fisiologia da FML, a correr no ambiente Matlab® (The MathWorks, Inc., Boston, MA).

#### **Estudo da sensibilidade dos baroreceptores**

No estudo da sensibilidade dos receptores (*BaroReflex Sensitivity* - BRS) utilizámos o método sequencial descrito por Parati [232] que se baseia na identificação de ‘rampas’ de pressão arterial sistólica constituídas por 3 ou mais batimentos cardíacos consecutivos em que a pressão arterial aumente ou diminua de forma consistente ( $\geq 1$  mmHg/batimento). Simultaneamente, identificam-se ‘rampas’ do intervalo RR, definidas como sequências  $\geq 3$  batimentos cardíacos em que o intervalo RR aumente ou diminua de forma consistente ( $\geq 4$  ms/batimento). Cada episódio de BRS é definido como uma sequência detectada em rampa do intervalo RR que acompanha uma rampa da PAS. Os episódios de BRS ocorrem sem intervalo (*Lag* 0), com intervalo de um batimento cardíaco (*Lag* 1) ou de dois batimentos cardíacos em relação à rampa de PAS (*Lag* 2).

Neste estudo avaliámos duas variáveis obtidas pelo método das sequências: o declive (*slope*) da BRS e o índice de efectividade dos baroreceptores (*Baroreceptor Effectiveness Index* – BEI). O *slope* da BRS indica o declive das linhas de regressão dos valores do intervalo RR em função da PAS. Neste estudo, o *slope* representa o valor médio do declive de todos episódios de BSR identificados durante o período em análise e foi calculado pela seguinte fórmula:

$$BSR = \frac{\Delta RR}{\Delta PAS} \text{ (ms/mmHg)}$$

O BEI corresponde à relação entre o número de episódios de BRS e o número total de rampas da PAS identificados durante o período analisado, que por definição está limitado a valores  $\leq 100\%$ . O BEI foi calculado através da seguinte fórmula [233]:

$$BEI = \frac{\# \text{ Episódios BRS}}{\# \text{ Rampas PAS}} (\%)$$

Analisámos os registos de cada indivíduo em períodos com 300 segundos de duração, obtidos em decúbito dorsal após um período de repouso de pelo menos 15 minutos, de modo a permitir a estabilização hemodinâmica, e antes de qualquer manobra de estimulação autonómica.

Nas análises da sensibilidade dos baroreceptores utilizámos o módulo BEI do software FísioSinal.

### **Análise estatística**

Efectuámos a estatística descritiva de todas as variáveis em estudo. Utilizámos o teste *t* de Student para comparação de médias entre grupos diferentes e o teste *t* para variáveis emparelhadas para comparação de médias antes e após estímulos autonómicos. Quando os pressupostos para a realização dos testes paramétricos não estavam presentes, utilizámos os testes não paramétricos de Wilcoxon para duas medições emparelhadas e o teste de Friedman para mais de duas medições repetidas.

As variáveis categóricas foram expressas como proporções e analisadas com o teste de Chi-quadrado. Nas tabelas de 2x2 utilizámos o teste exacto de Fisher. Usámos o teste de Pearson para avaliar a correlação entre variáveis contínuas ou intervalares.

Efectuámos todos os testes estatísticos com o auxílio do programa SPSS® versão 13.0 para Windows (SPSS Inc., USA). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, excepto quando os pressupostos de normalidade da distribuição não podiam ser assumidos e os resultados foram expressos em mediana e percentis 25 e 75.

Calculámos todos os testes estatísticos com métodos exactos. Utilizámos os valores de  $P$  correspondentes a duas caudas considerando significativos os valores de  $P < 0,05$ .

### **Considerações éticas**

Este estudo foi autorizado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa, tendo sido respeitadas as recomendações constantes nas Declarações de Helsínquia e de Tóquio, referentes à experimentação envolvendo seres humanos. Obtivemos o consentimento informado de todos os participantes no estudo.



## 4.2 Metodologia do estudo em modelos animais

### 4.2.1 Materiais e métodos

O animal escolhido para este trabalho foi o rato Wistar ( $n = 63$ ) por o Instituto de Fisiologia estar preparado para a sua utilização, tendo em conta o espaço no biotério dos animais, as rações e o material cirúrgico. Os ratos Wistar adultos de ambos os sexos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos de controlo e de nefrolitíase.

No entanto, num conjunto de experiências recorreremos a ratos Zucker obesos ( $n = 8$ ).

Os animais foram distribuídos por vários modelos experimentais. Descreveremos em primeiro lugar a metodologia comum às várias experiências e seguidamente os métodos específicos utilizados em cada modelo.

Todas as experiências foram efectuadas de acordo com a legislação nacional e da Comunidade Europeia sobre bem-estar e experimentação animal.

A metodologia comum utilizada nas diferentes experiências compreende o protocolo cirúrgico, a indução de nefrolitíase, a aquisição de dados, as análises bioquímicas e histológicas. Assim:

#### **Protocolo cirúrgico**

Nas 24 horas que precediam as experiências, colocávamos os ratos em gaiolas metabólicas para medir a quantidade de água e de ração ingeridos, medir a diurese, pesar as fezes e recolher amostras de urina de 24 horas.

No dia da experiência, o animal era pesado e anestesiado com pentotal sódico (Abbott Laboratories) administrado por via intraperitoneal numa dose de 60 mg/kg. O pentobarbital, um barbitúrico de curta acção, é frequentemente utilizado em anestesia geral em ratos. Após administração intraperitoneal, verifica-se rápida indução de anestesia geral e inibição de reflexos [235]. A sua administração provoca redução inicial da FC e da PAM, mais acentuada nos primeiros 15 minutos, seguida de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos [236]. Embora existam outros anestésicos gerais com menos efeitos sobre o aparelho cardiovascular, preferimos utilizar o pentobarbital por ser o anestésico habitualmente utilizado no Instituto de Fisiologia da FML e que não requer a utilização dos equipamentos necessários aos anestésicos voláteis. Para limitar a interferência do pentobarbital nos registos hemodinâmicos, após a sua administração aguardámos que os valores da FC e PAM regressassem aos valores basais.

Após indução da anestesia, colocámos um termómetro rectal e a temperatura corporal foi mantida estável entre 36 – 39 ° C com o auxílio de um colchão de aquecimento (Harvard Apparatus Limited).

O protocolo cirúrgico incluía a traqueostomia e colocação de cânula endotraqueal para prevenir possíveis complicações respiratórias e eventual necessidade de suporte ventilatório. Seguidamente, isolámos cirurgicamente a artéria e a veia femorais, cateterizando cada um dos vasos com catéteres com 0,3 mm de diâmetro. O catéter venoso foi usado para hidratação e administração endovenosa de fármacos. A anestesia foi mantida com uma solução de pentotal de sódio diluída a 20%, administrada por via endovenosa conforme as necessidades. O catéter da artéria femoral foi preenchido com soro fisiológico heparinizado (2,5 U/ml) e introduzido a contra-corrente para medição invasiva da PA.

Colocámos eléctrodos para registo contínuo do electrocardiograma (ECG) nas extremidades dos membros dos animais.

Após a conclusão dos registos fisiológicos, efectuámos uma laparotomia mediana e isolámos os rins. Identificámos e laqueámos os vasos renais, para nefrectomia bilateral. Seguidamente, colhemos amostras de sangue para análises bioquímicas utilizando o catéter colocado na artéria femoral, de forma a não ser necessário aplicar uma grande força de aspiração, que poderia conduzir a hemólise. No final das experiências, os animais foram sacrificados com uma dose letal de pentotal sódico administrada por via endovenosa.

#### **Indução de nefrolitíase**

No grupo de nefrolitíase induzimos a formação de cálculos renais através de tratamento com etileno glicol (Sigma-Aldrich) por via oral, diluído na água para bebida numa concentração de 0,75%, e 50 ng de calcitriol (Abbott Laboratories) diluídos em 0,5 ml de soro fisiológico a 0,9%, administrado por via intraperitoneal três vezes por semana [234]. Os ratos do grupo de controlo beberam água da torneira sem suplementos e foram tratados com injeções trissemanais de 0,5 ml de soro fisiológico.

O tratamento foi efectuado durante duas a quatro semanas em ambos os grupos. Devido a que um grande número de ratos tratados com calcitriol e etileno glicol desenvolveram insuficiência renal grave (o que resultou na morte de alguns animais durante o tratamento), aumentámos este grupo com ratos tratados com calcitriol e

etileno glicol durante duas semanas. Durante o período de tratamento, os ratos ficaram em gaiolas colectivas (máximo sete animais por gaiola) num ambiente controlado, com temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e humidade (30 – 50%) constantes. Respeitou-se um ciclo de luz de 12 horas de dia e 12 horas de noite.

### **Aquisição de dados**

O registo contínuo da PA e da actividade do ECG foram analisados em canais separados, utilizando um registador PowerLab/4SP (ADInstruments, USA) ligado a um computador pessoal a correr o software LabChart versão 6.0 para Windows® (ADInstruments). Os eléctrodos do ECG foram conectados a um amplificador A/C (AM Systems 1700) e este ao registador PowerLab. A PA foi medida por um transdutor de pressão (Statham Instruments Inc., Puerto Rico) alimentado por uma unidade alimentadora de transdutores (Quad Bridge Amp, ADInstruments) e ligada ao registador PowerLab. A pressão arterial média (PAM) foi calculada como  $2/3$  do valor da PAD e um terço da PAS.

A aquisição do sinal foi efectuada a 1 kHz.

Após um período de repouso inicial com a duração de 15 minutos, para estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, efectuámos registos basais da PA e do ECG com duração de 180 segundos. Posteriormente, com administração endovenosa de fenilefrina, estudámos a sensibilidade dos baroreflexos. A fenilefrina é um agonista selectivo dos receptores adrenérgicos alfa 1 que em pequenas doses é quase desprovida de efeitos beta adrenérgicos [238]. Quando administrada por via intravenosa provoca vasoconstrição periférica e aumento quase imediato da pressão arterial, que se pode manter durante alguns minutos. A hipertensão estimula a actividade vagal e conseqüente redução da FC e do débito cardíaco [239]. No rato, o aumento da PA após administração intravenosa de fenilefrina é habitualmente de curta duração, com regresso aos valores basais em poucos minutos.

### **Análises bioquímicas**

Com excepção do modelo em que estudámos os efeitos da deservação renal unilateral, colhemos amostras de sangue e urina das 24 horas de todos os animais para avaliação da função renal e identificar a presença de alterações urinárias induzidas pelo tratamento. As amostras de sangue foram colhidas imediatamente após a nefrectomia e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. Os 2,5 ml superiores do

sobrenadante foram utilizados para análise. Seguidamente, as amostras de sangue e de urina foram congeladas a -80°C e guardadas até serem analisadas.

O pH da urina foi determinado imediatamente após a conclusão do período de 24 horas nas gaiolas metabólicas utilizando um eléctrodo específico. As amostras de sangue foram analisadas para medir a concentração de creatinina, cálcio, fósforo inorgânico, ácido úrico sódio, potássio e cloro. As amostras de urina foram analisadas para medir a densidade urinária, a concentração de creatinina, cálcio, oxalato, fosfato, ácido úrico e catecolaminas totais e fraccionadas. Os valores urinários foram expressos pela excreção das 24 horas. A clearance da creatinina foi calculada pela

$$\text{fórmula: } Cr_{\text{Clearance}} = \frac{[U_{Cr}] \times \text{Volume}}{[P_{Cr}] \times 1440}.$$

Todas as análises bioquímicas foram efectuadas num laboratório comercial certificado (Laboratório do Dr. Joaquim Chaves), utilizando técnicas standardizadas.

### **Análises histológicas**

A presença de cálculos foi confirmada por análise histológica dos rins colhidos *in vivo* após a conclusão das experiências.

Os rins foram fixados numa solução de formalina (10% de formaldeído e água) imediatamente após a nefrectomia permanecendo nessa solução por um período não inferior a 24 horas. Seguidamente, as amostras foram enviadas para o Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Após a fixação, o tecido foi lavado em água corrente durante meia hora e desidratado de forma progressiva, em séries crescentes de álcoois (álcool a 80%:2x e álcool absoluto: 3x; 1 a 2 horas em cada um). Em seguida, o tecido foi diafanizado em xilol até se tornar claro, de modo a que o xilol ocupasse todos os espaços anteriormente ocupados pela água (para permitir a penetração adequada da parafina em todo o tecido), colocado em parafina a 56°C durante 1 hora, em estufa, e passado para nova parafina à mesma temperatura ao fim desse tempo.

Imediatamente antes de serem cortados, os blocos de inclusão foram colocados sobre gelo para endurecerem e foram efectuados cortes com micrótomos de 5 µm de espessura.

Para o estudo histológico foram efectuadas as seguintes colorações:



- i) Coloração pela hematoxilina-eosina, para observação geral do tecido e do estado de conservação das células e seus organelos;
- ii) Coloração de PAS, para observação das membranas celulares dos glomérulos, túbulos, vasos e depósitos de fibrina;
- iii) Coloração pelo tricrómico de Masson para estudo da fibrose intersticial e glomerular;
- iv) Coloração de Gomori, para identificação de depósitos tecidulares de uratos (os cortes foram tratados com solução aquosa de ácido clorídrico a 0,5% durante 2 min antes de serem corados pela prata-metanamina, de forma a remover os depósitos de cálcio, para evitar falsa reacção positiva);
- v) Verohef e von Kossa, para identificação dos depósitos de cálcio.

Pesquisámos em todos os rins a presença de cálculos e/ou cristais intratubulares e/ou parenquimatosos. Adicionalmente, identificámos eventuais alterações histológicas dos túbulos renais, interstício, glomérulos e vasos. Os aspectos histológicos foram comparados com os observados no grupo de controlo.

No modelo de deservação, o número de calcificações existentes nos rins desnervados foi comparado com o número observado nos rins de controlo (rim contralateral) utilizando um *score* semi-quantitativo (0 a 4+), conforme previamente descrito [237].

O estudo histológico foi efectuado no Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, (Director: Professor Doutor Miguel Correia). As análises histológicas foram efectuadas por um co-investigador com experiência em histologia renal, ao qual não era fornecida informação do grupo a que pertenciam os rins.

#### **Métodos específicos para cada modelo experimental**

Cada um dos modelos que a seguir descrevemos pretendeu responder às questões que nos surgiram durante a investigação, nomeadamente a obesidade, actividade autonómica eferente e a actividade do nervo renal. Assim:

#### ***Estudo da nefrolitíase em ratos Zucker obesos***

Nestas experiências utilizámos ratos Zucker obesos (Charles River Laboratories, strain code # 185) para estudar os efeitos da obesidade na formação de cálculos renais.

Nestes ratos não foram administrados medicamentos para induzir a formação de cálculos renais.

Os ratos do sexo feminino ( $n = 8$ ) foram adquiridos com quatro semanas de vida e permaneceram no biotério do Instituto de Fisiologia da FML até à data das experiências, submetidos às mesmas condições ambientais dos restantes modelos, alimentando-se com uma ração típica para ratos e com acesso liberal à água. Quando realizámos as experiências, a idade dos ratos estava compreendida entre as 19 e 27 semanas de vida.

### ***Estudo da actividade autonómica eferente no modelo de nefrolitíase induzida em ratos por calcitriol e etileno glicol***

Estudámos neste modelo 34 ratos adultos, 20 pertencentes ao grupo com nefrolitíase e 14 controlos. Quando as experiências foram realizadas, a idades média dos animais era de  $21,9 \pm 1,1$  semanas.

Analisámos os registos efectuados em condições basais para estudar a actividade do sistema nervoso autónomo, com auxílio dos métodos de análise da variabilidade da FC e da PA, e os registos efectuados antes e após administração endovenosa de fenilefrina para o estudo dos baroreflexos. Assim:

A variabilidade da FC foi avaliada pela variabilidade do intervalo RR, medida directamente no ECG de alta definição. As análises espectrais da variabilidade do intervalo RR e da PA foram efectuadas através da transformação rápida de Fourier. Classificámos as frequências espectrais como de muito baixa frequência (VLF: 0 a 0,15 Hz), baixa frequência (LF: 0,15 a 0,60 Hz) e alta frequência (HF: 0,60 a 2,0 Hz). Considerámos neste estudo as análises das potências nas gamas LF e HF por serem aquelas cujo significado fisiológico se encontra mais esclarecido.

Para a análise do sinal utilizámos o software FisioSinal versão 0.99, desenvolvido para o estudo do SNA pelo Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa e pelo Instituto Superior Técnico para o ambiente Matlab (MathWorks, Inc.).

O ganho do baroreflexo foi calculado pela relação entre a variação ( $\Delta$ ) da FC e a variação da PAM em resposta à administração endovenosas de fenilefrina. Realizámos três injeções sucessivas de 0,2 ml de fenilefrina (25  $\mu\text{g/ml}$ ) em cada animal. Cada injeção foi administrada na forma de um *bolus*, seguida por 0,2 ml de soro fisiológico para lavagem do lúmen do catéter, de forma a obter um pico de PA rápido e único. Cada administração de fenilefrina só foi efectuada após os parâmetros

hemodinâmicos terem regressado aos valores basais e ter sido efectuado um novo registo basal com 30 segundos de duração.

Calculámos o ganho do baroreflexo com o auxílio da fórmula seguinte:

$$Baro_{Ganho} = \frac{\overline{FC}_{Basal} - FC_{Min}}{PAM_{Basal} - PAM_{Max}} = \frac{\Delta FC}{\Delta PAM} \quad (ms/mmHg)$$

Nesta fórmula, a variação da FC foi calculada como a diferença entre a FC mínima após a injeção de fenilefrina e a média da FC durante os 30 segundos do período basal que precedeu a respectiva injeção de fenilefrina. Calculámos o delta da PAM pela diferença entre o valor máximo da PAM após a injeção de fenilefrina e a média da PAM durante o respectivo período basal. Para efeito de análise estatística, utilizámos a média do ganho das administrações efectuadas em cada rato.

### ***Estudo da actividade do nervo renal no modelo experimental de nefrolitíase de rato***

Nestas experiências utilizámos 16 ratos Wistar adultos com 21 semanas de vida distribuídos por um grupo de controlo ( $n = 7$ ) e com nefrolitíase ( $n = 9$ ). O tratamento foi efectuado durante duas semanas em ambos os grupos, conforme o grupo de destino dos animais.

Inicialmente, foram realizados os procedimentos cirúrgicos descritos no protocolo cirúrgico. Para a realização do estudo da actividade do nervo renal, efectuámos uma incisão lombar expondo o rim esquerdo. Isolámos o ureter ipsilateral e o pedículo renal e, com o auxílio de um microscópio operatório, isolámos cuidadosamente um ramo do nervo renal.

A porção distal do nervo foi colocada num eléctrodo bipolar de prata fino ligado a um pré-amplificador (Neurolog System NL-100, Digitimer, England). Após se estabelecerem as condições para obter o melhor registo possível da actividade do nervo renal, o nervo e o eléctrodo foram cobertos com parafina líquida para evitar a desidratação nervosa. A ANR foi amplificada 10.000x e filtrada por dois filtros de banda, um para frequências <100 Hz (baixas frequências) e outro para frequências > 20 kHz (altas frequências). O sinal foi tornado audível por um amplificador e registado para análise posterior utilizando o sistema de aquisição de dados da PowerLab (ADInstruments).

A ANR foi corrigida por subtracção do ruído de fundo, definido pelo número de desvios padrões acima e abaixo da média. Quantificámos a actividade nervosa pelo

número médio de impulsos/segundo registados durante um período de dois minutos consecutivos.

Efectuámos um registo basal da ANR 15 minutos após a conclusão das manobras para colocação do eléctrodo no nervo renal e optimização da qualidade do registo, para reduzir a possibilidade de alterações relacionadas com a manipulação.

Após conclusão do registo basal, o ureter ipsilateral foi clampado com o auxílio dum clamp cirúrgico. A obstrução do ureter foi mantida durante 20 minutos de forma a permitir que os seus efeitos fossem transmitidos ao rim ipsilateral. Nesta ocasião, foi efectuado um novo registo da ANR com duração idêntica à do registo basal.

No final das experiências os rins foram colhidos para exame histológico, de forma a documentar a formação de cálculos renais nos ratos tratados com calcitriol e etileno glicol, e foram enviadas amostras de sangue e urina para análises bioquímicas. Só considerámos para análise os registos da actividade nervosa dos ratos com função renal preservada.

### ***Estudo da deservação renal unilateral***

Para estudar os efeitos da actividade do nervo renal efectuámos modificações do protocolo cirúrgico de forma a deservar um dos rins, mantendo a enervação do rim contralateral. Assim:

#### ***a) Modelo da deservação renal unilateral***

Neste conjunto de experiências, o protocolo cirúrgico foi adaptado de forma a incluir um procedimento cirúrgico adicional para deservação do rim esquerdo. Após esta cirurgia os animais eram recuperados e iniciavam o tratamento para indução de cálculos renais com a medicação descrita anteriormente. A cirurgia de deservação foi efectuada em dez ratos adultos do sexo masculino com 20 semanas de idade e ~410 g de peso. Neste modelo, todos os animais fizeram tratamento para indução de litíase renal durante quatro semanas, considerando-se o rim direito (com enervação intacta) como controlo.

Após 4 semanas de tratamento, os ratos foram submetidos a nefrectomia, de forma a obter os rins para análise histológica. No dia da nefrectomia cada animal foi pesado e anestesiado com pentotal de sódio (Laboratórios Abbott) na dose de 60 mg/Kg por via intraperitoneal. Efectuámos uma laparotomia mediana e ambos os rins foram

cuidadosamente expostos. Após isolamento e laqueação do pedículo vascular, efectuámos nefrectomia bilateral, tendo o cuidado de evitar lesões dos órgãos.

#### *a) Técnica de deservação*

Os ratos foram anestesiados com uma solução de pentotal de sódio (Laboratórios Abbott), administrada por via intraperitoneal na dose de 60 mg/Kg.

Sob assepsia rigorosa, efectuámos uma incisão abdominal mediana. O rim esquerdo foi exposto e isolámos o respectivo pedículo vascular. Com o auxílio dum microscópio cirúrgico, separámos cuidadosamente a artéria e a veia renal da bainha de tecido conjuntivo que os envolve e seccionámos todos os ramos visíveis do nervo renal. Em seguida, os vasos renais foram pincelados durante dois minutos com uma solução de fenol a 10% em etanol absoluto para destruir eventuais ramos nervosos não visíveis [240]. Os órgãos adjacentes foram cuidadosamente tapados com compressas para evitar que fossem afectados pelo fenol.

A cavidade abdominal foi encerrada por planos. Soturámos a camada muscular com fio reabsorvível de ácido poliglicólico (Safil 3/0, B-Braun, Melsungen AG) e a pele com seda não reabsorvível (Silkam 1/0, B-Braun, Melsungen AG).

Após a cirurgia, colocámos os ratos em gaiolas individuais para recobro da anestesia e mantivemo-los em gaiolas individuais durante aproximadamente uma semana, até total cicatrização da ferida operatória e remoção dos pontos das suturas externas. Posteriormente, os animais foram transferidos para gaiolas colectivas (máximo de 7 animais/gaiola) onde foram mantidos durante pelo menos duas semanas antes de iniciarem a administração dos fármacos necessários à indução experimental de nefrolitíase.

#### *b) Avaliação da eficácia da deservação*

A confirmação da deservação foi realizada por doseamento do conteúdo de noradrenalina no tecido renal. Colhemos amostras de tecido do rim deservado e do rim contralateral imediatamente após a nefrectomia. As amostras foram identificadas e congeladas em azoto líquido.

Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com um tampão de lise, a uma temperatura de 4°C, utilizando um *Cell Strainer* de nylon de 40 µm (BD Falcon, USA). O tampão de lise foi constituído por 200 mMolar cloreto de sódio, 0,1% do detergente celular Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), 0,1% do detergente celular

Nonidet P40 (Roche Diagnostics GmbH) e 50 mMolar de tampão orgânico Tris para manter o pH 8. A quantidade de solução utilizada foi de aproximadamente 2 ml/g de tecido. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos. Foram recolhidos 2 ml do sobrenadante e conservados a -80°C até serem analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

### **Análise estatística**

Efectuámos a estatística descritiva de todas as variáveis em estudo. Utilizámos o teste *t* de Student para comparações de médias de duas variáveis independentes ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney quando a normalidade da distribuição não podia ser assumida. Recorremos ao teste *t* para dados emparelhados para comparação de médias de medidas repetidas, excepto na comparação dos resultados dos doseamentos de noradrenalina no tecido renal onde utilizámos o teste de Wilcoxon por a distribuição dos resultados não ser normal.

Utilizámos o teste exacto de Fisher para associações entre variáveis categóricas. Para comparação dos *scores* de ambos os rins utilizámos o teste não paramétrico do sinal.

Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão, ou mediana e percentis 25 – 75 quando os pressupostos da distribuição normal não foram assumidos.

Realizámos os testes estatísticos com o auxílio do software SPSS versão 13.0 para Windows (SPSS Inc., USA). Calculámos todos os testes com as fórmulas para testes exactos e utilizámos o valor de *P* para duas caudas, considerando significativos os valores de  $P < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Resultados do estudo clínico

O estudo autonómico foi realizado em 60 indivíduos, 30 doentes com nefrolitíase idiopática recorrente e 30 controlos saudáveis. Com excepção do peso e do IMC, que eram mais elevados no grupo de doentes com litíase renal, as características gerais dos dois grupos não foram significativamente diferentes (Quadro II).

Os primeiros sintomas de litíase renal ocorreram, em média, aos  $33,5 \pm 11,3$  anos (extremos: 17 a 51 anos). Quando efectuámos o estudo autonómico o tempo médio de duração das queixas de litíase renal era de  $12,1 \pm 8,3$  anos e a mediana do número de episódios sintomáticos 5,0. O intervalo de tempo médio entre episódios foi de 16,8 meses, mas a distribuição deste valor era assimétrica, sendo a mediana 12,0 (10,0 – 24,0) meses. A mediana do intervalo de tempo entre o último episódio sintomático de litíase renal e/ou intervenção urológica e o estudo autonómico foi de 11,0 (7,0 – 24,0) meses.

Quadro II - Resumo das características do grupo de doentes e controlos

	<b>Controlos</b> ( <i>n</i> = 30)	<b>Doentes</b> ( <i>n</i> = 30)	<b><i>P</i></b>
Idade ( <i>anos</i> )	42,0 ± 12,4	45,6 ± 12,1	0,263
Sexo ( <i>M:F</i> )	13:17	17:13	0,439
Peso ( <i>Kg</i> )	66,5 ± 11,4	78,5 ± 17,0	<b>&lt; 0,005</b>
Altura ( <i>m</i> )	1,67 ± 0,8	1,67 ± 0,9	0,938
IMC ( <i>Kg/m<sup>2</sup></i> )	23,7 ± 3,3	28,0 ± 5,0	<b>&lt; 0,001</b>

A distribuição por género encontra-se expressa em valor absoluto e foi analisada com o teste de  $\chi^2$ .  
As diferenças significativas encontram-se assinaladas a negrito.

Quinze doentes (50%) apresentaram antecedentes familiares de litíase renal. A idade de início dos sintomas era significativamente menor neste subgrupo em relação aos doentes sem história familiar de nefrolitíase ( $29,0 \pm 11,3$  vs.  $38,0 \pm 9,7$  anos, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Não existiam diferenças nas características basais dos dois subgrupos, nomeadamente na

idade quando da execução do estudo autonómico ou nos indicadores de gravidade da litíase renal.

Treze dos 30 doentes com nefrolitíase apresentavam antecedentes de HTA. Quando da realização do estudo autonómico, a média de idade dos doentes com e sem HTA era semelhante. De igual modo, não existiam diferenças na idade do início das manifestações clínicas de nefrolitíase, na duração da doença ou nos indicadores da sua actividade, incluindo o número ou intervalo de tempo livre entre episódios sintomáticos e/ou existência de complicações prévias, entre doentes com e sem HTA.

A creatinina sérica e a *clearance* da creatinina foram semelhantes nos doentes com e sem antecedentes de hipertensão (Quadro III).

**Quadro III** - Comparação das características dos doentes com e sem hipertensão arterial

	<b>Normotensos</b>	<b>Hipertensos</b>	<b>P</b>
	<b>(n = 17)</b>	<b>(n = 13)</b>	
Idade à data do estudo ( <i>anos</i> )	43,4 ± 13,5	48,5 ± 9,7	0,263
Sexo ( <i>M:F</i> )	11:6	6:7	0,460
Duração da doença ( <i>anos</i> )	11,1 ± 8,9	13,5 ± 7,5	0,440
Idade de início das queixas ( <i>anos</i> )	32,4 ± 11,8	35,0 ± 11,0	0,536
Número de episódios sintomáticos <sup>a)</sup>	5,0 (2 – 7)	4,0 (3 – 8)	0,858
Intervalo livre entre episódios ( <i>meses</i> )	16,5 ± 11,6	17,4 ± 4,3	0,878
IMC ( <i>Kg/m<sup>2</sup></i> )	27,8 ± 5,8	28,3 ± 3,8	0,782
Creatinina sérica ( <i>mg/dl</i> )	0,88 ± 0,25	0,95 ± 0,44	0,589
Clearance da creatinina ( <i>ml/min</i> )	116,2 ± 35,1	109,4 ± 35,5	0,603
Ácido úrico sérico ( <i>mg/dl</i> )	5,26 ± 1,55	5,02 ± 2,00	0,719

a) Valor expresso em mediana (percentil 25 – 75) e comparação das medianas com o teste de Mann-Whitney.

Não observámos diferença na média do IMC nos doentes com e sem antecedentes de HTA. Após estratificação do IMC segundo os critérios da OMS, não verificámos associação da obesidade com a existência de antecedentes de HTA nos doentes com nefrolitíase (Quadro IV).

Os antecedentes de HTA não foram associados ao fenótipo das alterações urinárias, à existência de antecedentes familiares de nefrolitíase, à forma de tratamento médico e/ou



cirúrgico efectuado (incluindo a realização de tratamentos com LEOC) nem a complicações renais relacionadas com a nefrolitíase (Quadro IV).

**Quadro IV** – Resultados dos testes destinados a pesquisar a associação de vários factores independentes com a HTA

Associações pesquisadas	Hipertensos			Normotensos			P
	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	
Alterações urinárias							
<i>Hipercaleiúria</i>	5	8	13	8	9	17	0,638
<i>Hiperuricosúria</i>	8	5	13	9	8	17	0,638
<i>Hiperoxalúria</i>	4	8	(12)	5	12	17	1,000
<i>Hipocitraturia</i>	7	5	(12)	4	12	(16)	0,121
<i>Hipomagnesiúria</i>	1	11	(12)	3	12	(15)	0,605
<i>Baixo volume de urina</i>	2	10	(12)	2	14	(16)	1,000
Obesidade	5	8	13	7	10	17	0,880
Intervenções urológicas em geral	7	6	13	4	13	17	0,132
LEOC	5	8	13	4	13	17	0,443
Complicações prévias da litíase	3	10	13	4	13	17	1,000
Antecedentes familiares de litíase	8	5	13	7	10	17	0,269

São apresentados entre parêntesis os resultados em que não existem dados para classificação de todos os casos.

### 5.1.1 Testes de função autonómica

#### Teste de tilt (ortostatismo passivo)

##### *Análise no domínio do tempo*

Durante o registo basal, em clinostatismo, os valores da FC, PA sistólica e PA diastólica foram significativamente mais elevados no grupo de doentes com litíase renal em relação ao grupo de controlos.

Não observámos sintomas de hipotensão ortostática em nenhum doente durante o período em *tilt*. O ortostatismo provocou na grande maioria dos participantes (doentes e/ou controlos) aumentos significativos da frequência cardíaca e/ou da pressão arterial. A variação da PAD foi significativamente maior no grupo de doentes com litíase renal do que no grupo de controlos [mediana: 22,4 (15,1 – 28,3) vs. 17,0 (11,9 – 21,4) mmHg, respectivamente;  $P < 0,05$ ]. Os aumentos médios da FC e da PAS foram semelhantes entre os grupos.

Durante a prova de *tilt* os valores máximos da FC e da PA foram significativamente mais elevados no grupo de doentes do que no grupo de controlos (Quadro V).

**Quadro V** – Valores da frequência cardíaca e pressão arterial durante a prova de *tilt*

	<b>Basal</b> ( <i>n</i> = 30)	<b>Ortostatismo passivo</b> ( <i>n</i> = 30)	<b><i>P</i> *</b>
Frequência cardíaca ( <i>bpm</i> )			
Doentes	73,5 ± 13,4 <sup>a)</sup>	98,3 ± 15,7 <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	63,7 ± 11,0	85,5 ± 15,4	< <b>0,001</b>
PA sistólica ( <i>mmHg</i> )			
Doentes	127,0 ± 14,3 <sup>b)</sup>	150,2 ± 15,3 <sup>c)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	113,8 ± 10,6	134,6 ± 17,7	< <b>0,001</b>
PA diastólica ( <i>mmHg</i> )			
Doentes	84,5 ± 10,3 <sup>b)</sup>	106,6 ± 14,0 <sup>b)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	73,0 ± 8,0	91,2 ± 12,0	< <b>0,001</b>

\* Teste *t* para variáveis emparelhadas.

a) *P* < 0,005; b) *P* = 0,001; c) *P* < 0,001, nas comparações com o teste *t* de Student entre doentes e controlos.

Nos diferentes subgrupos de doentes com e sem antecedentes conhecidos de HTA, não observámos diferenças significativas dos valores da FC ou da PA em decúbito nem durante o ortostatismo (Quadro VI).

Durante o período basal, os valores da PAS foram mais elevados nos doentes obesos do que nos não obesos (136,80 ± 13,99 vs. 120,45 ± 10,42 mmHg, respectivamente; *P* = 0,001). Neste período, a PAS também foi mais elevada nos doentes com hiperuricémia em relação aos doentes normouricémicos (133,3 ± 13,8 vs. 121,5 ± 12,8 mmHg, respectivamente; *P* < 0,05). Não verificámos diferenças da PAD e da FC em decúbito nos doentes com obesidade ou com hiperuricemia.

Durante o período em *tilt* observámos aumentos excessivos da FC e/ou da PA em 29 doentes (96,7%) e 24 controlos (80,0%) (*P* = NS). Observámos mais frequentemente a elevação excessiva da PA, em 28 dos 30 doentes; destes, em 16 (53,3%) verificámos aumento isolado da pressão arterial e nos restantes hipertensão ortostática e taquicardia. Um doente (3,3%) apresentou taquicardia isolada. No grupo de controlos, observámos durante o ortostatismo aumento excessivo da PA em 22 indivíduos: 11 (36,7% do total dos controlos) apresentaram aumento isolado da PA e outros 11 (36,7%) HTA e taquicardia. Dois controlos (6,7%) apresentaram taquicardia postural sem desenvolver hipertensão.

**Quadro VI** – FC e PA em decúbito e em ortostatismo passivo nos subgrupos de casos com e sem antecedentes de HTA

	<b>Doentes normotensos</b>	<b>Doentes hipertensos</b>	<b>P</b>
	(n = 17)	(n = 13)	
<b>Frequência cardíaca (bpm)</b>			
Basal	70,9 ± 9,0	76,9 ± 17,4	0,268
Ortostatismo	95,9 ± 14,5	101,4 ± 17,1	0,345
Δ FC	25,0 ± 12,0	24,3 ± 7,0	0,841
<b>PA sistólica (mmHg)</b>			
Basal	123,4 ± 13,0	130,4 ± 15,7	0,255
Ortostatismo	147,6 ± 14,6	153,8 ± 16,1	0,279
Δ PAS	23,3 ± 10,5	23,3 ± 8,1	1,000
<b>PA diastólica (mmHg)</b>			
Basal	81,7 ± 8,4	88,1 ± 11,7	0,110
Ortostatismo	105,0 ± 12,1	108,7 ± 16,5	0,484
Δ PAD	23,3 ± 10,0	22,1 ± 8,1	0,736

No grupo de doentes, não associámos o desenvolvimento o aumento excessivo da FC e/ou da PA em resposta ao ortostatismo passivo com a existência de antecedentes pessoais de HTA, obesidade, existência antecedentes familiares de litíase renal, complicações, forma de tratamento da nefrolitíase (incluindo o facto de terem sido efectuados tratamentos com LEOC) e fenótipo das alterações urinárias relacionadas com o risco de litíase renal.

#### **Análises no domínio do tempo-frequência**

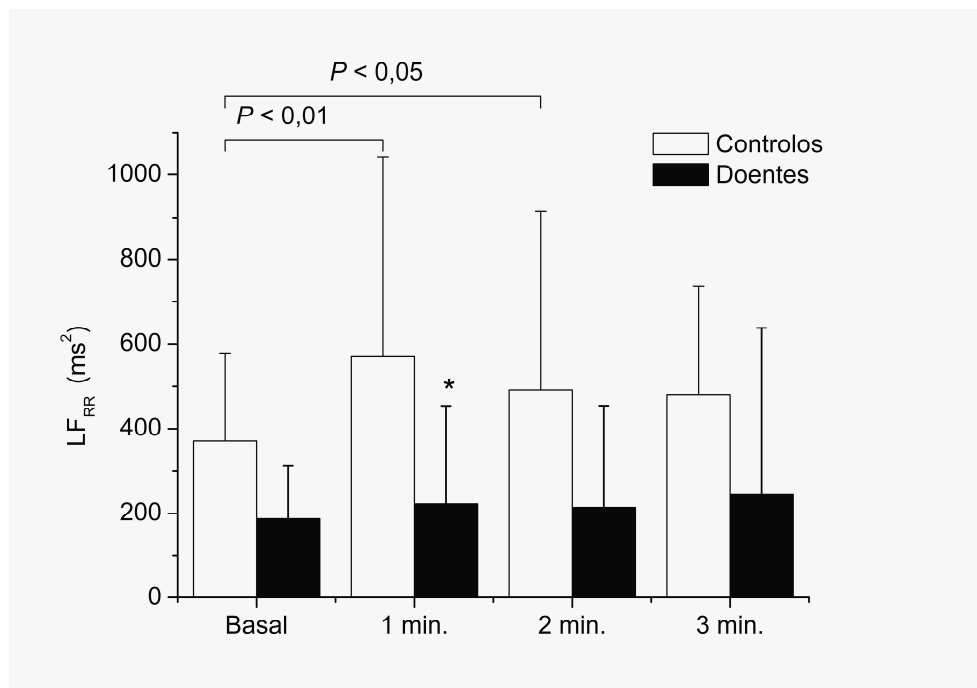
Um dos controlos não apresentou um registo com tempo e qualidade suficiente para as análises no domínio do tempo-frequência pelo que foi excluído desta análise.

#### **Variabilidade da frequência cardíaca**

No registo basal não observámos diferenças significativas dos componentes da variabilidade da frequência cardíaca entre doentes e controlos (Quadro VII).

Durante o primeiro minuto em ortostatismo (fase de adaptação), verificámos um aumento significativo das  $LF_{RR}$  no grupo de controlos. Neste, as  $LF_{RR}$  começaram a diminuir durante o 2º minuto em ortostatismo (apesar de o valor ainda ter sido significativamente mais elevado no 2º minuto em comparação com o valor basal) e mantiveram a tendência de descida durante o 3º minuto em ortostatismo. No grupo de doentes não existiu aumento significativo das  $LF_{RR}$  em resposta ao ortostatismo. Em consequência da ausência de aumento, a potência das  $LF_{RR}$

foi significativamente menor no grupo de doentes durante o período de adaptação ao ortostatismo (Figura 1).



**Figura 1** – Variação das LF<sub>RR</sub> durante a prova de ortostatismo passivo. As colunas representam a mediana e as barras de erro a amplitude interquartil. \*  $P < 0,05$  na comparação entre doentes e controlos no minuto de adaptação ao ortostatismo.

O ortostatismo passivo determinou uma redução acentuada das HF<sub>RR</sub> em ambos os grupos, em relação ao período basal. Esta redução foi mais intensa e precoce no grupo de doentes, cuja diminuição das HF<sub>RR</sub> foi significativa durante o período de adaptação ao ortostatismo. No grupo de controlos, a diminuição das HF<sub>RR</sub> foi significativa apenas durante o período de manutenção em *tilt*. No período de adaptação ao ortostatismo, a potência das HF<sub>RR</sub> foi significativamente menor no grupo de doentes em relação ao grupo de controlo ( $P < 0,05$ ).

A relação LF/HF aumentou significativamente durante a prova de *tilt* em ambos os grupos. No grupo de controlos, o aumento resultou do aumento das LF<sub>RR</sub> e da diminuição das HF<sub>RR</sub>. No grupo de doentes o aumento da relação LF/HF resultou quase exclusivamente a diminuição das HF<sub>RR</sub>.

### Variabilidade da pressão arterial sistólica

Durante o período basal, a potência das LF<sub>PAS</sub> foi significativamente mais elevada no grupo de doentes em comparação com o grupo de controlos ( $P < 0,05$ ).

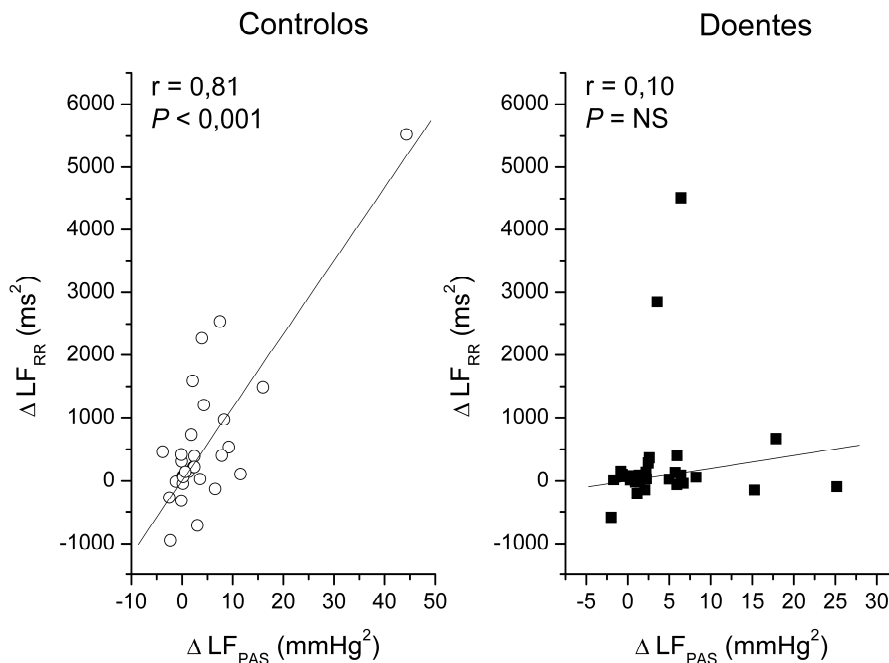
Durante o *tilt* observámos um aumento significativo das LF<sub>PAS</sub> em ambos os grupos. Nos controlos, o maior aumento das LF<sub>PAS</sub> em relação ao valor basal ocorreu durante o período de adaptação ao ortostatismo, com estabilização dos seus valores durante o período de

manutenção. No grupo de doentes, também ocorreu um aumento do componente de baixa frequência da variabilidade da PAS durante o período de adaptação ao ortostatismo mas a potência das  $LF_{PAS}$  continuou a aumentar progressivamente durante o período de manutenção, sendo o valor mais elevado das  $LF_{PAS}$  observado na fase final do período de manutenção em ortostatismo.

Em geral, os resultados da análise de *wavelets* foram confirmados com a transformada de Hilbert-Huang (Quadro VIII). Verificámos uma excelente correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos em todas as fases da prova. Este facto é exemplificado pelos resultados obtidos durante o período basal, no qual se verificaram excelentes correlações das  $LF_{RR}$  ( $r = 0,947$ ;  $P < 0,001$ ),  $HF_{RR}$  ( $r = 0,983$ ;  $P < 0,001$ ), relação  $LF/HF$  ( $r = 0,907$ ;  $P < 0,001$ ) e da  $LF_{PAS}$  ( $r = 0,934$ ;  $P < 0,001$ ), obtidas com os dois métodos.

### Relação entre o componente de baixa frequência da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica

No grupo de controlos verificámos uma correlação directa entre o delta da  $LF_{PAS}$  e o delta  $LF_{RR}$  entre o período basal e o período de adaptação ao ortostatismo ( $r = 0,811$ ;  $P < 0,001$ ). No grupo de doentes não observámos correlação ( $r = 0,10$ ;  $P = NS$ ) (Figura 2).



**Figura 2** – Correlação dos deltas da  $LF_{PAS}$  e  $LF_{RR}$  entre o registo basal e o primeiro minuto de adaptação ao ortostatismo.

**Quadro VII** — Variabilidade da frequência cardíaca e da PA sistólica obtidos com a transformada discreta de *wavelets* durante o teste de ortostatismo passivo (30 doentes e 29 controlos)

	Basal (clinostatismo)	Minuto adaptação ao ortostatismo	2º minuto ortostatismo	3º minuto ortostatismo	<i>P</i> §
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	370,9 (274,7 – 675,7)	569,4 (303,2 – 1147,1) <sup>a)</sup>	491,8 (234,1 – 1037,0) <sup>b)</sup>	481,0 (248,5 – 746,6)	< <b>0,05</b>
Doentes	187,3 (119,7 – 356,6)	222,7 (127,0 – 560,9) *	214,4 (112,9 – 581,3)	244,0 (101,9 – 859,1)	0,270
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	370,2 (155,0 – 610,7)	280,5 (128,1 – 744,3)	244,7 (100,2 – 566,5) <sup>e)</sup>	148,3 (83,1 – 466,5) <sup>-)</sup>	< <b>0,001</b>
Doentes	178,8 (100,0 – 396,6)	107,5 (50,1 – 195,2) <sup>b) †</sup>	66,2 (33,4 – 288,8) <sup>b) *</sup>	81,5 (33,5 – 162,8) <sup>b)</sup>	= <b>0,001</b>
<b>LF/HF</b>					
Controlos	1,01 (0,48 – 1,94)	1,84 (1,25 – 3,22) <sup>d)</sup>	2,03 (1,35 – 4,02) <sup>d)</sup>	2,85 (1,38 – 4,89) <sup>e)</sup>	< <b>0,001</b>
Doentes	1,18 (0,56 – 2,07)	2,03 (1,39 – 5,36) <sup>d)</sup>	2,04 (1,43 – 6,38) <sup>d)</sup>	2,79 (1,43 – 7,22) <sup>e)</sup>	< <b>0,005</b>
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	1,73 (1,8 – 3,34)	4,42 (2,16 – 7,18) <sup>d)</sup>	4,84 (2,56 – 7,88) <sup>e)</sup>	4,73 (2,84 – 7,45) <sup>e)</sup>	< <b>0,001</b>
Doentes	2,80 (1,38 – 4,01)	5,84 (4,20 – 9,28) <sup>e) *</sup>	6,36 (4,89 – 13,02) <sup>e) *</sup>	7,81 (3,77 – 14,53) <sup>e) **</sup>	< <b>0,001</b>

§ Resultado do teste de Friedman.

Teste de Wilcoxon para comparações *post-hoc* com o período basal do mesmo grupo: a)  $P < 0,01$ ; b)  $P < 0,05$ ; c)  $P < 0,005$ ; d)  $P = 0,001$ ; e)  $P < 0,001$ .

Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período do grupo de Controlos: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; †);  $P < 0,005$ .

Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

**Quadro VIII** – Análise de variabilidade da frequência cardíaca e PA sistólica durante o teste de ortostatismo passivo de acordo com a transformada de Hilbert-Huang (30 doentes e 29 controlos)

	Basal (clinostatismo)	Minuto adaptação ao ortostatismo	2º minuto ortostatismo (manutenção)	3º minuto ortostatismo	<i>P</i> <sup>§</sup>
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	417,0 (212,9 – 700,6)	704,0 (373,4 – 1715,6) <sup>e)</sup>	565,4 (309,3 – 1392,3) <sup>a)</sup>	450,7 (243,6 – 1160,0)	< 0,005
Doentes	209,9 (149,5 – 551,4)	237,9 (151,7 – 605,3) <sup>***</sup>	232,5 (120,5 – 700,4) <sup>*</sup>	333,6 (182,8 – 640,4)	0,766
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	359,5 (144,1 – 714,7)	291,3 (140,7 – 739,6)	196,3 (80,6 – 515,9) <sup>e)</sup>	138,0 (95,2 – 465,3) <sup>b)</sup>	< 0,001
Doentes	168,7 (91,0 – 364,0)	93,7 (44,8 – 134,6) <sup>e) ††</sup>	63,4 (33,8 – 209,2) <sup>c) *</sup>	89,3 (35,8 – 155,4) <sup>b) *</sup>	< 0,001
<b>LF/HF</b>					
Controlos	1,15 (0,54 – 2,14)	2,27 (1,64 – 4,62) <sup>e)</sup>	2,92 (1,65 – 5,46) <sup>d)</sup>	3,17 (1,62 – 6,33) <sup>e)</sup>	< 0,001
Doentes	1,45 (0,69 – 2,60)	3,57 (1,71 – 5,21) <sup>e)</sup>	2,97 (1,94 – 6,71) <sup>d)</sup>	4,07 (2,31 – 6,86) <sup>e)</sup>	< 0,001
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	1,78 (1,20 – 3,97)	4,10 (2,43 – 7,06) <sup>d)</sup>	5,22 (2,44 – 9,71) <sup>e)</sup>	4,90 (3,35 – 9,19) <sup>e)</sup>	< 0,001
Doentes	3,25 (1,82 – 5,87) <sup>*</sup>	8,19 (4,56 – 12,08) <sup>e) ††</sup>	7,99 (4,63 – 17,13) <sup>e) *</sup>	9,81 (4,95 – 17,68) <sup>e) *</sup>	< 0,001

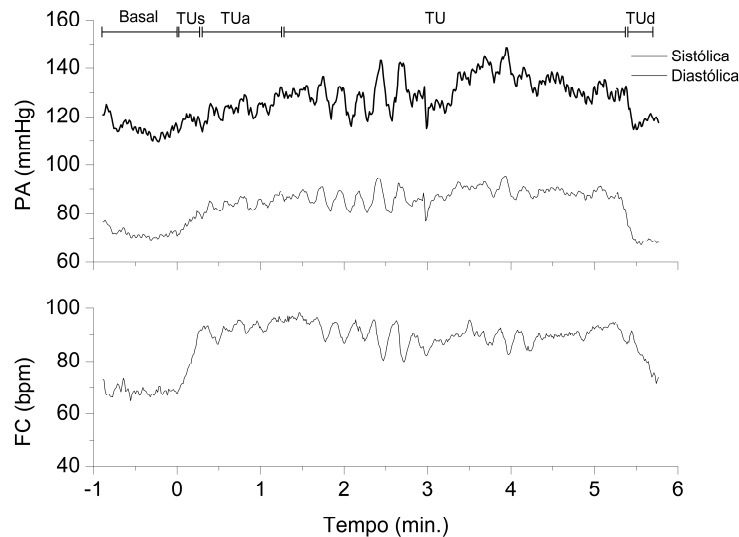
<sup>§</sup> Resultado do teste de Friedman.

Teste de Wilcoxon para comparações *post-hoc* com o período basal do mesmo grupo: a) *P* < 0,01; b) *P* < 0,05; c) *P* < 0,005; d) *P* = 0,001; e) *P* < 0,001.

Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período do grupo de Controlos: \* *P* < 0,05; \*\* *P* = 0,01; \*\*\* *P* < 0,01; †) *P* < 0,005; ††) *P* = 0,001; †††) *P* < 0,001.

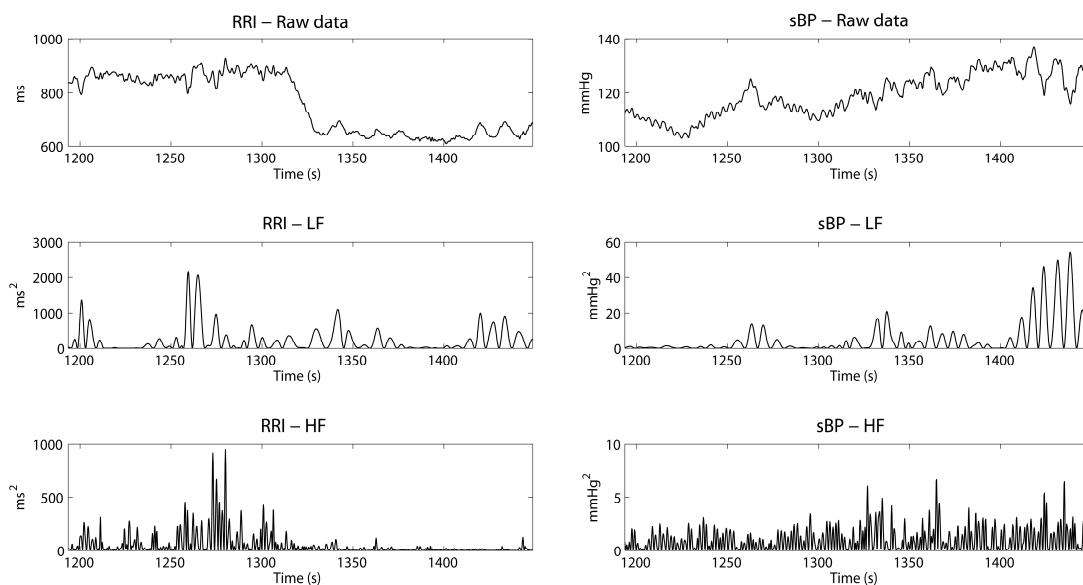
Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

Na Figura 3 observa-se a prova de *tilt* dum doente com litíase renal que apresenta as respostas hemodinâmicas características dos doentes nesta prova, com identificação das suas diferentes fases.



**Figura 3** – Prova de *tilt* dum doente com nefrolitíase com 5 minutos de duração. A FC e a PA aumentaram durante a fase de elevação da mesa de *tilt* (TUs) e de adaptação (TU). A PA aumentou ainda mais durante o período de manutenção (TU).

Na Figura 4 observam-se os gráficos da análise de *wavelets* no mesmo doente. Verificamos as alterações características do grupo de doentes com litíase renal nas análises no domínio do tempo-frequência: ausência de aumento das  $LF_{RR}$ , diminuição das  $HR_{RR}$  e aumento progressivo da potência das  $LF_{PAS}$  durante o período de manutenção em ortostatismo.



**Figura 4** – Análise de *Wavelets* da prova de *tilt* dum doente com nefrolitíase. Observe-se a diminuição notória das  $HR_{RR}$ , desde a fase de adaptação, e o aumento das  $LF_{PAS}$  na fase final da prova. A elevação da mesa de *tilt* ocorreu aos 1300 segundos.

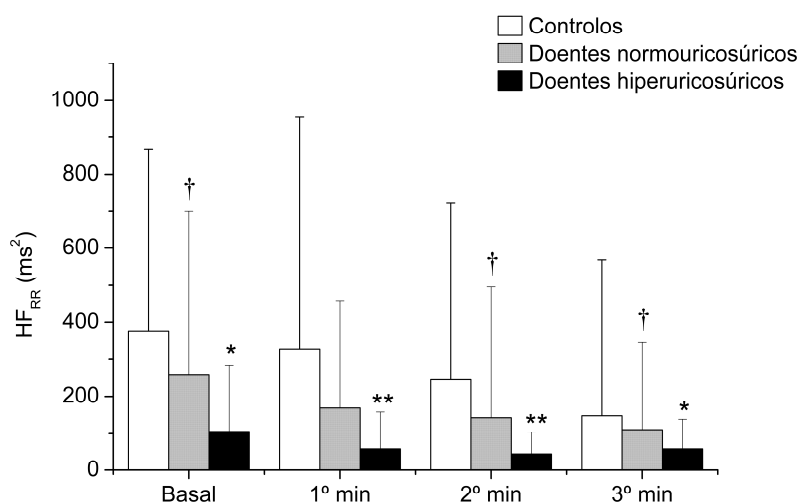


### Influência de factores independentes nos resultados observados no grupo de doentes

A potência das HF<sub>RR</sub> foi significativamente menor no subgrupo de doentes com nefrolitíase e hiperuricosúria em relação ao subgrupo de doentes com excreção normal de ácido úrico. A diferença foi observada durante o registo basal e durante o período de manutenção em ortostatismo, mas não foi significativa durante o período de adaptação ao ortostatismo (Figura 5). Quando excluímos desta análise os doentes hiperuricosúricos, verificámos que a menor potência das HF<sub>RR</sub> do grupo de doentes em comparação com os controlos não apresentava significado estatístico.

A potência das HF<sub>RR</sub> durante o período de adaptação ao ortostatismo foi significativamente menor nos doentes obesos comparativamente com os não obesos [mediana: 51,5 (32,4 – 123,4) vs. 134,9 (82,4 – 322,3) ms<sup>2</sup>;  $P < 0,05$ ]. Quando excluídos os doentes obesos desta análise, manteve-se a diminuição significativa das HF<sub>RR</sub> entre o valor basal e o valor obtido no período de adaptação ao *tilt* ( $P < 0,05$ ).

No grupo de doentes estudados não observámos associação estatística entre obesidade e hiperuricosúria.



**Figura 5** – Variação das HF<sub>RR</sub> durante a prova de *tilt* nos controlos e nos doentes com e sem hiperuricosúria. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,005$  nas comparações dos doentes hiperuricosúricos com os controlos; †  $P < 0,05$  na comparação dos doentes normouricosúricos com hiperuricosúricos.

Não observámos diferenças significativas das LF<sub>RR</sub> entre doentes com e sem antecedentes de HTA. Quando excluímos os doentes com antecedentes de HTA da análise continuámos a não observar aumento significativo da potência das LF<sub>RR</sub> na resposta ao ortostatismo passivo. No grupo de doentes, não encontramos diferenças das LF<sub>RR</sub> durante as várias fases do *tilt* entre indivíduos obesos e não obesos.

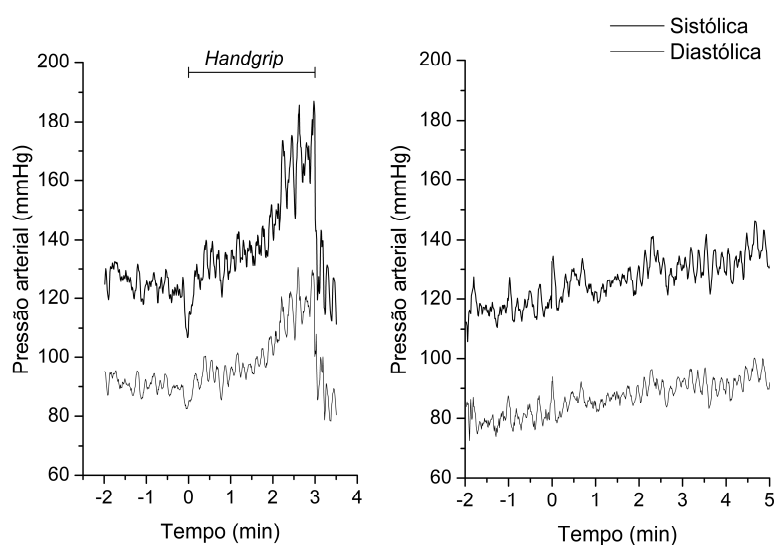
A potência das  $LF_{PAS}$  foi significativamente mais elevada nos doentes hipertensos do que nos doentes com nefrolitíase e sem antecedentes conhecidos de HTA. Observámos esta diferença durante o período de adaptação ao ortostatismo [mediana: 8,24 (5,22 – 11,37) vs. 4,54 (2,79 – 8,26)  $\text{mmHg}^2$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ] e durante o 3º minuto em ortostatismo [mediana: 10,56 (7,77 – 17,03) vs. 4,78 (3,44 – 9,37)  $\text{mmHg}^2$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ]. Após exclusão dos doentes com antecedentes de HTA da análise, as diferenças das  $LF_{PAS}$  entre doentes e controlos não apresentaram significado estatístico.

No grupo de doentes, não observámos diferenças nos componentes da variabilidade da frequência cardíaca ou da PAS em função de outros factores independentes, nomeadamente da existência de antecedentes familiares de nefrolitíase, dos indicadores de actividade da doença, das opções de tratamento, de complicações renais e das alterações urinárias relacionadas com o risco de litíase.

## Provas de estimulação do Sistema Nervoso Simpático

### *Prova de handgrip*

Quatro doentes não realizaram a totalidade do tempo previsto para a prova de *handgrip* por motivos clínicos: dois devido a respostas paradoxais com desenvolvimento de hipotensão súbita entre o segundo e terceiro minuto de exercício isométrico, sem referirem sintomatologia (Figura 6).



**Figura 6** – Exemplo de hipotensão ao 3º minuto de *handgrip* que obrigou a suspender a prova num doente com nefrolitíase. No painel do lado direito pode observar-se o exemplo duma prova normal num indivíduo do grupo de controlo.

Nos restantes, a prova foi interrompida por hipertensão e desenvolvimento de sintomatologia, nomeadamente dor muscular e cansaço extremo. A sintomatologia desapareceu e a PA voltou ao valor basal em menos de 60 segundos após a suspensão da prova.

### **Análise no domínio do tempo**

Os valores basais da FC e da PA foram significativamente mais elevados nos doentes com nefrolitíase em comparação com os controlos (Quadro IX).

Na manobra de *handgrip* observámos aumentos significativos da FC ( $P < 0,001$ ), da PAS ( $P < 0,001$ ) e da PAD ( $P < 0,001$ ) em ambos os grupos. Os valores máximos da FC e da PA foram mais elevados no grupo de doentes mas os delta em relação ao período basal foram semelhantes nos dois grupos.

**Quadro IX** - Parâmetros hemodinâmicos na prova de *handgrip*

	Basal			<i>Handgrip</i>		
	Doentes	Controlos	<i>P</i>	Doentes	Controlos	<i>P</i>
FC ( <i>bpm</i> )	79,4 ± 14,5	67,7 ± 11,9	<b>0,001</b>	98,0 ± 15,9	87,6 ± 16,8	< <b>0,05</b>
PAS ( <i>mmHg</i> )	131,7 ± 14,1	121,5 ± 15,6	< <b>0,05</b>	167,4 ± 18,2	155,5 ± 24,1	< <b>0,05</b>
PAD ( <i>mmHg</i> )	90,9 ± 10,7	81,9 ± 11,5	< <b>0,005</b>	119,6 ± 20,0	106,8 ± 19,2	< <b>0,05</b>

Todos os parâmetros apresentaram diferenças significativas na comparação Basal vs. *Handgrip* ( $P < 0,001$ ).

Classificámos o aumento da PAD como excessivo em 25 doentes (83,3%) e em 20 controlos (66,7%) ( $P = \text{NS}$ ).

No grupo de doentes, não registámos diferença na variação da PAD entre indivíduos com e sem antecedentes de HTA, em função da presença de obesidade, de antecedentes de complicações, da forma de tratamento, da documentação de hiperuricemia e de qualquer das alterações urinárias relacionados com o risco de nefrolitíase.

### **Análises no domínio do tempo-frequência**

#### *Variabilidade da frequência cardíaca*

As análises efectuadas no domínio do tempo-frequência apresentaram uma diminuição significativa da variabilidade da FC nos doentes com nefrolitíase durante o registo basal, caracterizada por diminuição das  $LF_{RR}$  e das  $HF_{RR}$  em relação aos controlos (Quadro X).

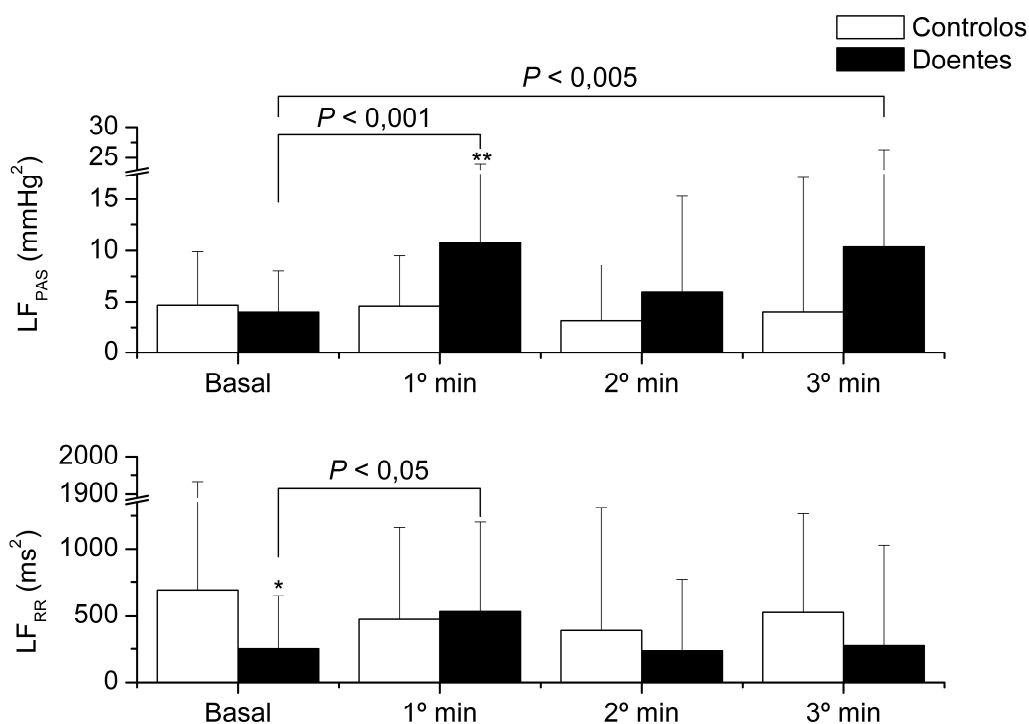
No grupo de doentes, observámos um aumento da potência das  $LF_{RR}$  durante o primeiro minuto de *handgrip* em relação aos valores basais (Figura 7). No grupo de controlos não observámos este aumento pelo que a potência das  $LF_{RR}$  durante o primeiro minuto de *handgrip* foi significativamente superior nos doentes com nefrolitíase do que nos controlos.

A potência das  $HF_{RR}$  foi significativamente menor no grupo de doentes durante todo o período de *handgrip* e, neste grupo, observámos uma redução progressiva das  $HF_{RR}$  durante a prova. O valor mínimo das  $HF_{RR}$  foi observado durante o segundo minuto de *handgrip*. Esta diminuição não foi significativa no grupo de controlos.

Os resultados obtidos com a transformada de Hilbert-Huang mostraram aumentos da relação LF/HF no grupo de doentes durante o primeiro e terceiro minutos da prova de *handgrip* em relação ao valor basal (Quadro XI). Não observámos estes aumentos nos controlos. No grupo de doentes, o aumento da relação LF/HF durante o primeiro minuto esteve relacionado com o

aumento das  $LF_{RR}$ . O aumento da relação  $LF/HF$  durante o terceiro minuto foi correspondente à diminuição das  $HF_{RR}$ .

A potência das  $HF_{RR}$  no período basal foi significativamente menor nos doentes obesos em relação aos doentes não obesos [mediana: 264,7 (121,2 – 441,4) vs. 398,6 (145,7 – 777,5)  $ms^2$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ]. Quando excluimos os resultados dos doentes obesos da análise, a diferença das  $HF_{RR}$  entre doentes e controlos não apresentou significado estatístico. A comparação da potência das  $HF_{RR}$  durante o terceiro minuto de *handgrip* entre os vários subgrupos de doentes não identificou diferenças relacionadas com a presença de obesidade ou de qualquer dos restantes factores independentes neste estudo.



**Figura 7** – Evolução das  $LF_{RR}$  e  $LF_{PAS}$  durante a prova de *handgrip*. O valor de  $P$  indicado na figura refere-se às comparações com o período basal dentro do grupo de doentes. As colunas expressam a mediana e as barras de erro a amplitude interquartil.  $*P < 0,05$  Doentes vs. Controlos;  $**P < 0,005$  Doentes vs. Controlos.

**Quadro X** – Resultados da prova de *handgrip* obtidos com a transformada discreta de *wavelets* (30 doentes e 29 controlos)

	Basal	1º minuto	2º minuto	3º minuto	<i>P</i> §
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	679,9 (236,4 – 1441,0)	406,0 (207,5 – 875,0)	361,3 (157,0 – 958,7)	526,8 (241,1 – 902,4)	0,110
Doentes	250,4 (142,4 – 526,3) *	532,6 (201,2 – 865,3) <sup>a)</sup>	234,8 (75,3 – 502,4)	272,9 (101,1 – 843,4)	< <b>0,05</b>
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	307,8 (150,0 – 568,9)	325,2 (127,8 – 413,7)	255,0 (93,0 – 598,1)	260,5 (115,6 – 445,6)	0,289
Doentes	98,4 (54,6 – 346,9) ***	111,5 (84,6 – 387,7) *	86,9 (37,2 – 306,6) *	104,0 (42,0 – 358,2) *	< <b>0,05</b>
<b>LF/HF</b>					
Controlos	2,01 (1,27 – 2,98)	1,76 (1,00 – 2,69)	1,77 (0,91 – 2,97)	2,35 (1,12 – 3,12)	0,317
Doentes	1,86 (1,32 – 3,39)	2,20 (1,46 – 5,46) **	2,31 (1,17 – 4,00)	2,311 (1,35 – 3,88)	0,286
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	5,11 (2,26 – 7,16)	4,68 (2,02 – 7,28)	3,17 (1,33 – 6,87)	6,34 (2,50 – 10,77) <sup>c)</sup>	< <b>0,05</b>
Doentes	3,95 (2,94 – 6,65)	10,73 (5,68 – 17,70) <sup>-)</sup> *****	5,94 (2,36 – 11,72)	7,69 (3,03 – 12,48) <sup>b)</sup>	< <b>0,001</b>

§ Resultado do teste de Friedman.

Teste de Wilcoxon para comparações *post-hoc* com o Basal do mesmo grupo: a)  $P < 0,001$ ; b)  $P < 0,005$ ; c)  $P < 0,05$ .

Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período do grupo de Controlos: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P = 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ;  $P < 0,0001$ .

Valores expressos em mediana (percentis 25 – 75).

**Quadro XI** - Resultados da prova de *handgrip* obtidos com a transformada de Hilbert-Huang (30 doentes e 29 controlos)

	Basal	1º minuto	2º minuto	3º minuto	<i>P</i> §
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	813,1 (261,3 – 2008,0)	400,2 (223,9 – 927,0)	474,4 (243,7 – 890,7)	613,4 (252,0 – 1176,3)	0,210
Doentes	339,4 (140,2 – 669,7) *	616,3 (222,7 – 1149,3) <sup>a)</sup>	308,3 (116,7 – 587,8)	283,8 (101,7 – 869,5)	< <b>0,01</b>
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	301,1 (148,5 – 476,0)	304,8 (125,9 – 448,5)	297,6 (89,3 – 537,1)	232,9 (91,4 – 459,3)	0,153
Doentes	87,0 (46,7 – 348,6) **	92,4 (67,6 – 397,7) **	68,4 (37,4 – 231,1) *	85,3 (31,8 – 226,5) **	< <b>0,05</b>
<b>LF/HF</b>					
Controlos	2,24 (1,41 – 4,23)	1,64 (0,97 – 3,19)	1,98 (1,28 – 4,88)	2,87 (1,71 – 4,37)	0,289
Doentes	2,73 (1,58 – 4,12)	3,36 (2,15 – 6,75) <sup>c)</sup> ****	3,34 (1,74 – 6,12)	3,36 (1,86 – 6,21) <sup>c)</sup>	< <b>0,05</b>
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>					
Controlos	5,97 (2,80 – 10,26)	4,80 (2,24 – 6,33)	4,14 (2,23 – 7,70)	3,97 (2,63 – 15,31)	0,062
Doentes	4,92 (3,10 – 8,52)	12,68 (7,90 – 18,45) <sup>-)</sup> ****	6,47 (3,09 – 13,76)	10,32 (3,47 – 18,54) <sup>b)</sup>	< <b>0,01</b>

§ Resultado do teste de Friedman.

Teste de Wilcoxon para comparações *post-hoc* com o Basal do mesmo grupo: a)  $P < 0,001$ ; b)  $P < 0,005$ ; c)  $P < 0,05$ .

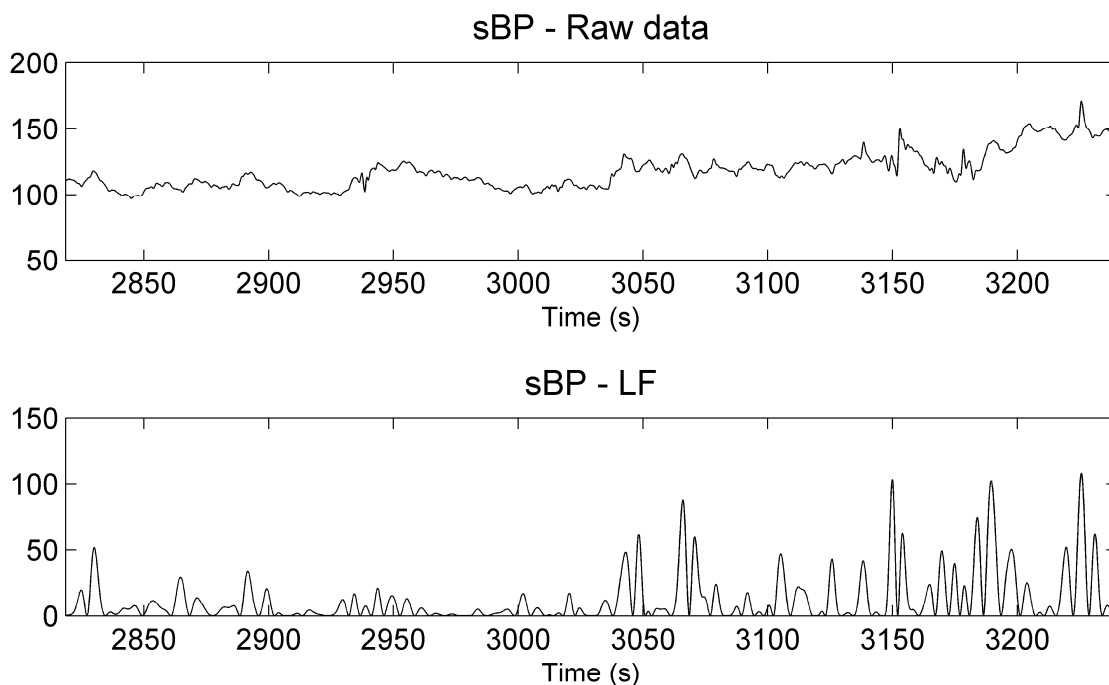
Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período do grupo de Controlos: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Valores expressos em mediana (percentis 25 – 75).

Não encontramos associação da menor potências das  $LF_{RR}$  observada no grupo de doentes durante o período basal com a existência de antecedentes de HTA, obesidade ou a qualquer dos restantes factores independentes, incluindo complicações da litíase renal, modo de tratamento ou qualquer das alterações urinárias relacionadas com a nefrolitíase. Também não relacionámos a maior potência das  $LF_{RR}$  durante o primeiro minuto de *handgrip* com os factores independentes já anteriormente mencionados.

#### *Variabilidade da pressão arterial sistólica*

Durante o período de *handgrip* observámos aumentos significativos da potência das  $LF_{PAS}$  em ambos os grupos. Os aumentos foram maiores no grupo de doentes e em dois períodos distintos: 1) durante o primeiro minuto de exercício isométrico, no qual a mediana da  $LF_{PAS}$  triplicou em relação ao valor basal do grupo (2x superior à mediana do grupo de controlos no mesmo período); 2) durante o terceiro minuto de prova (Figura 8). No grupo de controlos, o aumento das  $LF_{PAS}$  durante o *handgrip* foi significativo na análise com a transformada de *wavelets*. A análise *post hoc* mostrou que o aumento das  $LF_{PAS}$  no grupo de controlos foi significativo durante o último minuto da prova, em comparação com o valor observado durante o primeiro minuto ( $P < 0,05$ ).



**Figura 8** – Prova de *handgrip* característica dum doente com nefrolitíase. Pode observar-se o aumento das  $LF_{PAS}$  durante o primeiro minuto em comparação com o período basal (< 3000 s) e novo aumento nos últimos minutos da prova.



O grupo de doentes não apresentou diferenças significativas das  $LF_{PAS}$  entre subgrupos com e sem antecedentes conhecidos de HTA, de obesidade e qualquer dos restantes factores independentes em estudo. Observámos resultados idênticos quando comparámos os valores absolutos em cada minuto da prova e as variações da potência das  $LF_{PAS}$  entre cada minuto de *handgrip* e o valor basal.

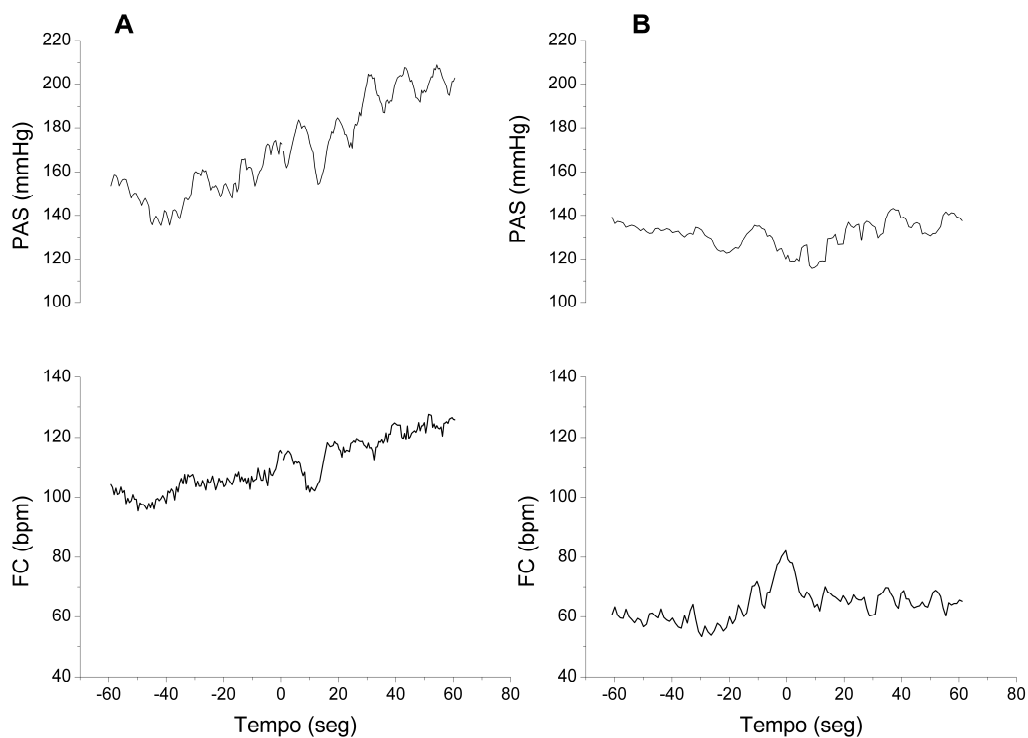
### ***Prova da aritmética mental***

Um dos indivíduos do grupo de controlos não efectuou a prova de aritmética mental por dificuldade em realizar os cálculos mentais em consequência de ansiedade.

### **Análises no domínio do tempo**

Durante o período basal, os valores da PA foram mais elevados nos doentes com nefrolitíase do que nos controlos. Não observámos diferenças significativas na FC durante este período (Quadro XII).

Observámos aumentos significativos da FC e da PA em resposta ao *stress* mental em ambos os grupos (Quadro XII). O valor máximo da PA durante a aritmética mental foi mais elevado no grupo de doentes mas a diferença da FC máxima não apresentou significado estatístico.



**Figura 9** – PAS e FC durante a aritmética mental. num doente com nefrolitíase (A) e prova normal dum controlo (B).

Não observámos diferenças significativas na variação da FC e da PAS entre doentes e de controlos. Com base nos aumentos da frequência cardíaca e/ou da PAS, a prova de aritmética mental apresentou alterações em 26/30 doentes e em 23/29 controlos ( $P = NS$ ).

No grupo de doentes, não observámos diferenças nos valores basais ou nos delta da FC e/ou da PAS entre doentes com e sem antecedentes de HTA. Também não encontramos diferenças em função da obesidade, antecedentes familiares de litíase renal, complicações, forma de tratamento ou alterações urinárias relacionadas com o risco de nefrolitíase.

**Quadro XII** – Variação dos parâmetros hemodinâmicos durante a prova de aritmética mental

	Basal			Aritmética mental		
	Doentes	Controlos	<i>P</i>	Doentes	Controlos	<i>P</i>
FC ( <i>bpm</i> )	81,9 ± 16,0	70,4 ± 12,9	< <b>0,05</b>	99,3 ± 16,5	91,7 ± 18,7	0,102
PAS ( <i>mmHg</i> )	132,1 ± 13,6	124,2 ± 14,8	< <b>0,005</b>	158,0 ± 20,1	144,0 ± 14,2	< <b>0,005</b>
PAD ( <i>mmHg</i> )	91,2 ± 9,4	81,3 ± 9,6	< <b>0,001</b>	111,0 ± 14,1	98,1 ± 11,4	< <b>0,001</b>

$P < 0,001$  em todas as comparações entre Basal e Aritmética Mental.

## **Análises no domínio do tempo-frequência**

### *Variabilidade da frequência cardíaca*

As análises da prova de aritmética mental no domínio do tempo-frequência demonstraram uma menor variabilidade da FC durante o período basal nos doentes com litíase renal do que nos controlos, como se pode verificar pela menor potência das LF<sub>RR</sub> e das HF<sub>RR</sub> (Quadro XIII).

Durante o minuto de aritmética mental observámos aumentos significativos das LF<sub>RR</sub> e da relação LF/HF no grupo de doentes em relação ao registo basal. Estes aumentos não apresentaram significado estatístico no grupo de controlos. Neste período não existiu variação significativa da potência das HF<sub>RR</sub> em nenhum dos grupos em comparação com o registo basal.

**Quadro XIII** – Variabilidade cardiovascular durante a prova da aritmética mental de acordo com a transformada de *wavelets*

	<b>Basal</b>	<b>Aritmética mental</b>	<b>P<sup>§</sup></b>
LF <sub>RR</sub> (ms <sup>2</sup> )			
Doentes	234,4 (108,0 – 554,6) <sup>a)</sup>	737,4 (273,0 – 554,6)	< <b>0,001</b>
Controlos	643,0 (225,0 – 1507,2)	966,7 (406,0 – 1324,1)	0,115
HF <sub>RR</sub> (ms <sup>2</sup> )			
Doentes	92,0 (49,6 – 426,6) <sup>a)</sup>	204,5 (68,5 – 580,3)	0,221
Controlos	320,7 (143,2 – 558,9)	290,4 (149,2 – 553,0)	0,121
LF/HF			
Doentes	1,91 (1,05 – 2,98)	3,07 (1,84 – 5,11)	< <b>0,005</b>
Controlos	1,65 (1,03 – 3,06)	2,67 (1,80 – 4,42)	0,190
LF <sub>PAS</sub> (mmHg <sup>2</sup> )			
Doentes	5,62 (2,80 – 9,07)	20,79 (8,73 – 44,86) <sup>b)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	3,69 (2,72 – 9,21)	8,11 (5,01 – 14,92)	< <b>0,05</b>

<sup>§</sup> Teste de Wilcoxon para comparação com basal do mesmo grupo.

Teste de Mann-Whitney para comparações entre Doentes e Controlos na mesma fase da prova: a)  $P < 0,05$ ; b)  $P < 0,001$ .

Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

Os resultados obtidos com a transformada de Hilbert-Huang confirmaram as diferenças identificadas entre doentes e controlos na análise de *wavelets* (Quadro XIV).

**Quadro XIV** – Variabilidade cardiovascular na prova de aritmética mental de acordo com a transformada de Hilbert-Huang

	<b>Basal</b>	<b>Aritmética mental</b>	<b>P<sup>§</sup></b>
LF <sub>RR</sub> (ms <sup>2</sup> )			
Doentes	249,3 (141,3 – 666,9) <sup>a)</sup>	825,4 (217,9 – 2230,8)	< <b>0,001</b>
Controlos	688,4 (263,1 – 2252,0)	1091,6 (502,7 – 1330,1)	0,405
HF <sub>RR</sub> (ms <sup>2</sup> )			
Doentes	75,4 (38,3 – 396,4) <sup>a)</sup>	211,5 (44,9 – 477,8)	0,229
Controlos	297,7 (98,8 – 560,9)	298,1 (132,3 – 586,5)	0,284
LF/HF <sub>RR</sub>			
Doentes	2,48 (1,53 – 4,57)	3,68 (2,99 – 5,37)	< <b>0,01</b>
Controlos	2,64 (1,39 – 4,84)	3,74 (1,75 – 5,07)	0,369
LF <sub>PAS</sub> (mmHg <sup>2</sup> )			
Doentes	6,89 (3,92 – 11,8)	26,07 (13,608 – 69,01) <sup>b)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	4,87 (3,11 – 8,85)	14,49 (4,68 – 18,77)	= <b>0,001</b>

<sup>§</sup> Teste de Wilcoxon para comparação com o basal do mesmo grupo.

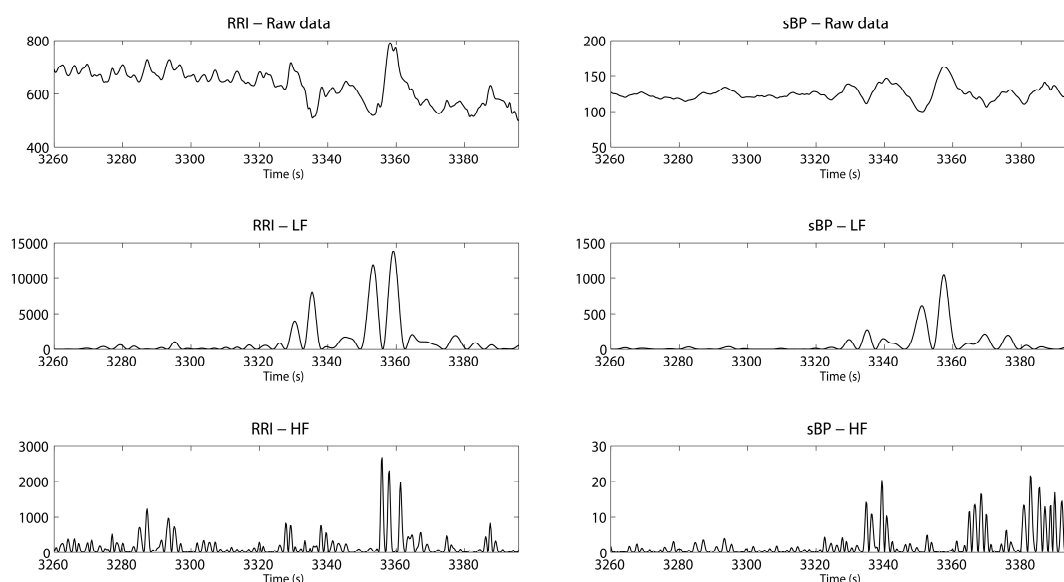
Teste de Mann-Whitney para comparações entre Doentes e Controlos na mesma fase da prova: a)  $P < 0,05$ ; b)  $P = 0,001$ .

Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

### *Variabilidade da pressão arterial sistólica*

No registo basal não observámos diferença na potência das  $LF_{PAS}$  entre doentes e controlos. A aritmética mental desencadeou um aumento significativo da potência das  $LF_{PAS}$  nos dois grupos, mais intenso nos doentes com nefrolitíase, nos quais esta potência aumentou cerca de quatro vezes em relação ao valor basal.

O aumento da PAS durante a aritmética mental correlacionou-se directamente com a variação das  $LF_{PAS}$  nos doentes com litíase renal e grupo de controlos. No entanto, o índice de correlação foi mais elevado nos doentes ( $r = 0,665$ ;  $P < 0,001$ ) do que nos controlos ( $r = 0,368$ ;  $P < 0,05$ ). A Figura 10 demonstra a relação do aumento da potência das  $LF_{PAS}$  com o aumento da PAS na prova de aritmética mental num doente com litíase renal.



**Figura 10** – Wavelets da prova de aritmética mental num doente com nefrolitíase. Início da aritmética aos 3330 segundos.

Não observámos diferenças das  $LF_{RR}$ , relação  $LF/HF$  ou  $LF_{PAS}$  entre doentes com e sem antecedentes de HTA, obesidade, antecedentes familiares de litíase renal, complicações, forma de tratamento ou alterações urinárias relacionadas com o risco de nefrolitíase.

### **Provas para estudo do Sistema Nervoso Parassimpático**

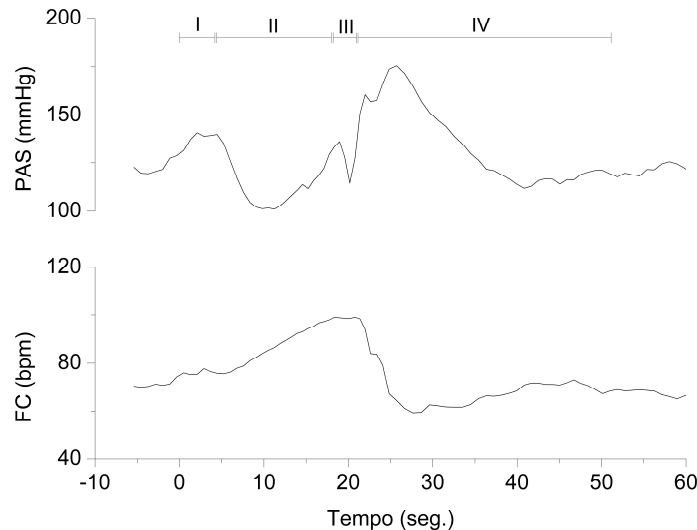
#### ***Manobra de Valsalva***

#### **Análise no domínio do tempo**

A manobra de Valsalva desencadeou uma descida da pressão arterial associada a aumento da FC durante o esforço expiratório (fase II), seguida de aumento da PA e diminuição

significativa da FC imediatamente após o final do esforço expiratório (período pós-Valsalva ou fase IV) (ver Figura 11). Observámos o valor mínimo da FC nos dois grupos durante os primeiros 30 segundos do período pós-Valsalva.

A FC foi significativamente mais elevada no grupo de doentes com litíase renal, em relação aos controlos, na fase II ( $P = 0,01$ ) e na fase IV ( $P = 0,01$ ) (Figura 12).



**Figura 11** – Variação da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC) durante a manobra de Valsalva num doente com litíase renal, com identificação das diferentes fases da prova.

Não observámos diferença na mediana do rácio de Valsalva (VR) entre doentes e controlos [mediana: 1,55 (1,34 – 1,81) vs. 1,48 (1,34 – 1,91), respectivamente;  $P = NS$ ].

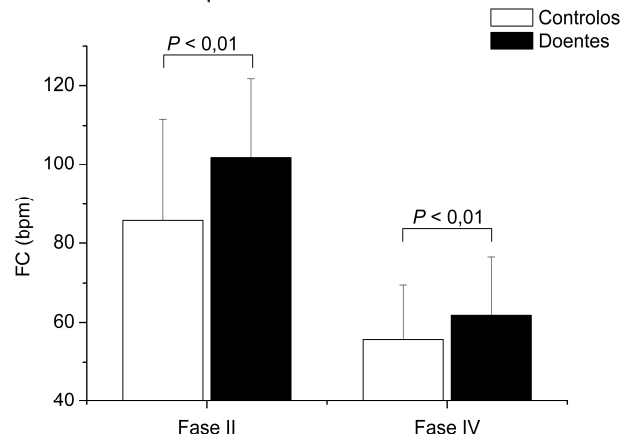
O VR, aferido para a idade, foi normal em 29/30 controlos (96,7%) e em 28/30 doentes (93,3%) ( $P = NS$ ). Os dois doentes com nefrolitíase com VR diminuído eram diabéticos.

## **Análises no domínio do tempo-frequência**

### *Variabilidade da frequência cardíaca*

No período basal, a potência das  $HF_{RR}$  foi significativamente menor no grupo de doentes do que nos controlos. Não observámos diferenças nos valores basais das  $LF_{RR}$  e da relação  $LF/HF$  (Quadro XV).

Durante a manobra de Valsalva, observámos um aumento significativo das  $LF_{RR}$  no grupo de doentes em relação ao período basal. No grupo de controlos, o aumento da  $LF_{RR}$  não apresentou significado estatístico.



**Figura 12** – Comparação da frequência cardíaca nas fases II e IV da manobra de Valsalva entre doentes e controlos. Dentro de cada grupo, a variação da FC da fase II para a fase IV foi significativa nos dois grupos ( $P < 0,001$ ). As colunas indicam mediana e as barras de erro as amplitudes interquartis.

Nos primeiros 30 segundos pós-Valsalva (correspondente à fase IV) observámos um aumento significativo da potência das  $LF_{RR}$  e das  $HF_{RR}$  em ambos os grupos, em relação ao período basal. No grupo de doentes, no período pós-Valsalva observámos um aumento significativo da relação LF/HF.

Os intervalos de tempo (15 segundos) utilizados na análise dos resultados da manobra de Valsalva não permitiram obter resultados interpretáveis com a transformada de Hilbert-Huang.

No grupo de doentes, a potência das  $HF_{RR}$  durante o período basal foi menor no subgrupo com obesidade do que nos não obesos [mediana: 65,3 (41,5 – 238,8) vs. 176,6 (97,7 – 593,1), respectivamente;  $P < 0,05$ ). A exclusão dos doentes obesos da análise determinou que a diferença da potência das  $HF_{RR}$  entre doentes e controlos no período basal não apresentasse significado estatístico [mediana: 392,6 (151,7 – 862,8) vs. 176,6 (93,7 – 593,1), respectivamente;  $P = NS$ ). Observámos que no grupo de doentes a potência das  $HF_{RR}$  durante o período basal era negativamente correlacionada com o IMC ( $r = -0,404$ ;  $P < 0,05$ ).

Durante o período pós-Valsalva, a relação LF/HF foi significativamente menor nos doentes com antecedentes de HTA do que nos doentes normotensos [mediana: 1,02 (0,54 – 9,69) vs. 6,51 (2,37 – 22,78), respectivamente;  $P < 0,05$ ] (Figura 13). Não observámos diferenças significativas da relação LF/HF em função dos restantes factores independentes em estudo, nomeadamente de antecedentes familiares de litíase renal, de complicações da doença, da forma de tratamento, dos indicadores de actividade e de alterações urinárias relacionadas com o risco de nefrolitíase.

**Quadro XV** – Resultados da análise da manobra de Valsalva utilizando a análise de *wavelets* (30 doentes e 30 controlos)

	Basal	Valsalva	Período pós-Valsalva	<i>P</i> §
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>				
Doentes	430,9 (151,5 – 917,1)	1206,6 (313,1 – 3547,9) <sup>a)</sup>	1975,7 (1328,6 – 8784,2) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	968,7 (274,1 – 2048,1)	1267,1 (599,6 – 1904,9)	2862,1 (1311,5 – 4970,3) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>				
Doentes	121,7 (59,3 – 391,3) *	187,6 (48,0 – 429,9)	604,0 (146,0 – 3358,0) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	392,6 (151,7 – 862,8)	228,1 (102,7 – 500,0)	1151,9 (509,3 – 2583,2) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
<b>LF/HF<sub>RR</sub></b>				
Doentes	2,74 (1,81 – 3,77)	6,33 (3,01 – 14,81) <sup>b)</sup>	3,97 (1,00 – 13,92) <sup>d)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	2,51 (1,01 – 4,62)	5,45 (3,07 – 10,04) <sup>c)</sup>	2,32 (1,37 – 4,88)	< <b>0,001</b>
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>				
Doentes	4,67 (1,99 – 10,49)	39,88 (27,54 – 81,03) <sup>a)</sup>	40,62 (20,83 – 99,44) <sup>a)</sup> **	< <b>0,001</b>
Controlos	4,93 (3,07 – 8,71)	36,54 (13,64 – 74,38) <sup>a)</sup>	16,22 (6,01 – 35,63) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>

§ Valor de *P* relativo ao teste de Friedman.

Comparações *post-hoc* com Basal utilizando teste de Wilcoxon: a) *P* < 0,001; b) *P* < 0,005; c) *P* = 0,001; d) *P* < 0,05.

Teste de Mann-Whitney para comparação Casos vs. Controlos na mesma fase da prova: \* *P* = 0,01; \*\* *P* < 0,005.

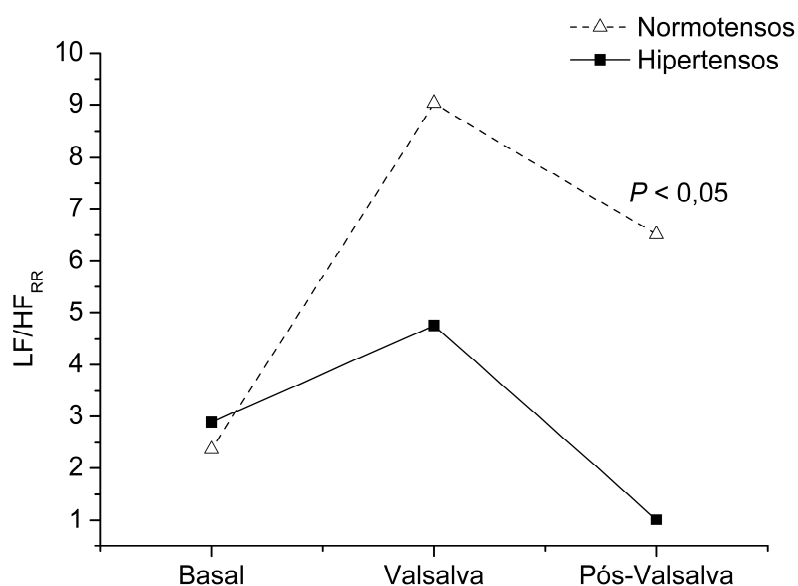
Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

### Variabilidade da pressão arterial sistólica

No período basal, não observámos diferença no componente de baixa frequência da variabilidade da PAS.

Durante a manobra de Valsalva verificámos um aumento das  $LF_{PAS}$  em ambos os grupos, em relação ao período basal, mas não observámos diferenças significativas nas potências deste componente entre os grupos. Nos primeiros 30 segundos do período pós-Valsalva observámos um grande aumento das  $LF_{PAS}$  em ambos os grupos. Nos doentes o aumento foi cerca de 10 vezes o valor observado durante o período basal e, nesta fase da prova, a potência das  $LF_{PAS}$  foi significativamente mais elevada em relação aos controlos.

Não observámos diferenças significativas na potência das  $LF_{PAS}$  durante o período pós-Valsalva nos doentes com ou sem antecedentes de HTA, em função da presença de obesidade, de antecedentes familiares de nefrolitíase, das forma de tratamento, de complicações da litíase, dos indicadores de actividade e das alterações urinárias relacionadas com o risco litogénico.



**Figura 13** – Relação LF/HF durante a manobra de Valsalva nos doentes com e sem antecedentes de hipertensão.



## ***Prova de Respiração Profunda Compassada***

### **Análise no domínio do tempo**

Na prova de respiração profunda compassada, a diferença média da FC entre a fase inspiratória (I) e a fase de expiratória (E), (expressa pelo R6), foi normal em 25/30 doentes com nefrolitíase (83,3%) e 27/30 controlos saudáveis (90,0%) ( $P = NS$ ).

No grupo de doentes, não relacionámos a observação do valor de R6 inferior ao normal com nenhum destes factores: antecedentes de HTA, obesidade, antecedentes familiares de litíase renal, complicações, forma de tratamento, indicadores de actividade e alterações urinárias relacionadas com a litíase renal.

### **Análises no domínio do tempo/frequência**

#### *Variabilidade da frequência cardíaca*

No período basal, as análises efectuadas com a transformada de *wavelets* demonstraram menor variabilidade da frequência cardíaca no grupo de doentes do que nos controlos, manifestada por menor potência das  $LF_{RR}$  e  $HF_{RR}$  (Quadro XVI). Nos resultados analisados com a transformada de Hilbert-Huang, observámos diferença significativa na potência das  $HF_{RR}$  entre os doentes e os controlos (Quadro XVII).

Durante a respiração profunda compassada observámos um aumento significativo da potência das  $LF_{RR}$ , cerca de 10 vezes superior ao valor basal. Com esta prova, verificámos aumento nos dois grupos, o que traduziu o aumento normal da actividade parassimpática durante a respiração profunda compassada. A variação das  $LF_{RR}$  entre o período basal e o período em respiração profunda foi significativamente menor no grupo de doentes ( $P < 0,05$ ). Este resultado foi confirmado pelos dois algoritmos utilizados na análise dos resultados.

No grupo de doentes, verificámos que a variação das  $LF_{RR}$  entre o período basal e a respiração profunda foi significativamente menor no subgrupo de doentes hiperuricosúricos em relação aos doentes com excreção de ácido úrico normal [mediana: 1670,1 (920,8 – 3390,7) vs. 5733,4 (3645,9 – 11110,9)  $ms^2$ , respectivamente;  $P < 0,005$ ]. Após exclusão da análise dos doentes hiperuricosúricos, as diferenças na variação das  $LF_{RR}$  entre doentes e controlos deixaram de ter significado estatístico.

Não observámos diferenças na potência das  $LF_{RR}$  relacionadas com a existência de outras alterações metabólicas relacionadas com a nefrolitíase, tanto no período basal como durante a respiração profunda. Não observámos diferenças na potência das  $LF_{RR}$  relacionadas com a

existência de antecedentes de HTA, de obesidade, de antecedentes familiares de nefrolitíase, de complicações da litíase, da forma de tratamento e dos indicadores de actividade da doença.

#### *Variabilidade da pressão arterial sistólica*

Não observámos diferenças na potência das LF<sub>PAS</sub> nos dois grupos durante o período basal. Durante a respiração profunda verificámos um aumento significativo da LF<sub>PAS</sub> em ambos os grupos, em comparação com as potências basais. No entanto, não observámos diferenças com significado estatístico entre doentes e controlos durante o período basal e durante a respiração profunda.

**Quadro XVI** – Resultados da transformada *wavelets* na prova de respiração profunda (30 doentes e 30 controlos)

	<b>Basal</b>	<b>Respiração profunda</b>	<b>P<sup>§</sup></b>
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	199,5 (75,2 – 839,6) <sup>a)</sup>	3286,2 (1268,7 – 6864,7) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	599,2 (197,5 – 1338,3)	5657,1 (2875,9 – 11006,8)	< <b>0,001</b>
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	76,4 (51,8 – 221,3) <sup>b)</sup>	537,4 (92,9 – 944,7) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	448,9 (158,4 – 633,4)	819,1 (434,8 – 1593,1)	< <b>0,001</b>
<b>LF/HF</b>			
Doentes	1,78 (1,08 – 2,95)	7,21 (4,71 – 11,56)	< <b>0,001</b>
Controlos	1,66 (0,77 – 2,67)	7,41 (4,83 – 11,22)	< <b>0,001</b>
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	3,44 (1,91 – 7,21)	23,38 (7,58 – 65,60)	< <b>0,001</b>
Controlos	4,28 (1,84 – 5,55)	13,16 (7,44 – 22,26)	< <b>0,001</b>

§ Valor de P relativo ao teste de Wilcoxon.

Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período entre doentes e controlos: a) P < 0,05; b) P = 0,001.

Valores expressos em mediana (percentis 25 – 75).

**Quadro XVII** – Resultados da prova de respiração profunda analisados pela transformada de Hilbert-Huang (30 doentes e 30 controlos)

	<b>Basal</b>	<b>Respiração profunda</b>	<b>P<sup>§</sup></b>
<b>LF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	206,6 (90,4 – 1027,1)	4117,8 (1548,6 – 11184,0) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	632,7 (299,8 – 1450,4)	7105,9 (4025,5 – 16941,0)	< <b>0,001</b>
<b>HF<sub>RR</sub> (ms<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	75,9 (47,3 – 390,1) <sup>b)</sup>	437,2 (78,5 – 914,2) <sup>a)</sup>	< <b>0,001</b>
Controlos	479,2 (157,0 – 701,9)	923,3 (347,3 – 1554,1)	= <b>0,001</b>
<b>LF/HF</b>			
Doentes	2,56 (1,48 – 4,35) <sup>a)</sup>	10,04 (7,15 – 18,59)	< <b>0,001</b>
Controlos	1,56 (0,99 – 2,45)	10,13 (6,73 – 15,38)	< <b>0,001</b>
<b>LF<sub>PAS</sub> (mmHg<sup>2</sup>)</b>			
Doentes	3,39 (2,33 – 9,07)	27,47 (9,04 – 62,66)	< <b>0,001</b>
Controlos	4,61 (2,03 – 5,79)	15,48 (10,87 – 25,98)	< <b>0,001</b>

<sup>§</sup> Valor de *P* relativo ao teste de Wilcoxon.

Teste de Mann-Whitney para comparação com o mesmo período entre doentes e controlos: a) *P* < 0,05; b) *P* < 0,001.

Valores expressos em mediana (percentis 25 – 75).

### ***Resultados de acordo com o protocolo de Ewing modificado***

Concluíram o conjunto das cinco provas destinadas a avaliar a actividade autonómica de acordo com o protocolo de Ewing 29 dos 30 controlos.

Observámos alterações em um ou mais testes autonómicos nos doentes e nos controlos. O número de testes que apresentaram alterações foi maior no grupo de doentes, todos com duas ou mais provas alteradas (mediana = 3), enquanto no grupo de controlos a mediana do número de provas com alterações foi de 2 (*P* < 0,001).

Verificámos que as alterações foram mais frequentes nas provas em que a avaliação incidiu predominantemente no ramo simpático do SNA (*tilt*, *handgrip* e aritmética mental). As alterações consistiram no aumento mais intenso da actividade simpática em resposta aos diferentes estímulos. O número de provas em que observámos este aumento foi maior no grupo de doentes, dos quais 20 apresentaram alterações no conjunto das três provas e nos restantes 10 documentámos alterações em duas. No grupo de controlos, em 10 indivíduos

observámos alterações em três provas, em 16 indivíduos encontrámos alterações em apenas duas e nos 3 restantes alterações numa única prova ( $P < 0,01$ ).

O número de participantes em que observámos alterações em pelo menos uma das provas destinadas à avaliação da actividade do sistema nervoso parassimpático foi maior no grupo de doentes ( $n = 11$ ) do que no grupo de controlos ( $n = 3$ ) ( $P < 0,05$ ).

Quando as alterações das provas autonómicas foram codificadas de acordo com uma escala de gravidade e considerado o somatório do conjunto das cinco provas autonómicas, não encontrámos diferenças significativas no *score* de Ewing entre doentes e controlos [mediana: 5,0 (5,0 – 6,0) vs. 4,0 (4,0 – 6,0), respectivamente;  $P = \text{NS}$ ].

No grupo de doentes, o número de provas em que ocorreu hiperactividade simpática foi maior nos não obesos do que nos obesos ( $P < 0,05$ ). Observámos uma correlação negativa entre o número de provas com hiperactividade simpática e o IMC ( $r$  de Spearman = -0,494;  $P = 0,005$ ). Não encontrámos diferenças no número de provas em que ocorreu hiperactividade simpática em função da existência de: antecedentes familiares de nefrolitíase, antecedentes pessoais de HTA, complicações da litíase, forma de tratamento (incluindo realização de tratamentos com LEOC) e alterações urinárias relacionadas com o risco de litíase renal. Não observámos correlação do número de provas com hiperactividade simpática com os critérios de actividade da litíase renal, nomeadamente do número de episódios sintomáticos, do intervalo de tempo entre episódios e do tempo decorrido desde o último episódio até à realização das provas autonómicas.

Nos doentes com litíase renal, associámos a presença de hiperuricosúria com alterações em pelo menos uma das provas destinadas a avaliar o sistema nervoso parassimpático ( $P = 0,005$ ). Não observámos associação entre a presença de alterações nas provas destinadas a avaliar a actividade do parassimpático com a existência de antecedentes de obesidade, HTA ou qualquer dos restantes factores independentes em estudo.

No grupo de doentes, considerado o conjunto das três provas para avaliação da actividade simpática, o *score* de Ewing foi superior nos que apresentavam antecedentes familiares de litíase renal do que nos que não apresentavam aqueles antecedentes (mediana 5,0 vs. 4,0, respectivamente;  $P < 0,005$ ) e verificámos uma correlação negativa entre a idade do início das queixas clínicas da litíase renal e o *score* nas provas ( $r$  de Spearman = -0,465;  $P = 0,01$ ). O *score* do conjunto das provas simpáticas também foi menor nos doentes com complicações renais da nefrolitíase em relação aos doentes sem complicações (mediana 3,0 vs. 5,0, respectivamente;  $P < 0,05$ ).

No grupo de doentes, considerando o conjunto das cinco provas, não verificámos diferenças no valor *score* de Ewing em função da existência de antecedentes de HTA, de obesidade, de antecedentes familiares de nefrolitíase, de complicações, da forma de tratamento (incluindo a realização de tratamentos de LEOC) e de alterações metabólicas relacionadas com a litíase renal.

### 5.1.2 Análise da Sensibilidade dos Baroreceptores

O tempo médio dos registos em decúbito na análise da sensibilidade dos baroreceptores foi  $301,3 \pm 0,7$  segundos. Em dois participantes, um doente (159 segundos) e um controlo (219 segundos) analisámos registos com duração inferior por existirem artefactos no traçado. O número médio de rampas de pressão arterial sistólica/indivíduo foi de  $47 \pm 25$ , que determinaram uma média de  $32 \pm 19$  episódios de BRS/indivíduo. O número total de rampas de PAS e o número total de episódios de BRS foram significativamente mais elevados no grupo de doentes (Quadro XVIII).

No conjunto dos episódios de BRS de subida e de descida, não observámos diferenças no valor médio do declive das linhas de regressão do intervalo RR em função da PAS. No entanto, o declive das rampas de descida foi significativamente menor no grupo de doentes nos episódios de BRS sem atraso (*Lag* 0) e nos episódios com atraso de 1 ciclo cardíaco (*Lag* 1).

Não observámos diferença no BEI entre os dois grupos. No grupo de controlos, identificámos quatro indivíduos com menos de 10 rampas de PAS e três deles apresentaram um valor do BEI muito reduzido (inferior a 40%). Após a exclusão destes controlos da análise, continuou a não existir diferença significativa entre doentes e controlos.

O declive das rampas de descida *Lag* 0 foi menor nos doentes hiperuricosúricos em comparação com aqueles em que a excreção urinária de ácido úrico era normal [mediana: 9,3 (5,8 – 13,3) vs. 15,6 (12,7 – 20,4) ms/mmHg, respectivamente;  $P < 0,05$ ]. Quando os doentes hiperuricosúricos foram excluídos da análise, a diferença do declive das rampas de descida *Lag* 0 entre doentes e controlos não apresentou significado estatístico.

O declive das rampas de descida *Lag* 1 foi menor nos doentes que apresentaram complicações da litíase renal comparativamente com os doentes sem complicações [mediana: 7,0 (4,6 – 8,9) vs. 14,4 (8,5 – 20,3) ms/mmHg, respectivamente;  $P = 0,01$ ]. Após exclusão da análise dos doentes com complicações da nefrolitíase, as diferenças do declive das rampas de descida *Lag* 1 entre doentes e controlos não apresentaram significado estatístico.

Não observámos diferenças no declive das rampas de descida (com ou sem atraso) em função da existência de antecedentes de HTA, obesidade ou outros factores em estudo.

No grupo de doentes, não observámos diferenças do número total de rampas de PAS, do número total de episódios de BRS e do BEI em função dos factores independentes em estudo.

**Quadro XVIII** – Resultados da análise da sensibilidade dos baroreceptores pelo método sequencial

	<b>Controlos</b> ( <i>n</i> = 30)	<b>Doentes</b> ( <i>n</i> = 30)	<b><i>P</i></b>
Nº rampas PAS	38 (18 – 56)	54 (34 – 79)	< <b>0,05</b>
Nº episódios BRS	23 (14 – 35)	35 (22 – 52)	< <b>0,01</b>
BEI (%)	74 (59 – 82)	71 (53 – 85)	1,000
<i>Slope</i> (ms/mmHg)			
<i>Lag 0</i>			
Subida	17,2 (10,2 – 24,2)	12,8 (7,8 – 21,0)	0,200
Descida	18,0 (10,4 – 22,1)	12,2 (7,3 – 16,5)	< <b>0,05</b>
Total	15,1 (10,6 – 20,0)	12,8 (7,6 – 22,0)	0,065
<i>Lag 1</i>			
Subida	15,1 (10,5 – 20,5)	11,7 (7,5 – 21,0)	0,461
Descida	15,6 (10,7 – 22,0)	10,1 (7,0 – 17,0)	< <b>0,05</b>
Total	15,1 (10,6 – 20,0)	12,8 (7,6 – 22,0)	0,152
<i>Lag 2</i>			
Subida	14,9 (6,7 – 25,8)	12,0 (6,0 – 19,2)	0,491
Descida	12,3 (7,4 – 19,6)	12,1 (7,1 – 18,5)	0,956
Total	16,2 (9,5 – 23,8)	12,2 (6,5 – 19,5)	0,121

Teste de Mann-Whitney.

Resultados expressos em mediana (percentis 25 – 75).

## 5.2 Resultados das experiências em modelos animais

### 5.2.1 Modelo de ratos Zucker obesos

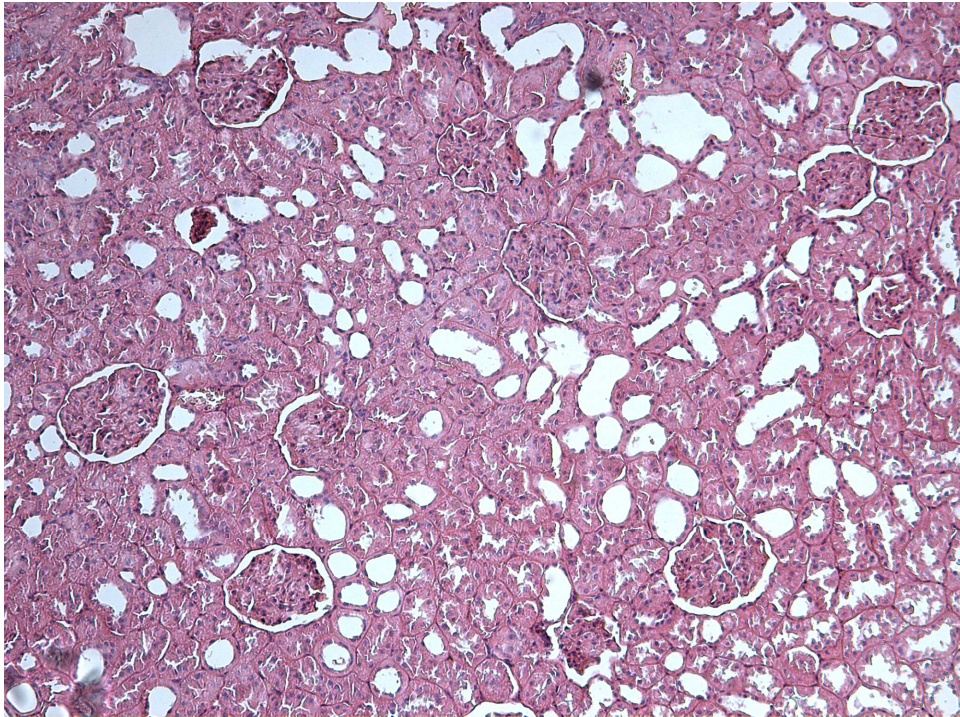
Os ratos Zucker adultos desenvolveram obesidade apreciável: as experiências foram efectuadas com idade compreendida entre 19 e 27 semanas e o peso de  $592,1 \pm 14,1$  g.

O consumo de alimentos, peso das fezes, volume de água ingerida, diurese e outras variáveis analisadas nos ratos Zucker obesos encontram-se resumidas no Quadro XIX. A função renal e restantes parâmetros bioquímicos encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie. A PA e a FC corresponderam aos valores descritos na literatura para esta estirpe de ratos [241;242].

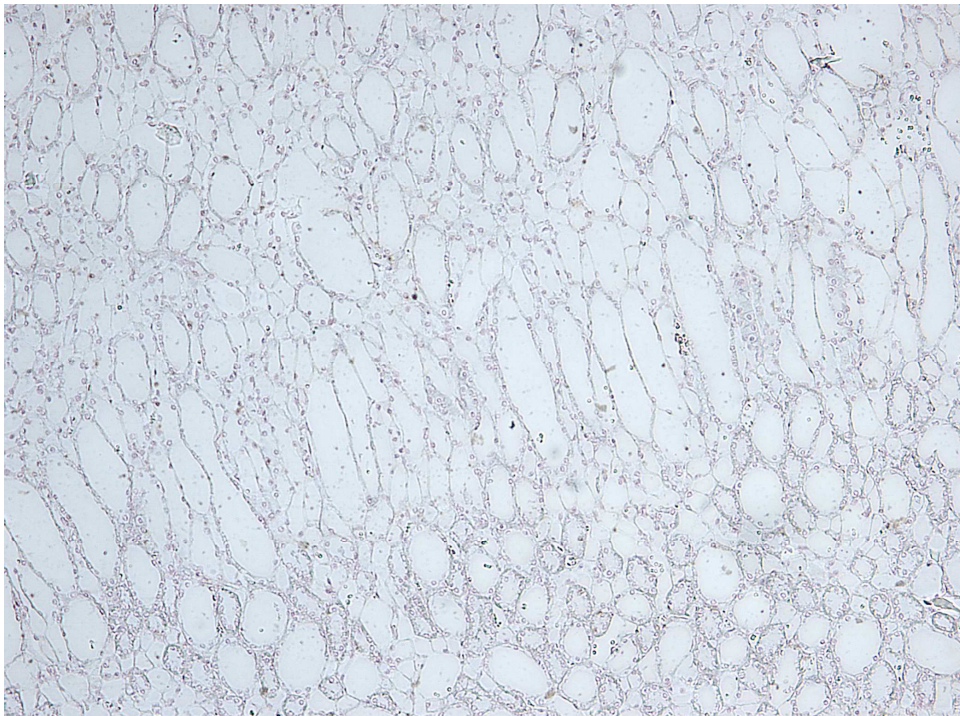
A análise histológica demonstrou que os rins dos ratos Zucker obesos apresentavam um acentuado aumento das dimensões dos glomérulos. No entanto, nenhum destes animais desenvolveu cálculos renais, nem alterações dos túbulos ou do interstício compatíveis com obstrução (Figura 14). As colorações de Gomori e von Kossa confirmaram a ausência de depósitos cristalinos de uratos e de cálcio, respectivamente. Na Figura 15 pode observar-se a medula normal de um rato Zucker obeso; nesta figura, a coloração de von Kossa torna evidente a ausência de cristais contendo cálcio.

Quadro XIX – Características dos ratos Zucker

	<b>Zucker obesos</b> <b>(n = 7)</b>
Idade ( <i>semanas</i> )	$21,7 \pm 1,1$
Peso ( <i>g</i> )	$592,1 \pm 14,1$
Alimento consumido ( <i>g/dia</i> )	$34,7 \pm 6,5$
Peso fezes ( <i>g/dia</i> )	$6,6 \pm 1,0$
Água ingerida ( <i>ml/dia</i> )	$22,0 \pm 5,2$
Diurese ( <i>ml/dia</i> )	$11,5 \pm 0,2$
pH urina	$7,0 \pm 0,4$
Creatinina ( $\mu\text{mol/l}$ )	$10,6 \pm 17,7$
Clearance da creatinina ( <i>ml/min</i> )	$7,2 \pm 0,8$
PA média ( <i>mmHg</i> )	$139 \pm 6$
Frequência cardíaca ( <i>bpm</i> )	$372 \pm 20$



**Figura 14** – Córtex renal de um rato Zucker obeso. Observam-se glomérulos aumentados de volume. Os túbulos e o interstício não apresentam alterações (Hematoxilina-Eosina, ampliação 100x).



**Figura 15** – Medula renal de um rato obeso demonstrando a ausência de cálculos ou cristais (von Kossa; ampliação 10x).



### 5.2.2 Resultados do modelo de nefrolitíase experimental induzida por calcitriol e etileno glicol

Dos 20 ratos Wistar que desenvolveram nefrolitíase, 7 (35%) apresentaram insuficiência renal grave (creatinina sérica entre 152 e 450  $\mu\text{mol/L}$ ). Não encontramos relação da gravidade da insuficiência renal com a duração do tratamento: 3/7 ratos foram tratados durante quatro semanas e 4/7 durante 2 semanas ( $P = 1,000$ ). Excluímos os resultados dos ratos com insuficiência renal grave da análise principal mas posteriormente utilizámos os resultados desse grupo para comparações adicionais entre ratos com nefrolitíase com e sem insuficiência renal. Assim, os ratos que permaneceram no grupo com nefrolitíase ( $n = 13$ ) apresentaram creatinina sérica  $\leq 103 \mu\text{mol/L}$ , sete foram tratados durante duas semanas e seis durante quatro semanas.

Os ratos com nefrolitíase apresentaram ingestão de água e diurese significativamente mais elevados quando comparados com os controlos. Não observámos outras diferenças significativas nas características gerais dos dois grupos (Quadro XX).

A creatinina sérica, comparativamente com os controlos, era ligeiramente mais elevada no grupo com nefrolitíase mas as análises bioquímicas não mostraram diferenças significativas nos outros parâmetros séricos entre os dois grupos. Os ratos tratados com calcitriol e etileno glicol apresentaram um aumento significativo da excreção urinária de cálcio e de oxalato comparativamente com os ratos do grupo de controlos. O pH, a densidade da urina, e a excreção urinária de fosfato e ácido úrico foram significativamente menores nos ratos com nefrolitíase (Quadro XXI).

Quadro XX – Características basais dos ratos Wistar que permaneceram no estudo

	Controlos ( $n = 14$ )	Nefrolitíase ( $n = 13$ )	<i>P</i>
Idade (semanas)	20,0 $\pm$ 1,1	21,4 $\pm$ 1,5	0,463
Sexo (machos: fêmeas)	10:4	9:4	1,000
Peso (g)	404 $\pm$ 25	357 $\pm$ 30	0,231
Alimento (g/24 h)	21,4 $\pm$ 1,5	20,1 $\pm$ 8,9	0,635
Fezes (g/24 h)	8,2 $\pm$ 0,8	7,8 $\pm$ 0,9	0,713
Água ingerida (ml/24 h)	33,9 $\pm$ 3,6	54,4 $\pm$ 3,9	<b>&lt; 0,001</b>
Volume urina (ml/24h)	11,1 $\pm$ 0,6	31,8 $\pm$ 3,4	<b>&lt;0,001</b>

**Quadro XXI** – Resultados laboratoriais dos ratos dos grupos de controlo e de nefrolitíase

	Controlos (n = 14)	Nefrolitíase (n = 13)	P
Creatinina sérica ( $\mu\text{mol/L}$ )	34 $\pm$ 4	79 $\pm$ 6	<b>&lt;0,001</b>
Cálcio sérico ( $\text{mmol/L}$ )	2,15 $\pm$ 0,05	2,25 $\pm$ 0,02	0,058
Fósforo sérico ( $\text{mmol/L}$ )	2,23 $\pm$ 0,13	2,84 $\pm$ 0,29	0,071
Ácido úrico sérico ( $\mu\text{mol/L}$ )	68 $\pm$ 18	108 $\pm$ 28	0,221
Sódio sérico ( $\text{mmol/L}$ )	143 $\pm$ 2	138 $\pm$ 3	0,096
Potássio sérico ( $\text{mmol/L}$ )	4,2 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,4	0,067
Cloro sérico ( $\text{mmol/L}$ )	106 $\pm$ 2	103 $\pm$ 2	0,246
Clearance creatinina normalizada ( $\text{ml/min/100 g peso corporal}$ )	0,73 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,05	<b>&lt;0,001</b>
pH urina	8,2 $\pm$ 0,8	7,8 $\pm$ 3,3	<b>0,003</b>
Densidade urinária	1047 $\pm$ 3	1017 $\pm$ 2	<b>&lt;0,001</b>
Cálcio urinário ( $\text{mmol/24 h}$ )	0,038 $\pm$ 0,004	0,098 $\pm$ 0,016	<b>0,004</b>
Oxalato urinário ( $\text{mmol/24 h}$ )	0,006 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,004	<b>0,045</b>
Fosfato urinário ( $\text{mmol/24 h}$ )	0,008 $\pm$ 0,002	0,003 $\pm$ 0,001	<b>0,021</b>
Ácido úrico urinário ( $\text{mmol/24 h}$ )	0,012 $\pm$ 0,000	0,006 $\pm$ 0,000	<b>&lt;0,005</b>

Não observámos diferenças na excreção de catecolaminas na urina das 24 horas entre ratos com nefrolitíase e controlos (Quadro XXII).

**Quadro XXII** – Catecolaminas urinárias

	Controlos (n = 14)	Nefrolitíase (n = 13)	P
Catecolaminas totais( $\mu\text{g/24 h}$ )	8,2 $\pm$ 2,1	7,7 $\pm$ 1,8	0,843
Norepinefrina ( $\mu\text{g/24 h}$ )	0,93 $\pm$ 0,17	0,64 $\pm$ 0,17	0,250
Epinefrina ( $\mu\text{g/24 h}$ )	0,16 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,03	0,198
Dopamina ( $\mu\text{g/24 h}$ )	7,1 $\pm$ 2,0	6,9 $\pm$ 1,7	0,945

### **Análise histológica do tecido renal**

Todos os ratos tratados com calcitriol e etileno glicol desenvolveram nefrolitíase, com numerosos depósitos intra-tubulares de cristais, agregados de cristalinos e cálculos aderentes às papilas renais (Figura 16). As alterações histológicas incluíram ainda dilatação dos tubos renais e fibrose intersticial.

Nos ratos do grupo com nefrolitíase e creatinina normal e naqueles cujo valor de creatinina era ligeiramente elevado mas não levou à exclusão da análise, não observámos alterações significativas dos glomérulos. Nos ratos deste grupo que desenvolveram insuficiência renal mais grave (creatinina sérica > 150  $\mu\text{mol/L}$ ), o exame histológico revelou glomerulosclerose segmentar escassa, atrofia tubular e denso infiltrado inflamatório associado a fibrose intensa do interstício. Não observámos lesões significativas dos vasos renais nos ratos com nefrolitíase.

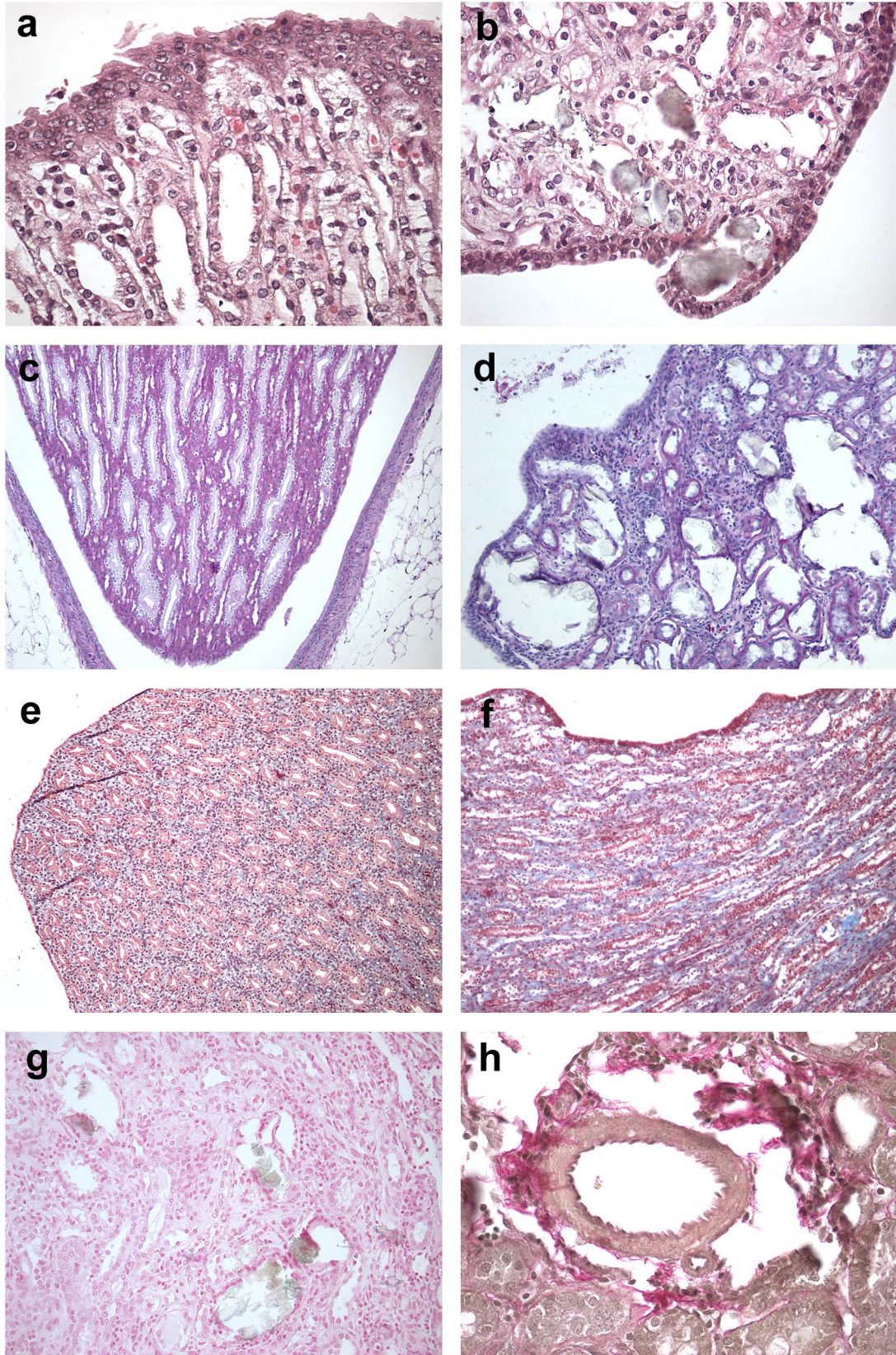
No grupo de controlos, não observámos cálculos renais ou alterações túbulo-intersticiais em nenhum dos rins.

### **Análise de variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial**

Não observámos diferenças nos valores basais da FC e da PA entre os grupos com nefrolitíase e de controlo. A frequência respiratória foi menor nos ratos que desenvolveram cálculos renais (diferença:  $20 \pm 6$  cpm;  $P < 0,005$ ).

A análise da variabilidade da FC mostrou que a potência das  $LF_{RR}$  foi significativamente menor nos ratos com nefrolitíase em relação aos controlos, tanto em valor absoluto como em unidades normalizadas. Não observámos variações significativas das  $HF_{RR}$  comparadas em valor absoluto, mas as  $HF_{RR}$  expressas em unidades normalizadas foram significativamente mais elevadas no grupo com nefrolitíase. Nos ratos com nefrolitíase, a relação LF/HF foi menor comparativamente com os controlos (Quadro XXIII).

Não verificámos diferença na variabilidade da PAM entre ratos com nefrolitíase e controlos. Nos ratos com litíase renal, não observámos diferenças da variabilidade da FC ou da PAM entre animais tratados durante duas e quatro semanas.



**Figura 16** – Histologia dos rins dos ratos de controle e com litíase renal.

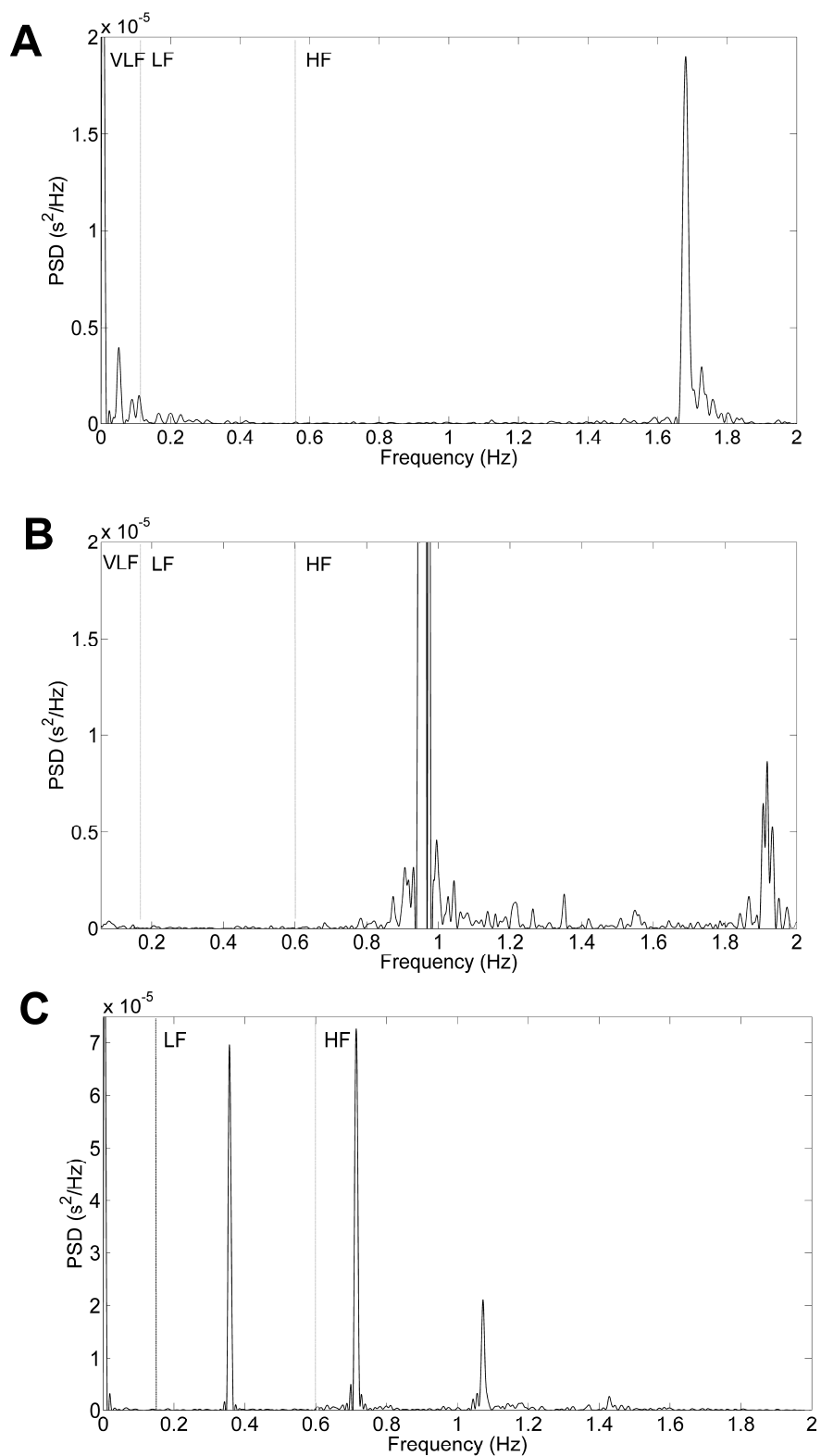
Legenda da Figura 16: **(a)** Medula renal normal num rato de controlo (Hematoxilina-Eosina, ampliação 400x); **(b)** múltiplos cálculos junto da papila, dilatação tubular, achatamento e atrofia das células tubulares, e lesão do urotélio num rato com nefrolitíase (Hematoxilina-Eosina, ampliação 400x); **(c)** Coloração pelo Periodic acid-Schiff (PAS) dum rim de controlo (ampliação 400x); **(d)** rim de rato com nefrolitíase revelando espessamento e pregueamento das membranas basais dos tubos renais, associado a intenso infiltrado inflamatório do interstício por células mononucleadas (coloração PAS, ampliação 400x); **(e)** coloração pelo tricrómio de Masson mostra ausência de fibrose no rim dum rato de controlo (ampliação 50x); **(f)** rim de rato com nefrolitíase revelando distorção da medula renal em consequência da presença de múltiplos cálculos associada a fibrose moderada, mais proeminente na proximidade de tubos lesados (tricrómio de Masson, ampliação 50x); **(g)** a coloração castanha pelo método de von Kossa confirma a presença de cálcio nos cálculos renais num rim de rato do grupo de nefrolitíase (ampliação 200x); **(h)** uma pequena artéria e arteríola coradas pela técnica de Verhoeff demonstram a ausência de lesões vasculares no rim dum rato com nefrolitíase (ampliação 400x).

**Quadro XXIII** – Análises de variabilidade cardiovascular obtidos com a transformada de Fourier

	Controlos ( <i>n</i> = 14)	Nefrolitíase ( <i>n</i> = 13)	<i>P</i>
Pressão arterial média ( <i>mmHg</i> )	116 ± 3	109 ± 4	0,281
Frequência cardíaca ( <i>bpm</i> )	405 ± 10	373 ± 16	0,100
Frequência respiratória ( <i>cpm</i> )	81 ± 4	61 ± 13	<b>0,002</b>
LF <sub>RR</sub> ( <i>s</i> <sup>2</sup> )	0,030 ± 0,005	0,014 ± 0,003	<b>0,010</b>
LF <sub>RR</sub> ( <i>n.u.</i> )	7,2 ± 1,0	4,1 ± 1,0	<b>0,037</b>
HF <sub>RR</sub> ( <i>s</i> <sup>2</sup> )	0,519 ± 0,120	0,738 ± 0,348	0,544
HF <sub>RR</sub> ( <i>n.u.</i> )	92,8 ± 1,0	95,9 ± 1,0	<b>0,037</b>
LF/HF	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01	<b>0,042</b>
LF <sub>PAM</sub> ( <i>mmHg</i> <sup>2</sup> )	2,35 ± 0,60	2,17 ± 0,54	0,823
LF <sub>PAM</sub> ( <i>n.u.</i> )	46,8 ± 5,1	33,5 ± 6,2	0,106

A comparação dos resultados da variabilidade da FC dos ratos do grupo com nefrolitíase e creatinina ≤ 103 μmol/L com os resultados dos ratos excluídos da análise principal por terem desenvolvido insuficiência renal grave mostrou as seguintes diferenças: *a)* a potência das LF<sub>RR</sub> foi significativamente mais elevada nos ratos com insuficiência renal [mediana: 3,2 (1,6 – 5,7) vs. 14,0 (5,4 – 21,3) n.u.; *P* < 0,001]; *b)* a potência das HF<sub>RR</sub> foi menor nos ratos com insuficiência renal [mediana: 96,8 (94,3 – 98,4) vs. 86,0 (78,6 – 94,6) n.u.; *P* = 0,005]; *c)* a relação LF/HF foi maior nos ratos com insuficiência renal [mediana: 0,03 (0,02 – 0,06) vs. 0,16 (0,06 – 0,27); *P* = 0,005] (Figura 17).

Não observámos diferença na potência das LF<sub>PAM</sub> entre ratos com função renal preservada e com insuficiência renal.



**Figura 17** – Exemplos das análises espectrais da frequência cardíaca obtidas com a transformada rápida de Fourier. A) Rato de controle; B) rato com nefrolitíase e função renal preservada; C) Rato com nefrolitíase e insuficiência renal grave. A menor frequência respiratória dos ratos tratados para desenvolver litíase renal torna-se evidente no pico das  $HF_{RR}$  no espectro da frequência cardíaca.

### Sensibilidade dos baroreflexos

Avaliámos a sensibilidade dos baroreflexos em ratos do grupo com nefrolitíase tratados durante quatro semanas e creatinina sérica  $\leq 150 \mu\text{mol/L}$  ( $n = 6$ ) e ratos do grupo de controlos ( $n = 8$ ). Nos ratos com nefrolitíase, observámos uma diminuição significativa da bradicardia reflexa em resposta à injeção de fenilefrina que se traduziu num ganho do baroreflexo significativamente menor neste grupo em comparação com os ratos do grupo de controlos ( $0,9 \pm 0,3$  vs  $2,8 \pm 0,6$  ms/mmHg, respectivamente;  $P < 0,05$ ) (Figura 18).

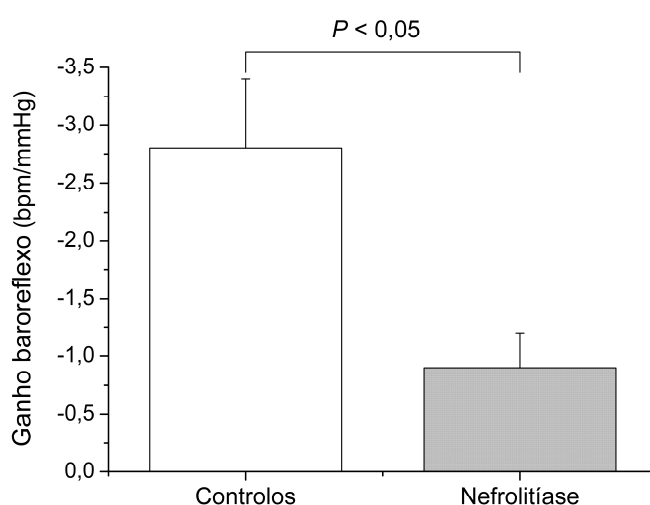


Figura 18 – Ganho do baroreflexo após injeção endovenosa de fenilefrina.

### 5.2.3 Resultados do estudo da actividade do nervo renal

Os ratos do grupo de nefrolitíase ( $n = 9$ ) e do grupo de controlos ( $n = 7$ ) apresentavam função renal preservada no final do tratamento. Todos os ratos do grupo de nefrolitíase desenvolveram cálculos renais e obstrução tubular, confirmados por exame histológico.

A ingestão de água foi significativamente mais elevada no grupo com nefrolitíase mas não observámos outras diferenças nas características basais dos dois grupos. Não observámos diferenças nos parâmetros hemodinâmicos basais entre os ratos do grupo com nefrolitíase e do grupo de controlos (Quadro XXIV).

**Quadro XXIV** – Características gerais dos grupos de ratos incluídos no estudo da actividade do nervo renal

	Controlos ( <i>n</i> = 7)	Nefrolitíase ( <i>n</i> = 9)	<i>P</i> §
Peso corporal ( <i>g</i> )	460 (355 – 493)	407 (321 – 424)	0,210
Alimento ( <i>g</i> )	27 (24 – 29)	27 (22 – 30)	1,000
Fezes ( <i>g</i> )	10 (7 – 11)	10 (9 – 12)	0,586
Água ingerida ( <i>ml/24 h</i> )	30 (28 – 38)	60 (45 – 70)	<b>0,015</b>
Urina ( <i>ml/24 h</i> )	12 (10 – 13)	32 (20 – 36)	<b>0,002</b>
Frequência cardíaca ( <i>bpm</i> )	413 (408 – 425)	416 (401 – 434)	0,864
Pressão arterial média ( <i>mmHg</i> )	116 (110 – 121)	104 (95 – 124)	0,529

§ Teste de Mann-Whitney

Com excepção do sódio, cuja concentração sérica foi menor nos ratos com nefrolitíase, os restantes valores séricos foram semelhantes em ambos os grupos (Quadro XXV). Comparativamente com os controlos, os ratos com nefrolitíase apresentaram menor densidade urinária [mediana: 1051 (1041 – 1056) vs. 1022 (1019 – 1025); *P* < 0,005] e pH urinário mais baixo [mediana: 7,8 (7,6 – 8,0) vs. 7,1 (6,9 – 7,3); *P* = 0,001].

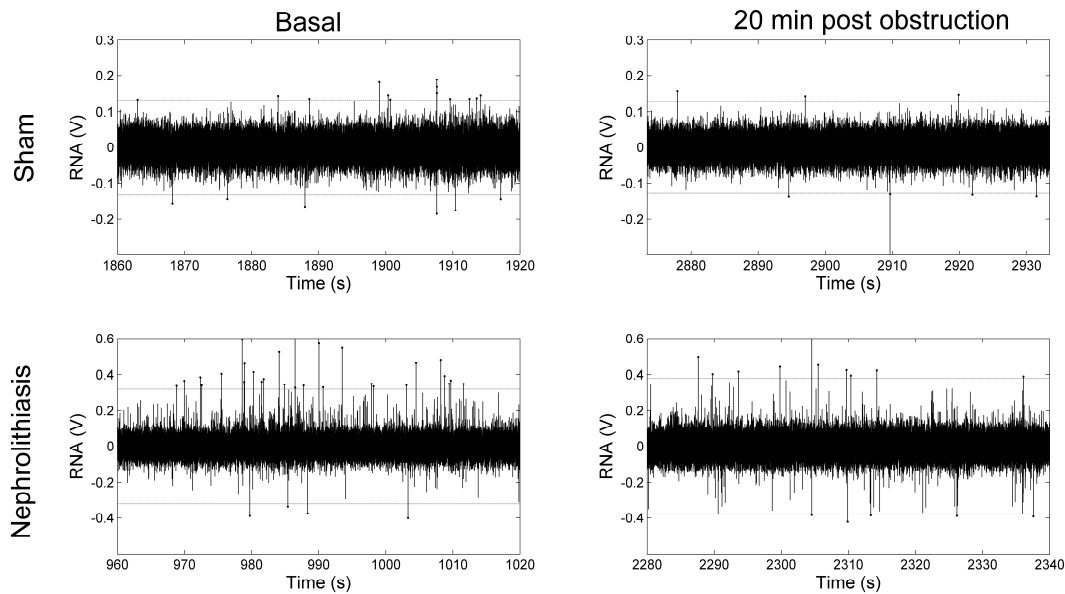
**Quadro XXV** – Resultados das análises bioquímicas dos dois grupos de ratos

	Controlos ( <i>n</i> = 7)	Nefrolitíase ( <i>n</i> = 9)	<i>P</i> §
Creatinina sérica ( <i>mg/dl</i> )	0,46 (0,34 – 0,47)	0,64 (0,42 – 0,98)	0,519
Ácido úrico sérico ( <i>mg/dl</i> )	1,00 (0,65 – 1,95)	0,9 (0,50 – 2,3)	0,938
Cálcio sérico ( <i>mg/dl</i> )	8,3 (8,2 – 8,6)	8,6 (8,2 – 9,2)	0,552
Fósforo sérico ( <i>mg/dl</i> )	7,2 (7,1 – 7,7)	7,9 (7,4 – 8,1)	0,470
Sódio sérico ( <i>mmol/L</i> )	146 (143 – 150)	143 (137 – 144)	<b>0,037</b>
Potássio sérico ( <i>mmol/L</i> )	4,0 (4,0 – 4,2)	4,6 (4,2 – 5,0)	0,066
Cloro sérico ( <i>mmol/L</i> )	109 (107 – 113)	107 (103 – 109)	0,118
Densidade urinária	1051 (1041 – 1056)	1022 (1019 – 1025)	<b>&lt;0,005</b>
pH urinário	7,8 (7,6 – 8,0)	7,1 (6,9 – 7,3)	<b>0,001</b>
Clearance da creatinina normalizada ( <i>ml/min/100 g peso</i> )	0,50 (0,43 – 0,66)	0,49 (0,25 – 0,73)	0,758

§ Teste de Mann-Whitney



No período basal, o número de impulsos/segundo no nervo renal foi significativamente mais elevado no grupo de ratos com nefrolitíase em relação com os controlos [mediana: 0,50 (0,40 – 080) vs. 0,30 (0,13 – 0,35) impulsos/segundo, respectivamente;  $P < 0,05$ ] (Figura 19).

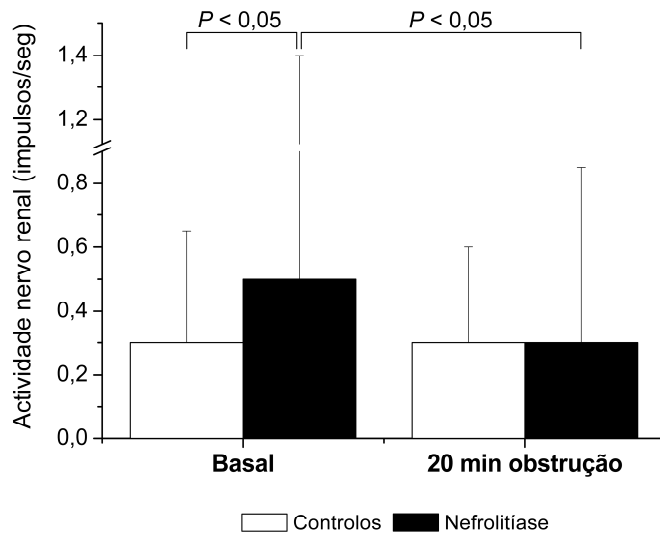


**Figura 19** – Actividade no nervo renal (RNA) nos ratos com litíase renal e nos controlos (*Sham*).

No momento e após a clampagem do ureter observámos uma diminuição acentuada da PA em ambos os grupos. Esta diminuição foi transitória e muito breve, relacionada provavelmente com a manipulação do ureter, como se comprovou pelo regresso dos parâmetros hemodinâmicos aos valores iniciais cerca de 10 segundos após esta manobra.

Nos ratos com nefrolitíase, após 20 minutos de obstrução contínua do ureter observámos uma diminuição significativa da ANR ipsilateral em comparação com os valores basais [mediana: 0,50 (0,40 – 0,80) vs. 0,30 (0,20 – 0,60) impulsos/segundo, respectivamente;  $P < 0,05$ ] (Figura 20). No grupo de controlos, não observámos variação significativa da ANR entre o período basal e durante a obstrução do ureter.

Nos ratos com nefrolitíase, observámos um aumento significativo da FC durante a obstrução subaguda em comparação com a FC basal [mediana: 416 (382 – 434) vs. 429 (391 – 451) bpm, respectivamente;  $P < 0,05$ ]. Neste grupo, durante a obstrução não verificámos diferença significativa da PAM em relação ao registo basal. No grupo de controlos, não observámos diferenças significativas na FC ou na PAM entre as medições efectuadas durante o período basal e após 20 minutos de obstrução.



**Figura 20** – Actividade do nervo renal em condições basais e durante obstrução ureteral.

#### 5.2.4 Resultados do modelo de deservação unilateral do rim

Nove ratos Wistar submetidos a deservação do rim esquerdo sobreviveram durante quatro semanas de tratamento. Macroscopicamente, todos os ratos apresentavam um grande aumento das dimensões de ambos os rins, que apresentavam uma cor pálida e heterogénea, com ponteados brancos visíveis na sua superfície cortical. Em dois ratos, o rim esquerdo encontrava-se muito dilatado e com sinais evidentes de deterioração da sua estrutura. A análise histológica demonstrou lesões extensas de necrose, facto que impediu a avaliação da presença de cálculos ou lesões do parênquima renal nestes dois animais (Figura 21).



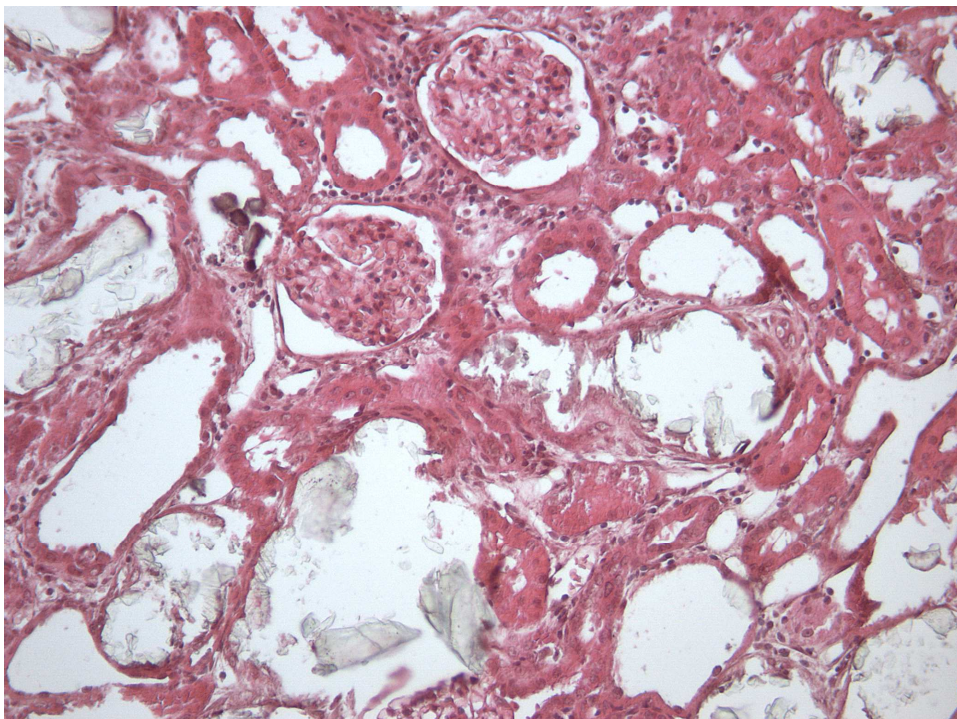
**Figura 21** – Rim desnervado muito dilatado e com sinais macroscópicos de necrose.

O doseamento de noradrenalina foi superior nos rins enervados comparativamente com os desenervados [mediana: 245 (39 – 652) vs. 45 (16 – 133)  $\mu\text{g/L}$ ;  $P < 0,005$ ].

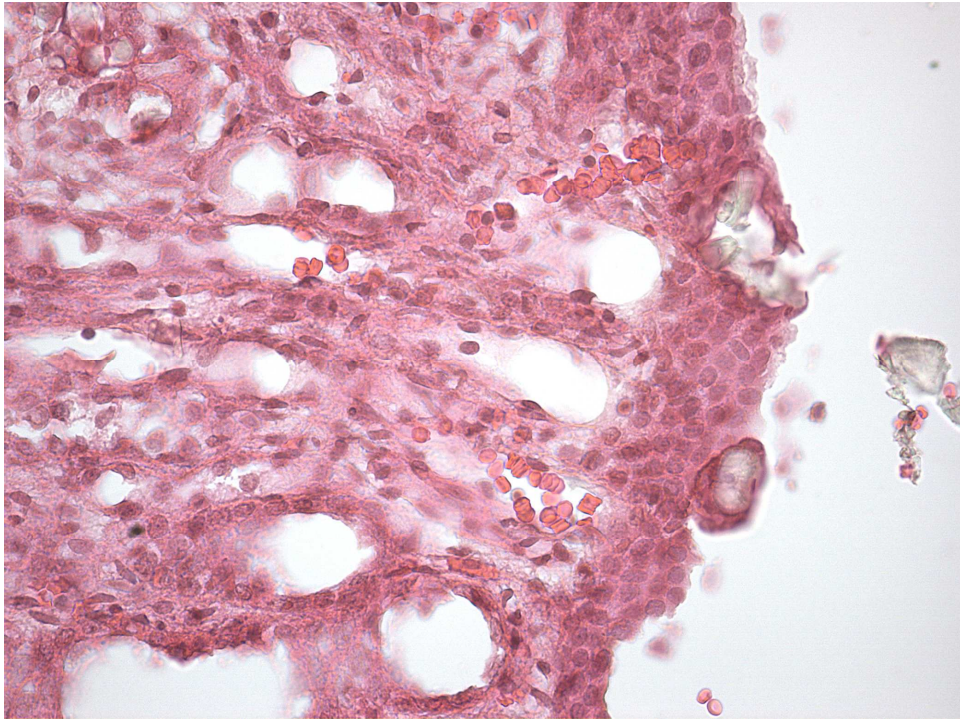
A histologia mostrou numerosos depósitos intra-tubulares de cristais em ambos os rins, desde o córtex até à medula, com agregados de cristais e cálculos aderentes às papilas renais, por vezes provocando obstrução total dos tubos renais (Figura 22 e Figura 23). A maior quantidade de cristais observou-se no córtex, sendo menor na zona de transição cortico-medular e medula. Todos os cálculos continham cálcio, conforme confirmado pela coloração de von Kossa (Figura 24).

Observámos dilatação muito acentuada dos túbulos, desde o córtex até à papila, com distorção da arquitetura e atrofia tubular. Muitos túbulos estavam destruídos e apresentavam cilindros celulares e hialinos. Em alguns casos, coexistiam túbulos completamente destruídos e outros relativamente preservados.

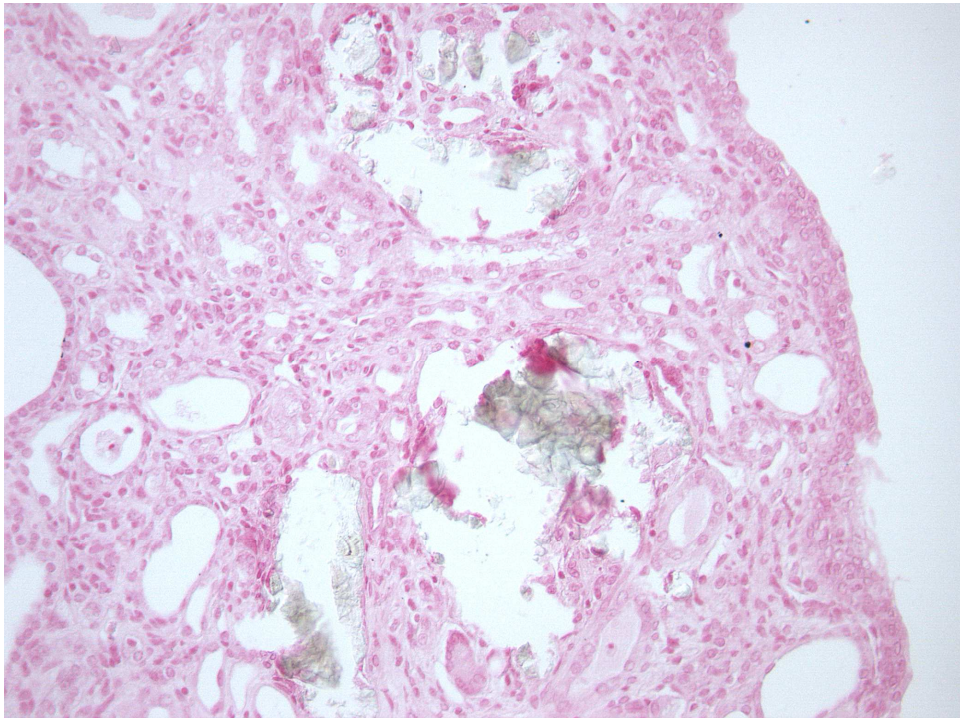
Em cerca de metade dos casos não observámos alterações glomerulares, mas alguns glomérulos apresentavam hipertrofia e outros diminuição da população celular (atrofia do tufo) ou sinais de esclerose focal. Os vasos não apresentavam alterações estruturais (Figura 25). Em alguns casos, a zona de transição e a medula apresentavam extenso infiltrado inflamatório e estase vascular. Observámos fibrose intersticial ligeira a intensa em todos os rins (Figura 26).



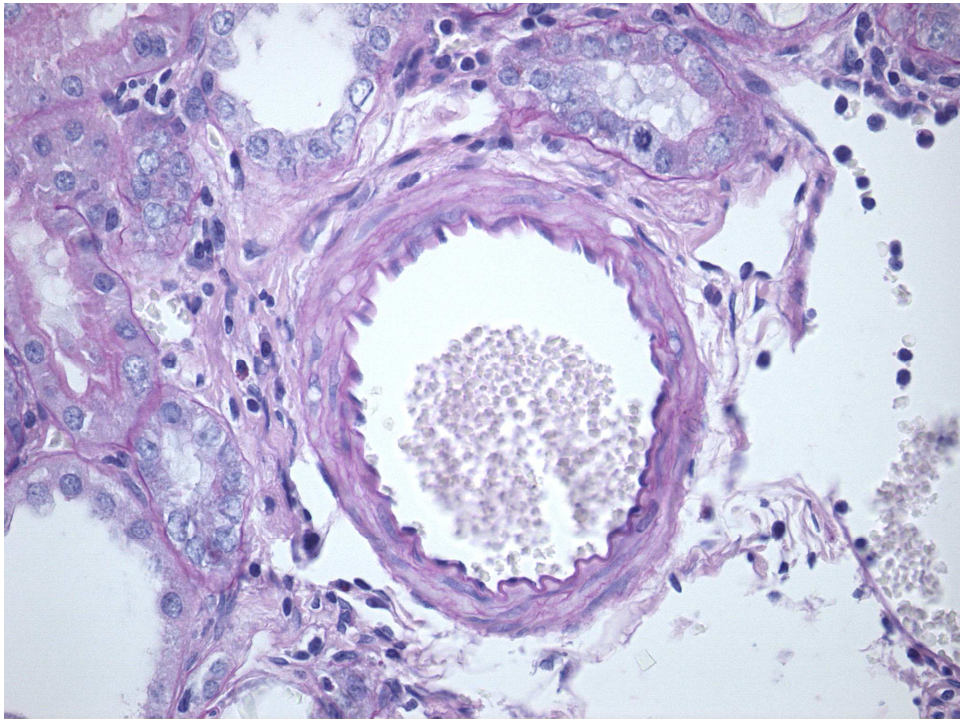
**Figura 22** – Córtex do rim direito (enervado) com inúmeros cristais e agregados de cristais nos tubos renais lesões glomerulares significativas (hematoxilina-eosina, ampliação 50x).



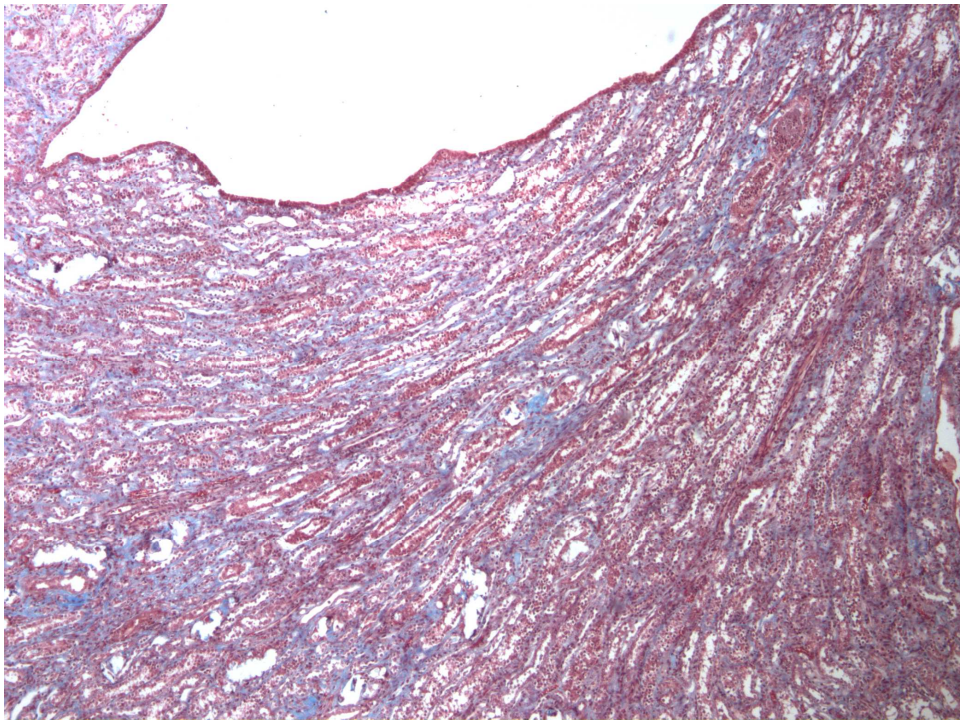
**Figura 23** – Cálculos da papila com rotura do urotélio e libertação dos cálculos (hematoxilina-eosina, ampliação 100x).



**Figura 24** – A coloração de von Kossa confirma a presença de cálcio nos cristais presentes na região medular (ampliação 400x).



**Figura 25** – Arteriola do córtex mostra a inexistência de alterações das paredes dos vasos (PAS, ampliação 400x).



**Figura 26** – Fibrose intensa evidenciada pela cor azul da zona da medula (tricroímio de Masson 50x).

Não observámos diferenças significativas na quantidade de cálculos e/ou cristais nem na gravidade das restantes lesões histológicas nos rins desnervados e nos rins contralaterais (Quadro XXVI).

**Quadro XXVI** -- Comparação das alterações histológicas nos rins desnervados e nos rins de controlo

	<b>Rins Controlo</b>	<b>Rins Desnervados</b>	<b>P</b>
	<b>(n = 7)</b>	<b>(n = 7)</b>	
<b>Cristais/cálculos</b>			0,500
Ausentes (0+)	0	0	
Escassos/dispersos (1+)	0	2	
Abundantes ou agregados (2+)	6	4	
Muito abundantes (3+)	1	1	
<b>Túbulos</b>			1,000
Normais	0	0	
Dilatados	7	7	
<b>Interstício</b>			1,000
Sem fibrose	0	0	
Fibrose escassa	5	5	
Fibrose intensa	2	2	
<b>Glomérulos</b>			1,000
Normais	3	3	
Alterados	4	4	
<b>Vasos</b>			1,000
Normais	7	7	
Alterados	0	0	

Teste do sinal.

## **6. Discussão e comentários**

Por comodidade, dividimos a discussão e consequente interpretação dos resultados das diferentes experiências em duas secções: discussão dos resultados do estudo clínico e das experiências em modelos animais.

### **6.1 Discussão dos resultados do estudo clínico**

A nefrolitíase está associada ao aumento da prevalência e da incidência de HTA. Um estudo epidemiológico recente efectuado na população portuguesa demonstrou maior prevalência de doenças cardiovasculares nos indivíduos com antecedentes de litíase renal, incluindo uma associação independente com o enfarte do miocárdio no sexo feminino [152]. Neste estudo foi demonstrado que em muitos casos a litíase renal precedia o aparecimento destas doenças, mas os mecanismos que as relacionavam com a litíase não foram esclarecidos.

No nosso trabalho testámos a hipótese dos doentes com nefrolitíase poderem apresentar alterações da actividade eferente do SNA e procurámos relacionar essas alterações com a litíase renal ou com eventuais comorbilidades existentes. Os resultados demonstraram a existência de alterações da actividade eferente do sistema nervoso autónomo nos doentes com nefrolitíase recorrente, que se manifestaram por alterações do controlo cardiovascular em alguns testes de função autonómica. As manifestações de disfunção autonómica eram ligeiras mas tornaram-se evidentes com ferramentas para análise dos resultados no domínio do tempo-frequência. Acreditamos ser o primeiro trabalho em que a actividade autonómica foi estudada e onde foram descritas alterações em doentes com litíase renal.

Por facilidade de exposição vamos dividir esta discussão em três partes distintas: interpretação dos resultados das provas, influência das comorbilidades nos seus resultados e considerações relacionadas com a metodologia utilizada.

### 6.1.1 Interpretação dos resultados

#### Prova de *tilt*

O *tilt* foi a prova que mais frequentemente revelou alterações, documentadas em 96,7% dos doentes. A mais frequente foi o aumento excessivo da PA durante o ortostatismo, observado em 28 dos 30 doentes estudados. Os valores máximos da PAS e da PAD durante o ortostatismo foram significativamente mais elevados no grupo de doentes do que no grupo de controlo. No entanto, não observámos diferença significativa na variação PAS entre doentes e controlos. Este facto poderá ser explicado por dois motivos: 1) os valores basais da PA foram mais elevados no grupo de doentes; 2) os controlos saudáveis apresentaram variações da PAS e da PAD relativamente elevados, em relação ao aumento esperado, superiores aos resultados referidos por outros autores na prova de *tilt* em indivíduos saudáveis [243;244]. O aumento da FC foi considerado excessivo em 13 doentes, 12 dos quais apresentaram respostas hipertensoras. Estes resultados demonstraram que, no grupo de doentes, o aumento da actividade simpática durante o ortostatismo passivo se manifesta preferencialmente nos receptores adrenérgicos vasculares. Esta possibilidade parece ser confirmada pela dissociação entre a variação da  $LF_{RR}$  e da  $LF_{PAS}$  durante o ortostatismo, no grupo de doentes, e pode estar relacionada com a elevada prevalência de HTA na população com litíase renal.

A elevada sensibilidade da prova de *tilt* para identificar alterações hemodinâmicas relacionadas com o risco de HTA foi documentada há várias décadas: em 1981, Chrysant *et al.* [245] descreveram aumentos da FC, PAD e PAM em resposta ao ortostatismo passivo em doentes hipertensos e relacionaram as respostas hemodinâmicas com a gravidade da hipertensão. Segundo estes autores, o aumento da PAD só ocorreu num subgrupo de doentes que apresentava uma forma de HTA que designaram como 'lábil', não tendo observado aumento nos doentes com HTA mantida. Nestes, os autores observaram diminuição da PAS e da PAM durante o ortostatismo. Quando estes investigadores compararam os resultados das provas de *tilt* e de *handgrip*, verificaram que a capacidade discriminatória da prova de *tilt* para identificar os subgrupos de doentes com HTA 'lábil' ou mantida era superior à da prova de *handgrip*.



A revisão da bibliografia da década de 1980 mostrou que o termo ‘hipertensão lábil’ designava uma condição clínica caracterizada pela observação ocasional de valores de pressão arterial  $> 140/90$  mmHg em indivíduos que noutras ocasiões apresentavam valores de PA normais [246]. A designação ‘lábil’ foi contestada por alguns autores pelo facto das medições ambulatoriais da PA documentarem flutuações consideráveis dos valores da PA em indivíduos aparentemente saudáveis que ocasionalmente apresentam valores elevados de PA em resposta a algumas actividades da vida diária, sem que possa ser atribuído qualquer significado clínico a estes resultados [8]. Em meados da década de 1980, Wicker *et al.* [246] defenderam a existência da ‘hipertensão lábil’ como uma entidade clínica autónoma e sugeriram que correspondia a uma forma ligeira da doença hipertensiva. Actualmente, esta entidade clínica é habitualmente designada por hipertensão *borderline*.

A hipertensão *borderline* é objecto de interesse científico e clínico principalmente por dois motivos: 1) as respostas hemodinâmicas a vários estímulos (incluindo a prova de *tilt*) são muito características e parecem corresponder a uma fase específica (provavelmente a fase mais inicial) da doença hipertensiva, na qual estão envolvidos mecanismos fisiopatológicos diferentes dos que determinam a hipertensão crónica; 2) a hipertensão *borderline* é habitualmente diagnosticada em indivíduos com outros factores de risco cardiovascular e com maior tendência para desenvolver HTA mantida [247]. Estudos prospectivos efectuados em adultos jovens com hipertensão *borderline* mostraram que o aumento da PAD durante a prova de *tilt* estava associado ao desenvolvimento de HTA e aumento do peso corporal durante o período de seguimento [248]. Por estes motivos, é actualmente recomendado que os indivíduos com hipertensão *borderline* tenham maior vigilância clínica e, se possível, façam modificações dos hábitos de vida com o objectivo de impedir o desenvolvimento de HTA crónica [8;246].

As diferenças nas respostas hemodinâmicas durante o teste de ortostatismo passivo entre doentes com HTA *borderline* e mantida podem estar relacionadas com o papel do SNA no desenvolvimento da HTA. Este papel é predominante na fase inicial da doença hipertensiva e nos doentes mais jovens [249;250]. Trabalhos em que se utilizaram métodos de análise de frequências para estudar a variabilidade cardiovascular demonstraram que o aumento da actividade simpática precede o

desenvolvimento da HTA: 1) a análise de *wavelets* mostrou que a potência das  $LF_{RR}$  durante o ortostatismo nos filhos normotensos de pais em que um dos progenitores apresentava hipertensão era maior do que a dos controlos da mesma idade em que ambos os progenitores eram normotensos [251]; 2) durante o decúbito, a potência das  $LF_{RR}$  e a relação  $LF/HF$  são mais elevadas nos doentes hipertensos do que nos controlos normotensos [252]. Outros autores demonstraram que a potência das  $LF_{RR}$  em decúbito era mais elevada em doentes hipertensos com disfunção diastólica do ventrículo esquerdo [253].

No nosso grupo de doentes, a ausência de aumento das  $LF_{RR}$  durante o ortostatismo é um resultado importante e muito sugestivo de disfunção autonómica. Durante o *tilt* era expectável um aumento das  $LF_{RR}$ , tal como foi descrito por outros autores em indivíduos saudáveis [229]. Esse aumento foi observado nos nossos controlos saudáveis e a sua ausência nos doentes com litíase sugere uma diminuição do cardireflexo simpático, que foi confirmada pelos resultados do estudo dos baroreflexos utilizando o método das sequências.

Nos doentes com nefrolitíase, a diminuição do cardireflexo simpático poderia ser atribuída à existência duma subpopulação de doentes hipertensos. É do conhecimento geral que nos indivíduos hipertensos a actividade simpática pode estar aumentada em decúbito [252] e, nesse caso, a hiperactividade basal poderia condicionar o aumento da actividade simpática em resposta ao ortostatismo. Radaelli *et al.* [254] referiram um aumento menos acentuado das  $LF_{RR}$  durante a prova de *tilt* nos doentes hipertensos quando comparados com controlos saudáveis. No nosso estudo não observámos diferenças significativas na variabilidade da FC basal (nomeadamente da potência das  $LF_{RR}$ ) entre doentes e controlos, pelo que a ausência de aumento das  $LF_{RR}$  durante o ortostatismo não seria explicada pelo aumento da actividade simpática basal. Além disso, não observámos relação entre a ausência de aumento da potência das  $LF_{RR}$  durante o ortostatismo e antecedentes de HTA e não encontramos associação com qualquer dos outros factores independentes. A inexistência de estudos sobre a actividade autonómica eferente em doentes com nefrolitíase, não permite confrontar os nossos resultados com os de outros autores.

Durante a prova de *tilt*, a diminuição das  $HF_{RR}$  ocorreu mais precocemente e de forma mais acentuada no grupo de doentes. Este resultado traduz um menor controlo

parassimpático da FC durante o ortostatismo que relacionámos com dois factores independentes: obesidade e hiperuricosúria. A relação com a obesidade está de acordo com estudos prévios que demonstraram que a potência das  $HF_{RR}$  se correlacionava inversamente com o IMC [255]. Outros estudos demonstraram que a potência das  $HF_{RR}$  era menor em adolescentes obesos [256], em mulheres obesas antes da menopausa [257] e em homens obesos com enfarte do miocárdio [258]. No entanto, no nosso estudo a obesidade não explicou totalmente a maior redução das  $HF_{RR}$  nos doentes com nefrolitíase, como se demonstrou pelo facto das diferenças das  $HF_{RR}$  entre doentes e controlos persistirem quando os doentes obesos foram excluídos do estudo.

Observámos que a potência das  $HF_{RR}$  durante o ortostatismo foi menor nos doentes hiperuricosúricos comparativamente com os doentes com excreção normal de ácido úrico. Ao excluirmos os doentes hiperuricosúricos da análise, as diferenças da potência das  $HF_{RR}$  entre doentes e controlos não apresentaram significado estatístico. Este resultado sugere que a hiperuricosúria pode ser um factor mais importante do que a obesidade para explicar a diminuição das  $HF_{RR}$  durante o ortostatismo. Como não observámos associação da hiperuricosúria com nenhum dos factores independentes em estudo, este resultado sugere que a hiperuricosúria pode estar associada ao aumento independente do risco de cardiovascular dos doentes com litíase renal por diminuição do controlo parassimpático da actividade cardíaca. Não encontramos na literatura médica estudos relativos a este assunto.

Aparentemente, o aumento da relação LF/HF durante o ortostatismo foi idêntico nos doentes e nos controlos. Este aumento foi semelhante ao observado por outros autores em indivíduos normais [229] devido aos mecanismos fisiológicos de adaptação ao ortostatismo. No entanto, uma análise mais atenta dos resultados do grupo de doentes demonstrou que o aumento da relação LF/HF durante o *tilt* era explicado exclusivamente pela diminuição das  $HF_{RR}$  (no grupo de controlos o aumento da relação LF/HF traduzia fundamentalmente o aumento da potência das  $LF_{RR}$ ). Devido à ausência de aumento do componente de  $LF_{RR}$ , no grupo de doentes o aumento da relação LF/HF mascarava uma diminuição da variabilidade da FC durante o ortostatismo resultante da diminuição excessiva das  $HF_{RR}$ .

Contrariamente ao observado nos controlos, o aumento progressivo da potência das LF<sub>PAS</sub> durante o período de manutenção em ortostatismo constitui outra forte evidência de hiperactividade simpática nos doentes com nefrolitíase. Este resultado difere das observações efectuadas por Ducla-Soares *et al.* [229] que descreveram, em indivíduos saudáveis, um aumento da potência das LF<sub>PAS</sub> durante a fase de adaptação ao ortostatismo seguido de descida progressiva dessa potência durante o período de manutenção em ortostatismo. Os resultados do nosso estudo demonstraram que o estímulo simpático eferente sobre o sistema vascular foi mais intenso e mais prolongado nos doentes com nefrolitíase e manifestou-se de forma mais exuberante na fase final da prova.

Observámos que a potência mais elevada das LF<sub>PAS</sub> durante o ortostatismo esteve relacionada com a existência de um subgrupo de doentes com antecedentes de HTA. Este resultado diverge de alguns estudos anteriores de outros autores que demonstraram um aumento menor das LF<sub>PAS</sub> durante o ortostatismo nos indivíduos com hipertensão em relação com controlos saudáveis e que aquela potência era ainda menor nos doentes com hipertrofia ventricular esquerda [254]. Uma possível explicação para a diferença dos nossos resultados em relação a esses estudos seria a menor gravidade da doença hipertensiva no subgrupo de doentes hipertensos incluídos no nosso estudo, nomeadamente a ausência de lesões dos órgão-alvo da HTA. Esta possibilidade é corroborada pelo facto da maioria dos nossos doentes hipertensos apresentarem HTA no estadio 1, de todos terem PA controlada em repouso e de nenhum doente apresentar antecedentes de doença cardíaca. O facto de o ortostatismo não inibir o aumento das LF<sub>PAS</sub> pode ser explicado pela possibilidade dos doentes com litíase renal apresentarem uma forma de hipertensão inicial, ou *borderline*, na qual ainda podem ser identificados sinais de hiperactividade simpática.

#### **Prova de *handgrip***

No nosso estudo, a percentagem de provas analisadas no domínio do tempo que apresentavam resultados anormais na prova de *handgrip* foi ligeiramente inferior à dos restantes testes da actividade simpática. A menor sensibilidade desta prova na identificação de respostas excessivas em comparação com a prova de *tilt* foi mencionada anteriormente [245]. No entanto, não excluímos a possibilidade dos

critérios utilizados neste estudo para classificar as provas como alteradas tenha contribuído para aumentar a percentagem de falsos negativos. Contudo, salientamos que o delta da PAD foi classificado como excessivo em 83,3% dos doentes com nefrolitíase, mesmo considerando os valores basais da PAD significativamente mais elevados neste grupo.

No nosso estudo o delta da PAD na prova de *handgrip* foi mais elevado em comparação com os resultados referidos na literatura, tanto nos doentes como nos controlos [259-262]. Sublinhamos este facto porque a elevada percentagem de respostas pressoras dos nossos controlos pode ter contribuído para a ausência de diferenças significativas na distribuição dos resultados.

Demonstrou-se que o aumento da PA durante o *handgrip* estava relacionado com a gravidade da HTA e com a existência de lesões dos órgãos-alvo [263]. No nosso estudo, não relacionámos o aumento da PAD com a existência de antecedentes de HTA ou com qualquer das variáveis independentes analisadas. Alguns doentes hipertensos faziam terapêutica hipotensora durante as provas. É sabido que alguns medicamentos hipotensores interferem com os resultados da prova de *handgrip* nos doentes hipertensos, nomeadamente os  $\beta$ -bloqueantes, por contribuírem para um aumento maior da PA sistólica durante a prova [264]. Nenhum dos nossos doentes estava medicado com  $\beta$ -bloqueantes porque foram suspensos pelo menos uma semana antes da realização das provas autonómicas. Quatro estavam medicados com IECAs ou bloqueadores dos receptores da Angiotensina II, mas não encontramos referências que associassem esses medicamentos a maior aumento da PAD na prova de *handgrip*. A análise dos resultados da prova de *handgrip* no domínio do tempo-frequência permitiram identificar três alterações da variabilidade da FC fortemente sugestivas de disfunção autonómica nos doentes com nefrolitíase:

- 1) Menor variabilidade basal da FC, demonstrada pela menor potência das  $LF_{RR}$  e das  $HF_{RR}$ ;
- 2) Diminuição mais acentuada das  $HF_{RR}$  durante o período de *handgrip*;
- 3) Aumento muito acentuado da actividade simpática durante o primeiro minuto de *handgrip*, demonstrado pelo aumento da potência das  $LF_{RR}$ .

A diminuição da variabilidade da FC durante o período basal foi um resultado inesperado por não ter sido observada no período basal da prova de *tilt*. Supomos que

esta divergência esteja relacionada com a posição em que se efectuaram os dois registos (em decúbito, na prova de *tilt*, e na posição sentada, na prova de *handgrip*). Esta diferença de posição poderia explicar o facto de se observar uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca nos registos basais em todas as provas autonómicas efectuados em posição sentada nos doentes com nefrolitíase.

Consideramos que a diminuição acentuada das  $HF_{RR}$  durante o período de *handgrip* constitui uma manifestação de disautonomia, com provável significado prognóstico. No grupo de controlos não observámos alteração significativa do componente  $HF_{RR}$ . Kurita *et al.* [265] descreveram um aumento das  $HF_{RR}$  durante o *handgrip* em indivíduos saudáveis, como consequência do aumento da actividade vagal. A ausência de aumento da  $HF_{RR}$  foi associada a aumento do risco de cardiopatia isquémica [237]. No grupo de doentes, o aumento das  $LF_{RR}$  durante o primeiro minuto de *handgrip*, acompanhado por aumento significativo da potência das  $LF_{PAS}$ , evidenciou um aumento precoce e intenso da actividade simpática nesta prova. Neste grupo, os aumentos da PA e das  $LF_{PAS}$  não ocorreram de forma linear durante o *handgrip*: após um aumento inicial, durante o segundo minuto da prova verificámos uma diminuição da potência das  $LF_{PAS}$  para valores semelhantes aos observados durante o período basal. Interpretámos esta diminuição como resultado do reajustamento da actividade simpática pelos baroreceptores (*reseting*), provavelmente como consequência da hiperactividade simpática inicial. Em teoria, na ausência de reajustamento verificar-se-ia um aumento progressivo da PA e das  $LF_{PAS}$  com o prolongamento do tempo de exercício isométrico como consequência do aumento progressivo da actividade simpática [266]. O reajustamento dos baroreceptores explicaria a descida brusca da PA observada durante o segundo minuto de *handgrip* em alguns doentes que evidenciaram aumento mais intenso da actividade simpática durante o primeiro minuto. A ausência do efeito do *reseting* nos controlos seria explicada pelo facto de, neste grupo, não se observar aumento significativo da actividade simpática durante o primeiro minuto de *handgrip*.

Nos doentes com litíase renal, a hiperactividade simpática durante o primeiro minuto de *handgrip* constituiu um resultado interessante. Como é do conhecimento geral, o aumento da PA nesta prova resulta de três estímulos diferentes:

- 1) Um estímulo central que resulta na estimulação do SNS e no efeito motor, com um tempo latência de cerca de 3 segundos [267;268]. O estímulo central determina também uma inibição temporária da actividade vagal [269]. A redução do controlo dos baroreceptores vagais associada ao aumento do débito cardíaco – em consequência dos aumentos do *preload* e da contractibilidade cardíaca – com mobilização do sangue do território esplâncnico para a circulação central, provocam um aumento quase imediato da pressão arterial [262].
- 2) Um reflexo mecânico (mecanoreflexo) provocado pela estimulação das fibras nervosas sensitivo-motoras existentes no músculo estriado, com um tempo de latência superior a 6 segundos [270]. Estudos com Doppler documentaram a vasoconstricção renal provocada pelo mecanoreflexo cerca de 6 a 10 segundos após a contracção muscular e demonstraram a sua independência do estímulo central [271].
- 3) Um reflexo metabólico (metaboreflexo) provocado pela activação dos quimio-receptores existentes no tecido muscular, em consequência da acumulação de produtos do metabolismo muscular. Este reflexo apresenta um tempo de latência superior a 60 segundos [272].

De acordo com os mecanismos descritos, o aumento da actividade simpática que observámos nos doentes com nefrolitíase durante o primeiro minuto de *handgrip* deveria resultar duma resposta excessiva ao estímulo central ou duma resposta excessiva ao mecanoreflexo. Dado que os dois mecanismos se sobrepõem no tempo, os métodos de análise que utilizámos não nos permitiram diferenciá-los.

No grupo de doentes, observámos um aumento significativo da actividade simpática nos últimos minutos de *handgrip* (no grupo de controlos os aumentos das  $LF_{RR}$ ,  $LF_{PAS}$  e relação  $LF/HF$  não foram significativos). Este aumento coincidiu no tempo com o valor máximo da PAD e deverá ser interpretado como resultado de uma resposta excessiva ao metaboreflexo.

Existem trabalhos que sugerem que as respostas excessivas ao metaboreflexo podem estar associadas ao desenvolvimento de hipertensão: estudos efectuados durante a fase de isquémia pós-*handgrip* demonstraram que o metaboreflexo encontra-se aumentado em doentes hipertensos em relação aos controlos normotensos [273]. No entanto,

neste estudo não encontramos diferenças significativas nos deltas da PA diastólica (critério utilizado para avaliação da prova no domínio no tempo) nem na potência do componente de baixa frequência da PAS (utilizado para avaliar a prova no domínio do tempo-frequência) entre doentes com e sem antecedentes de HTA. Interpretamos a hiperactividade simpática dos doentes com nefrolitíase em resposta ao metaboreflexo, independentemente de terem ou não antecedentes conhecidos de HTA, como uma indicação de que estes doentes apresentam uma maior predisposição para desenvolver hipertensão *borderline*.

### **Prova de aritmética mental**

Na prova de aritmética mental, as análises no domínio do tempo não permitiram identificar diferenças significativas nos deltas da FC ou da PAS entre doentes e controlos. Atribuímos esta limitação a dois motivos: 1) os critérios para afirmar a existência de aumento anormal da FC e/ou da PA sistólica nesta prova não se encontram estandardizados; 2) os deltas da FC e da PAS do nosso grupo de controlos foram superiores aos relatados em indivíduos saudáveis noutras populações [259]. Estas limitações só poderiam ser ultrapassadas se os valores de referência da normalidade fossem definidos com base numa amostra significativa de indivíduos da população portuguesa. No entanto, é de salientar que as respostas hemodinâmicas durante a aritmética mental foram classificadas como excessivas em 86,7% dos doentes, apesar dos valores basais da FC e da PAS serem significativamente mais elevados neste grupo.

As análises no domínio do tempo-frequência mostraram que os doentes com nefrolitíase apresentaram aumentos significativos das  $LF_{RR}$ , relação  $LF/HF_{RR}$  e da  $LF_{PAS}$  durante a aritmética mental. Estes resultados traduziram a influência do *stress* mental na actividade simpática eferente, o que está de acordo com resultados publicados por outros investigadores [274]. A ausência de variação significativa das  $HF_{RR}$  concorda com estudos prévios que demonstraram a menor influência da actividade vagal no controlo da frequência cardíaca durante a prova de aritmética mental [275;276].

Neste estudo observámos diferenças relevantes entre as respostas dos doentes e dos controlos durante a aritmética mental: 1) contrariamente ao observado no grupo de



doentes, no grupo de controlos os aumentos das  $LF_{RR}$  e da relação LF/HF não foram significativos; 2) a potência das  $LF_{PAS}$  durante a aritmética mental foi significativamente mais elevada nos doentes com nefrolitíase do que nos controlos. Estes resultados demonstraram que o aumento da actividade simpática em resposta a estímulos centrais era mais intenso nos doentes com nefrolitíase e manifestou-se por um aumento significativo da actividade simpática sobre a função cardíaca e sobre os receptores adrenérgicos do sistema vascular, em relação aos indivíduos do grupo de controlos.

Em conjunto, as duas provas pressoras (*handgrip* e aritmética mental) demonstraram que a tendência para a hiperactividade simpática observada nos doentes com nefrolitíase durante a prova de *tilt* era comum a outros estímulos simpáticos, manifestando-se predominantemente por aumento excessivo da PA. Esta maior actividade simpática nos doentes com nefrolitíase recorrente pode ter significado prognóstico por o aumento da PA durante as provas pressoras estar associado a aumento do risco de desenvolvimento futuro de HTA. Demonstrou-se que os indivíduos normotensos com antecedentes familiares de HTA apresentavam aumentos superiores da PA durante a prova de *handgrip* e durante a aritmética mental comparativamente a controlos normotensos e sem história familiar de HTA [259]. Foram descritas alterações no teste da aritmética mental em adultos com HTA ligeira e em indivíduos normotensos filhos de pais hipertensos [277]. Após um período de seguimento de 10 anos, demonstrou-se que o risco de desenvolver HTA mantida era mais elevado nos indivíduos com HTA *borderline* que tiveram aumentos mais acentuados da PA durante a prova de aritmética mental [278]. Um estudo prospectivo com 18 anos de acompanhamento realizado em indivíduos saudáveis demonstrou que o aumento da actividade simpática em resposta a dois testes pressores (teste aritmética mental e teste do frio) era um factor preditivo para o desenvolvimento futuro de hipertensão [279].

As duas provas pressoras revelaram-se pouco sensíveis na identificação das diferenças entre doentes e controlos, principalmente quando os resultados foram analisados no domínio do tempo. As dificuldades para identificar diferenças entre grupos relacionaram-se com a ausência de definições estandardizadas para definir os limites da normalidade, com o facto muitos indivíduos do grupo de controlos apresentarem

respostas hemodinâmicas excessivas, mas também com a reconhecida variabilidade inter e intra-individual que caracteriza as respostas hemodinâmicas nas provas pressoras, a qual já foi referida por outros autores [280].

### **Manobra de Valsalva**

A análise dos resultados da manobra de Valsalva no domínio do tempo não demonstrou alterações significativas da actividade do parassimpático na maioria dos doentes. Observámos diminuição do VR em dois doentes diabéticos. É sabido que a diminuição do controlo vagal da FC constitui uma das manifestações precoces da disautonomia diabética que, nas fases mais avançadas, também pode manifestar-se por diminuição do controlo simpático da actividade cardíaca [281]. As alterações da variabilidade da FC na diabetes correlacionam-se com o tempo de duração da doença, níveis de hemoglobina glicosilada e existência de obesidade, e foi associada à existência de retinopatia e outras complicações microvasculares [281;282]. Não dispomos de informação sobre a duração da diabetes e controlo metabólico dos dois doentes em que o VR foi inferior ao normal, mas relacionámos a disfunção do parassimpático com a doença. Interpretámos o facto de não observarmos diminuição da actividade simpática como indicador de que a disautonomia da diabetes, nestes dois doentes, estaria numa fase inicial.

A análise de *wavelets* demonstrou um aumento significativo da actividade parassimpática durante o período pós-Valsalva, traduzido por aumento significativo da potência das  $HF_{RR}$ . O aumento foi semelhante nos dois grupos e concordante com os resultados de estudos prévios efectuados em indivíduos saudáveis com utilização da análise de *wavelets* [283], o que corrobora a hipótese do controlo parassimpático da FC não apresentar alterações graves nos doentes com litíase renal.

Embora a manobra de Valsalva tenha sido utilizada com o objectivo de estudar a actividade do ramo parassimpático do SNA, os resultados desta prova analisados no domínio do tempo-frequência permitiram obter informações sobre actividade simpática eferente. Para interpretar esta avaliação devemos considerar as quatro fases da manobra de Valsalva [284]: a fase I, caracterizada por um pequeno aumento da pressão arterial em consequência do aumento da pressão intratorácica sobre a aorta no início da expiração; a fase II, na qual se verifica uma descida inicial da PA e um

aumento progressivo da FC seguidos, habitualmente, por recuperação da PAS num momento mais avançado desta fase; a fase III, muito breve e caracterizada pela ligeira diminuição da PAS que ocorre no final do esforço expiratório; a fase IV, que corresponde aos primeiros 30 segundos após o final da manobra de Valsalva, durante os quais pode ser observado um aumento marcado da PAS em consequência do aumento súbito do volume de sangue na circulação central, num momento em que a actividade simpática está aumentada. Na fase IV, o aumento brusco da PAS (*overshoot*) activa os baroreflexos e o aumento da actividade parassimpática determina uma diminuição brusca da frequência cardíaca. No nosso estudo, observámos aumentos significativos das  $LF_{RR}$ , relação LF/HF e  $LF_{PAS}$  durante a manobra de Valsalva e nos 30 segundos do período pós-Valsalva. Parte destes aumentos correspondem ao aumento fisiológico da actividade simpática eferente em resposta à descida inicial da PAS que ocorre no início da fase II. No entanto, a potência das  $LF_{PAS}$  durante o período pós-Valsalva foi significativamente mais elevada no grupo de doentes e esse facto reflectiu-se no aumento da PAS. No grupo de doentes a relação LF/HF durante o período pós-Valsalva foi significativamente mais elevada em relação ao grupo de controlos. Normalmente, durante esta fase, embora a actividade simpática ainda esteja mais elevada, verifica-se um aumento muito intenso da actividade parassimpática pelo que o resultado do grupo de doentes revelou um predomínio mais intenso da actividade simpática sobre a actividade vagal durante o período pós-Valsalva. Não encontramos descrição de resultados semelhantes na literatura.

#### **Respiração profunda compassada**

Na prova de respiração profunda compassada, a diferença entre a frequência cardíaca na fase inspiratória e expiratória (R6) é considerada como um indicador sensível e específico da actividade cardio-vagal [285]. A observação do R6 normal na maior parte dos doentes confirmou a ausência de alterações graves do controlo parassimpático da FC nos doentes com nefrolitíase. Cinco doentes apresentaram R6 inferior ao normal mas a revisão dos resultados da manobra de Valsalva de quatro dos doentes revelou que o VR estava dentro dos valores normais, pelo que é questionável se a diminuição do R6 nesses quatro casos pode ser interpretada como diminuição do

controlo vagal da FC. Não observámos associação entre diminuição anormal do R6 e qualquer dos factores independentes em estudo, nomeadamente diabetes ou obesidade. Assim, uma possível explicação para o R6 anormalmente baixo em alguns doentes poderia relacionar-se com a dificuldade na coordenação dos movimentos respiratórios, como a amplitude e o ritmo apropriado, os quais nem sempre são fáceis de alcançar durante esta prova. A confirmar esta dificuldade, verificámos que o R6 também foi inferior ao normal em três controlos saudáveis.

As análises no domínio do tempo-frequência mostraram um aumento significativo das  $LF_{RR}$  durante a respiração profunda, cerca de 10 a 15 vezes o valor basal. Na prova de respiração profunda compassada a frequência respiratória (um ciclo respiratório a cada 10 segundos) é sobreponível às frequências onde normalmente são identificadas as LF pelo que, nesta prova, o aumento das  $LF_{RR}$  traduziu predominantemente o aumento da actividade vagal. A potência das  $LF_{RR}$  foi menor no grupo de doentes em relação ao grupo de controlos, mas não consideramos relevante esta diferença por a potência das  $LF_{RR}$  no registo basal ser também significativamente menor no grupo de doentes, com a magnitude do aumento a ser ligeiramente superior neste grupo. Estes resultados são concordantes com os descritos por outros autores que utilizaram a análise de *wavelets* para avaliar os resultados da prova de respiração profunda em indivíduos saudáveis [229].

Na prova de respiração profunda a actividade vagal é preferencialmente avaliada na gama das baixas frequências pelo que não atribuímos significado ao componente  $HF_{RR}$  da variabilidade da FC e, conseqüentemente, à relação LF/HF. A não valorização da variação da  $LF_{PAS}$  deveu-se ao facto da variabilidade da PAS durante a respiração profunda ser muito dependente de efeitos mecânicos e das variações da pressão intratorácica.

### **6.1.2 Influência das comorbilidades nos resultados das provas**

As comorbilidades existentes em alguns doentes explicam parcialmente a disfunção autonómica. A existência de comorbilidades constitui um aspecto incontornável no estudo de doentes com nefrolitíase recorrente e existem cada vez mais evidências que relacionam a litíase renal com manifestações da síndrome metabólica, como a HTA, a obesidade e a diabetes [152]. Por este motivo, seria difícil, senão mesmo artificial,

constituir um grupo de doentes com litíase renal recorrente de dimensões suficientes para obter resultados significativos se excluíssemos os doentes com outros diagnósticos. A obesidade e a HTA foram os principais factores de confundimento. Os nossos resultados mostraram que as duas situações não se associavam entre si, motivo porque as tratámos como factores independentes na análise dos resultados das provas autonómicas. A diabetes apenas influenciou significativamente os resultados da manobra de Valsalva.

Um terço dos doentes apresentava peso corporal normal ( $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ ), outro terço tinha excesso de peso mas não apresentava critérios de obesidade e os restantes eram obesos. Estes resultados eram expectáveis e são concordantes com outros trabalhos que demonstraram que os doentes com nefrolitíase apresentam maior prevalência de excesso de peso e obesidade em relação à generalidade da população [93;94;286]. No entanto, estas diferenças do peso e do IMC entre doentes e controlos têm de ser valorizadas na interpretação dos resultados em virtude da obesidade e da síndrome metabólica estarem associadas a disfunção autonómica [287;288].

As alterações autonómicas relacionadas com a obesidade incluem a diminuição da variabilidade da FC em repouso [289], menor controlo vagal da FC em resposta a estímulos parassimpáticos [255] e hiperactividade simpática em resposta aos estímulos simpáticos, principalmente em indivíduos com obesidade visceral [290]. Estas alterações podem ser identificadas muito precocemente nos indivíduos obesos. Num estudo caso/controlo, Brunetto *et al.* [256] compararam a variabilidade da FC em resposta ao ortostatismo passivo entre adolescentes obesos ( $IMC > 27 \text{ Kg/m}^2$ ) e com peso normal, demonstrando que a variabilidade da FC era menor nos adolescentes obesos, tanto em decúbito como durante o ortostatismo passivo.

No nosso estudo, as manifestações de disautonomia relacionadas com a obesidade manifestaram-se fundamentalmente por diminuição do controlo vagal da FC. Com excepção da prova de *tilt*, os doentes com nefrolitíase apresentaram menor potência das  $HF_{RR}$  nos registos basais de todas as provas autonómicas. As diferenças não apresentaram significado estatístico nas provas de aritmética mental e de respiração profunda compassada, mas nos registos basais da prova de *handgrip* e da manobra de Valsalva a potência das  $HF_{RR}$  foi significativamente inferior nos doentes obesos

relativamente aos não obesos. Na prova de *tilt*, a potência das HF<sub>RR</sub> durante o período de adaptação ao ortostatismo foi significativamente inferior nos doentes obesos.

Não observámos diferenças nos componentes da variabilidade da FC sugestivas de hiperactividade simpática entre doentes obesos e não obesos em repouso e em resposta aos diversos estímulos. Por este motivo, o IMC mais elevado do grupo de doentes com nefrolitíase não explicava o aumento da actividade simpática em resposta a alguns estímulos que caracterizava este grupo.

Na prova de *tilt*, a PAS em decúbito foi mais elevada nos doentes com hiperuricémia e nos obesos. Não dispomos dos valores dos lípidos nem da glicémia em jejum, mas os valores mais elevados da PA nos doentes com aquelas características são relevantes porque a obesidade, a HTA e a hiperuricémia constituem manifestações frequentes da síndrome metabólica [291]. A hipótese duma possível associação da nefrolitíase com a síndrome metabólica obteve recentemente maior consistência, com a publicação em 2008 dos resultados dum estudo transversal efectuado numa amostra representativa da população adulta norte-americana, incluída no *National Health and Nutrition Examination Survey* 1988-1994 (NHANES III). Este estudo demonstrou que os doentes com várias manifestações da síndrome metabólica apresentavam maior probabilidade de desenvolver litíase renal [292]. Existem outras evidências sugestivas desta associação: a diminuição do pH da urina é uma das alterações renais frequentes na síndrome metabólica [293] e foi demonstrado que os doentes com nefrolitíase e hipertensão essencial apresentavam um aumento da excreção urinária de acidez titulável em comparação com doentes normotensos com litíase [294]. Estes resultados reforçaram a hipótese da HTA nos doentes com nefrolitíase constituir uma manifestação da síndrome metabólica.

A etiopatogenia da HTA associada à síndrome metabólica não está completamente esclarecida mas dados disponíveis sugerem que possa ser multifactorial. Estudos baseados na análise da variabilidade dos parâmetros cardiovasculares demonstraram que a disfunção autonómica pode contribuir para a etiopatogenia da HTA na síndrome metabólica. Um estudo em 2.359 indivíduos com idades compreendidas entre os 45 e os 64 anos, incluindo controlos saudáveis e doentes com várias componentes da síndrome metabólica (hipertensão arterial, dislipidemia ou diabetes), revelou uma diminuição da variabilidade da FC em repouso no grupo de doentes caracterizada

principalmente pela diminuição da potência das  $HF_{RR}$ , sugestiva de diminuição do controlo vagal da FC [295]. Recentemente, demonstrou-se que a síndrome metabólica estava associada à disfunção dos baroreceptores e a aumento da actividade simpática a nível muscular [296].

A fisiopatologia da disfunção simpática na síndrome metabólica não está esclarecida. Um estudo caso/controlo revelou que indivíduos obesos apresentavam uma redução global das  $LF_{RR}$  no Holter das 24 horas, mas durante o período pós-prandial os doentes obesos revelavam aumentos superiores da FC, da potência das  $LF_{RR}$  e da relação LF/HF em relação aos controlos não obesos [297]. Este aumento da actividade simpática no período pós-prandial indicava uma provável influência da insulina na fisiopatologia da HTA. Contudo, a análise da variabilidade da FC após administração aguda de insulina em voluntários saudáveis demonstrou que esta só estimulava a actividade simpática nos indivíduos com maior sensibilidade à insulina, o que não acontecia nos indivíduos com insulino-resistência aumentada [298]. Estes resultados contrariam a hipótese do aumento da actividade simpática ser consequência directa da acção da insulina, embora possa resultar do ambiente de insulino-resistência que caracteriza a obesidade e a síndrome metabólica.

O aumento da PAS em decúbito nos doentes hiperuricémicos e/ou obesos poderia ocorrer independentemente da actividade autonómica. De facto, na análise do domínio do tempo os deltas da FC e da PA foram idênticos nos doentes com obesidade ou hiperuricémia, comparativamente aos doentes sem aquelas características, e as análises no domínio do tempo-frequência não demonstraram diferenças nos componentes da variabilidade da FC e da PAS em função daqueles factores independentes. Como é do conhecimento geral, a regulação da PA efectua-se por vários mecanismos e a actividade do SNA representa apenas um deles. Os mecanismos que têm sido sugeridos para explicar o aumento da PA na obesidade incluem a retenção urinária de sódio e a diminuição dos níveis do péptido natriurético auricular, com consequente expansão de volume plasmático, e a produção de substâncias vasoactivas pelos adipócitos, nomeadamente de angiotensina II, ácidos gordos insaturados [299] e citocinas (leptina e adiponectina) provenientes da acumulação de gordura visceral [300]. O desenvolvimento de HTA secundária à

hiperuricemia foi relacionado em modelos animais com alterações vasculares renais e com aumento da sensibilidade ao sódio [77].

A menor potência das HF<sub>RR</sub> nos doentes hiperuricosúricos representou um resultado relevante. A hiperuricosúria constitui um factor de risco frequente para nefrolitíase recorrente e um dos principais mecanismos etiopatogénicos da formação de cálculos renais [301-304]. No nosso estudo, não encontramos associação da hiperuricosúria com a hiperuricémia, obesidade ou antecedentes de HTA. O nosso resultado concorda com a generalidade dos conhecimentos disponíveis. Em termos fisiopatológicos, o aumento da excreção urinária de uratos é consequência da menor reabsorção tubular e aumento da sua *clearance* urinária [305]. Assim, na ausência de aumento anormal da produção de uratos, os indivíduos hiperuricosúricos podem apresentar valores séricos de ácido úrico normais ou baixos. Na maioria dos doentes com nefrolitíase idiopática, a hiperuricosúria está associada ao consumo exagerado de proteínas na dieta e não existem alterações do metabolismo dos uratos relacionadas com a síndrome metabólica ou gota úrica, nomeadamente hiperuricémia, diminuição da fracção de excreção de uratos ou redução do pH urinário [306]. Por estes motivos, consideramos que os resultados demonstram que a diminuição da HF<sub>RR</sub> nos doentes hiperuricosúricos é independente de qualquer das comorbilidades documentadas no grupo de doentes. Em nossa opinião, este representa o primeiro estudo que relaciona a hiperuricosúria com diminuição da variabilidade da FC.

Na prova de *tilt*, associámos o aumento da potência das LF<sub>PAS</sub> durante o ortostatismo com a existência dum subgrupo de doentes com antecedentes de HTA. A hiperactividade simpática nos indivíduos hipertensos também foi observada noutros estudos [161-163]. No entanto, a percentagem relativamente elevada de hipertensos no grupo de doentes com nefrolitíase (cerca de 43%) não resultou de critérios de selecção e foi concordante com resultados de estudos independentes que demonstraram maior prevalência de HTA nos doentes com nefrolitíase [3;4].

Nas provas pressoras não observámos diferenças nas respostas hemodinâmicas entre os doentes hipertensos e os normotensos. Os componentes da variabilidade cardiovascular não demonstraram maior actividade simpática nos doentes hipertensos em relação aos normotensos, quer na comparação dos valores basais bem como nas respostas dos dois grupos a cada estímulo. Este resultado confirma os estudos prévios



que demonstraram que os doentes com antecedentes de HTA não apresentavam respostas hemodinâmicas mais intensas durante os testes pressores [264]. Num grupo de indivíduos idosos estudados por James *et al.* [307], não observaram diferença no delta da PA entre hipertensos e normotensos durante a prova de *handgrip*. Um estudo com 109 adolescentes hipertensos não permitiu identificar diferenças nos aumentos da PA durante o *handgrip* em relação aos controlos normotensos com a mesma idade [261]. Van Egeren *et al.* [260] atribuíram a ausência de relação das respostas hemodinâmicas nas provas pressoras com a existência de antecedentes de HTA ao facto das provas autonómicas serem efectuadas num ambiente laboratorial e de estas condições “artificiais” não reproduzirem adequadamente as condições existentes na vida real. Outra possível explicação seria o facto, já anteriormente mencionado, das alterações autonómicas serem mais evidentes nas fases iniciais da HTA. Foi referido que a prova de aritmética mental era influenciada por diversos factores, incluindo a idade e a gravidade da HTA. Ruediger *et al.* [275], demonstraram um aumento da potência das LF<sub>RR</sub> durante o *stress* mental num grupo de 20 doentes hipertensos comparativamente com 20 controlos normotensos. Contudo, Itoh *et al.* [308] só encontraram aumentos significativos na PA e na relação LF/HF<sub>RR</sub> em indivíduos mais jovens com hipertensão *borderline*, não observando diferenças entre hipertensos e normotensos em indivíduos com idade superior a 50 anos.

No nosso estudo, observámos aumentos excessivos da PA e/ou FC nas provas pressoras em doentes sem antecedentes conhecidos de HTA e os estudos da variabilidade da FC e da PAS demonstraram sinais evidentes de hiperactividade simpática nos doentes sem antecedentes conhecidos de HTA. As respostas anómalas nestas provas foram relacionadas por outros autores a aumento do risco de desenvolvimento futuro de HTA em indivíduos normotensos [264]. As respostas hipertensivas à aritmética mental foram associadas à variabilidade da PA em registos ambulatoriais de 24 horas [263]. Contudo, trabalhos recentes questionaram a relação entre antecedentes de HTA com alterações da variabilidade do intervalo RR ou da PAS nos testes de *stress* mental [309].

Independentemente da existência de comorbilidades, os doentes com nefrolitíase recorrente que estudámos apresentaram sinais de disfunção autonómica que se manifestou sobretudo por aumento da actividade simpática eferente em resposta a

vários estímulos. Estas alterações foram parcialmente explicadas pela coexistência de antecedentes de HTA em alguns doentes. Observámos ainda manifestações subtis de disfunção do sistema nervoso parassimpático relacionadas com a obesidade, diabetes e alterações do metabolismo do ácido úrico. No seu conjunto, estas alterações poderão contribuir para o aumento do risco de doenças cardiovasculares.

### **6.1.3 Considerações e discussões relacionadas com a metodologia utilizada**

Este trabalho leva-nos a tecer algumas considerações relativas à metodologia utilizada.

Assim:

Não podemos excluir a possibilidade da população estudada ser constituída por doentes com formas de litíase renal mais activas do que a maioria dos doentes com nefrolitíase. Os doentes foram recrutados em diversas consultas de Nefrologia e este método não permite excluir um possível viés de selecção porque os doentes enviados para consultas da especialidade poderiam apresentar formas de nefrolitíase mais graves. O número de episódios sintomáticos e a documentação de complicações da litíase renal em cerca de 23% dos doentes sugerem esta possibilidade. Importa referir que as características da população estão de acordo com a selecção da nefrolitíase recorrente como paradigma para o estudo da actividade do SNA nos doentes com litíase renal, e os resultados só devem ser interpretados neste contexto. A nefrolitíase recorrente constitui uma entidade específica que afecta um subgrupo de doentes com litíase renal. Embora esta seja uma doença relativamente prevalente na população geral, apresenta uma actividade clínica muito variável. A maioria dos indivíduos com um episódio sintomático de litíase renal pode não voltar a apresentar manifestações da doença e não existe consenso acerca da necessidade desses indivíduos fazerem estudos para identificar eventuais alterações metabólicas [310]. Por analogia, se existirem manifestações de disautonomia associadas a um aumento do risco de doença cardiovascular, a probabilidade de identificar essas alterações seria maior nos doentes com formas activas e recorrentes da doença do que em indivíduos com um único episódio sintomático durante a vida.

O recrutamento dos doentes nas consultas da especialidade de Nefrologia apresentou a vantagem de reunir um grupo relativamente homogéneo de doentes com critérios rigorosos de inclusão, nomeadamente o facto de efectuarem o estudo metabólico

exaustivo em condições estandardizadas. O estudo nestas condições não seria possível com o recrutamento efectuado de outra forma.

A actividade da litíase renal e a gravidade das complicações foi semelhante à descrita numa consulta hospitalar de litíase renal [2]. Além disso, limitámos o estudo a doentes sem episódios sintomáticos e/ou complicações recentes da nefrolitíase e excluímos os doentes com doença renal crónica em estadio 2 ou mais grave. A exclusão de casos de litíase renal de causa secundária limitou o número de variáveis de confundimento dado que, na maioria dos casos, não são conhecidos os efeitos das doenças relacionadas com nefrolitíase secundária na actividade do SNA. Foram descritas alterações autonómicas em diferentes tipos de doenças como, por exemplo, nas doenças inflamatórias intestinais [311].

A distribuição das alterações urinárias relacionadas com o risco de nefrolitíase foi semelhante ao descrito noutros trabalhos efectuados na população portuguesa com nefrolitíase recorrente [2;312].

Uma elevada percentagem de doentes efectuava tratamento médico para prevenção da nefrolitíase e um número significativo de doentes tinha sido submetido a intervenções urológicas. Estas características discordam dos resultados publicados na população Portuguesa que mostraram que a maioria dos doentes com litíase cálcica idiopática recorrente apenas tinha efectuado terapêutica sintomática [2]. A diferença pode ser explicada por os doentes que participaram no estudo serem referenciados por consultas de Nefrologia onde o tratamento preventivo passou recentemente a ser efectuado de forma sistemática. No entanto, nem o facto de os doentes terem efectuado tratamento prévio nem a sua forma (médico ou urológico) estiveram associados à existência de antecedentes de HTA ou a diferenças significativas nos resultados dos testes autonómicos.

A actividade autonómica eferente foi avaliada indirectamente por um conjunto de cinco provas destinadas a estudar a actividade dos ramos simpático e parassimpático do SNA. Os resultados destas provas analisados no domínio do tempo sugeriram a existência de disfunção autonómica em todos os doentes, manifestada por maior FC e PA em comparação com o grupo de controlos, quer durante os registos basais como em resposta aos vários estímulos. Com efeito, as análises no domínio do tempo demonstraram aumentos excessivos da FC e/ou da PA em resposta aos estímulos

simpáticos em todos os doentes com nefrolitíase recorrente. Os aumentos foram observados em pelo menos duas provas e, na maioria dos doentes, nas três provas em que foi estudado o efeito da estimulação simpática, um número significativamente maior do que o observado no grupo de controlos.

As análises no domínio do tempo revelaram pouca sensibilidade para identificar alterações na actividade parassimpática e pouca especificidade para identificar diferenças na actividade simpática entre doentes e controlos, dado que também observámos alterações numa percentagem significativa de controlos saudáveis.

A ausência de definições consensuais para considerar “anormais” as respostas aos diversos estímulos pode ter contribuído para a menor especificidade das análises no domínio do tempo. Estas análises basearam-se numa adaptação do protocolo de Ewing que foi originalmente utilizado para quantificar diminuições da actividade simpática e/ou, parassimpática, mais especificamente no quadro da disautonomia da diabetes *Mellitus* [221;313]. Recentemente, foi demonstrado que a disfunção autonómica que acompanha algumas doenças associadas a hiperinsulinismo e aumento da resistência à insulina (nomeadamente a obesidade e a síndrome metabólica) também se manifesta, nas fases iniciais, por aumento da actividade simpática [314]. A HTA essencial caracteriza-se pelo aumento precoce da actividade simpática [160]. Por este motivo, a análise no tempo das provas incluídas no protocolo de Ewing tem sido modificada em vários estudos de forma a identificar o aumento na actividade simpática eferente.

No entanto, comparativamente com as definições de diminuição da actividade simpática e/ou parassimpática utilizadas no protocolo de Ewing ‘clássico’, a interpretação das provas com o objectivo de identificar a hiperfunção simpática apresenta alguns problemas práticos, principalmente a inexistência de definições consensuais. Enquanto a hipotensão ortostática, por exemplo, foi consensualmente definida como uma redução da PAS > 20 mmHg após a passagem de decúbito para ortostatismo [315], não existe uma definição estandardizada de aumento ‘anormal’ da PA durante o ortostatismo passivo. A definição de hipertensão ortostática que utilizámos neste trabalho (aumento da PAS  $\geq$  20 mmHg após a passagem de decúbito para o ortostatismo) é, provavelmente, a mais consensual [316]. Esta definição foi utilizada em estudos efectuados em doentes idosos com HTA essencial e, neste grupo

etário, foi demonstrado que a HTA ortostática definida deste modo estava associada a resultados adversos, nomeadamente à documentação de enfartes cerebrais silenciosos na ressonância magnética nuclear [317].

Também não encontramos uma definição consensual para classificar o aumento da PA diastólica na prova de *tilt* como excessivo. Streeten *et al.* [318] identificaram um grupo de doentes hipertensos que apresentavam PAD inferior a 90 mmHg em decúbito, que aumentava para valores superiores a 90 mmHg durante o ortostatismo passivo, e demonstraram que o aumento estava relacionado com maior actividade simpática e vasoconstricção arteriolar como resposta ao aumento de *pool* venoso dos membros inferiores. Utilizando a mesma definição, Yoshinari *et al.* [319] demonstraram que a HTA ortostática nos doentes diabéticos estava associada a *outcomes* clínicos adversos, nomeadamente ao desenvolvimento de hipertensão mantida. No entanto, no nosso estudo, todos os doentes apresentaram PAD superior a 90 mmHg durante o ortostatismo, o que não diferenciava as respostas entre subgrupos de doentes. Por este motivo, só classificámos como excessivos os aumentos da PAD superiores a 10 mmHg após a passagem do decúbito para o ortostatismo. No entanto, este critério é mais conservador, quando comparado com os restantes autores, e não podemos excluir a hipótese da percentagem de doentes que desenvolveram hipertensão ortostática durante o *tilt* estar subavaliada.

A ausência de definições consensuais para identificar respostas simpáticas excessivas foi mais limitante na interpretação das provas pressoras (*handgrip* e aritmética mental) nas quais utilizámos valores adaptados da literatura internacional. Os resultados das provas pressoras são variáveis com a idade, pelo que são necessários grandes grupos para definir os valores normais em cada grupo etário. Os resultados do nosso laboratório foram obtidos num grupo relativamente reduzido de indivíduos saudáveis ( $n = 30$ ) e esse facto não permitiu definir os intervalos de referência para as diferentes classes etárias. Acresce que nos controlos do nosso laboratório os deltas da PA e da FC durante as provas de *handgrip* e de aritmética foram ligeiramente superiores aos resultados da literatura internacional [222], pelo que só classificámos como excessivos os aumentos da PA e da FC que superaram os limites das referências internacionais, ajustados ao respectivo grupo etário, acrescidos de uma margem de 10%. A adopção deste critério para acomodar eventuais diferenças populacionais e

reduzir a probabilidade de resultados falsos positivos não permite, contudo, excluir a sua contribuição para a baixa sensibilidade dos testes pressores para diferenciar as respostas dos doentes e dos controlos com os métodos de análise no domínio do tempo.

Os métodos de análise no domínio do tempo-frequência revelaram maior sensibilidade e especificidade para identificar diferenças entre doentes e controlos, e permitiram localizar as alterações no tempo. Nestas análises, utilizámos dois algoritmos diferentes: a transformada discreta de *wavelets* e a transformada de Hilbert-Huang. A transformada discreta de *wavelets* é um método mais divulgado e validado para analisar a variabilidade cardiovascular em períodos de tempo relativamente breves ( $\geq 10$  segundos) [226;228]. Utilizando a análise de *wavelets*, foi possível identificar alterações subtis do SNA em jovens normotensos em que um dos pais apresentava antecedentes de HTA em relação aos controlos em que ambos os pais eram normotensos [251].

A transformada de Hilbert-Huang é baseada num algoritmo matemático mais recente, baseado na teoria do caos, mas menos divulgado, pelo que não apresenta uma fundamentação teórica tão sólida. Teoricamente, a transformada de Hilbert-Huang apresenta vantagens sobre a análise de *wavelets* porque os pressupostos da sua utilização não incluem a necessidade de linearidade ou estabilidade do sinal a analisar, o que torna este método menos vulnerável à falta de dados no registo (ou artefactos que tenham sido removidos), registos com tendência a variações lineares ou em patamar dos dados (relacionados com variações electrónicas nos equipamentos de medida) ou oscilações mistas em diversas frequências [320]. A transformada de Hilbert-Huang foi utilizada em 1998 por Huang *et al.* [321] na análise da variabilidade da pressão arterial e permitiu decompor empiricamente as variações da PA em várias frequências instantâneas no tempo. Posteriormente a transformada de Hilbert-Huang foi utilizada em estudos para estudar os mecanismos de auto-regulação do fluxo de sanguíneo cerebral [322-324].

Neste estudo, considerámos válida a utilização simultânea dos dois métodos de análise no domínio do tempo-frequência por dois motivos: 1) a transformada de Hilbert-Huang, como método independente e menos vulnerável a artefactos, confirmou as manifestações de disautonomia identificadas pela análise de *wavelets*

em várias provas; 2) a validade da transformada de Hilbert-Huang no estudo não invasivo do SNA foi confirmada pela excelente correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. No entanto, referimos o facto da transformada de Hilbert-Huang se ter revelado menos adequada para análise de registos com duração mais curta, o que não permitiu obter resultados da manobra de Valsalva, na qual existia a necessidade analisar intervalos de tempo com 15 segundos de duração.

#### **6.1.4 Dificuldades técnicas do estudo clínico**

O perímetro abdominal não foi medido o que poderia caracterizar melhor a obesidade e a presença de síndrome metabólica.

Devido ao facto dos doentes serem seleccionados em consultas da especialidade de Nefrologia, não podemos excluir a possibilidade dum viés de selecção por serem doentes com litíase renal mais grave do que a maioria dos doentes com nefrolitíase recorrente.

Alguns doentes apresentavam complicações renais da nefrolitíase e/ou intervenções urológicas, mas não encontramos referências que permitissem saber se as complicações obstrutivas ou intervenções urológicas influenciavam a actividade autonómica eferente.

## **6.2 Discussão dos resultados das experiências em modelos animais**

Por comodidade de exposição, discutimos em separado os resultados de cada um dos modelos animais. Assim:

### **6.2.1 Experiências efectuadas com o modelo de ratos Zucker obesos**

Utilizámos os ratos Zucker obesos com o objectivo de avaliar se a obesidade provocava nefrolitíase no modelo animal e se, nesse caso, as alterações autonómicas seriam semelhantes às que observámos na nefrolitíase humana. Foram descritos vários modelos genéticos para o estudo dos efeitos da obesidade e da síndrome metabólica em espécies murinas [325;326], mas os ratos Zucker obesos (ratos homozigóticos para o gene *fa*) constituem o modelo genético mais utilizado no estudo destas patologias. Estes ratos são portadores duma mutação do alelo *fa* descrita em 1961 por Zucker *et*

al. [327], após cruzamento de estirpes de ratos Sherman com um grupo de ratos da estirpe 13M da Merck. Esta mutação é transmitida de forma autossómica recessiva. Os ratos Zucker homocigóticos (*fa/fa*) desenvolvem espontaneamente hiperfagia e obesidade nas primeiras semanas de vida e na idade adulta apresentam hipercolesterolemia [328], hipertrofia e hiperplasia dos adipocitos [329] e hiperinsulinismo [330].

O exame histológico dos rins dos ratos Zucker obesos revelou aumento das dimensões dos glomérulos e ausência de cálculos ou lesões túbulo-intersticiais em todos os animais. As alterações glomerulares observadas neste modelo concordam com as lesões histopatológicas descritas por outros autores em ratos da mesma estirpe, nomeadamente glomerulomegália e glomerulosclerose focal e segmentar [331;332]. Não encontramos na bibliografia referências à ausência de cálculos renais nos ratos Zucker obesos mas atribuímos a inexistência dessas descrições ao facto dos trabalhos disponíveis não investigarem esta consequência renal da obesidade, o que seria devido ao facto de não utilizarem colorações específicas para a pesquisa de cristais.

Os resultados das nossas experiências excluíram a utilização do modelo de ratos Zucker obesos para estudar a nefrolitíase em modelos animais por revelar diferenças muito acentuadas com a nefrolitíase humana, na qual a obesidade parece constituir um factor de risco importante para o desenvolvimento de nefrolitíase. Nos animais de laboratório são necessários estímulos litogénicos mais intensos.

Pelos motivos expostos, recorreremos a modelos de nefrolitíase experimental induzida por fármacos, em ratos Wistar, para estudar a actividade autonómica em modelos animais.

### **6.2.2 Modelo de nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol**

A formação de cálculos renais foi induzida em ratos com a administração de calcitriol e etileno glicol.

A litíase renal raramente ocorre de forma espontânea em animais de laboratório, o que poderá resultar da actividade da uricase nos mamíferos, uma enzima que metaboliza o ácido úrico em alantoína. A alantoína é muito mais solúvel na urina do que o ácido úrico [333]. Com excepção do Homem e de alguns primatas superiores (e dos cães de raça Dálmata, mas por motivos diferentes), a excreção urinária de ácido úrico é muito



reduzida nos mamíferos [334]. O ácido úrico na urina é um importante promotor da litogênese porque cristaliza com pH reduzido [335], o que promove a formação de cálculos de ácido úrico se o pH urinário se mantiver persistentemente <5.5 [54] e promove a litíase cálcica se a concentração urinária de ácido úrico for elevada [64]. Por isto, o desenvolvimento de nefrolitíase em animais de laboratório requer a administração de ácido oxónico, para inibir a uricase, ou de estímulos que promovam a excreção urinária de outros promotores da litogênese, nomeadamente do cálcio e do oxalato, em valores suprafisiológicos.

A inibição da uricase em ratos provoca hiperuricémia aguda, desenvolvimento de lesões estruturais das artérias pré-glomerulares, HTA grave e insuficiência renal grave [79;336]. Em consequência do desenvolvimento de HTA, a inibição da uricase não seria um método adequado para investigar diferenças na actividade eferente do SNA relacionadas com a presença de cálculos renais.

Foram descritos modelos animais que desenvolveram formação de cristais de cálcio nas espécies murinas, mas a formação de cálculos renais com dimensões significativas foi inconstante [337]. A hipercalcúria é um factor de risco importante para a cristalização do cálcio na urina. O modelo genético de ratos espontaneamente hipercalcúricos demonstrou que a formação de cálculos renais de dimensões suficientemente grandes para ficarem retidos no espaço urinário requeria a presença concomitante de lesão tubular ou de outras alterações urinárias [338;339]. A administração oral de etileno glicol demonstrou ser um método fiável para aumentar a excreção urinária de oxalato e provocar a formação de cálculos renais em ratos [340]. A administração simultânea de etileno glicol e calcitriol revelou ser um método consistente e reprodutível na indução de cálculos renais em ratos [341].

Neste estudo, o tratamento com etileno glicol e calcitriol aumentou a excreção urinária de oxalato e de cálcio que resultou na formação de cálculos de dimensões suficientes para ficarem retidos nos túbulos renais e provocarem obstrução intra-renal. Contudo, este tratamento também resultou no desenvolvimento de insuficiência renal grave num número significativo de animais, o que determinou a sua exclusão da análise deste trabalho.

Pensamos que a insuficiência renal nos ratos tratados com calcitriol e etileno glicol seria explicada pela obstrução. Além de inúmeros cálculos renais, o exame histológico

demonstrou diversas lesões túbulo-intersticiais nos rins dos ratos tratados com calcitriol e etileno glicol, as quais promoveram dilatação e obstrução dos tubos renais e fibrose intersticial extensa. É sabido que nas espécies murinas a fibrose ocorre muito rapidamente na presença de nefropatia obstrutiva [342], pelo que a gravidade da fibrose poderia ser explicada pela obstrução. As lesões glomerulares foram escassas e predominaram nos animais com insuficiência renal mais grave. Estas alterações são sugestivas duma forma secundária de glomerulosclerose relacionada com refluxo e/ou nefropatia obstrutiva [343]. A ausência de lesões vasculares concorda com o facto dos ratos com nefrolitíase não apresentarem valores de PA mais elevados do que os controlos.

A nefropatia obstrutiva explicaria o volume de urina mais elevado e a menor densidade urinária no grupo de ratos com nefrolitíase. A incapacidade para concentrar a urina é uma manifestação frequente da obstrução urinária incompleta [344]. O tratamento com calcitriol poderia contribuir para o maior volume de urina por um defeito da concentração tubular. É do conhecimento geral que o calcitriol aumenta a absorção intestinal de cálcio e não podemos excluir que a sua administração tenha provocado aumento do cálcio sérico. Os mecanismos moleculares envolvidos no défice de concentração urinária secundários à hipercalcémia não estão completamente esclarecidos, mas demonstraram que os ratos com hipercalcémia apresentavam uma diminuição da expressão da aquaporina 2 nas células principais dos tubos colectores [345]. No entanto, no nosso estudo os níveis séricos do cálcio não foram significativamente diferentes nos dois grupos. Assim, os nossos resultados sugerem que o aumento do volume de urina dos ratos com nefrolitíase seria uma consequência dum défice de concentração urinária secundário à uropatia obstrutiva.

A existência dum défice de concentração e a poliúria poderiam conduzir à contracção do volume plasmático, que explicaria a menor excreção urinária de ácido úrico dos ratos com nefrolitíase. É sabido que o volume extracelular influencia de forma decisiva a reabsorção tubular de ácido úrico e que a contracção de volume contribui para a diminuição da eliminação urinária de uratos [346]. Também foi observada diminuição da excreção fraccional de uratos em ratos nos quais provocaram contracção de volume plasmático com a administração de diuréticos [347].

Não observámos diferenças na calcémia ou fosfatémia, mas a excreção urinária de fosfato foi significativamente inferior nos ratos com nefrolitíase. Atribuímos este resultado ao tratamento com calcitriol. Os efeitos do calcitriol na eliminação renal de fósforo foram observados em vários estudos [348;349] mas os resultados não foram conclusivos devido à interferência dos níveis séricos do cálcio, da hormona paratiroideia e de outras hormonas que intervêm na regulação da excreção renal do fósforo. Foi demonstrado que na ausência de alteração dos níveis séricos de cálcio e fosfato, a administração do calcitriol em ratos aumenta a reabsorção tubular de fosfato [350].

Nos ratos com nefrolitíase, observámos diferenças significativas da variabilidade da FC em relação aos controlos manifestadas por diminuição das  $LF_{RR}$  e aumento das  $HF_{RR}$ . A diminuição das  $LF_{RR}$  e da relação LF/HF sugere uma diminuição do controlo simpático da função cardíaca. No entanto, o aumento da potência do componente  $HF_{RR}$  é mais difícil de valorizar por os ratos com nefrolitíase apresentaram uma frequência respiratória inferior aos controlos.

A potência das  $HF_{RR}$  reflecte a arritmia sinusal modulada pela actividade vagal e pela actividade respiratória. Alguns autores demonstraram, em modelos animais, uma possível dissociação entre a arritmia sinusal provocada pela respiração e pelo controlo vagal. Esta dissociação pressupõe a existência de mecanismos diferentes de controlo da FC, demonstrados num estudo realizado com ratos anestesiados que apresentaram uma arritmia sinusal paradoxal com desaceleração cardíaca durante a inspiração [351]. Nesse estudo, a arritmia respiratória paradoxal permaneceu inalterada após a realização de vagotomia bilateral, o que demonstrou que nos ratos a arritmia sinusal era consequência da actividade mecânica da respiração e não da actividade neurológica.

Não encontrámos diferenças da PA em repouso nem na variabilidade da PA entre os ratos com nefrolitíase e controlos. Este resultado não correspondeu à nossa expectativa inicial porque uma das principais razões para suspeitar de disfunção autonómica associada à nefrolitíase renal seria a elevada prevalência de HTA relatada em alguns estudos humanos. Uma provável explicação para a ausência de aumento da PA neste modelo animal estaria relacionada com o aumento da diurese no grupo de ratos com nefrolitíase a qual, ao contribuir para um certo grau de depleção do volume

extracelular, impediria o desenvolvimento da HTA. Contudo, neste caso seria expectável a ocorrência de aumento da actividade simpática e não encontramos diferenças na potência das  $LF_{PAM}$ . Neste contexto, não podemos excluir a hipótese das manifestações cardiovasculares relacionadas com a nefrolitíase serem diferentes nas espécies murina e humana.

O estudo da sensibilidade dos baroreceptores demonstrou uma diminuição severa dos baroreflexos nos ratos com cálculos renais. O ganho do baroreflexo baseia-se na diminuição fisiológica da FC pela estimulação dos baroreceptores de alta pressão localizados nas artérias de maior calibre quando aumenta bruscamente a PA. No rato, a FC diminui habitualmente de forma muito rápida, com atraso de poucos batimentos cardíacos em relação ao aumento da PA, como resultado quase imediato da resposta vagal [352]. Em seguida, a redução da FC é mantida durante algumas dezenas de segundos em consequência da diminuição da actividade simpática [353]. Os nossos resultados abrangeram todo o período que se seguiu imediatamente à administração da fenilefrina até ao momento em que a PA começou a descer, pelo que evidenciaram uma resposta vagal menos activa e uma redução insuficiente da actividade simpática na função cardíaca como resposta à hipertensão.

A diminuição da sensibilidade dos baroreceptores foi descrita em ratos com HTA e noutras situações patológicas [354-356]. No nosso estudo, não observámos diferenças significativas da PAM entre ratos do grupo com nefrolitíase em relação ao grupo de controlo. Todos os animais saudáveis foram distribuídos aleatoriamente entre os dois grupos que divergiram no tratamento necessário para o desenvolvimento de cálculos renais. Não encontramos na literatura médica referências a efeitos do calcitriol e/ou do etileno glicol que expliquem os resultados dos baroreflexos. Como referido anteriormente, o estudo dos baroreflexos foi realizado sob anestesia geral com pentobarbital. Foi descrito que a anestesia com pentobarbital diminui o ganho do baroreflexo por inibir a actividade vagal [357]. Contudo, usámos o mesmo anestésico, administrado em função do peso corporal em ambos os grupos, o que não justificava a diferença observada nos baroreflexos.

A alteração da função renal nos ratos com nefrolitíase constituiu um factor de confundimento importante na interpretação dos resultados do estudo autónomico devido à insuficiência renal estar associada a disfunção autonómica em vários

estudos. Actualmente, o conhecimento sobre a disfunção autonómica na insuficiência renal resulta de trabalhos efectuados em doentes com insuficiência renal crónica avançada (estadio 5) que demonstram que o aumento da actividade simpática eferente contribui para o desenvolvimento de HTA, arritmias cardíacas e agravamento da insuficiência cardíaca [358]. Demonstrou-se que a diminuição da variabilidade da FC contribui para o aumento do risco de morte súbita nos doentes em hemodiálise [359;360]. Estudos experimentais em ratos com insuficiência renal provocada pelo modelo de nefrectomia 5/6 demonstraram que a diminuição do tónus parassimpático era responsável por aumento da FC [361]. Num estudo com o modelo de doença poliquística renal, em ratos, observou-se que os animais com insuficiência renal apresentavam FC e PAS mais elevadas em repouso e alterações da variabilidade da FC sugestivas de aumento da actividade simpática e diminuição da actividade vagal [362]. Contudo, são muito escassos os estudos relativos à actividade do SNA em humanos e em animais com insuficiência renal ligeira/moderada pelo que os dados disponíveis não permitem a comparação com os nossos resultados.

Como consequência das dificuldades na indução de nefrolitíase em modelos animais, a disfunção renal era uma consequência previsível. Para ultrapassar esta limitação, excluímos da análise principal os resultados dos ratos com insuficiência renal grave, embora tenhamos utilizado esses animais para comparações *a posteriori* com os resultados dos ratos com disfunção renal ligeira. Relativamente a outros estudos efectuados em ratos com insuficiência renal, não observámos aumentos significativos da PA ou da FC nos ratos com nefrolitíase (e função renal preservada) em relação aos controlos. As alterações da variabilidade da FC dos ratos com nefrolitíase foram diferentes das observadas nos ratos com insuficiência renal. Estes resultados sugerem que as alterações da variabilidade da FC observadas nos ratos com nefrolitíase não podem ser atribuídas à disfunção renal.

Os nossos resultados demonstraram que o modelo de nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol está associado a disfunção autonómica que se manifestou por diminuição do controlo simpático da FC e diminuição severa dos baroreflexos cardíacos.

### **Dificuldades técnicas do modelo de nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol**

O modelo de nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol foi limitado pelo desenvolvimento de insuficiência renal num número significativo de ratos.

O estudo dos baroreflexos apenas foi realizado nos animais que concluíram quatro semanas de tratamento.

### **6.2.3 Estudo da actividade do nervo renal**

O conjunto de experiências destinadas ao estudo da actividade do nervo renal (ANR) demonstrou um aumento da actividade nervosa no registo basal dos ratos com nefrolitíase induzida por calcitriol e etileno glicol em comparação com os ratos de controlo. Nos ratos com nefrolitíase, as experiências demonstraram uma diminuição significativa da ANR após obstrução subaguda do ureter ipsilateral. Julgamos ser este o primeiro estudo relativo à ANR em modelo animal de nefrolitíase.

Nas experiências iniciais com o modelo de nefrolitíase induzida com calcitriol e etileno glicol observámos alterações no controlo simpático da FC. Naquele modelo experimental, a disfunção simpática poderia resultar da presença de cálculos no parênquima renal, da obstrução intra-renal ou da insuficiência renal ligeira. Estas medições da actividade nervosa permitiram relacionar a nefrolitíase com a ANR porque neste conjunto de experiências administrámos o tratamento durante duas semanas e não incluímos ratos com insuficiência renal. Assim, as alterações observadas na ANR poderiam ser secundárias à presença de cálculos no parênquima renal e/ou obstrução.

Foram documentadas alterações da actividade aferente do nervo renal (ARNA) em diversos modelos animais de doença renal, nomeadamente na diabetes [363], na lesão renal pós-isquémica [364] e após alívio da obstrução renal durante 24 horas [365].

Os nervos renais incluem fibras que transmitem a actividade nervosa aferente do rim (ARNA) para o SNC e fibras simpáticas pós-ganglionares que transmitem a actividade simpática eferente destinada ao rim (RNSA). Neste estudo, a actividade do nervo renal correspondia à actividade nervosa integrada. Os métodos utilizados não permitiram identificar qual dos dois componentes da actividade nervosa contribuiu para o aumento da ANR basal nos ratos com nefrolitíase. A actividade aferente poderia estar aumentada devido à estimulação de dois tipos de receptores sensoriais

nas terminações dos nervos aferentes do rim: mecanoreceptores e quimiorreceptores. Os mecanoreceptores são sensíveis à pressão e detectam a obstrução ao fluxo de urina [366-368]. Os quimiorreceptores são sensíveis à composição da urina e do interstício [369;370]. A histologia confirmou a presença de cálculos renais e grande dilatação dos tubos renais nos rins dos ratos com nefrolitíase, sugestivas de obstrução intrarenal. Concomitantemente, observou-se um débito de urina muito superior nos ratos deste grupo comparativamente aos controlos. Estes factores estimulariam os mecanoreceptores existentes no rim. A densidade urinária foi inferior nos ratos com nefrolitíase relativamente aos controlos. Esta diferença seria detectada pelos quimiorreceptores R2 localizados no bacinete renal [370]. Assim, os efeitos da estimulação dos mecanoreceptores e quimiorreceptores explicariam o aumento da ARNA no registo basal.

Não podemos excluir um aumento concomitante da RNSA [tráfego nervoso eferente]. Como é do conhecimento geral, o rim é um órgão densamente enervado. Os estímulos nervosos aferentes do rim são processados nos centros integradores da actividade cardiovascular no SNC e contribuem para a actividade autonómica eferente e para a homeostase do SNA [371]. A informação aferente dos rins poderia influenciar a actividade simpática eferente, nomeadamente através do reflexo reno-renal [371;372]. Por este motivo, é possível admitir que a RNSA também poderia contribuir para o aumento da ANR nos ratos com nefrolitíase durante o período basal.

Nos ratos com nefrolitíase, a obstrução subaguda do ureter provocou uma redução significativa do número de impulsos/segundo no nervo renal em relação ao registo basal. Realçamos a não observação de qualquer alteração da ANR após a obstrução no grupo de controlos. Uma explicação provável para esta diferença na resposta à obstrução subaguda do ureter resultaria da diferença no débito urinário entre grupos, que foi significativamente inferior no grupo de controlos. As medições da ANR foram efectuadas após 20 minutos de obstrução do ureter em ambos os grupos mas o volume de urina produzido durante esse intervalo de tempo poderia não ser igual nos dois grupos. Assim, nos ratos de controlo o volume de urina seria insuficiente para aumentar significativamente a pressão no bacinete ipsilateral, o que explicaria a ausência de alterações na ANR em relação ao período basal.

Neste conjunto de experiências, o objectivo da clampagem do ureter foi avaliar os efeitos da obstrução subaguda na actividade nervosa do rim e procurar diferenciá-los dos efeitos da simples presença dos cálculos no parênquima renal. De acordo com este objectivo, a diminuição do número de impulsos/segundo na ANR dos ratos com nefrolitíase durante a clampagem do ureter foi um resultado relevante porque demonstrou que a obstrução não foi a causa principal do aumento da ANR no período basal, o qual seria consequência da presença de cálculos renais e/ou de alterações na composição da urina.

Durante a obstrução do ureter não observámos alteração da PA em nenhum dos grupos mas observámos um aumento da FC nos ratos com nefrolitíase. Este resultado permitiu relacionar as variações da ANR com a actividade autonómica e com os seus efeitos no sistema cardiovascular. O aumento da FC, na presença de valores mantidos da PA, demonstrou que os efeitos da ANR no SNA foram selectivos, ou seja, só se manifestaram no controlo da actividade cardíaca. Estes resultados são concordantes com outros estudos que descreveram que a actividade nervosa aferente do rim é integrada nos circuitos neuronais que controlam toda a actividade autonómica e a função dos órgãos efectores [373]. Os mecanismos precisos como esta integração é efectuada não bem estão esclarecidos, mas demonstraram que os efeitos cardiovasculares seriam relativamente selectivos: a estimulação eléctrica das fibras nervosas aferentes dos rins não exerceu um efeito sistemático na PA sistémica (que pode aumentar ou diminuir) e que os efeitos cardiovasculares resultantes da estimulação simpática provocada pela infusão intra-renal de adenosina são limitados à actividade cardíaca [371].

Concluímos que o modelo de nefrolitíase de ratos induzida por calcitriol e etileno glicol está associado ao aumento da actividade do nervo renal. A diminuição desta durante a obstrução urinária subaguda, sugere que o seu aumento no período basal não é explicado pela obstrução urinária.

#### **Dificuldades técnicas do estudo da actividade do nervo renal**

O ruído de fundo afectou a qualidade dos registos da actividade do nervo renal. O valor relativamente elevado do filtro de altas frequências pode ter diminuído a qualidade dos registos.



Devido à diferença do débito urinário entre os grupos, o intervalo de tempo entre a clampagem do ureter e a repetição dos registos de nervo pode ter sido insuficiente para excluir o efeito da obstrução urinária na ANR no grupo de controlos.

#### **6.2.4 Modelo de deservação unilateral do rim**

O modelo de deservação unilateral do rim não identificou diferenças no número de cálculos formados e na gravidade das lesões provocadas no parênquima renal pelos depósitos cristalinos. Estes resultados não corroboraram a nossa hipótese.

A ausência dum efeito protector da deservação renal no desenvolvimento de nefrolitíase foi um resultado inesperado. Os primeiros estudos sobre os efeitos da enervação renal, na década de 1930, demonstraram que a estimulação nervosa do rim apresentava um efeito antidiurético e, conseqüentemente, a deservação renal aumentava o volume de urina produzido [374;375]. Além disso, a estimulação nervosa do rim aumenta a reabsorção tubular de solutos, incluindo bicarbonato [376;377], que diminuía o pH da urina. Assim, a abolição da actividade simpática renal deveria resultar numa urina mais diluída e menos ácida e, conseqüentemente, numa diminuição do risco litogénico por diminuição da supersaturação urinária em oxalato de cálcio e ácido úrico.

Consideramos que os nossos resultados não permitem tirar conclusões definitivas sobre um eventual efeito da enervação autonómica no risco litogénico. Apesar do conteúdo em noradrenalina dos rins desnervados ter sido significativamente menor (cerca de 18%) do que os rins contralaterais, outros autores consideraram necessário que o conteúdo em noradrenalina do rim deservado fosse inferior a 10% do valor do rim contralateral para assumir o sucesso da deservação [378]. Assim, a concentração de noradrenalina dos rins desnervados só permitiria assumir a deservação parcial. Uma das hipóteses para explicar esta dificuldade seria a possibilidade de algumas fibras nervosas simpáticas não terem sido destruídas durante a cirurgia de deservação do rim. Outra hipótese, seria a regeneração do nervo renal durante o intervalo de tempo de várias semanas necessárias para recuperação completa da cirurgia e para o tratamento de indução da nefrolitíase. Demonstrou-se que a regeneração do nervo renal ocorre em poucas semanas nos ratos desnervados [379;380], embora não seja consensual que o processo de reervação seja

acompanhado por regeneração das fibras simpáticas porque que não foi observado aumento da concentração de noradrenalina no tecido renal [381].

Outro motivo pelo qual não consideramos estes resultados conclusivos relaciona-se com a gravidade das lesões histológicas, muito superior às lesões habitualmente observadas na nefrolitíase humana. Evan *et al.* [382], demonstraram diferenças relevantes na formação das placas de Randal, possivelmente consequência de diferenças da morfologia da região das papilas renais no Homem e no rato. Com excepção dos casos de litíase de brushite, em que o número dos cálculos e a gravidade das lesões são habitualmente mais elevados [383;384], na nefrolitíase humana não é normal observarem-se depósitos de material cristalino nos tubos medulares e colectores. Estas diferenças permitem questionar se a nefrolitíase em modelos de rato poderá ser extrapolada para o Homem.

A gravidade das lesões neste modelo experimental foi provavelmente muito superior à observada na nefrolitíase humana, nomeadamente nas formas idiopáticas. As lesões sugerem que ambos os rins estiveram expostos a um estímulo litogénico bastante intenso e prolongado em consequência de aumentos significativos da excreção urinária de cálcio e oxalato. Estes aumentos resultaram dos efeitos sistémicos da terapêutica sobre os rins e não foram afectados pela deservação. Assim, é admissível considerar que a intensidade do estímulo litogénico utilizado poderia ser muito superior a um eventual efeito protector da deservação.

## 7. Conclusões

Os resultados apresentados e a discussão que deles fizemos permitem-nos tirar as seguintes conclusões:

1. Existem alterações da actividade autonómica eferente em todos os doentes estudados com nefrolitíase recorrente.
2. A disfunção autonómica manifesta-se de forma mais evidente por aumento da actividade simpática sobre o sistema vascular. Diversos estímulos simpáticos (estímulos centrais, mecânicos e metabólicos) desencadeiam respostas exageradas nos doentes com nefrolitíase que se manifestam principalmente por respostas hipertensivas ao ortostatismo passivo e nas provas pressoras.
3. O aumento exagerado da pressão arterial nas respostas pressoras foi observado nos doentes com e sem antecedentes de hipertensão arterial.
4. Nos doentes com nefrolitíase recorrente existe uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca, evidenciada por métodos de análise do domínio do tempo-frequência que permitem identificar alterações do ramo simpático e parassimpático do sistema nervoso autónomo.
5. A disfunção autonómica é, em parte, justificada por comorbilidades existentes nos doentes com nefrolitíase, tais como obesidade e hipertensão.
6. A obesidade e a hiperuricosúria estão associadas à diminuição do componente de alta frequência (HF) da variabilidade da frequência cardíaca, que traduz uma diminuição do controlo parassimpático da frequência cardíaca.
7. A diminuição do componente de baixa frequência (LF) da variabilidade frequência cardíaca nos doentes com nefrolitíase recorrente não está associada

à existência de antecedentes de hipertensão arterial ou a qualquer das restantes variáveis explicativas.

8. O aumento do componente LF da pressão arterial sistólica está associado à existência de antecedentes de hipertensão arterial.
9. As experiências efectuadas em modelo de nefrolitíase animal mostram uma diminuição da potência das  $LF_{RR}$  e uma diminuição acentuada dos baroreflexos. Além da nefrolitíase, a insuficiência renal e/ou a obstrução urinária podem ter contribuído para este resultado.
10. O estudo da actividade do nervo renal evidencia um aumento significativo da actividade nervosa do rim nos ratos com nefrolitíase. O aumento não é explicado pela presença de insuficiência renal ou de obstrução urinária, o que sugere que a presença de cálculos renais contribui para a disfunção autonómica.
11. Atendendo às diferenças entre a nefrolitíase humana e os modelos animais de litíase renal actualmente existentes, tais como a necessidade dum poderoso estímulo litogénico para promover a formação de cálculos renais e a gravidade das lesões histológicas observadas nos ratos, qualquer relação entre a disfunção autonómica do estudo clínico e dos modelos animais deve ser interpretada sob reserva.
12. Globalmente, os resultados sugerem que a disfunção autonómica contribui para uma maior prevalência de doenças cardiovasculares descrita nos doentes com nefrolitíase. No entanto, estas conclusões não podem ser generalizadas para as formas de litíase renal com menor gravidade e sem carácter recorrente.
13. Consideramos que o estudo do sistema nervoso autónomo poderá constituir um instrumento importante para a identificação e prevenção do risco cardiovascular nos doentes com nefrolitíase recorrente.

## 8. Referências

1. Gillen DL, Coe FL, Worcester EM: Nephrolithiasis and increased blood pressure among females with high body mass index. *Am J Kidney Dis* 46:263-269, 2005
2. Serra A, Domingos F: *Avaliação nefrológica de uma população com litíase cálcica idiopática recorrente*. 1 ed. Porto, Laboratórios Bial, 2006
3. Robertson WG, Peacock M, Baker M *et al.*: Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol* 55:595-598, 1983
4. Cirillo M, Laurenzi M: Elevated blood pressure and positive history of kidney stones: results from a population-based study. *J Hypertens Suppl* 6:S485-S486, 1988
5. Chou YH, Li WM, Li CC *et al.*: Clinical study of uric Acid urolithiasis. *Kaohsiung J Med Sci* 23:298-301, 2007
6. Cappuccio FP, Strazzullo P, Mancini M: Kidney stones and hypertension: population based study of an independent clinical association. *BMJ* 300:1234-1236, 1990
7. Cupisti A, Morelli E, Meola M *et al.*: Hypertension in kidney stone patients. *Nephron* 73:569-572, 1996
8. Kaplan NM: *Kaplan's Clinical Hypertension*. 8 ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 1-24 pp
9. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 157:2413-2446, 1997
10. Johnson RJ, Tittle S, Cade JR *et al.*: Uric acid, evolution and primitive cultures. *Semin Nephrol* 25:3-8, 2005
11. Hoy W, Kelly A, Jacups S *et al.*: Stemming the tide: reducing cardiovascular disease and renal failure in Australian Aborigines. *Aust N Z J Med* 29:480-483, 1999
12. Chan KH, Segasothy M: Gouty arthritis in Australian Aborigines: more common than previously suspected. *Med J Aust* 181:172, 2004

13. Schutte AE, Van Rooyen JM, Huisman HW *et al.*: Factor analysis of possible risks for hypertension in a black South African population. *J Hum Hypertens* 17:339-348, 2003
14. Schutte R, Huisman HW, Malan L *et al.*: Differences in cardiovascular function of rural and urban African males: the THUSA study. *Cardiovasc J S Afr* 15:161-165, 2004
15. Cassim B, Mody GM, Deenadayalu VK, Hammond MG: Gout in black South Africans: a clinical and genetic study. *Ann Rheum Dis* 53:759-762, 1994
16. Bullen C, Tipene-Leach D, Vander HS *et al.*: Ethnic differences in blood pressure: findings from the Fletcher Challenge-Auckland University Heart and Health Study. *N Z Med J* 109:395-397, 1996
17. Gentles D, Metcalf P, Dyall L *et al.*: Blood pressure prevalences and levels for a multicultural population in Auckland, New Zealand: results from the Diabetes, Heart and Health Survey 2002/2003. *N Z Med J* 119:U2318, 2006
18. Rose BS: Gout in Maoris. *Semin Arthritis Rheum* 5:121-145, 1975
19. Trinchieri A: Epidemiological trends in urolithiasis: impact on our health care systems. *Urol Res* 34:151-156, 2006
20. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR *et al.*: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289:2560-2572, 2003
21. Messerli FH, Williams B, Ritz E: Essential hypertension. *Lancet* 370:591-603, 2007
22. Jungers P, Joly D, Barbey F *et al.*: ESRD caused by nephrolithiasis: prevalence, mechanisms, and prevention. *Am J Kidney Dis* 44:799-805, 2004
23. Ramello A, Vitale C, Marangella M: Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* 13 Suppl 3:S45-S50, 2000
24. Parks JH, Coe FL: The financial effects of kidney stone prevention. *Kidney Int* 50:1706-1712, 1996
25. Amato M, Lusini ML, Nelli F: Epidemiology of nephrolithiasis today. *Urol Int* 72 Suppl 1:1-5, 2004
26. Saigal CS, Joyce G, Timilsina AR: Direct and indirect costs of nephrolithiasis in an employed population: opportunity for disease management? *Kidney Int* 68:1808-1814, 2005
27. Hamano S, Nakatsu H, Suzuki N *et al.*: Kidney stone disease and risk factors for coronary heart disease. *Int J Urol* 12:859-863, 2005

28. Vupputuri S, Soucie JM, McClellan W, Sandler DP: History of kidney stones as a possible risk factor for chronic kidney disease. *Ann Epidemiol* 14:222-228, 2004
29. Madore F, Stampfer MJ, Rimm EB, Curhan GC: Nephrolithiasis and risk of hypertension. *Am J Hypertens* 11:46-53, 1998
30. Madore F, Stampfer MJ, Willett WC *et al.*: Nephrolithiasis and risk of hypertension in women. *Am J Kidney Dis* 32:802-807, 1998
31. Borghi L, Meschi T, Guerra A *et al.*: Essential arterial hypertension and stone disease. *Kidney Int* 55:2397-2406, 1999
32. Cappuccio FP, Siani A, Barba G *et al.*: A prospective study of hypertension and the incidence of kidney stones in men. *J Hypertens* 17:1017-1022, 1999
33. Strazzullo P, Barba G, Vuotto P *et al.*: Past history of nephrolithiasis and incidence of hypertension in men: a reappraisal based on the results of the Olivetti Prospective Heart Study. *Nephrol Dial Transplant* 16:2232-2235, 2001
34. Williams CM, Kaude JV, Newman RC *et al.*: Extracorporeal shock-wave lithotripsy: long-term complications. *AJR Am J Roentgenol* 150:311-315, 1988
35. Yokoyama M, Shoji F, Yanagizawa R *et al.*: Blood pressure changes following extracorporeal shock wave lithotripsy for urolithiasis. *J Urol* 147:553-557, 1992
36. Bataille P, Cardon G, Bouzernidj M *et al.*: Renal and hypertensive complications of extracorporeal shock wave lithotripsy: who is at risk? *Urol Int* 62:195-200, 1999
37. Strohmaier WL, Carl AM, Wilbert DM, Bichler KH: Effects of extracorporeal shock wave lithotripsy on plasma concentrations of endothelin and renin in humans. *J Urol* 155:48-51, 1996
38. Elves AW, Tilling K, Menezes P *et al.*: Early observations of the effect of extracorporeal shockwave lithotripsy on blood pressure: a prospective randomized control clinical trial. *BJU Int* 85:611-615, 2000
39. Strohmaier WL, Schmidt J, Lahme S, Bichler KH: Arterial blood pressure following different types of urinary stone therapy. Presented at the 8th European Symposium on Urolithiasis, Parma, Italy, 1999. *Eur Urol* 38:753-757, 2000
40. Krambeck AE, Gettman MT, Rohlinger AL *et al.*: Diabetes mellitus and hypertension associated with shock wave lithotripsy of renal and proximal ureteral stones at 19 years of followup. *J Urol* 175:1742-1747, 2006
41. Ritz E, Fliser D: Hypertension and the kidney--an overview. *Am J Kidney Dis* 21:3-9, 1993

42. Tiselius HG: Epidemiology and medical management of stone disease. *BJU Int* 91:758-767, 2003
43. Scheinman SJ: Nephrolithiasis. *Semin Nephrol* 19:381-388, 1999
44. Smith LH: The pathophysiology and medical treatment of urolithiasis. *Semin Nephrol* 10:31-52, 1990
45. Jaeger P: Genetic versus environmental factors in renal stone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5:342-346, 1996
46. Tiselius H-G: Aetiological factors in stone formation, chap. 8.1, in *Oxford Textbook of Clinical Nephrology* (vol 2), 3th ed., edited by Davison AM, Cameron JW, Grünfeld J-P *et al.*, New York, Oxford University Press, 2005, pp 1199-1223
47. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH *et al.*: Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 53:194-199, 1998
48. Hess B, Jordi S, Zipperle L *et al.*: Citrate determines calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology-studies in the presence of Tamm-Horsfall protein of a healthy subject and a severely recurrent calcium stone former. *Nephrol Dial Transplant* 15:366-374, 2000
49. Glauser A, Hochreiter W, Jaeger P, Hess B: Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* 15:1580-1587, 2000
50. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ: Twenty-four-hour urine chemistries and the risk of kidney stones among women and men. *Kidney Int* 59:2290-2298, 2001
51. Daudon M, Dore JC, Jungers P, Lacour B: Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. *Urol Res* 32:241-247, 2004
52. Tiselius H-G: Solution Chemistry of Supersaturation, in *Kidney stones: Medical and Surgical Management*, edited by Coe FL, Favus MJ, Pak CYC *et al.*, Philadelphia, Lippincott - Raven, 1996, pp 33-64
53. Gault MH, Chafe L: Relationship of frequency, age, sex, stone weight and composition in 15,624 stones: comparison of results for 1980 to 1983 and 1995 to 1998. *J Urol* 164:302-307, 2000
54. Pak CY, Sakhaee K, Peterson RD *et al.*: Biochemical profile of idiopathic uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int* 60:757-761, 2001
55. Agarwal BN, Cabebe FG: Renal acidification in elderly subjects. *Nephron* 26:291-295, 1980
56. Strazzullo P, Cappuccio FP: Hypertension and kidney stones: hypotheses and implications. *Semin Nephrol* 15:519-525, 1995



57. Quereda C, Orte L, Sabater J *et al.*: Urinary calcium excretion in treated and untreated essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 7:1058-1065, 1996
58. McCarron DA, Morris CD: Epidemiological evidence associating dietary calcium and calcium metabolism with blood pressure. *Am J Nephrol* 6 Suppl 1:3-9, 1986
59. McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S: Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 3:1162-1167, 1981
60. Kamijo T, Gonzalez JM, Jost LJ *et al.*: Renal abnormality of calcium handling in spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int Suppl* 55:S166-S168, 1996
61. Malberti F, Surian M, Colussi G *et al.*: Evaluation of calcium and phosphate metabolism in patients affected by essential hypertension and calcium nephrolithiasis. *Am J Nephrol* 6 Suppl 1:131-133, 1986
62. Hess B, Hasler-Strub U, Ackermann D, Jaeger P: Metabolic evaluation of patients with recurrent idiopathic calcium nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 12:1362-1368, 1997
63. Leonetti F, Dussol B, Berthezene P *et al.*: Dietary and urinary risk factors for stones in idiopathic calcium stone formers compared with healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* 13:617-622, 1998
64. Coe FL: Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int* 13:418-426, 1978
65. Parks JH, Coward M, Coe FL: Correspondence between stone composition and urine supersaturation in nephrolithiasis. *Kidney Int* 51:894-900, 1997
66. Shekarriz B, Stoller ML: Uric acid nephrolithiasis: current concepts and controversies. *J Urol* 168:1307-1314, 2002
67. Angius A, Melis PM, Morelli L *et al.*: Archival, demographic and genetic studies define a Sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits. *Hum Genet* 109:198-209, 2001
68. Gianfrancesco F, Esposito T, Ombra MN *et al.*: Identification of a novel gene and a common variant associated with uric acid nephrolithiasis in a Sardinian genetic isolate. *Am J Hum Genet* 72:1479-1491, 2003
69. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A *et al.*: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417:447-452, 2002
70. Enomoto A, Endou H: Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol* 9:195-205, 2005

71. Sakhaee K, ms-Huet B, Moe OW, Pak CY: Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int* 62:971-979, 2002
72. Choi HK, Atkinson K, Karlson EW *et al.*: Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. *N Engl J Med* 350:1093-1103, 2004
73. Cameron JS, Simmonds HA: Uric acid and the kidney, in *Oxford Textbook of Clinical Nephrology* (vol 2), 3th ed., edited by Davison AM, Cameron JW, Grünfeld J-P *et al.*, New York, Oxford University Press, 2005, pp 1059-1073
74. Asplin JR: Uric acid stones. *Semin Nephrol* 16:412-424, 1996
75. Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D: Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 131:7-13, 1999
76. Nakanishi N, Tatara K, Nakamura K, Suzuki K: Risk factors for the incidence of hyperuricaemia: a 6-year longitudinal study of middle-aged Japanese men. *Int J Epidemiol* 28:888-893, 1999
77. Johnson RJ, Kivlighn SD, Kim YG *et al.*: Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *Am J Kidney Dis* 33:225-234, 1999
78. Kang DH, Nakagawa T, Feng L *et al.*: A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13:2888-2897, 2002
79. Mazzali M, Kanellis J, Han L *et al.*: Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F991-F997, 2002
80. Perlstein TS, Gumieniak O, Hopkins PN *et al.*: Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans. *Kidney Int* 66:1465-1470, 2004
81. Price KL, Sautin YY, Long DA *et al.*: Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 17:1791-1795, 2006
82. Sanders PW: Uric acid: an old dog with new tricks? *J Am Soc Nephrol* 17:1767-1768, 2006
83. Masuo K, Kawaguchi H, Mikami H *et al.*: Serum uric acid and plasma norepinephrine concentrations predict subsequent weight gain and blood pressure elevation. *Hypertension* 42:474-480, 2003
84. Fang J, Alderman MH: Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 283:2404-2410, 2000
85. Hoieggen A, Alderman MH, Kjeldsen SE *et al.*: The impact of serum uric acid on cardiovascular outcomes in the LIFE study. *Kidney Int* 65:1041-1049, 2004

86. Short RA, Johnson RJ, Tuttle KR: Uric acid, microalbuminuria and cardiovascular events in high-risk patients. *Am J Nephrol* 25:36-44, 2005
87. Johnson RJ, Segal MS, Tittle S *et al.*: Essential Hypertension, Progressive Renal Disease, and Uric Acid: A Pathogenetic Link? *J Am Soc Nephrol*, 2005
88. Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T *et al.*: Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 44:642-650, 2004
89. Tisler A, Pierratos A, Honey JD *et al.*: High urinary excretion of uric acid combined with high excretion of calcium links kidney stone disease to familial hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 17:253-259, 2002
90. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB *et al.*: Body size and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 9:1645-1652, 1998
91. Kahn BB, Flier JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481, 2000
92. Powell CR, Stoller ML, Schwartz BF *et al.*: Impact of body weight on urinary electrolytes in urinary stone formers. *Urology* 55:825-830, 2000
93. Maalouf NM, Sakhaee K, Parks JH *et al.*: Association of urinary pH with body weight in nephrolithiasis. *Kidney Int* 65:1422-1425, 2004
94. Krivosikova Z, Spustova V, Dzurik R: Participation of P-dependent and P-independent glutaminases in rat kidney ammoniogenesis and their modulation by metabolic acidosis, hippurate and insulin. *Physiol Res* 47:177-183, 1998
95. Gesek FA, Schoolwerth AC: Insulin increases Na(+)-H+ exchange activity in proximal tubules from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 260:F695-F703, 1991
96. Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV, Jr. *et al.*: The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int* 65:386-392, 2004
97. Bergman RN, Ader M: Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11:351-356, 2000
98. Vinay P, Lemieux G, Cartier P, Ahmad M: Effect of fatty acids on renal ammoniogenesis in in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 231:880-887, 1976
99. Meydan N, Barutca S, Caliskan S, Camsari T: Urinary stone disease in diabetes mellitus. *Scand J Urol Nephrol* 37:64-70, 2003
100. Daudon M, Lacour B, Jungers P: High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone formers. *Nephrol Dial Transplant* 20:468-469, 2005
101. Moran ME: Uric acid stone disease. *Front Biosci* 8:s1339-s1355, 2003

102. Hossain RZ, Ogawa Y, Hokama S *et al.*: Urolithiasis in Okinawa, Japan: a relatively high prevalence of uric acid stones. *Int J Urol* 10:411-415, 2003
103. Ferrannini E: Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38:42-51, 2006
104. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE: Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-880, 2006
105. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B *et al.*: Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension* 30:1144-1149, 1997
106. Kanauchi M, Yamano S, Kanauchi K, Saito Y: Homeostasis model assessment of insulin resistance, quantitative insulin sensitivity check index, and oral glucose insulin sensitivity index in nonobese, nondiabetic subjects with high-normal blood pressure. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3444-3446, 2003
107. Brands MW, Hall JE, Van Vliet BN *et al.*: Obesity and hypertension: roles of hyperinsulinemia, sympathetic nervous system and intrarenal mechanisms. *J Nutr* 125:1725S-1731S, 1995
108. ter Maaten JC, Bakker SJ, Serne EH *et al.*: Insulin's acute effects on glomerular filtration rate correlate with insulin sensitivity whereas insulin's acute effects on proximal tubular sodium reabsorption correlation with salt sensitivity in normal subjects. *Nephrol Dial Transplant* 14:2357-2363, 1999
109. Oh MS, Carrol HJ: External balance of electrolytes and acids and alkali, in *The Kidney -- Physiology and pathophysiology* (vol 1), 3 ed., edited by Seldin DW, Giebisch G, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 33-59
110. Kimura G, Brenner BM: Implications of the linear pressure-natriuresis relationship and importance of sodium sensitivity in hypertension. *J Hypertens* 15:1055-1061, 1997
111. Gerdtts E, Lund-Johansen P, Omvik P: Reproducibility of salt sensitivity testing using a dietary approach in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 13:375-384, 1999
112. Chioloro A, Maillard M, Nussberger J *et al.*: Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension* 36:631-637, 2000
113. Galletti F, Strazzullo P, Ferrara I *et al.*: NaCl sensitivity of essential hypertensive patients is related to insulin resistance. *J Hypertens* 15:1485-1491, 1997
114. Suzuki M, Kimura Y, Tsushima M, Harano Y: Association of insulin resistance with salt sensitivity and nocturnal fall of blood pressure. *Hypertension* 35:864-868, 2000

115. Granger JP, West D, Scott J: Abnormal pressure natriuresis in the dog model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 23:18-11, 1994
116. Strazzullo P, Barba G, Cappuccio FP *et al.*: Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: a link to hypertension. *J Hypertens* 19:2157-2164, 2001
117. ter Maaten JC, Voorburg A, Heine RJ *et al.*: Renal handling of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)* 92:51-58, 1997
118. Watanabe S, Kang DH, Feng L *et al.*: Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 40:355-360, 2002
119. Clausen JO, Borch-Johnsen K, Ibsen H, Pedersen O: Analysis of the relationship between fasting serum uric acid and the insulin sensitivity index in a population-based sample of 380 young healthy Caucasians. *Eur J Endocrinol* 138:63-69, 1998
120. Kahn HS, Valdez R: Metabolic risks identified by the combination of enlarged waist and elevated triacylglycerol concentration. *Am J Clin Nutr* 78:928-934, 2003
121. Carnethon MR, Fortmann SP, Palaniappan L *et al.*: Risk factors for progression to incident hyperinsulinemia: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987-1998. *Am J Epidemiol* 158:1058-1067, 2003
122. Carvalheira JB, Saad MJ: [Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:360-367, 2006
123. Hikita M, Ohno I, Mori Y *et al.*: Relationship between hyperuricemia and body fat distribution. *Intern Med* 46:1353-1358, 2007
124. Taylor EN, Curhan GC: Fructose consumption and the risk of kidney stones. *Kidney Int* 73:207-212, 2008
125. Koh ET, Reiser S, Fields M: Dietary fructose as compared to glucose and starch increases the calcium content of kidney of magnesium-deficient rats. *J Nutr* 119:1173-1178, 1989
126. Koh ET, Min KW: Fructose precipitates calcium phosphate in the kidneys of female rats fed magnesium-deficient diets. *Magnes Res* 4:171-176, 1991
127. Milne DB, Nielsen FH: The interaction between dietary fructose and magnesium adversely affects macromineral homeostasis in men. *J Am Coll Nutr* 19:31-37, 2000
128. Nguyen NU, Dumoulin G, Henriët MT, Regnard J: Increase in urinary calcium and oxalate after fructose infusion. *Horm Metab Res* 27:155-158, 1995

129. Kaul P, Sidhu H, Sharma SK, Nath R: Calculogenic potential of galactose and fructose in relation to urinary excretion of lithogenic substances in vitamin B6 deficient and control rats. *J Am Coll Nutr* 15:295-302, 1996
130. Asselman M, Verkoelen CF: Fructose intake as a risk factor for kidney stone disease. *Kidney Int* 73:139-140, 2008
131. Basciano H, Federico L, Adeli K: Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2:5, 2005
132. Miller A, Adeli K: Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 24:204-209, 2008
133. Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E *et al.*: Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 21:1018-1022, 2008
134. Dai S, McNeill JH: Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33:101-107, 1995
135. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S *et al.*: A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F625-F631, 2006
136. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ: Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature Clin Pract Nephrol* 1:80-86, 2005
137. Gao X, Qi L, Qiao N *et al.*: Intake of added sugar and sugar-sweetened drink and serum uric acid concentration in US men and women. *Hypertension* 50:306-312, 2007
138. Choi HK, Curhan G: Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. *BMJ* 336:309-312, 2008
139. Gersch MS, Mu W, Cirillo P *et al.*: Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1256-F1261, 2007
140. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A *et al.*: Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F423-F429, 2007
141. Glushakova O, Kosugi T, Roncal C *et al.*: Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 19:1712-1720, 2008
142. Singh AK, Amlal H, Haas PJ *et al.*: Fructose-induced hypertension: essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. *Kidney Int* 74:438-447, 2008

143. Vitart V, Rudan I, Hayward C *et al.*: SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 40:437-442, 2008
144. Jankowski J, Gunthner T: Does an apple a day put hypertension in play? *Kidney Int* 74:409-410, 2008
145. Mente A, Honey RJ, McLaughlin JM *et al.*: High urinary calcium excretion and genetic susceptibility to hypertension and kidney stone disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2567-2575, 2006
146. Tisler A, Pierratos A, Honey JD *et al.*: Hypertension aggregates in families of kidney stone patients with high urinary excretion of uric acid. *J Hypertens* 17:1853-1858, 1999
147. Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV: Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 24:2321-2332, 2009
148. Monico CG, Rossetti S, Schwanz HA *et al.*: Comprehensive mutation screening in 55 probands with type 1 primary hyperoxaluria shows feasibility of a gene-based diagnosis. *J Am Soc Nephrol* 18:1905-1914, 2007
149. Ekeruo WO, Tan YH, Young MD *et al.*: Metabolic risk factors and the impact of medical therapy on the management of nephrolithiasis in obese patients. *J Urol* 172:159-163, 2004
150. Westlund K: Urolithiasis and coronary heart disease: a note on association. *Am J Epidemiol* 97:167-172, 1973
151. Ljunghall S, Hedstrand H: Renal stones and coronary heart disease. *Acta Med Scand* 199:481-485, 1976
152. Domingos F, Serra A: Nephrolithiasis is associated with an increased prevalence of cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 26:864-868, 2011
153. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knuiman MW: Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 15:815-819, 1992
154. Taylor DR, Wing JR, Sonnekus MI *et al.*: Abnormal cation exchange in insulin-resistant patients with essential hypertension. *Cardiovasc J Afr* 19:67-71, 2008
155. Li C, Engstrom G, Hedblad B *et al.*: Risk factors for stroke in subjects with normal blood pressure: a prospective cohort study. *Stroke* 36:234-238, 2005
156. Sakhaee K: Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:304-309, 2008
157. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC: Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int* 68:1230-1235, 2005

158. Wyss JM, Carlson SH: The role of the nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 3:255-262, 2001
159. Esler M: The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens* 13:99S-105S, 2000
160. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G: Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension* 34:724-728, 1999
161. Grisk O, Rettig R: Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 61:238-246, 2004
162. Calhoun D.A., Oparil S.: Hypertension and sympathetic nervous system activity, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., edited by Robertson D., Biaggioni I, Burnstock G, Low P.A., San Diego, Elsevier, 2004, pp 241-244
163. Mark AL: The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl* 14:S159-S165, 1996
164. Montani JP, Antic V, Yang Z, Dulloo A: Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2:S28-S38, 2002
165. Young JB, Landsberg L: Diet-induced changes in sympathetic nervous system activity: possible implications for obesity and hypertension. *J Chronic Dis* 35:879-886, 1982
166. Kshatriya S, Liu K, Salah A *et al.*: Obesity hypertension: the regulatory role of leptin. *Int J Hypertens* 2011:270624, 2011
167. Morris DL, Rui L: Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1247-E1259, 2009
168. Haynes WG, Morgan DA, Djalali A *et al.*: Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 33:542-547, 1999
169. Shek EW, Brands MW, Hall JE: Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 31:409-414, 1998
170. Chung WK, Belfi K, Chua M *et al.*: Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol* 274:R985-R990, 1998
171. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML *et al.*: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295, 1996
172. Rahmouni K: Obesity, sympathetic overdrive, and hypertension: the leptin connection. *Hypertension* 55:844-845, 2010



173. Goodfriend TL, Egan BM: Nonesterified fatty acids in the pathogenesis of hypertension: theory and evidence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57:57-63, 1997
174. Egan BM, Schork NJ, Weder AB: Regional hemodynamic abnormalities in overweight men. Focus on alpha-adrenergic vascular responses. *Am J Hypertens* 2:428-434, 1989
175. Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM: Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity. *Hypertension* 25:774-778, 1995
176. Haastrup AT, Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM: Intralipid enhances alpha 1-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension* 32:693-698, 1998
177. Collins S, Surwit RS: The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Horm Res* 56:309-328, 2001
178. Collins S, Cao W, Daniel KW *et al.*: Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:982-990, 2001
179. Ferrari P, Weidmann P: Insulin, insulin sensitivity and hypertension. *J Hypertens* 8:491-500, 1990
180. Landsberg L: Insulin and the sympathetic nervous system in the pathophysiology of hypertension. *Blood Press Suppl* 1:25-29, 1996
181. Landsberg L: Role of the sympathetic adrenal system in the pathogenesis of the insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 892:84-90, 1999
182. Landsberg L: Insulin-mediated sympathetic stimulation: role in the pathogenesis of obesity-related hypertension (or, how insulin affects blood pressure, and why). *J Hypertens* 19:523-528, 2001
183. Hoeldtke R: Regulation of metabolism, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., San Diego, Elsevier, 2004, pp 122-123
184. Hausberg M, Hoffman RP, Somers VK *et al.*: Contrasting autonomic and hemodynamic effects of insulin in healthy elderly versus young subjects. *Hypertension* 29:700-705, 1997
185. Hausberg M, Mark AL, Hoffman RP *et al.*: Dissociation of sympathoexcitatory and vasodilator actions of modestly elevated plasma insulin levels. *J Hypertens* 13:1015-1021, 1995
186. Van De BP, Hausberg M, Hoffman RP *et al.*: Hyperinsulinemia produces cardiac vagal withdrawal and nonuniform sympathetic activation in normal subjects. *Am J Physiol* 276:R178-R183, 1999
187. Deibert DC, DeFronzo RA: Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 65:717-721, 1980

188. Rocchini AP, Mao HZ, Babu K *et al.*: Clonidine prevents insulin resistance and hypertension in obese dogs. *Hypertension* 33:548-553, 1999
189. Giugliano D, Acampora R, Marfella R *et al.*: Hemodynamic and metabolic effects of transdermal clonidine in patients with hypertension and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 11:184-189, 1998
190. Giugliano D, Acampora R, Marfella R *et al.*: Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 126:955-959, 1997
191. Kveiborg B, Christiansen B, Major-Petersen A, Torp-Pedersen C: Metabolic effects of beta-adrenoceptor antagonists with special emphasis on carvedilol. *Am J Cardiovasc Drugs* 6:209-217, 2006
192. Najem GR, Seebode JJ, Samady AJ *et al.*: Stressful life events and risk of symptomatic kidney stones. *Int J Epidemiol* 26:1017-1023, 1997
193. Diniz DH, Blay SL, Schor N: Anxiety and depression symptoms in recurrent painful renal lithiasis colic. *Braz J Med Biol Res* 40:949-955, 2007
194. Diniz DH, Schor N, Blay SL: Stressful life events and painful recurrent colic of renal lithiasis. *J Urol* 176:2483-2487, 2006
195. Ziegler MG: Psychological stress and the autonomic nervous system, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., San Diego, Elsevier, 2004, pp 189-190
196. Grassi G, Turri C, Vailati S *et al.*: Muscle and skin sympathetic nerve traffic during the "white-coat" effect. *Circulation* 100:222-225, 1999
197. Sumi T, Umeda Y: Adrenergic regulation of the plasma levels of purine metabolites in the rat. *Eur J Pharmacol* 46:243-247, 1977
198. Schmucki O, Asper R, Zortea C: [Stress and urolithiasis]. *Urol Int* 39:159-164, 1984
199. Crook TJ, Keoghane SR: Renal transplant lithiasis: rare but time-consuming. *BJU Int* 95:931-933, 2005
200. Challacombe B, Dasgupta P, Tiptaft R *et al.*: Multimodal management of urolithiasis in renal transplantation. *BJU Int* 96:385-389, 2005
201. Abbott KC, Schenkman N, Swanson SJ, Agodoa LY: Hospitalized nephrolithiasis after renal transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3:465-470, 2003
202. Beckly J, Bhandari S, Eris J, Horvath J: The man who gained a stone. *Nephrol Dial Transplant* 18:434-435, 2003

203. Klingler HC, Kramer G, Lodde M, Marberger M: Urolithiasis in allograft kidneys. *Urology* 59:344-348, 2002
204. Kim H, Cheigh JS, Ham HW: Urinary stones following renal transplantation. *Korean J Intern Med* 16:118-122, 2001
205. Jackson E.K.: Autonomic control of the kidney, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., edited by Robertson D., Biaggioni I, Burnstock G, Low P.A., San Diego, Elsevier, 2004, pp 157-161
206. DiBona GF: Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R633-R641, 2005
207. DiBona GF, Rios LL: Renal nerves in compensatory renal response to contralateral renal denervation. *Am J Physiol* 238:F26-F30, 1980
208. Bello-Reuss E, Colindres RE, Pastoriza-Munoz E *et al.*: Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. *J Clin Invest* 56:208-217, 1975
209. DiBona GF, Kopp UC: Neural control of renal function, in *The Kidney -- Physiology and pathophysiology* (vol 1), 3 ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 981-1005
210. Bencsath P, Szenasi G, Takacs L: Water and electrolyte transport in Henle's loop and distal tubule after renal sympathectomy in the rat. *Am J Physiol* 249:F308-F314, 1985
211. Johns EJ: Role of angiotensin II and the sympathetic nervous system in the control of renal function. *J Hypertens* 7:695-701, 1989
212. Bencsath P, Asztalos B, Szalay L, Takacs L: Renal handling of sodium after chronic renal sympathectomy in the anesthetized rat. *Am J Physiol* 236:F513-F518, 1979
213. Kassab S, Kato T, Wilkins FC *et al.*: Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* 25:893-897, 1995
214. Levey AS, Coresh J, Balk E *et al.*: National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 139:137-147, 2003
215. Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41, 1976
216. World Health Organization: *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. Geneva, World Health Organization, 2000
217. Robertson D: Clinical assessment of autonomic failure, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., San Diego, Elsevier, 2004, pp 213-216

218. Felker GM, Cuculich PS, Gheorghiadu M: The Valsalva maneuver: a bedside "biomarker" for heart failure. *Am J Med* 119:117-122, 2006
219. Carter JR, Kupiers NT, Ray CA: Neurovascular responses to mental stress. *J Physiol* 564:321-327, 2005
220. Sloan RP, Korten JB, Myers MM: Components of heart rate reactivity during mental arithmetic with and without speaking. *Physiol Behav* 50:1039-1045, 1991
221. Ewing DJ, Clarke BF: Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 285:916-918, 1982
222. Mathias CJ, Bannister R: Investigation of autonomic disorders, in *Autonomic Failure -- A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system.*, 4 ed., edited by Mathias CJ, Bannister R, Oxford, Oxford University Press, 1999, pp 169-195
223. Taverner D, Nunan TA, Tonkin AL: Reproducibility of conventional and power spectral measurements of cardiovascular sympathetic activation in normal subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:804-806, 1996
224. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology: Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 17:354-381, 1996
225. Tanaka K, Hargens AR: Wavelet packet transform for R-R interval variability. *Med Eng Phys* 26:313-319, 2004
226. Belova NY, Mihaylov SV, Piryova BG: Wavelet transform: A better approach for the evaluation of instantaneous changes in heart rate variability. *Auton Neurosci* 131:107-122, 2007
227. Petretta M, Spinelli L, Marciano F *et al.*: Wavelet transform analysis of heart rate variability during dipyridamole-induced myocardial ischemia: relation to angiographic severity and echocardiographic dyssynergy. *Clin Cardiol* 22:201-206, 1999
228. Wiklund U, Akay M, Morrison S, Niklasson U: Wavelet decomposition of cardiovascular signals for baroreceptor function tests in pigs. *IEEE Trans Biomed Eng* 49:651-661, 2002
229. Ducla-Soares JL, Santos-Bento M, Laranjo S *et al.*: Wavelet analysis of autonomic outflow of normal subjects on head-up tilt, cold pressor test, Valsalva manoeuvre and deep breathing. *Exp Physiol*, 2007
230. Furlan R., Malliani A.: Assessment of the autonomic control of the cardiovascular system by frequency domain approach, in *Primer on the autonomic nervous system*, 2 ed., edited by Robertson D., Biaggioni I, Burnstock G, Low P.A., San Diego, Elsevier, 2004, pp 228-230

231. Novak V, Novak P, de CJ *et al.*: Influence of respiration on heart rate and blood pressure fluctuations. *J Appl Physiol* 74:617-626, 1993
232. Parati G, Di RM, Mancia G: How to measure baroreflex sensitivity: from the cardiovascular laboratory to daily life. *J Hypertens* 18:7-19, 2000
233. Di RM, Parati G, Castiglioni P *et al.*: Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R744-R751, 2001
234. Meimaridou E, Lobos E, Hothersall JS: Renal oxidative vulnerability due to changes in mitochondrial-glutathione and energy homeostasis in a rat model of calcium oxalate urolithiasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F731-F740, 2006
235. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T: Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60:481-487, 2011
236. Matsuda Y, Ohsaka K, Yamamoto H *et al.*: Comparison of newly developed inhalation anesthesia system and intraperitoneal anesthesia on the hemodynamic state in mice. *Biol Pharm Bull* 30:1716-1720, 2007
237. Iguchi M, Takamura C, Umekawa T *et al.*: Inhibitory effects of female sex hormones on urinary stone formation in rats. *Kidney Int* 56:479-485, 1999
238. Hussain MB, Marshall I: Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 122:849-858, 1997
239. Levine MA, Leenen FH: Role of vagal activity in the cardiovascular responses to phenylephrine in man. *Br J Clin Pharmacol* 33:333-336, 1992
240. Luippold G, Beilharz M, Muhlbauer B: Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 19:342-347, 2004
241. Towa S, Kuwahara M, Tsubone H: Characteristics of autonomic nervous function in Zucker-fatty rats: investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Exp Anim* 53:137-144, 2004
242. Carlson SH, Shelton J, White CR, Wyss JM: Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension* 35:403-408, 2000
243. Imholz BP, Dambrink JH, Karemaker JM, Wieling W: Orthostatic circulatory control in the elderly evaluated by non-invasive continuous blood pressure measurement. *Clin Sci (Lond)* 79:73-79, 1990
244. Wieling W, Van Lieshout JJ, Ten Harkel AD: Dynamics of circulatory adjustments to head-up tilt and tilt-back in healthy and sympathetically denervated subjects. *Clin Sci (Lond)* 94:347-352, 1998

245. Chrysant SG, Luu TM, Danisa K: Hemodynamic correlates of autonomic reflexes in patients with labile and fixed hypertension. *Clin Exp Hypertens* 3:1109-1119, 1981
246. Wicker P, Dallochio M: [From labile or borderline arterial hypertension to mild hypertension. Current data and practical management]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 34:253-258, 1985
247. Julius S, Jamerson K, Mejia A *et al.*: The association of borderline hypertension with target organ changes and higher coronary risk. Tecumseh Blood Pressure study. *JAMA* 264:354-358, 1990
248. Payen DM, Safar ME, Levenson JA *et al.*: Prospective study of predictive factors determining borderline hypertensive individuals who develop sustained hypertension: prognostic value of increased diastolic orthostatic blood pressure tilt-test response and subsequent weight gain. *Am Heart J* 103:379-383, 1982
249. Dustan HP: Essential hypertension: neural considerations. *Med Clin North Am* 71:897-905, 1987
250. Julius S, Schork N, Schork A: Sympathetic hyperactivity in early stages of hypertension: the Ann Arbor data set. *J Cardiovasc Pharmacol* 12 Suppl 3:S121-S129, 1988
251. Davrath LR, Goren Y, Pinhas I *et al.*: Early autonomic malfunction in normotensive individuals with a genetic predisposition to essential hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1697-H1704, 2003
252. Piccirillo G, Munizzi MR, Fimognari FL, Marigliano V: Heart rate variability in hypertensive subjects. *Int J Cardiol* 53:291-298, 1996
253. Piccirillo G, Germano G, Vitarelli A *et al.*: Autonomic cardiovascular control and diastolic dysfunction in hypertensive subjects. *Int J Cardiol* 110:160-166, 2006
254. Radaelli A, Bernardi L, Valle F *et al.*: Cardiovascular autonomic modulation in essential hypertension. Effect of tilting. *Hypertension* 24:556-563, 1994
255. Molfino A, Fiorentini A, Tubani L *et al.*: Body mass index is related to autonomic nervous system activity as measured by heart rate variability. *Eur J Clin Nutr* 63:1263-1265, 2009
256. Brunetto AF, Roseguini BT, Silva BM *et al.*: [Cardiac autonomic responses to head-up tilt in obese adolescents]. *Rev Assoc Med Bras* 51:256-260, 2005
257. Monda M, Messina G, Vicidomini C *et al.*: Activity of autonomic nervous system is related to body weight in pre-menopausal, but not in post-menopausal women. *Nutr Neurosci* 9:141-145, 2006
258. Piestrzeniewicz K, Luczak K, Lelonek M *et al.*: Obesity and heart rate variability in men with myocardial infarction. *Cardiol J* 15:43-49, 2008

259. Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK: Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 20:606-611, 1992
260. Van Egeren LF, Sparrow AW: Laboratory stress testing to assess real-life cardiovascular reactivity. *Psychosom Med* 51:1-9, 1989
261. Fixler DE, Laird WP, Browne R *et al.*: Response of hypertensive adolescents to dynamic and isometric exercise stress. *Pediatrics* 64:579-583, 1979
262. Stewart JM, Montgomery LD, Glover JL, Medow MS: Changes in regional blood volume and blood flow during static handgrip. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H215-H223, 2007
263. Murakami E, Matsuzaki K, Sumimoto T *et al.*: Clinical significance of pressor responses to laboratory stressor testing in hypertension. *Hypertens Res* 19:133-137, 1996
264. Rose KM, North K, Arnett DK *et al.*: Blood pressure and pulse responses to three stressors: associations with sociodemographic characteristics and cardiovascular risk factors. *J Hum Hypertens* 18:333-341, 2004
265. Kurita A, Takase B, Hikita H *et al.*: Frequency domain heart rate variability and plasma norepinephrine level in the coronary sinus during handgrip exercise. *Clin Cardiol* 22:207-212, 1999
266. Ichinose M, Saito M, Kondo N, Nishiyasu T: Time-dependent modulation of arterial baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity during isometric exercise in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1419-H1426, 2006
267. Victor RG, Secher NH, Lyson T, Mitchell JH: Central command increases muscle sympathetic nerve activity during intense intermittent isometric exercise in humans. *Circ Res* 76:127-131, 1995
268. Victor RG, Pryor SL, Secher NH, Mitchell JH: Effects of partial neuromuscular blockade on sympathetic nerve responses to static exercise in humans. *Circ Res* 65:468-476, 1989
269. Rowell LB, O'Leary DS: Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. *J Appl Physiol* 69:407-418, 1990
270. Herr MD, Imadojemu V, Kunselman AR, Sinoway LI: Characteristics of the muscle mechanoreflex during quadriceps contractions in humans. *J Appl Physiol* 86:767-772, 1999
271. Momen A, Leuenberger UA, Ray CA *et al.*: Renal vascular responses to static handgrip: role of muscle mechanoreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1247-H1253, 2003

272. Wallin BG, Victor RG, Mark AL: Sympathetic outflow to resting muscles during static handgrip and postcontraction muscle ischemia. *Am J Physiol* 256:H105-H110, 1989
273. Sausen MT, Delaney EP, Stillabower ME, Farquhar WB: Enhanced metaboreflex sensitivity in hypertensive humans. *Eur J Appl Physiol* 105:351-356, 2009
274. Lucini D, Covacci G, Milani R *et al.*: A controlled study of the effects of mental relaxation on autonomic excitatory responses in healthy subjects. *Psychosom Med* 59:541-552, 1997
275. Ruediger H, Seibt R, Scheuch K *et al.*: Sympathetic and parasympathetic activation in heart rate variability in male hypertensive patients under mental stress. *J Hum Hypertens* 18:307-315, 2004
276. Langewitz W, Ruddle H, Schachinger H: Reduced parasympathetic cardiac control in patients with hypertension at rest and under mental stress. *Am Heart J* 127:122-128, 1994
277. Falkner B: Blood pressure response to mental stress. *Am J Hypertens* 4:621S-623S, 1991
278. Borghi C, Costa FV, Boschi S *et al.*: Factors associated with the development of stable hypertension in young borderline hypertensives. *J Hypertens* 14:509-517, 1996
279. Flaa A, Eide IK, Kjeldsen SE, Rostrup M: Sympathoadrenal stress reactivity is a predictor of future blood pressure: an 18-year follow-up study. *Hypertension* 52:336-341, 2008
280. Lenders J, Houben H, van VR *et al.*: Reproducibility of haemodynamic and plasma catecholamine responses to isometric exercise and mental arithmetic in normo- and hyper-tensive subjects. *Clin Sci (Lond)* 75:615-619, 1988
281. Valensi P, Huard JP, Giroux C, Attali JR: Factors involved in cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 11:180-187, 1997
282. Valensi P, Paries J, Attali JR: Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications--the French multicenter study. *Metabolism* 52:815-820, 2003
283. Xavier R, Laranjo S, Ducla-Soares E *et al.*: The Valsalva maneuver revisited by wavelets. *Rev Port Cardiol* 27:435-441, 2008
284. Looga R: The Valsalva manoeuvre--cardiovascular effects and performance technique: a critical review. *Respir Physiol Neurobiol* 147:39-49, 2005
285. Shields RW, Jr.: Heart rate variability with deep breathing as a clinical test of cardiovagal function. *Cleve Clin J Med* 76 Suppl 2:S37-S40, 2009



286. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC: Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA* 293:455-462, 2005
287. Julius S, Nesbitt S: Sympathetic overactivity in hypertension. A moving target. *Am J Hypertens* 9:113S-120S, 1996
288. Laederach-Hofmann K, Mussgay L, Ruddel H: Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J Endocrinol* 164:59-66, 2000
289. Tonhajzerova I, Javorka M, Trunkvalterova Z *et al.*: Cardio-respiratory interaction and autonomic dysfunction in obesity. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 6:709-718, 2008
290. Davy KP, Orr JS: Sympathetic nervous system behavior in human obesity. *Neurosci Biobehav Rev* 33:116-124, 2009
291. Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553, 1998
292. West B, Luke A, Durazo-Arvizu RA *et al.*: Metabolic syndrome and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) 1988-1994. *Am J Kidney Dis* 51:741-747, 2008
293. Otsuki M, Kitamura T, Goya K *et al.*: Association of urine acidification with visceral obesity and the metabolic syndrome. *Endocr J* 58:363-367, 2011
294. Losito A, Nunzi EG, Covarelli C *et al.*: Increased acid excretion in kidney stone formers with essential hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 24:137-141, 2009
295. Liao D, Sloan RP, Cascio WE *et al.*: Multiple metabolic syndrome is associated with lower heart rate variability. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care* 21:2116-2122, 1998
296. Tentolouris N, Argyrakopoulou G, Katsilambros N: Perturbed Autonomic Nervous System Function in Metabolic Syndrome. *Neuromolecular Med*, 2008
297. Emdin M, Gastaldelli A, Muscelli E *et al.*: Hyperinsulinemia and autonomic nervous system dysfunction in obesity: effects of weight loss. *Circulation* 103:513-519, 2001
298. Bergholm R, Westerbacka J, Vehkavaara S *et al.*: Insulin sensitivity regulates autonomic control of heart rate variation independent of body weight in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1403-1409, 2001
299. Sharma AM, Engeli S, Pischon T: New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. *Curr Hypertens Rep* 3:152-156, 2001

300. Bogaert YE, Linas S: The role of obesity in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 5:101-111, 2009
301. Levy FL, ms-Huet B, Pak CY: Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* 98:50-59, 1995
302. Pak CY: Etiology and treatment of urolithiasis. *Am J Kidney Dis* 18:624-637, 1991
303. Hess B, Hasler-Strub U, Ackermann D, Jaeger P: Metabolic evaluation of patients with recurrent idiopathic calcium nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 12:1362-1368, 1997
304. Sorensen CM, Chandhoke PS: Hyperuricosuric calcium nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 31:915-925, 2002
305. Marangella M: Uric acid elimination in the urine. Pathophysiological implications. *Contrib Nephrol* 147:132-148, 2005
306. Pak CY, Poindexter JR, Peterson RD *et al.*: Biochemical distinction between hyperuricosuric calcium urolithiasis and gouty diathesis. *Urology* 60:789-794, 2002
307. James MA, Robinson TG, Potter JF: The effect of systemic blood pressure on cardio-vascular reflexes in elderly subjects. *Clin Physiol* 21:67-76, 2001
308. Itoh H, Takeda K, Nakamura K *et al.*: Young borderline hypertensives are hyperreactive to mental arithmetic stress: spectral analysis of R-R intervals. *J Auton Nerv Syst* 54:155-162, 1995
309. Guasti L, Simoni C, Mainardi L *et al.*: Lack of relationship between cardiovascular reactivity to mental stress and autonomic modulation of the sinoatrial node in normotensive and hypertensive male subjects. *Int J Psychophysiol* 71:258-263, 2009
310. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ: The first kidney stone. *Ann Intern Med* 111:1006-1009, 1989
311. Taylor CT, Keely SJ: The autonomic nervous system and inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci* 133:104-114, 2007
312. Serra A, Domingos F, Salgueiro C, Prata MM: [Metabolic evaluation of recurrent idiopathic calcium stone disease in Portugal]. *Acta Med Port* 17:27-34, 2004
313. Boer CA, Mocelin AJ, Matsuo T: [Ewing's tests validation for autonomic dysfunction assessment]. *Arq Neuropsiquiatr* 56:250-254, 1998
314. Grassi G: Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res* 29:839-847, 2006

315. Kaufmann H: Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, pure autonomic failure and multiple system atrophy. *Clin Auton Res* 6:125-126, 1996
316. Fessel J, Robertson D: Orthostatic hypertension: when pressor reflexes overcompensate. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:424-431, 2006
317. Kario K, Eguchi K, Hoshida S *et al.*: U-curve relationship between orthostatic blood pressure change and silent cerebrovascular disease in elderly hypertensives: orthostatic hypertension as a new cardiovascular risk factor. *J Am Coll Cardiol* 40:133-141, 2002
318. Streeten DH, Auchincloss JH, Jr., Anderson GH, Jr. *et al.*: Orthostatic hypertension. Pathogenetic studies. *Hypertension* 7:196-203, 1985
319. Yoshinari M, Wakisaka M, Nakamura U *et al.*: Orthostatic hypertension in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24:1783-1786, 2001
320. Lo MT, Novak V, Peng CK *et al.*: Nonlinear phase interaction between nonstationary signals: a comparison study of methods based on Hilbert-Huang and Fourier transforms. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 79:061924, 2009
321. Huang W, Shen Z, Huang NE, Fung YC: Engineering analysis of biological variables: an example of blood pressure over 1 day. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4816-4821, 1998
322. Hu K, Peng CK, Huang NE *et al.*: Altered Phase Interactions between Spontaneous Blood Pressure and Flow Fluctuations in Type 2 Diabetes Mellitus: Nonlinear Assessment of Cerebral Autoregulation. *Physica A* 387:2279-2292, 2008
323. Hu K, Peng CK, Czosnyka M *et al.*: Nonlinear assessment of cerebral autoregulation from spontaneous blood pressure and cerebral blood flow fluctuations. *Cardiovasc Eng* 8:60-71, 2008
324. Novak V, Yang AC, Lepicovsky L *et al.*: Multimodal pressure-flow method to assess dynamics of cerebral autoregulation in stroke and hypertension. *Biomed Eng Online* 3:39, 2004
325. Raz I, Wexler I, Weiss O *et al.*: Role of insulin and the IGF system in renal hypertrophy in diabetic *Psammomys obesus* (sand rat). *Nephrol Dial Transplant* 18:1293-1298, 2003
326. Winzell MS, Ahren B: The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S215-S219, 2004
327. Zucker LM, Zucker TF: Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 52:275-278, 1961

328. ZUCKER TF, Zucker LM: Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr* 80:6-19, 1963
329. Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J: Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res* 12:706-714, 1971
330. Zucker LM, Antoniades HN: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90:1320-1330, 1972
331. Gades MD, Van GH, Kaysen GA *et al.*: Brief periods of hyperphagia cause renal injury in the obese Zucker rat. *Kidney Int* 56:1779-1787, 1999
332. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ *et al.*: Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 57:167-182, 2000
333. Cammalleri L, Malaguarnera M: Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *Int J Med Sci* 4:83-93, 2007
334. Gianfrancesco F, Esposito T, Casu G *et al.*: Emergence of Talanin protein associated with human uric acid nephrolithiasis in the Hominidae lineage. *Gene* 339:131-138, 2004
335. Maalouf NM, Cameron MA, Moe OW, Sakhaee K: Novel insights into the pathogenesis of uric acid nephrolithiasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:181-189, 2004
336. Mazzali M, Hughes J, Kim YG *et al.*: Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 38:1101-1106, 2001
337. Liu J, Cao Z, Zhang Z *et al.*: A comparative study on several models of experimental renal calcium oxalate stones formation in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27:83-87, 2007
338. Bushinsky DA, Grynpas MD, Nilsson EL *et al.*: Stone formation in genetic hypercalciuric rats. *Kidney Int* 48:1705-1713, 1995
339. Gambaro G, Valente ML, Zanetti E *et al.*: Mild tubular damage induces calcium oxalate crystalluria in a model of subtle hyperoxaluria: Evidence that a second hit is necessary for renal lithogenesis. *J Am Soc Nephrol* 17:2213-2219, 2006
340. Khan SR, Glenton PA, Byer KJ: Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney Int* 70:914-923, 2006
341. Buck A.C., Reis-Santos J.M.: Animal models of stone disease, in *Renal tract stone - Metabolic basis and clinical practise*, edited by Wickham J.E., Buck A.C., Edinburgh, Churchill Livingstone, 1990, pp 149-161

342. Klahr S, Morrissey J: Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F861-F875, 2002
343. Churg J, Bernstein J, Glassock RJ: *Renal disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases*. 2 ed. New York, Igaku-Shoin Medical Publishers, 1995
344. Klahr S: Obstructive nephropathy. *Intern Med* 39:355-361, 2000
345. Earm JH, Christensen BM, Frokiaer J *et al.*: Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J Am Soc Nephrol* 9:2181-2193, 1998
346. Weinman EJ, Eknoyan G, Suki WN: The influence of the extracellular fluid volume on the tubular reabsorption of uric acid. *J Clin Invest* 55:283-291, 1975
347. Iwaki K, Yonetani Y: Decreased renal excretion of uric acid following diuretic administration in rats. *Jpn J Pharmacol* 34:389-396, 1984
348. Bronner F: Vitamin D deficiency and rickets. *Am J Clin Nutr* 29:1307-1314, 1976
349. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 320:980-991, 1989
350. Silve C, Friedlander G: Renal regulation of phosphate excretion, in *The Kidney -- Physiology and pathophysiology* (vol 1), 3 ed., edited by Seldin DW, Giebisch G, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 1885-1904
351. Yasuma F, Hayano J: Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? *Chest* 125:683-690, 2004
352. Struyker-Boudier HA, Evenwel RT, Smits JF, Van EH: Baroreflex sensitivity during the development of spontaneous hypertension in rats. *Clin Sci (Lond)* 62:589-594, 1982
353. Coleman TG: Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. *Am J Physiol* 238:H515-H520, 1980
354. Henze M, Hart D, Samarel A *et al.*: Persistent alterations in heart rate variability, baroreflex sensitivity, and anxiety-like behaviors during development of heart failure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H29-H38, 2008
355. Howe PR, Rogers PF, Head GA: Limited baroreflex control of heart rate in young stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 7:69-75, 1989
356. Miller AW, Sims JJ, Canavan A *et al.*: Impaired vagal reflex activity in insulin-resistant rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 33:698-702, 1999

357. Watkins L, Maixner W: The effect of pentobarbital anesthesia on the autonomic nervous system control of heart rate during baroreceptor activation. *J Auton Nerv Syst* 36:107-114, 1991
358. Schlaich MP, Socratous F, Hennebry S *et al.*: Sympathetic activation in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 20:933-939, 2009
359. Oikawa K, Ishihara R, Maeda T *et al.*: Prognostic value of heart rate variability in patients with renal failure on hemodialysis. *Int J Cardiol* 131:370-377, 2009
360. Ranpuria R, Hall M, Chan CT, Unruh M: Heart rate variability (HRV) in kidney failure: measurement and consequences of reduced HRV. *Nephrol Dial Transplant* 23:444-449, 2008
361. Kuncova J, Svirglerova J, Kummer W *et al.*: Parasympathetic regulation of heart rate in rats after 5/6 nephrectomy is impaired despite functionally intact cardiac vagal innervation. *Nephrol Dial Transplant* 24:2362-2370, 2009
362. Harrison JL, Hildreth CM, Callahan SM *et al.*: Cardiovascular autonomic dysfunction in a novel rodent model of polycystic kidney disease. *Auton Neurosci* 152:60-66, 2010
363. Chien CT, Chien HF, Cheng YJ *et al.*: Renal afferent signaling diuretic response is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 57:203-214, 2000
364. Ma MC, Huang HS, Wu MS *et al.*: Impaired renal sensory responses after renal ischemia in the rat. *J Am Soc Nephrol* 13:1872-1883, 2002
365. Ma MC, Huang HS, Chen CF: Impaired renal sensory responses after unilateral ureteral obstruction in the rat. *J Am Soc Nephrol* 13:1008-1016, 2002
366. Gilmore JP, Tomomatsu E: Renal mechanoreceptors in nonhuman primates. *Am J Physiol* 248:R202-R207, 1985
367. Knuepfer MM, Schramm LP: Properties of renobulbar afferent fibers in rats. *Am J Physiol* 248:R113-R119, 1985
368. Nijima A: Afferent discharges from arterial mechanoreceptors in the kidney of the rabbit. *J Physiol* 219:477-485, 1971
369. Recordati GM, Moss NG, Waselkov L: Renal chemoreceptors in the rat. *Circ Res* 43:534-543, 1978
370. Recordati GM, Moss NG, Genovesi S, Rogenes PR: Renal receptors in the rat sensitive to chemical alterations of their environment. *Circ Res* 46:395-405, 1980
371. Stella A: The kidney as a sensor: functional evidence. *J Hypertens Suppl* 10:S113-S119, 1992

372. Moss NG: Renal function and renal afferent and efferent nerve activity. *Am J Physiol* 243:F425-F433, 1982
373. Ciriello J, de Oliveira CV: Renal afferents and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4:136-142, 2002
374. Theobald GW, Verney EB: The inhibition of water diuresis by afferent nerve stimuli after complete denervation of the kidney. *J Physiol* 83:341-351, 1935
375. Salman IM, Sattar MA, Abdullah NA *et al.*: Renal functional & haemodynamic changes following acute unilateral renal denervation in Sprague Dawley rats. *Indian J Med Res* 131:76-82, 2010
376. Cogan MG: Neurogenic regulation of proximal bicarbonate and chloride reabsorption. *Am J Physiol* 250:F22-F26, 1986
377. Wang T, Chan YL: Neural control of distal tubular bicarbonate and fluid transport. *Am J Physiol* 257:F72-F76, 1989
378. Muhlbauer B, Spohr F, Schmidt R, Osswald H: Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol* 273:F144-F149, 1997
379. Kline RL, Mercer PF: Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation in rats. *Am J Physiol* 238:R353-R358, 1980
380. Norman RA, Jr., Dzielak DJ: Role of renal nerves in onset and maintenance of spontaneous hypertension. *Am J Physiol* 243:H284-H288, 1982
381. Grisk O, Grone HJ, Rose HJ, Rettig R: Sympathetic reinnervation of rat kidney grafts. *Transplantation* 72:1153-1155, 2001
382. Evan AP, Weinman EJ, Wu XR *et al.*: Comparison of the pathology of interstitial plaque in human ICSF stone patients to NHERF-1 and THP-null mice. *Urol Res* 38:439-452, 2010
383. Krambeck AE, Handa SE, Evan AP, Lingeman JE: Profile of the brushite stone former. *J Urol* 184:1367-1371, 2010
384. Evan AP, Coe FL, Lingeman JE, Worcester E: Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res* 33:383-389, 2005